



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

Caracterización molecular de Bdp1,
subunidad del factor de transcripción
TFIIIB, en *Leishmania major*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

B I Ó L O G O

Presenta:

FIORDALISO CAROLINA ROMÁN CARRARO

Director de tesis: Dr. Santiago Martínez Calvillo



MÉXICO, D.F.

SEPTIEMBRE, 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

Esta tesis se realizó en un momento trascendental para mi y mis parentelas, por lo que se la dedico principalmente a la familia ROMÁN CARRARO que incluye a mi madre **Maricela Carolina Carraro Zanella**, a mi padre **Pedro Román Prieto**, a mi hermano **José Manuel Román Carraro** y a mi abuelita **Victoria Zanella**. Ustedes son las personas que más amo y las que más han influenciado en mi crecimiento y educación profesional y espiritual. Esta tesis representa el esfuerzo de todos y les agradezco su amor, comprensión y confianza, deseando que esto sea un orgullo y una motivación más para todos.

Para el **Dr. Santiago Martínez Calvillo** a quien considero una persona admirable y muy inteligente. Le agradezco haya compartido parte de sus conocimientos y haberme permitido realizar esta tesis en su laboratorio. Créame que usted es un ejemplo a seguir para muchos estudiantes como yo y sepa que mi estancia con usted nunca desaparecerá de mi mente. En su laboratorio no sólo aprendí de biología molecular, también a retomar valores como la tolerancia, la constancia y sobre todo la paciencia, ya que la ciencia es incierta y puede generar infinidad de posibilidades. Estoy muy agradecida con usted.

Para la profesora y amiga **M. en C. Laura Castañeda** por enseñarme de genética, por su tiempo, sensibilidad y consejos que han resultado muy importantes para mi. Usted apareció como un ángel mostrándome una perspectiva diferente a la científica donde DIOS existe y está en nuestros corazones dándonos amor para así poder amar a los demás.

Para el **Dr. Erasmo Negrete** ya que gracias a su clase de genética me surgió el interés por la biología molecular. Gracias por la confianza que puso en mí para dicha ciencia.

Para la **UNAM** por permitirme estudiar en una de sus facultades y darme la formación profesional y espiritual **PUMA**. Siempre me sentiré orgullosa de haber egresado de dicha universidad y deseo continuar con estudios de posgrado. Goya goya cachun cachun rrara rrara goya UNIVERDIDAD!

Para mis amigos que han resultado ser parte del viento que mueve el océano de Fio. A **Arturo Siliceo González** a quien conozco desde primer semestre, tu has demostrado ser una persona noble de alma pura con mucha inteligencia y sobre todo mucho amor hacia la vida. Espero que tu mente y alma te lleven a lo que siempre has deseado, que por cierto vas por excelente camino. Te quiero. A mis amigos de laboratorio **Norma Padilla**, gracias por compartir tu tiempo y consejos, **Rodrigo Moreno** gracias por tu sinceridad y visión, **Juan Carlos Vizuet** gracias por tu amistad y conocimiento, **Saúl Rojas** gracias por tu empatía y diversión, **Gabriela Romero** gracias por tu honestidad y humildad, **Daniel Vélez** gracias por tu actitud e invitación a tu boda y **Luis Enrique Florencio** gracias por todo tu tiempo y experiencia.

Hago una agradecimiento especial para el **M. en C. Felipe de Jesús Arguijo Pérez**, apareciste como un *enhancer* en la transcripción de mi vida (haaaay baaasta). Eres toda una personalidad, te admiro no sólo profesionalmente sino también personalmente. Tu carisma y humildad me cautivan y me motivan a ser mejor persona, espero que nuestros caminos sigan convergiendo y no dudo que tu hija **Fatima Arguijo** (a quien quiero y considero una personita muy hermosa e inteligente) se siente orgullosa de tener un papá como tu.

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

ABREVIATURAS

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 TRIPANOSOMÁTIDOS.....	1
1.1.1 Agentes patógenos y enfermedades.....	1
1.1.2 Biología celular.....	3
1.1.3 Clasificación.....	6
1.2 LEISHMANIA.....	8
1.2.1 Distribución.....	8
1.2.2 Ciclo bio-epidemiológico.....	10
1.2.3 Sistemática.....	12
1.2.4 Manifestaciones clínicas.....	13
1.3 TRANSCRIPCIÓN.....	17
1.3.1 Mecanismos y regulación de la transcripción.....	17
1.3.2 Promotores y factores de transcripción de las RNA Pol I y II.....	21
1.3.3 Transcripción de la RNA polimerasa III.....	22
1.3.4 Bdp1.....	24
1.3.5 Organización del genoma de <i>Leishmania</i>	26
1.3.6 Procesamiento del mRNA: <i>trans-splicing</i> y poliadenilación.....	26
1.3.7 Promotores en <i>Leishmania</i>	28
1.4 ANTECEDENTES.....	30
2. OBJETIVOS.....	31
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
3.1 Análisis <i>in silico</i>	32
3.2 Cultivo y conteo de promastigotes de <i>Leishmania</i>	32
3.3 Extracción de DNA genómico.....	33
3.4 Electroforesis de DNA en geles de agarosa.....	34
3.5 Purificación de DNA de geles de agarosa.....	34
3.6 Eliminación de sales de muestras de DNA.....	35
3.7 Amplificación de DNA por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	35
3.8 Ligaciones de DNA.....	36
3.9 Transformaciones de células competentes de <i>E. coli</i>	37
3.10 Purificación de plásmidos en escala pequeña (Miniprep).....	38

3.11 Marcaje de DNA con High Prime.....	39
3.12 Cromatografía con columnas de Sefadex G-50.	40
3.13 Extracción de RNA total.....	40
3.14 Ensayos de RT-PCR.....	41
3.14.1 Tratamiento de RNA con DNasa I.....	41
3.14.2 Síntesis de cDNA.	41
3.15 PCRs para la localización de los sitios de procesamiento.....	42
3.15.1 Identificación del sitio aceptor del minexón	42
3.15.2 Identificación del sitio aceptor de poliadenilación	42
3.16 Ensayo tipo Northern-Blot.	43
3.16.1 Electroforesis de RNA en un gel desnaturalizante.....	43
3.16.2 Transferencia por capilaridad de RNA a los filtros.....	43
3.16.3 Prehibridación e hibridación.....	44
3.16.4 Lavado de filtros radioactivos.	44
3.17 Ensayo con actinomicina D.	45
4. RESULTADOS.	46
4.1 Análisis de la secuencia de Bdp1 en <i>L. major</i> y otros eucariontes.	46
4.2 Análisis de secuencia de Bdp1 en tripanosomátidos.....	49
4.3 Clonación del gen de Bdp1 de <i>L. major</i>	54
4.4 Análisis del tamaño del mRNA de Bdp1.....	56
4.5 Ubicación de los sitios de procesamiento de Bdp1.....	57
4.6 Localización del sitio aceptor del miniexón del mRNA de Bdp1.....	59
4.7 Determinación de la región de poliadenilación de Bdp1.....	64
4.8 Determinación de la vida media del transcrito de Bdp1 de <i>L. major</i>	67
5. DISCUSIÓN.	72
6. CONCLUSIONES Y LOGROS.	80
7. REFERENCIAS	82

ABREVIATURAS

cDNA	DNA complementario
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ED	Elemento distal
EI	Elemento intermedio
EP	Elemento proximal
FE	Fase estacionaria
FML	Fase media logarítmica
kDNA	DNA mitocondrial (cinetoplasto)
miRNA	RNA micro
mRNA	RNA mensajero
nt	Nucleótido
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RNA Pol I	RNA polimerasa I
RNA Pol II	RNA polimerasa II
RNA Pol III	RNA polimerasa III
rRNA	RNA ribosomal
RT	Transcripción reversa

TF	Factor de transcripción
TBP	Proteína de unión a la caja TATA
tRNA	RNA de transferencia
tRNA-like	Molécula semejante al tRNA
SIT	Sitio de inicio de la transcripción
SL	<i>Spliced-leader</i>
SNAPc	Complejo Proteico activador de snRNA
snRNA	RNA pequeño nuclear

RESUMEN

Leishmaniasis es un término que define un conjunto de enfermedades producidas por parásitos del género *Leishmania*, pertenecientes a la familia Trypanosomatidae. *Leishmania* se caracteriza por requerir de 2 huéspedes, un artrópodo y un vertebrado que puede ser el humano. Además del interés médico, los tripanosomátidos son importantes por poseer características particulares en su expresión génica, como la presencia de genes policistrónicos que producen transcritos primarios largos que son procesados por *trans-splicing* y poliadenilación para producir los mRNAs maduros. Ningún factor de transcripción de la RNA Polimerasa III (RNA Pol III) ha sido caracterizado en *L. major*. Sin embargo, el análisis de su secuencia genómica reveló la presencia de tres genes que presentan similitud con las tres subunidades del factor TFIIB: TBP, Brf1 y Bdp1. Uno de los principales intereses en nuestro laboratorio es la caracterización molecular de Bdp1, proteína esencial para la transcripción de todos los genes de tRNAs, 5S rRNA, snRNAs y otros genes sintetizados por la RNA Pol III. Mediante análisis *in silico* se determinó que Bdp1 de *L. major* posee el dominio SANT, secuencia altamente conservada en Bdp1 de otros eucariontes. El resto de la secuencia de Bdp1 resultó ser muy poco conservada. Sin embargo, se observó que el locus de Bdp1 es altamente sinténico entre especies pertenecientes al género *Leishmania* y *Trypanosoma*. El gen completo de Bdp1 fue amplificado por PCR y clonado en el vector pGEM-T Easy. Ensayos tipo Northern-blot mostraron que el tamaño del mRNA de Bdp1 de *L. major* es de ~3.8 Kb. Por medio de ensayos RT-PCR se localizaron los sitios de procesamiento del mRNA de Bdp1, determinándose que el sitio aceptor del miniexón está a 1064 pb río arriba del codón de inicio del gen y la región de poliadenilación a 1091 pb río abajo del codón de término. Así, las regiones no traducidas del mRNA de Bdp1 de *L. major* son grandes, con un tamaño muy superior al promedio de los tripanosomátidos. Ensayos Northern-blot con RNA aislado de

células creciendo con el inhibidor de la transcripción actinomicina D revelaron que la vida media del transcrito de Bdp1 que fue mayor en fase estacionaria (~2 h) que en fase media logarítmica (>1 h). Un resultado similar se obtuvo con el mRNA de C160, la subunidad mayor de la RNA Pol III. Esto sugiere que la estabilidad de los mRNAs de las proteínas involucradas en la transcripción de la RNA Pol III se regula de manera muy parecida en *L. major*. Los datos también indican que los mRNAs de Bdp1 y C160 se estabilizan durante la fase estacionaria, fenómeno ya reportado en genes de mantenimiento de otros tripanosomátidos.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 TRIPANOSOMÁTIDOS.










1.1.1 Agentes patógenos y enfermedades.

Dentro del reino protista, los tripanosomátidos son un grupo monofilético de protozoarios parásitos, unicelulares y flagelados, que pertenecen a la familia Trypanosomatidae, Orden Kinetoplastida (Hamilton *et al.*, 2004). Éstos se encuentran ampliamente distribuidos en todo el mundo y su éxito evolutivo se debe a su ostentosa capacidad de parasitar vertebrados, invertebrados y plantas (Lopes *et al.*, 2010). Para el ser humano, los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania* son los principales agentes causantes de graves enfermedades zoonóticas, tales como la enfermedad del sueño (*Trypanosoma brucei*), la enfermedad de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) y la leishmaniasis (varias especies de *Leishmania*). Estos parásitos causan graves problemas de salud principalmente en países en vías de desarrollo de América, África y Asia (Tabla I) (Verlinde, 2001).

La enfermedad del sueño, también conocida como tripanosomiasis africana, se presenta en 36 países del África subsahariana y es causada por las sub-especies *T. brucei gambiense* (con un 95% de los casos) y *T. brucei rhodesiense* en el oeste y este de África, respectivamente (Balmer *et al.*, 2011). Es transmitida por la picadura de la mosca tsetse del género *Glossina*. Cuando los tripanosomas se introducen en el torrente sanguíneo del hospedero, proliferan hasta invadir el sistema nervioso central (Verlinde, 2001). *T. brucei brucei* causa en el ganado una enfermedad llamada nagana, que significa “estar deprimido” en la lengua zulu (Grimaldi y Tesh, 1993).

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana se extiende desde el sur de los Estados Unidos hasta el sur de Argentina y Chile y está asociada a condiciones sanitarias altamente desfavorables, donde proliferan chinches hematófagas de la familia Reduvidae, que actúan como vector del agente etiológico, *T. cruzi* (WHO, 2010).

Tabla I. Principales enfermedades ocasionadas por parásitos tripanosomátidos en el ser humano en todo el mundo.

	Enfermedad del sueño o tripanosomiasis Africana	Mal de Chagas o tripanosomiasis Americana	Leishmaniasis
Distribución	África 	América 	África, América, Asia y sur de Europa 
Vector	 Género <i>Glossina</i>	 Género <i>Triatoma</i>	 Géneros <i>Phlebotomus</i> y <i>Lutzomyia</i>
Parásito	 <i>Trypanosoma brucei gambiense</i> y <i>rhodesiense</i>	 <i>Trypanosoma cruzi</i>	 <i>Leishmania</i> sp.

1.1.2 Biología celular.

Los tripanosomátidos poseen estructuras y organelos únicos que los diferencian de otras células eucariontes. La presencia de una masa conspicua de DNA mitocondrial llamada cinetoplasto (kDNA) es una característica exclusiva del Orden Kinetoplastida (Figura 1). El cinetoplasto se sitúa adyacente al cuerpo basal del flagelo (Figura 2) y consiste en miles de copias de minicírculos (0.5-10 kb) y algunas copias de maxicírculos (20-40 kb) que se encuentran interconectados topológicamente formando una red (Figura 1) (Simpson *et al.*, 1987).

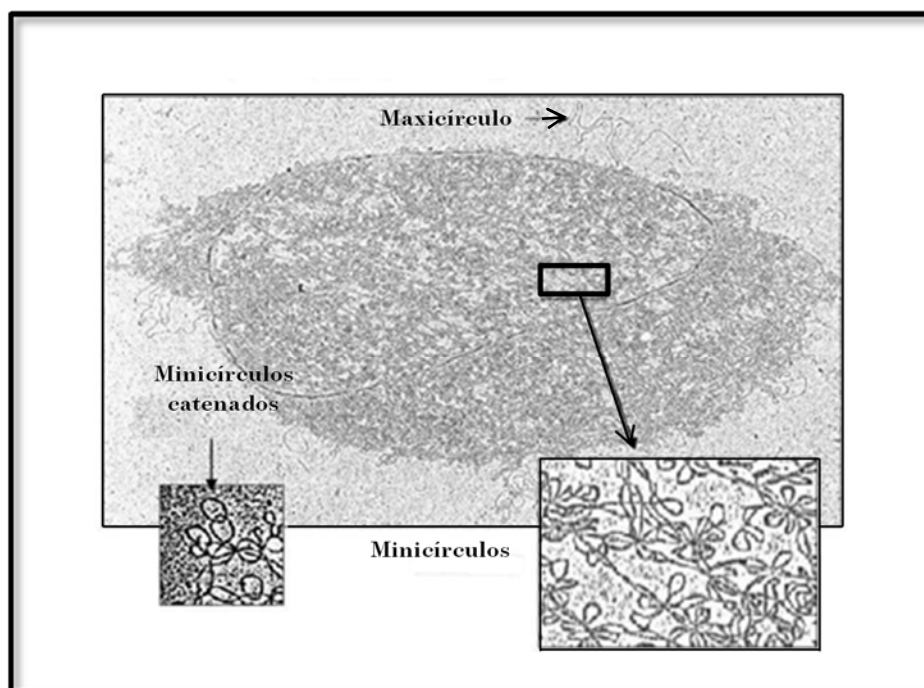


Figura 1. DNA mitocondrial (cinetoplasto) de *Leishmania tarentolae*. Los minicírculos y los maxicírculos son señalados con flechas (Challbergj y Englund, 1980).

Otra característica particular de este grupo de parásitos es la presencia de microtúbulos (polímeros lineares de alfa y beta tubulina) subpeliculares, los cuales se encuentran adosados a la membrana citoplásmica, conformando un citoesqueleto periférico de gran rigidez (Figura 2). Éstos se distribuyen a lo largo

de toda la membrana, excepto en el área por donde emerge el flagelo, que se conoce como saco flagelar, el cual resulta de gran importancia para la célula, ya que es el único sitio donde se realiza endocitosis o exocitosis de moléculas (Landfear e Ignatushchenko, 2001). El organelo que le otorga movilidad al organismo en algunos estadios celulares es el flagelo, que consiste en el clásico motor axonemal tubular, pero que incluye una estructura paracristalina llamada cuerda paraflagelar (PFR) que se encuentra posicionada a lo largo del axonema (Figura 2) (Fridberg *et al.*, 2006). Los glicosomas son estructuras esféricas conformadas por una matriz proteica rodeada por una bicapa fosfolípídica simple, y contienen diferentes enzimas que actúan en la vía glucolítica (Ardelli *et al.*, 2000). Éstos son exclusivos de los tripanosomátidos, aunque están evolutivamente relacionadas con los peroxisomas (presentes en células animales) y glicosomas (presentes en plantas) (Figura 2) (Michels *et al.*, 2006).

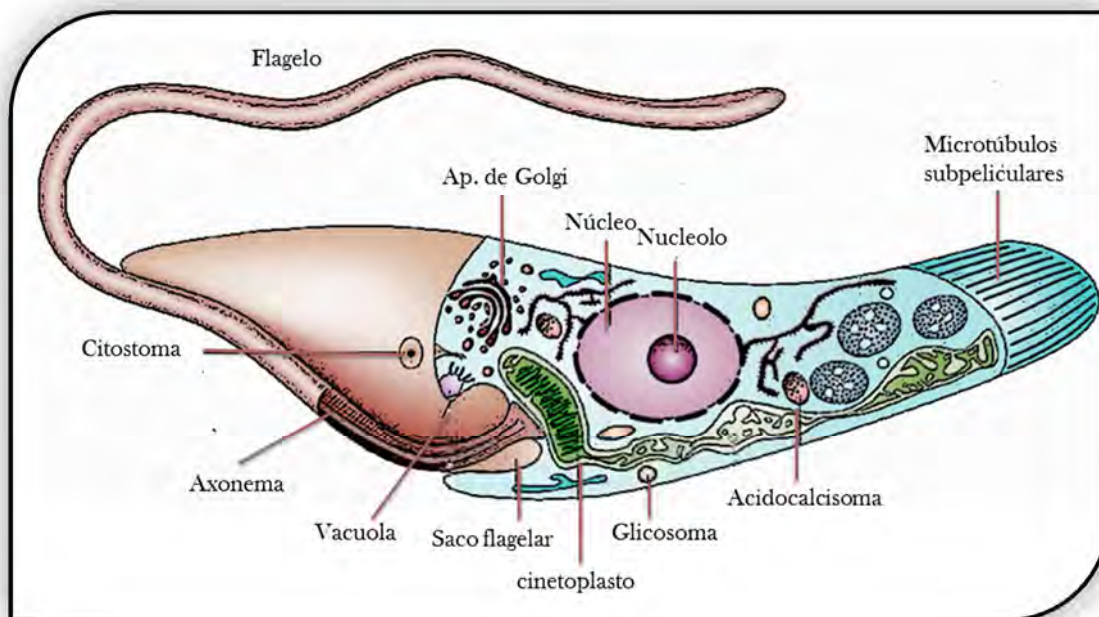


Figura 2. Representación esquemática de un tripanosomátido en su estadio de promastigote. Se exhiben y señalan todos sus componentes celulares (modificado de (Docampo *et al.*, 2005)

Los ciclos de vida que presentan los tripanosomátidos son bastante complejos, pues involucran varios estadios de desarrollo ya sea en el insecto vector o dentro del hospedero vertebrado (Debrabant y Nakhasi, 2003). Los estadios más comunes son promastigote, amastigote, epimastigote y tripomastigote, que se distinguen por su forma y dimensión celular, así como por la posición de donde emerge el flagelo (Figura 3) (Lopes *et al.*, 2010). En la forma tripomastigote, el cinetoplasto se encuentra localizado posterior al núcleo. El flagelo sale del extremo posterior y se dobla hacia adelante a lo largo del cuerpo del parásito, formando una membrana ondulante. El amastigote es esférico y no tiene flagelo libre y el cinetoplasto se ve como un cuerpo oscuro cerca del núcleo. El promastigote tiene el cinetoplasto en la parte anterior y un flagelo libre sin membrana ondulante. En el epimastigote, el cinetoplasto se encuentra en la parte media del organismo y el flagelo emerge de la parte media del parásito (Debrabant y Nakhasi, 2003).

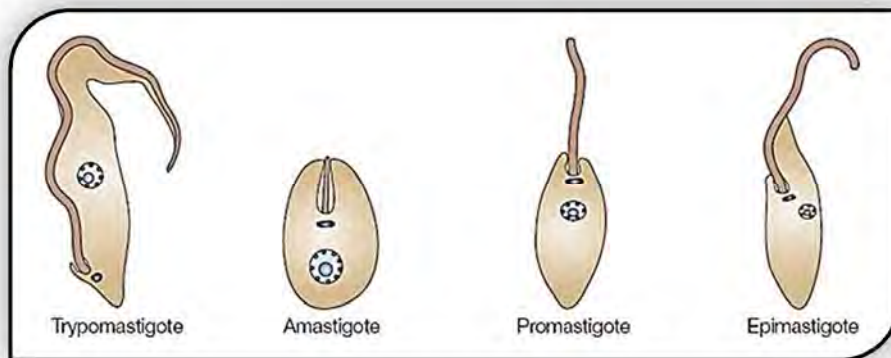


Figura 3. Estadios más comunes en tripanosomátidos: tripomastigote, amastigote, promastigote y epimastigote (Docampo *et al.*, 2005).

1.1.3 Clasificación.

En el esquema clásico, los tripanosomátidos se sitúan en el filo Sarcocystophora, clase Zoomastigophora, Orden Kinetoplastida (Figura 4) (Simpson *et al.*, 2006). Sin embargo, durante los últimos 25 años los estudios filogenéticos moleculares han forjado extensas modificaciones a los esquemas tradicionales de clasificación de organismos, particularmente en eucariontes (Adl *et al.*, 2007).

REINO	Protista (Hackel, 1886)
SUBREINO	Protozoa (Golfuss, 1817)
PHYLUM	Sarcocystophora (Honigberg & Balamuth, 1963)
SUBPHYLUM	Mastigophora (Delsing, 1866)
CLASE	Zoomastigophora (Calkins, 1909)
ORDEN	Kinetoplastida (Honigberg, 1963; Emend Vickeman, 1976)
SUBORDEN	Trypanosomatina (Kent, 1880)
FAMILIA	Trypanosomatidae (Dolfein, 1901)

Figura 4. Clasificación clásica de los tripanosomátidos.

En el 2005, Adl y colaboradores propusieron una nueva clasificación donde se incluyen organismos micro y macroscópicos considerados por Cavalier-Smith en 1998, además de estar basada en evidencias moleculares que delimitan seis nuevos súper grupos: Amebozoa, Chromalveolata, Archaeplastida, Excavata, Opisthokonta y Rhizaria (Tabla II). En esta clasificación, los tripanosomátidos se posicionan dentro del súper grupo Excavata, primer clado Euglenozoa, y segundo clado Kinetoplastea (junto con euglénidos y diplomonádidos) (Tabla II). Excavata se caracteriza por presentar algunos grupos de organismos considerados como

antecesores del linaje eucariótico que primitivamente carecían de mitocondria (Keeling *et al.*, 2005).

Tabla II. Nueva clasificación de eucariontes (Adl *et al.*, 2005).

SÚPER GRUPO	PRIMER CLADO	SEGUNDO CLADO
Amoebozoa	Tubulinea Flabellinea Stereomyxida Acanthameobidae Entamoebida Mastigamebidae Pelimyza Eumycetozoa	Leptomyxida, Testacealobosia, Tubullinida Cochliopodium, Dactilopodia, Thecamoebida, Vanellida Dictyostelia, Myxogastria, Protostelia
Opisthokonta	Fungi Mesomycetozoa Choanomonada Metazoa	Ascomyceta, Basidiomyceta, Chytridiomycetes, Glomeromycota, Microsporidia, Urediniomycetes, Ustilaginomycetes, Zygomycota. Aphelidea, Capsaspora, Corallochytrium, Ichtyosporea, Miinisteria, Nucleariida. Acanthoecidae, Monosgidae, Salpinogoeidae. Porifera, Trichoplax, Mesozoa, Animalia
Rhizaria	Cercozoa Haplosporidia Foraminifera Gromia Radolaria	Cercomonadida, Chlorarachniophyta, Nucleohelea, Phaeodarea, Phytomyxea, Silicofilosea Acantharia, Polycystinea, Sticholonche
Archaeplastida	Glaucophyta Rhodophyceae Chloroplastida	Charophyta, Cholodendrales, Chlorophyta, Mesostigma, Prasinophytae.
Chromalveolata	Cryptophyceae Haptophyta Stramenopiles Alveolata	Chryptomonadales, Gonimonadales Pavlovophyceae, Prymnesiophyceae Actinophryidae, Bacillariophyta, Bolidomonas, Bicosoecida, Chrysophyceae, Dictyochophyceae, Eustigmatales, Hypochytriales, Apicompleza, Ciliophora, Dinozoa
Excavata	Fornicata Malawimonas Parabasalia Preaxostyla Jakobida Heterolobosea Euglenozoa	Carpediemonas, Eopharyngia Cristamonadida, Spirotriconymphida, Trycomonadida, Triconymphda Oxymonadida, Trimastix Histonidae, Jakoba Acrasidae, Gruberellidae, Vahlkampfiidae Euglenida, Diplonema, Kinetoplastea

*Se sombrea la ubicación en esta nueva taxonomía de los cinetoplástidos.

1.2 LEISHMANIA.

Diferentes especies de protozoarios hemoflagelados del género *Leishmania* causan la leishmaniasis, término que define un conjunto de enfermedades de presentación clínica muy variada. El parásito es transmitido por la picadura de la hembra de una mosca (conocida como mosca de la arena) perteneciente a los géneros *Phlebotomus* en Europa, Asia y África, y *Lutzomyia* en América (Montalvo, 2010). Dependiendo de la especie de *Leishmania* infectante, los síntomas abarcan desde lesiones cutáneas limitadas hasta enfermedades viscerales fatales (McDowell *et al.*, 2011).

1.2.1 Distribución.

La leishmaniasis es una enfermedad de prevalencia alta en regiones tropicales y subtropicales del mundo (Sánchez-Saldaña *et al.*, 2004), tales como el este y sureste de Asia, Oriente Medio, norte y este de África, el sur de Europa (cuenca del Mediterráneo) y América (Figura 5) (Zetina, 2008). La enfermedad es endémica en 98 países o territorios, la mayoría de los cuales están en vías de desarrollo (González *et al.*, 2008). En América, la leishmaniasis se presenta en 24 países, extendiéndose desde el sur de Estados Unidos (Texas) hasta el norte de Argentina (McHugh *et al.*, 1996).

En nuestro país, la leishmaniasis es endémica en el sureste de México (Campeche, Yucatán, Quintana Roo, Chiapas y Tabasco) y su principal forma clínica es la cutánea, conocida ahí como “úlceras de los chicleros” (Jheman 2008; Córdova *et al.*, 1993). Los estados en los cuales se han detectado casos de leishmaniasis visceral son Chiapas, Puebla y Guerrero (la cuenca del Balsas), Oaxaca, Morelos y Tabasco (Trejo *et al.*, 1993).

La infección por *Leishmania* constituye un problema de gran importancia a nivel mundial desde el punto de vista de salud pública. La prevalencia de la leishmaniasis está en torno a los 12 millones de enfermos y la población en riesgo es de más de 350 millones de personas (WHO, 2010). De todos los casos, la cuarta parte corresponde a formas viscerales, presentes principalmente en la India, Nepal, Bangladesh, Brasil y Sudán. De las formas cutáneas, el 90% ocurre en Afganistán, Arabia Saudita, Irán, Siria, Brasil, Perú y México. Por otro lado, los casos de leishmaniasis mucocutánea se concentran en un 90% en Bolivia, Brasil y Perú (WHO, 2006). El número de casos de leishmaniasis ha ido en aumento en todo el mundo debido principalmente a los cambios del medio ambiente generados por el hombre, aumentando la exposición humana a las zonas de reproducción del vector (Vidyashankar y Noel, 2002).

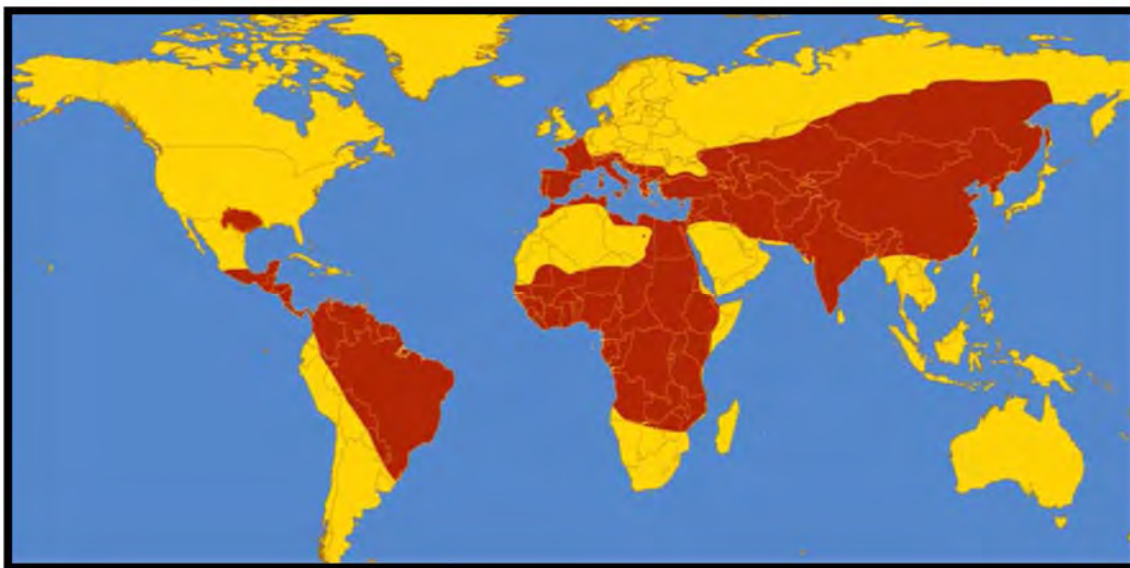


Figura 5. Distribución geográfica de la leishmaniasis. La enfermedad se presenta en 98 países o territorios de todo el mundo, abarcando principalmente zonas tropicales y subtropicales. Las áreas resaltadas de color rojo representan zonas donde existen personas infectadas con este parásito (Lopes *et al.*, 2010).

1.2.2 Ciclo bio-epidemiológico.

Leishmania es un parásito que presenta dos estadios morfológicos principales: el **amastigote** y el **promastigote** (Figura 6). A su vez, el promastigote presenta dos formas celulares, dependiendo de la ubicación dentro del vector, ya sea en el intestino medio (promastigote procíclico), o dentro de la probóscide del insecto (promastigote metacíclico), siendo este último la forma infectiva para el hospedero vertebrado (Dedet y Francine, 2005; Pearson y De Queiroz, 1995).

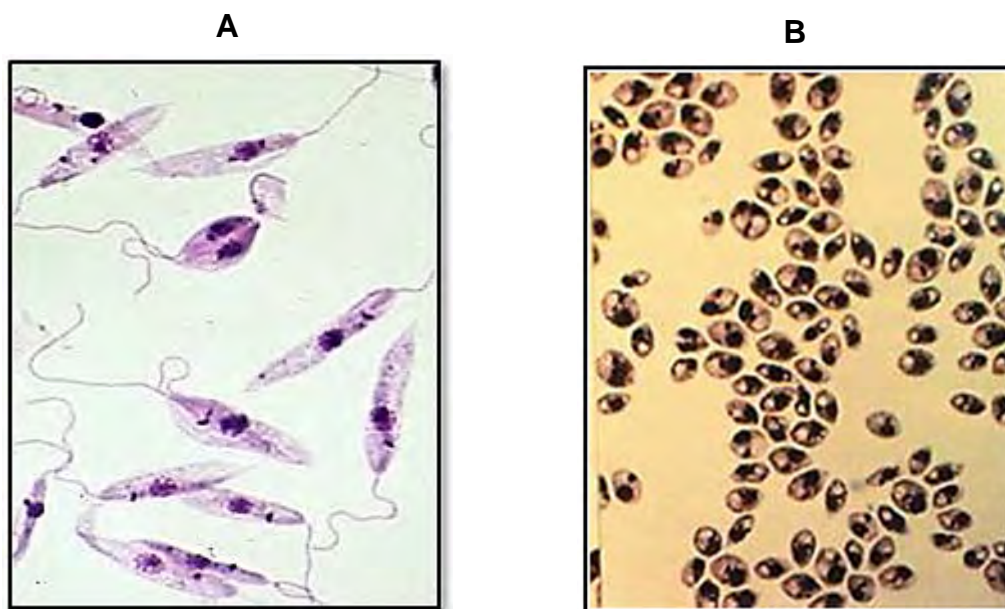


Figura 6. *Leishmania* presenta dos estadios morfológicos principales. A) promastigote y B) amastigote (Fariñas y Burgio, 2009).

El ciclo biológico comienza cuando una hembra de la mosca de la arena infectada pica a un hospedero vertebrado, inyectándole promastigotes metacíclicos. Éstos son rápidamente fagocitados por los macrófagos del hospedero y se diferencian a amastigotes en el interior de los fagolisosomas, donde se han adaptado para sobrevivir y multiplicarse en el medio ácido. La

multiplicación de los amastigotes lisa los macrófagos, quedando libres para infectar otras células. El mosquito, al ingerir sangre del hospedero infectado, toma amastigotes libres, o bien macrófagos infectados, que se diferencian a promastigotes procíclicos en el tracto digestivo del vector, en un proceso que lleva alrededor de tres días. Algunos de estos promastigotes se transforman en promastigotes metacíclicos móviles, que son los responsables de iniciar la infección cuando la mosca pica a otro vertebrado (Figura 7) (Zurita, 2001).

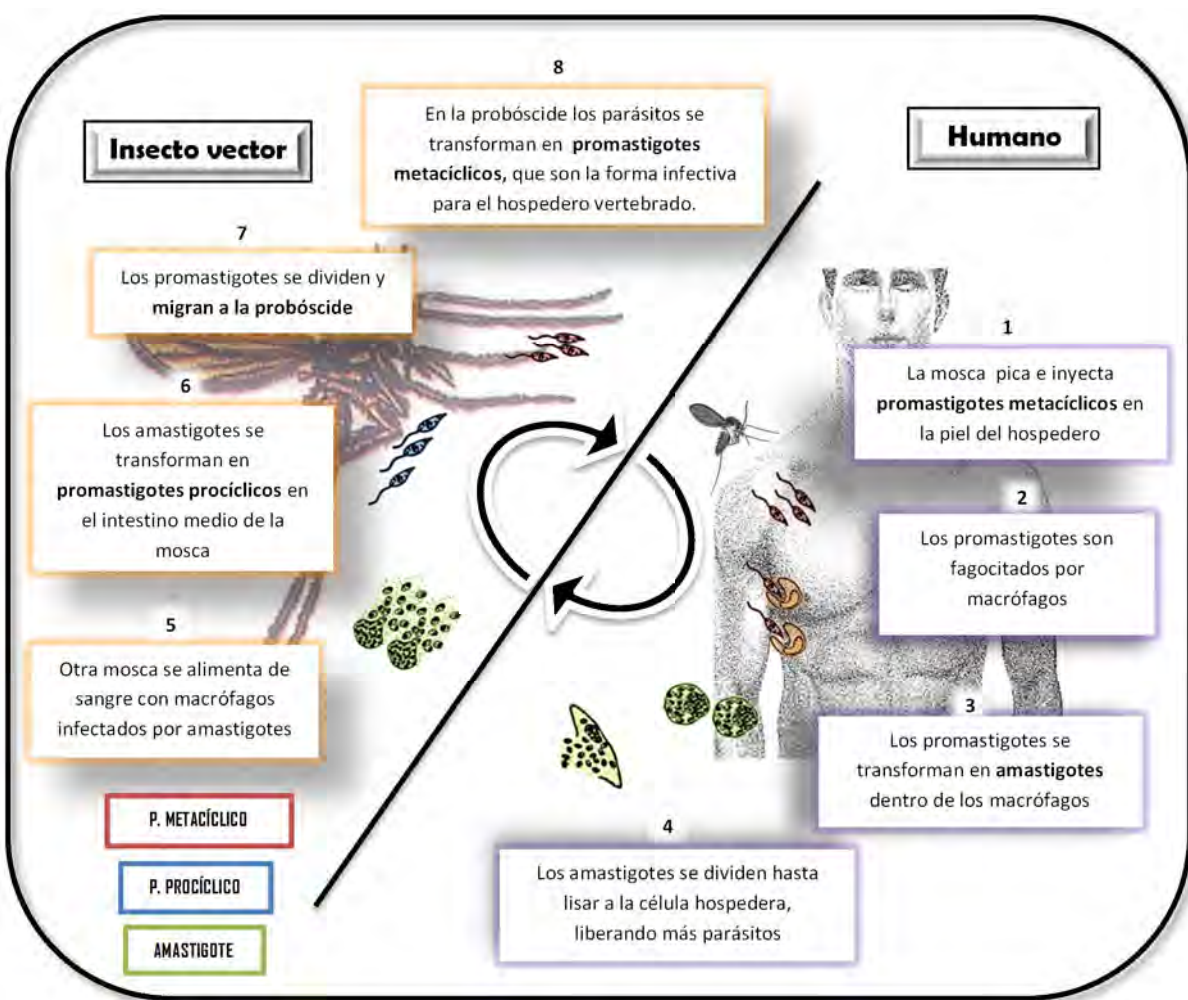


Figura 7. Ciclo de vida de *Leishmania*. Se presentan los tres estadios del parásito (amastigote en verde, promastigote procíclico en azul y promastigote metacíclico en rojo) en el insecto vector (izquierda) y en el hospedero humano (derecha).

1.2.3 Sistemática.

Más de 20 especies diferentes de *Leishmania* son capaces de infectar al humano y producir las distintas manifestaciones de la leishmaniasis (Herwaldt, 1999). Así, el género *Leishmania* se divide en tres subgéneros, dependiendo de las partes del intestino de la mosca de la arena que son colonizadas por el parásito: *Leishmania*, *Viannia* y *Sauroleishmania*. Las especies pertenecientes al subgénero *Leishmania* producen leishmaniasis cutánea y/o visceral tanto en el Viejo como en el Nuevo Mundo, mientras que las especies que se incluyen en el subgénero *Viannia* causan leishmaniasis cutánea y/o mucocutánea sólo en el Nuevo Mundo. Por su parte, las especies que pertenecen al subgénero *Sauroleishmania* no son patógenas para el humano, pues infectan sólo reptiles (Bates, 2007) (Tabla III).

Tabla III. Clasificación simplificada del género *Leishmania* derivada de análisis filogenéticos basados en isoenzimas (Rioux *et al.*, 1990).

Subgénero *Leishmania* (Ross, 1903).

Complejo <i>L. donovani</i>	<i>L. donovani</i> (Laveran y Mesnil, 1903) <i>L. archibaldi</i> (Castellani y Chalmers, 1919) <i>L. chagasi</i> <i>L. venezuelensis</i>
Complejo <i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i> (Nicolle, 1908) <i>L. chagasi</i> (Cunha y Chagas, 1937)
Complejo <i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i> (Wright, 1903)
Complejo <i>L. killicki</i>	<i>L. killicki</i> (Rioux, Lanotte y Pratlong, 1986)
Complejo <i>L. aethiopica</i>	<i>L. aethiopica</i> (Bray, Ashford & Bray, 1973)
Complejo <i>L. major</i>	<i>L. major</i> (Yakimoff y Schokhor, 1914)
Complejo <i>L. turanica</i>	<i>L. turanica</i> (Strelkova, Peters y Evans, 1990)
Complejo <i>L. gerbilli</i>	<i>L. gerbilli</i> (Wang, Qu y Guan, 1964)
Complejo <i>L. arabica</i>	<i>L. rabica</i> (Peters, Elbihari y Evans, 1986)
Complejo <i>L. mexicana</i>	<i>L. mexicana</i> (Biagi, 1953) <i>L. pifanoi</i> (Medina y Romero, 1959)
Complejo <i>L. amazonensis</i>	<i>L. amazonensis</i> (Lainson y Shaw, 1972) (syn. <i>L. garnhami</i> (Scorza <i>et al.</i> , 1979) <i>L. aristidesi</i> (Lainson y Shaw, 1979)
Complejo <i>L. enriettii</i>	<i>L. enriettii</i> (Muniz y Medina, 1948)
Complejo <i>L. hertigi</i>	<i>L. hertigi</i> (Herrer, 1971) <i>L. deanei</i> (Lainson y Shaw, 1977)

■ Subgénero *Viannia* (Lainson y Shaw, 1987).

Complejo <i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i> (Vianna, 1911) <i>L. peruviana</i> (Velez, 1913)
Complejo <i>L. guyanensis</i>	<i>L. guyanensis</i> (Floch, 1954) <i>L. panamensis</i> (Lainson & Shaw, 1972) <i>L. shawi</i> (Lainson <i>et al</i> , 1989)
Complejo <i>L. naiffi</i>	<i>L. naiffi</i> (Lainson y Shaw, 1989)
Complejo <i>L. lainsoni</i>	<i>L. lainsoni</i> (Silveira <i>et al</i> , 1987)
Complejo <i>L. equatoriensis</i>	<i>L. equatoriensis</i>
Complejo <i>L. colombiensis</i>	<i>L. colombiensis</i>

■ Subgénero *Sauroleishmania* (Ranke, 1973).

<i>L. adleri</i>
<i>L. gymnodactyli</i> (Khodukin y Sofiey, 1940)
<i>L. hoosraali</i>
<i>L. tarentolae</i> (Wengon, 1921)
<i>L. guliki</i> (Ovezmukhammedov y Saf'janova, 1987)

1.2.4 Manifestaciones clínicas.

La variedad en las formas clínicas de la leishmaniasis depende de varios factores, entre los que se encuentra la susceptibilidad genética del hospedero, el contexto inmunológico en que se produce la infección y la especie de *Leishmania* infectante. Esta variedad de presentaciones comprende formas cutáneas, mucocutáneas y viscerales (Montalvo, 2010).

1.2.4.1 *Leishmaniasis* cutánea.

Es causada por *L. tropica* y *L. major* (en Asia y América), *L. infantum* (en la cuenca mediterránea occidental fundamentalmente), *L. aethiopica* (en África) y *L. mexicana* y *L. braziliensis* en el Nuevo Mundo (Sanchez-Garcia *et al.*, 2010). Se considera un grave problema de salud pública debido a su amplia distribución geográfica y porque puede llegar a producir lesiones destructivas irreversibles e

incluso discapacitantes (Sánchez-Saldaña *et al.*, 2004). La lesión ya establecida, inicialmente papulosa, redondeada u ovalada, asintomática o levemente pruriginosa, puede ser única o múltiple y localizarse en la cara u otras áreas de la piel descubiertas. Paulatinamente va tomando un tono rojizo más oscuro, al tiempo que se infiltra y aumenta de tamaño (Figura 8 A) (García, 2004).

1.2.4.2 Leishmaniasis mucocutánea.

Es causada principalmente por *L. braziliensis*, y también por *L. guyanensis*, *L. peruviana* y *L. panamensis*. Es conocida como “espundia” en Sudamérica y sus manifestaciones clínicas pueden presentarse muchos meses o años después de haberse infectado primero con la enfermedad cutánea. Las lesiones se manifiestan principalmente en la mucosa nasal, simulando en el inicio una rinitis. Se aprecia inflamación de la mucosa e hipertrofia vascular, con ulceración posterior que llega a comprometer el tabique nasal cartilaginoso (Figura 8 B). El progreso de la enfermedad es crónico y puede involucrar el labio superior, paladar, pilares, úvula, epiglotis, cuerdas vocales, hipofaringe, laringe y tráquea. Los cuadros severos se asocian a dificultad para respirar, deglutir y también se presenta disfonía, afonía e incluso asfixia (Ampuero, 2000).

1.2.4.3 Leishmaniasis visceral.

También conocida como kala-azar, es causada por *L. infantum/L. chagasi* en América y *L. donovani* y *L. infantum* en el Viejo Mundo. La infección puede ser asintomática, aguda o crónica. Los cuadros agudos son menos frecuentes, pero son graves, pues la mortalidad sin tratamiento es del 100%. El tiempo de incubación es de meses, a veces de años y la aparición de signos y síntomas es habitualmente insidiosa, y en ocasiones, en el sitio de la picadura se desarrolla un nódulo permanente como único signo. Los primeros síntomas llegan a ser

inespecíficos: malestares generales, cefalea, fiebre, esplenomegalia progresiva y dolores agudos del abdomen (Figura 8 C). Luego las manifestaciones más importantes son anemia con leucopenia, esplenomegalia sólida y progresiva, hepatomegalia, edema de la piel y periostio, emaciación, fiebre irregular, diarrea y hemorragias gingivales y nasales. El paciente puede morir en pocas semanas en casos agudos, en un año en casos subagudos o en dos o tres años en casos crónicos (Nuernberger y Ramos, 1974).

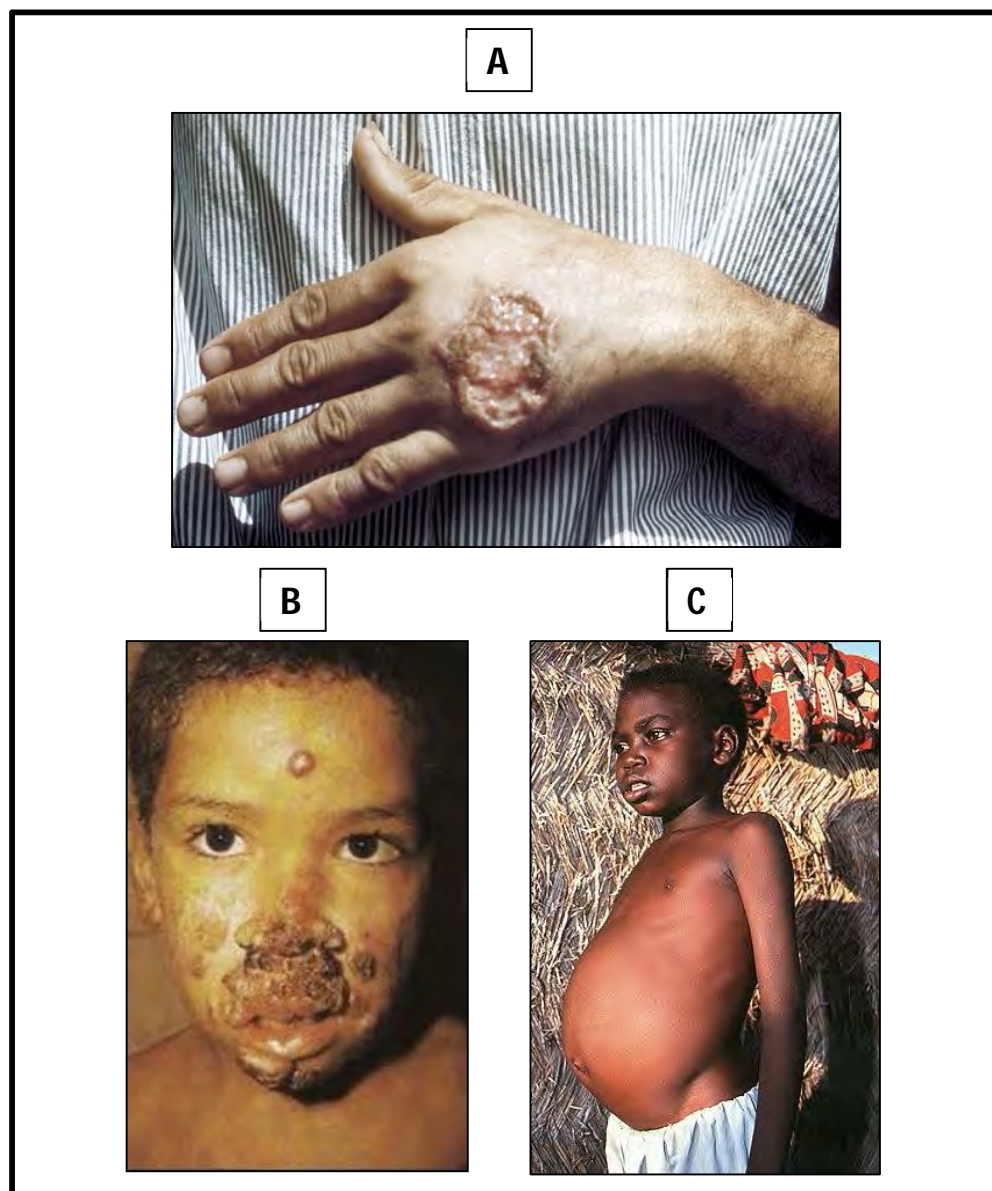


Figura 8. Las tres formas clínicas generales de la leishmaniasis: A) cutánea, B) mucocutánea y C) visceral (tomado de (Salazar y Castro, 2001)

Es importante señalar que el comportamiento de los parásitos no es estricto, ya que existen casos reportados de lesiones cutáneas ocasionadas por *L. infantum* y lesiones viscerales debidas a *L. amazonensis* y *L. tropica* (Rivas *et al.*, 2004).

Los tratamientos convencionales para la leishmaniasis contemplan a los antimoniales pentavalentes, como antimoniato de meglumina (glucantime) y estibogluconato de sodio (pentostam) (Herwaldt y Berman, 1992). Otros fármacos sistémicos utilizados son: anfotericina B, anfotericina B liposomal (AmBisome), pentamidina, paromomicina y sitamaquina (Hernández-Flores *et al.*, 2007); Berman, 1997). Entre los fármacos orales, se han empleado: miltefosine, ketoconazol e itraconazol. Los fármacos mencionados tienen un alto costo y son tóxicos, con la excepción de AmBisome, que presenta menos efectos adversos. Asimismo, se han identificado cepas de *Leishmania* resistentes a los fármacos (Soto *et al.*, 2008). Varios antígenos son candidatos potenciales en el desarrollo de vacunas. También se están realizando estudios con proteínas recombinantes.

En nuestro laboratorio estamos interesados en estudiar los mecanismos de expresión genética en *Leishmania major* Friedlin, la cepa de referencia del “proyecto del genoma de *Leishmania*”. En particular, nuestro interés está enfocado en el análisis de la transcripción de la RNA polimerasa III (RNA Pol III), la cual sintetiza moléculas de RNA pequeñas que son esenciales para el crecimiento celular.

1.3 TRANSCRIPCIÓN.

1.3.1 Mecanismos y regulación de la transcripción.

La transcripción es el proceso enzimático que lleva a la síntesis de RNA a partir de DNA, y es catalizado por enzimas llamadas RNA polimerasas. En organismos eucariontes todos los genes nucleares son transcritos por tres RNA polimerasas diferentes: RNA Pol I, RNA Pol II y RNA Pol III. Aunque es sabido que éstas comparten subunidades, cada una de ellas transcribe genes diferentes (Andrau *et al.*, 1999), y difieren en su localización nuclear y en el grado de sensibilidad a la droga α -amanitina (Tabla IV) (Lorenzen *et al.*, 2007).

Existen al menos 4 clases diferentes de moléculas de RNA que juegan un papel esencial para la expresión de los genes. Los RNAs mensajeros (mRNAs) son los intermediarios que acarrean la información desde el DNA hasta los ribosomas, donde son traducidos para sintetizar proteínas. Los RNAs de transferencia (tRNAs) son moléculas pequeñas que funcionan como adaptadores entre los aminoácidos y los codones del mRNA durante la traducción. Los RNAs ribosomales (rRNAs) son componentes estructurales y catalíticos de los ribosomas, los cuales traducen la secuencia de nucleótidos del mRNA en secuencias de aminoácidos para generar polipéptidos; y finalmente los RNAs pequeños nucleares (snRNAs), que son componentes estructurales del empalmosoma, partícula ribonucleoproteica que elimina los intrones de los precursores de los mRNAs (Snustad y Simmons, 2006).

La RNA Pol I se encarga de transcribir los genes de los rRNAs 28S, 18S y 5.8S. La RNA Pol II transcribe los genes codificadores de proteínas, así como también los genes de snRNAs y de algunos microRNAs (miRNAs). Por su parte, la RNA Pol III sintetiza moléculas de RNA pequeñas que llevan a cabo papeles

esenciales para el crecimiento celular, tales como tRNA, el 5S rRNA y el U6 snRNA (Tamarin, 1999).

Tabla IV. Características principales de las RNA polimerasas en eucariontes.

	Transcrito primario que sintetiza	Producto génico final	Localización	Actividad enzimática	Efecto de la α -amanitina
RNA Pol I	Pre-rRNAs grandes	rRNAs 28S, 18S y 5.8S	Nucléolo	50-70%	Ninguno
RNA Pol II	hnRNAs (pre-mRNA) y pre-miRNAs	mRNAs y miRNAs	Nucleoplasma	20-40%	Fuerte inhibición
RNA Pol III	Pre-tRNAs Pre-rRNAs y varios snRNAs	tRNAs, 5S rRNA y U6 snRNA.	Nucleoplasma	~10%	Débil inhibición

El proceso de transcripción está conformado de tres fases principalmente: iniciación, elongación y terminación. La fase de iniciación es considerada como la etapa más compleja de la transcripción y en la que tiene lugar la mayor parte de la regulación transcripcional. Para iniciar se requiere de la separación de las hebras de DNA en un pequeño tramo cercano a la secuencia promotora para permitir que la RNA polimerasa sintetice un fragmento corto de RNA con secuencia complementaria a la de la hebra molde. La separación de las dos cadenas de DNA genera la llamada burbuja de transcripción, la cual se irá desplazando a la par de la RNA Pol a lo largo del gen. Para esta fase también se requiere la unión al DNA de proteínas llamadas comúnmente factores de transcripción (Luque y Herráez, 2001).

En la fase de elongación la RNA Pol alarga la cadena de RNA naciente mientras avanza por el DNA, desplazando junto con ella la burbuja de transcripción. Para que la elongación sea eficiente, en el caso de la RNA Pol II se requiere de la ayuda de los llamados factores de transcripción generales de elongación, que son proteínas que se agrupan en varios tipos y que evitan la terminación prematura de la transcripción (Luque y Herráez, 2001).

Al alcanzar una secuencia de DNA determinada se produce la terminación de la transcripción como consecuencia de la combinación de dos mecanismos: la detención o pausa de la RNA polimerasa y la desestabilización del híbrido de RNA/DNA. El resultado final es la separación de los componentes del complejo de transcripción. La influencia de los dos mecanismos mencionados es diferente para cada una de las tres RNA Pol (Luque y Herráez, 2001).

Existen diferentes componentes regulatorios *cis* y *trans* que delimitan las funciones de las RNA polimerasas, dependiendo de las necesidades celulares (Orioli *et al.*, 2012). Entre los componentes *cis* encontramos a las secuencias promotoras, aisladoras (*insulators*), potencializadoras (*enhancers*) y silenciadoras, que son fragmentos de DNA ubicados en la misma hebra del gen a transcribir y que van a regular directa o indirectamente la transcripción, según sea el caso (Figura 9). Entre los elementos *trans* encontramos a las proteínas que se asocian al DNA, como los factores generales de transcripción. Muchos factores de transcripción presentan dedos de zinc, los cuales son dominios conformados por residuos de cisteínas e histidinas que permiten la unión de cationes Zn^{2+} y que interaccionan con la mitad de una vuelta de la doble hélice del DNA. Los *enhancers* también pueden actuar como elementos *trans* porque pueden potencializar la transcripción de un gen aun encontrándose en cromosomas diferentes (Rice y Allis, 2001; Bulger y Groudine, 2010; Cechinni y Kim, 2009).

contribuye a una regulación funcional al exponer parte de los cromosomas hacia el centro nuclear donde se localiza una mayor cantidad de fábricas transcripcionales, presentándose reestructuraciones específicas del genoma en cada momento del ciclo celular (Widschwendter *et al.*, 2004).

En el citoplasma la función de los mRNAs es modulada su localización, la eficiencia de traducción y las proporciones de degradación. El procesamiento posttranscripcional del mRNA es un proceso integral en la regulación de la expresión genética en células eucariontes. La concentración de transcritos funcionales disponibles para su traducción a proteína no sólo depende de la tasa de síntesis, sino también de su estabilidad relativa en el citoplasma (Wang, 2001). La estabilidad del mRNA es frecuentemente estudiada monitoreando los niveles de transcritos en las diferentes fases celulares reportándose el tiempo que se requiere para degradar el 50% de los transcritos existentes. La modulación de los mRNA provee información importante sobre el comportamiento de la estabilidad del mensajero en diferentes estadios celulares.

1.3.2 Promotores y factores de transcripción de las RNA Pol I y II.

La iniciación de la transcripción por las RNA polimerasas en genes eucariontes es controlada por segmentos de DNA llamados promotores, los cuales incluyen el sitio de inicio de la transcripción (SIT, +1) y secuencias flanqueantes inmediatas. Las regiones promotoras típicas para RNA Pol II abarcan alrededor de 40 pb y contienen subregiones llamadas elementos promotores *core*, que incluyen la caja TATA, el iniciador (Inr) y el elemento promotor río abajo (DPE). Estos elementos promotores van a reclutar y ensamblar el complejo de preiniciación (PIC) que se compone de los factores generales de transcripción, que son TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF y TFIIH (Juven-Gershon y Kadonaga, 2010). Para los promotores de la RNA Pol I, se han reportado pocos factores de transcripción, siendo los principales SL1 y UBF1 (Marvin y Robert, 2000).

1.3.3 Transcripción de la RNA polimerasa III.

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y en vertebrados la RNA Pol III es considerada como la más compleja de las RNA polimerasas, ya que está conformada por 17 subunidades (RNA Pol II por 12 y RNA Pol I por 14), de las cuales cinco son compartidas entre las tres RNA polimerasas (ABC27, ABC23, ABC14.5, ABC10 α y ABC10 β), dos son compartidas con RNA Pol I (AC40 y AC19) con homólogos en RNA Pol II (B44 y B12.5), otras cinco son homólogas entre las tres RNA polimerasas (A190/B220/C160, A135/B150/C128, A43/B16/C25, A14/B32/C17 y A12/B12.6/C11); resultando 5 subunidades exclusivas para la RNA Pol III (C82, C53, C37, C34 y C31) (Martinez-Calvillo *et al.*, 2010). Estas últimas subunidades forman dos subcomplejos con distintas funciones en la transcripción, C82/C34/C31 y C37/C53, entre las que se encuentra la apertura del promotor, terminación y reiniciación de la transcripción (Kassavetis *et al.*, 2010).

Se han identificado tres clases de promotores que la RNA Pol III puede reconocer, los cuales se caracterizan por presentar, en la mayoría de los casos, secuencias consenso intergénicas o río abajo del SIT. Los promotores tipo I son característicos de los genes 5S rRNA y consisten en tres dominios internos: la caja A, el elemento intermedio (EI) y la caja C (Figura 10). El promotor tipo II está presente en los genes de tRNA y se conforma por dos elementos internos altamente conservados: la caja A, que se ubica próxima al SIT, y la caja B (que se encuentra a distancias variables del SIT) (Figura 10). El promotor tipo III es característico del U6 snRNA y contempla elementos que residen exclusivamente río arriba de la secuencia codificante, por lo general de una caja TATA ubicada a -30, un elemento proximal (PSE) a -60 y un elemento distal (DSE) que, como su nombre lo indica, se encuentra alejado del gen (en humanos entre -244 y -214) (Figura 10) (Paule y White, 2000).

La RNA Pol III requiere principalmente de tres factores de transcripción: TFIIIA, TFIIIB y TFIIIC (Figura 10). TFIIIA es necesario para la transcripción del 5S rRNA, y posee los llamados dedos de zinc para unirse al promotor interno de dicho gen. TFIIIC se caracteriza por ser un complejo proteico grande (con un tamaño mayor a 500 kDa), compuesto de 6 subunidades capaces de reconocer los promotores de los genes 5S rRNA y tRNAs. Por su parte, TFIIIB es un factor indispensable para la transcripción de todos los genes de la RNA Pol III (Figura 10) (Tsihlis y Grove, 2006).

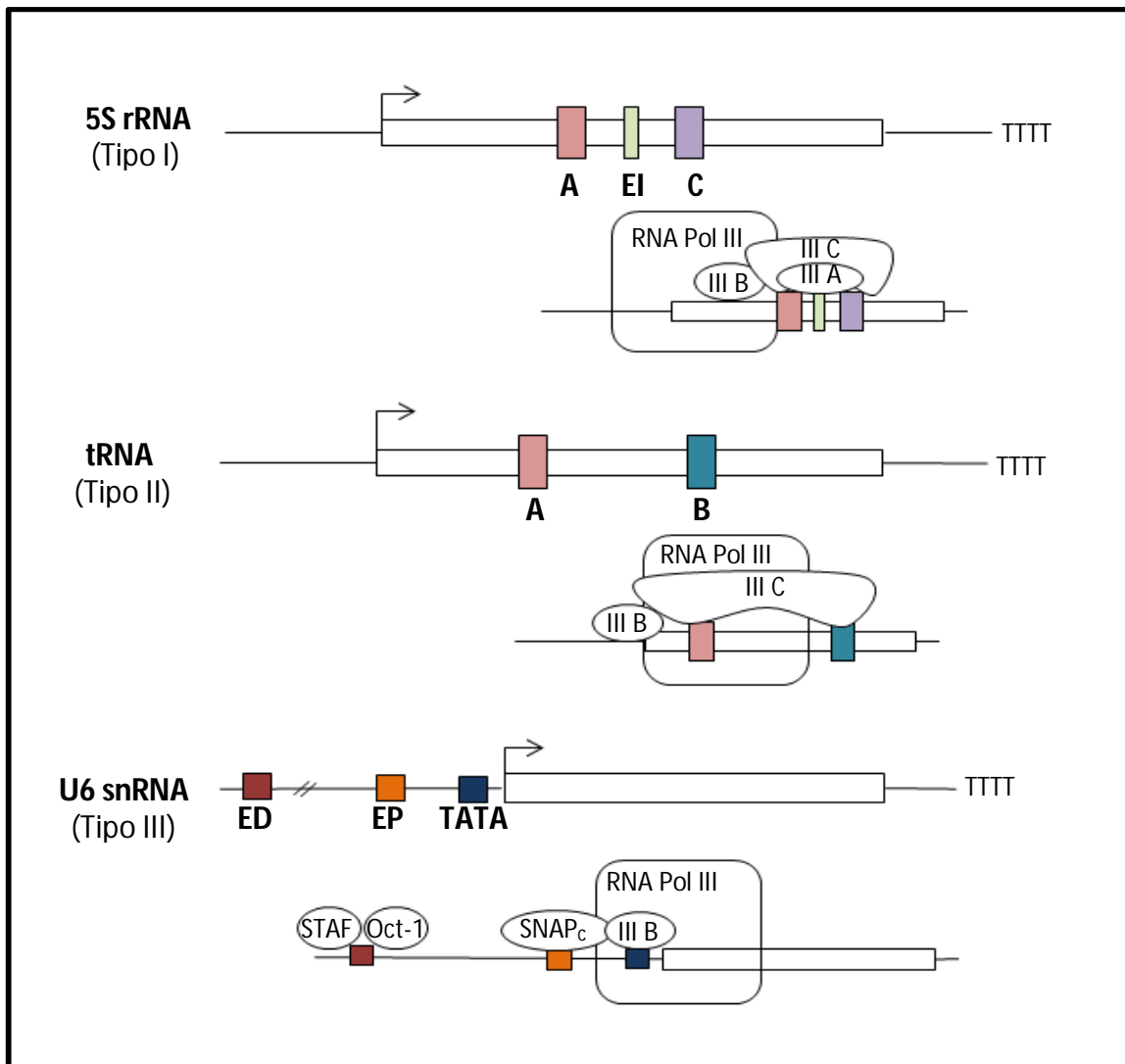


Figura 10. Representación esquemática de los tres tipos de promotores de la RNA polimerasa III. Debajo de cada promotor se esquematiza la presencia de los factores de transcripción asociados. Se observa que TFIIB es indispensable para la transcripción de todos los genes por la RNA Pol III. TFIIA es requerido para los genes 5S rRNA, y TFIIC para los genes tRNA y 5S rRNA. El promotor para el U6 snRNA por lo general presenta secuencias río arriba del gen a los cuales se asocian proteínas específicas como STAF, Oct-1 y SNAPc. A, caja A; B, caja B; C, caja C; EI, elemento intermedio; ED, elemento distal; EP, elemento proximal; TATA, caja TATA

Entre las funciones de TFIIB encontramos la formación del complejo de iniciación para la apertura de la doble hebra del DNA, el posicionamiento de la RNA Pol III en las inmediaciones del sitio de inicio de la transcripción y el reinicio de la transcripción (Saïda, 2008). Este factor se conforma de 3 subunidades: la proteína TBP, Brf1 y Bdp1. TBP es considerado como un factor universal porque también se presenta en los complejos transcripcionales de las RNA Pol I y II. La subunidad Brf1 es una proteína bipartita que está relacionada al factor TFIIB de la RNA Pol II y presenta un dedo de zinc (Kassavetis *et al.*, 2006).

1.3.4 Bdp1.

Bdp1 es una subunidad que conforma al complejo TFIIB y se caracteriza por poseer un dominio de ~50 residuos conocido como SANT (**S**WI-SNF, **A**DA, **N**-CoR y **T**FIIB) (Figura 11) (Aasland *et al.*, 1996). Dicho dominio contiene repeticiones de tres alfas hélices y presenta un arreglo hélice-vuelta-hélice. Un dominio similar al SANT se presenta en diversas enzimas remodeladoras de la cromatina como el SWI-SNF, implicando un papel importante en la regulación de la accesibilidad de la cromatina (Boyer *et al.*, 2002; Boyer *et al.*, 2004).

Hs	298	YYSKPWSNKETDMEFLAISMGVGTDFSMIGQLFPHRARIETIKNKFREKTINGWRIDKA	355
Mm	300	YYSKPWSNKETDMEFLAISMGVGTDFSMIGQLFPHRARIETIKNKFREKTINGWRIDKA	357
Dm	344	KRTPYWTSDETVRFYRSLQIIGTDFSLMCQMFPIRSRRDLKIKYKKEERTINGQLINKA	401

Figura 11. Alineamiento del dominio SANT de Bdp1. Secuencia de la porción de Bdp1 que contiene el dominio SANT de *H. sapiens*, *M. musculus* y *D. melanogaster*. Los aminoácidos resaltados en negro o en gris son idénticos o similares, respectivamente (tomado de Barry, 2007)

Bdp1 tiene un papel comparable con el factor sigma en la RNA Pol en bacterias, ya que funciona como estabilizador del complejo de inicio de la transcripción al interactuar con otra subunidad de TFIIB, Brf1. En los casos en donde se requiere de TFIIIC, Brf1 exhibe conexiones con la subunidad Tfc4 a través de dos arreglos de tetratricopéptidos que este último presenta, para así consolidar el complejo basal de la transcripción (Liao *et al.*, 2006). Para delimitar los residuos de Bdp1 que interactúan con Brf1, se hicieron análisis de deleciones utilizando como molde un fragmento de Bdp1 (a partir del aminoácido 410 hasta el 596) de *S. cerevisiae* y se encontró que el fragmento 477-492 presentó una contribución significativa en la unión con Brf1 (Kassavetis *et al.*, 2006). Por otro lado, utilizando resonancia magnética nuclear, se identificaron los 17 principales residuos con unión a Brf1, ubicados en el fragmento 412-493 de Bdp1 (que incluye al dominio SANT), siendo K430, Q444, Y448, R465 y K489 los aminoácidos principalmente involucrados en la interacción. Posteriormente se encontró que la interacción entre Bdp1 y Brf1 es relativamente débil, pues al someter al complejo TFIIB a una purificación por cromatografía de afinidad y a ensayos tipo *pull down*, se observó la separación del complejo en 2 partes: TBP y Brf1 (B'), y Bdp1 sola (B'') (Kassavetis *et al.*, 2006; Saïda, 2008). Considerando que los 17 aminoácidos de Bdp1 que mostraron mayor interacción con Brf1 se ubicaron en las hélices uno y dos del dominio SANT, y que la interacción entre Bdp1 y el DNA es a través de las hélices dos y tres del mismo dominio, se sugiere que el dominio SANT experimenta la dinámica necesaria para cumplir con las interacciones proteína-proteína y proteína-DNA, dependiendo de las necesidades en el proceso de transcripción (Saïda, 2008).

Por otro lado, recientemente se reportó que Bdp1 también tiene interacciones con el extremo C-terminal la subunidad C37, la cual conforma el subcomplejo C37/C53 de la RNA polimerasa III (Wu *et al.*, 2011).

1.3.5 Organización del genoma de *Leishmania*

L. major tiene un genoma de 32.8 megabases (Mb), distribuido en 36 cromosomas relativamente pequeños (Ivens *et al.*, 2005). Una característica distintiva del genoma nuclear de *Leishmania* y otros tripanosomátidos es el ordenamiento de los genes en unidades policistrónicas largas; esto es, grupos de hasta 200 genes localizados en una misma cadena de DNA. Esta organización fue inicialmente descrita en el cromosoma 1 de *L. major*, el cual presenta dos unidades policistrónicas divergentes: los primeros 32 genes están localizados en la cadena de abajo (orientados hacia el telómero izquierdo), mientras que los 53 genes restantes están localizados en la cadena de arriba (orientados hacia el derecho) (Myler y Audleman, 1999; Raska *et al.*, 2004). Esta conformación génica es similar a la presente en los procariontes, representada por los operones. Sin embargo, a diferencia de éstos, los genes que conforman estas agrupaciones en los tripanosomátidos no se encuentran relacionados funcionalmente; además, en los tripanosomátidos los transcritos policistrónicos son procesados por *trans-splicing* y poliadenilación para generar los transcritos maduros (Clayton, 2002).

1.3.6 Procesamiento del mRNA: *trans-splicing* y poliadenilación.

Leishmania y el resto de los tripanosomátidos utilizan el proceso del *trans-splicing* para la maduración de los pre-mRNAs nucleares (Martínez-Calvillo *et al.*, 2010). Aunque el *cis-splicing* ha sido observado en *T. brucei*, la presencia de

intrones es muy escasa en estos parásitos (Mair *et al.*, 2000). El proceso de *trans-splicing* implica la adición de una secuencia de 39 nucleótidos, conocida como miniexón o *spliced-leader* (SL), en el extremo 5' terminal del pre-mRNA. Al igual que el *cis-splicing*, el *trans-splicing* se realiza a través de dos reacciones de transesterificación. Sin embargo, en los tripanosomátidos se genera un intrón con una estructura en forma de “Y” como producto intermediario (y no la típica estructura en forma de “lazo” del *cis-splicing*). Este proceso también viene ligado a la poliadenilación en la región 3' del transcrito, concluyendo así la maduración del pre-mRNA (Figura 12). El proceso de *trans-splicing* fue descrito originalmente en tripanosomátidos y después fue encontrado en tremátodos y *Euglena* (Requena *et al.*, 2003).

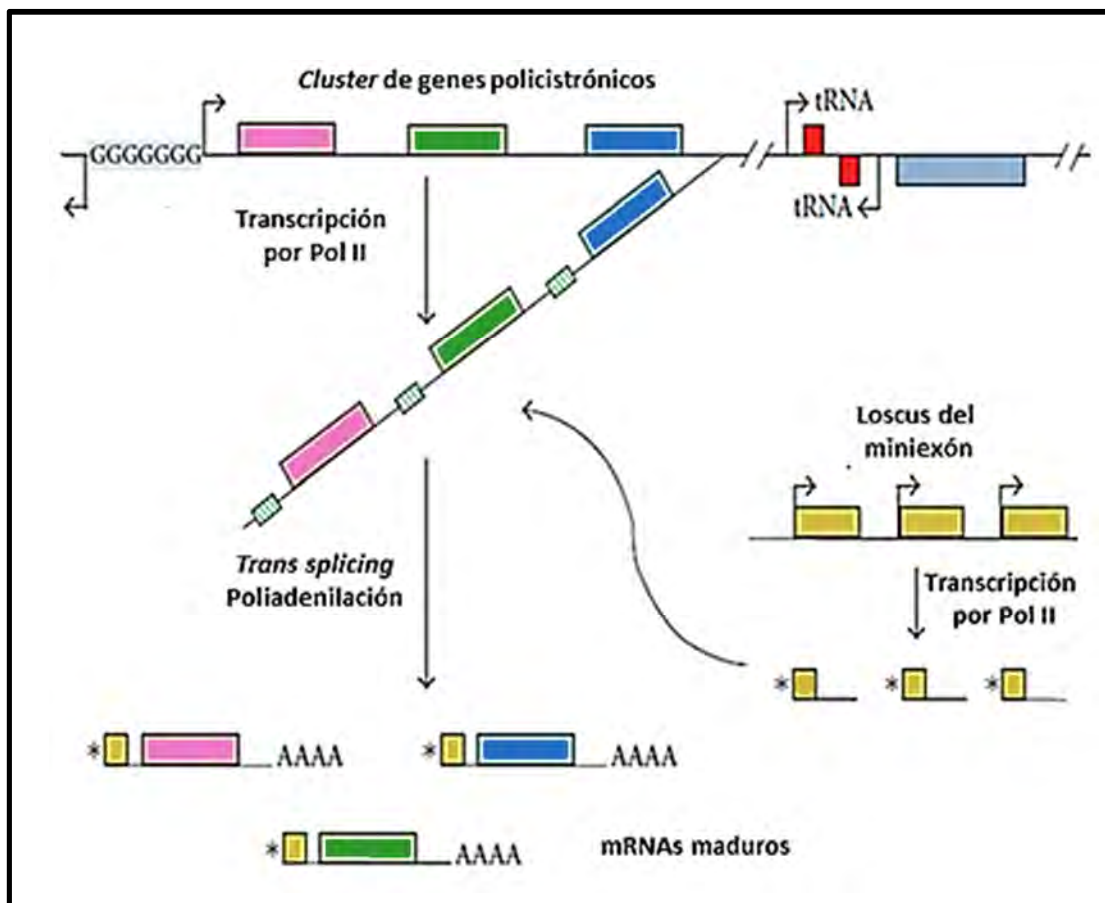


Figura 12. Transcripción y procesamiento del mRNA en tripanosomátidos. En la parte de arriba se representa un cromosoma hipotético con tres agrupaciones policistrónicas. La

transcripción de una unidad policistrónica produce un transcrito primario que es procesado por *trans-splicing*, que consiste en la adición del miniexón en el extremo 5' de cada mRNA. La maduración del mRNA finaliza con la adición de una cola de poli A (modificado de Martínez-Calvillo *et al.*, 2010).

1.3.7 Promotores en *Leishmania*.

Son pocas las secuencias reguladoras de la transcripción que han sido caracterizadas en *Leishmania* (Martínez-Calvillo *et al.*, 2010). Entre las regiones promotoras identificadas encontramos la de los genes del miniexón y la de la unidad del rRNA. En *L. tarentoale* la secuencia promotora del miniexón consiste de dos dominios: el elemento “-60”, que se ubica aproximadamente de -67 a -58 (en relación con el SIT), y el elemento “-30”, que se ubica aproximadamente de -41 a -31 (Figura 13 A). La región promotora de la unidad del rRNA de *L. donovani*, transcrita por la RNA Pol I, está formada por 3 regiones diferentes: -69 a -57, -46 a -27 y -6 a +4 (en relación al SIT) (Figura 13 D) (Yan *et al.*, 1999). Por otro lado, el análisis de *run-on* nuclear en *L. major* mostró que la transcripción de la RNA Pol II en los cromosomas 1 y 3 inicia en la región intergénica (llamada región SSR) ubicada entre las dos unidades policistrónicas que conforman dichos cromosomas, dando como resultado una transcripción bidireccional hacia los telómeros (Figura 13 B) (Martínez-Calvillo *et al.*, 2004; Martínez-Calvillo *et al.*, 2003). Esto indica que una única región promotora regula la expresión de decenas o cientos de genes. Con esto se hace notar una de las grandes diferencias entre los tripanosomátidos y otros eucariontes, los cuales requieren de promotores independientes para cada uno de sus genes. En una región de aproximadamente 100 pb de la región SSR del cromosoma 1 fueron identificados varios sitios de inicio de la transcripción para ambas unidades policistrónicas (Martínez-Calvillo *et al.*, 2003). Esta región es rica en trectos de Gs y carece de dominios típicos de la RNA Pol II, como las cajas TATA. En tripanosomátidos se han identificado pocos factores de transcripción de la RNA Pol II. Entre éstos se encuentra TFIIA y TFIIB que participan en la síntesis del miniexón de *T. brucei* (Schimanski *et al.*, 2005).

En tripanosomátidos la RNA Pol III sintetiza todos los snRNAs (no sólo U6, como en otros eucariontes), además del 5S rRNA, 7SL RNA y tRNAs. En *T. brucei* y *Leptomonas* se han caracterizado los promotores para el 7SL RNA y varios snRNAs. Éstos genes tienen un gen de tRNA contiguo, hacia su extremo 5' y localizado en la cadena opuesta de DNA (Figura 13 C). Sorprendentemente, las cajas A y B del tRNA vecino son esenciales para la expresión del snRNA y del 7SL RNA. En la mayoría de los casos, se requieren también elementos regulatorios intragénicos del snRNA y del 7SL RNA para lograr un nivel de expresión óptimo (Nakaar *et al.*, 1994). Los genes de 5S rRNA en tripanosomátidos contienen la caja A, la caja C y la secuencia EI, pero estos elementos no se han caracterizado funcionalmente (Figura 13 C)

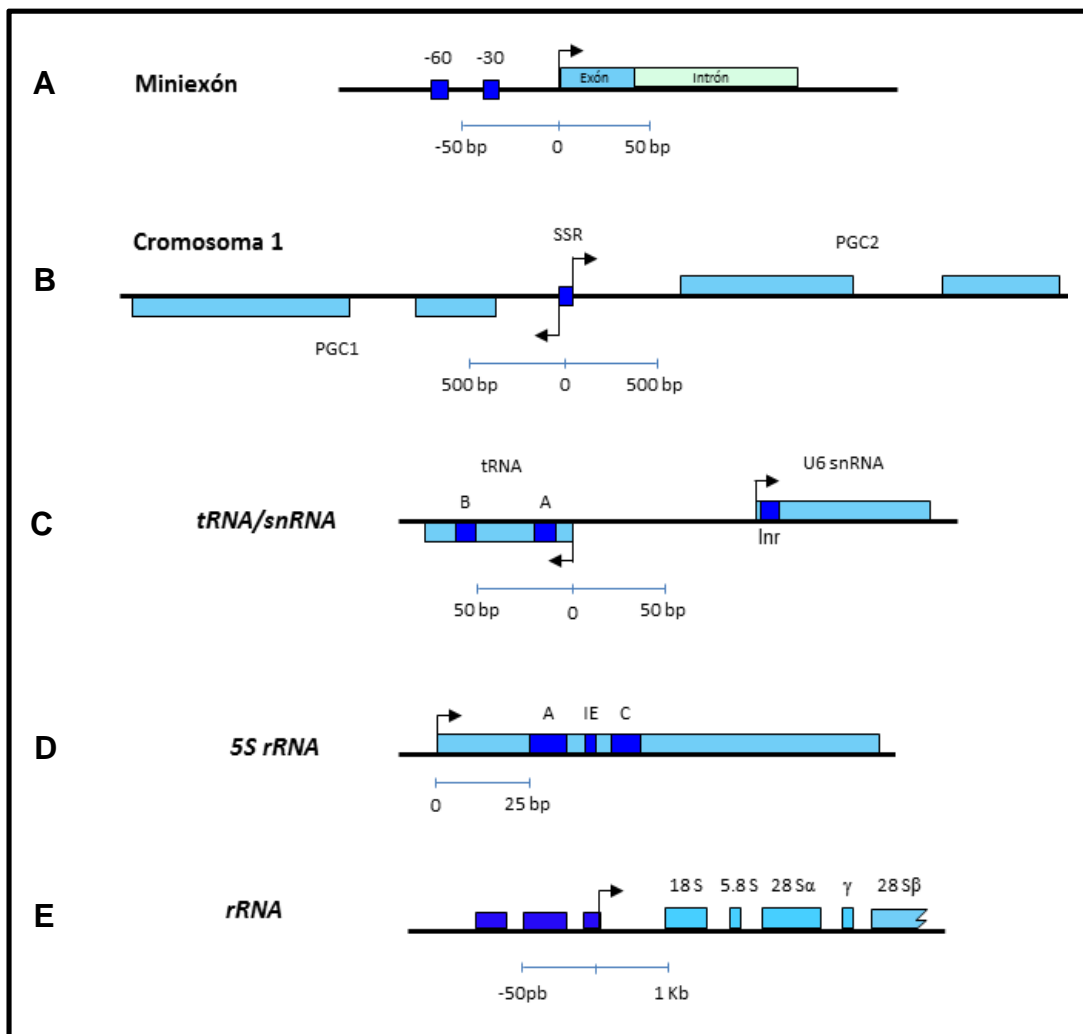


Figura 13. Representación esquemática de las regiones promotoras caracterizadas en *Leishmania* y otros tripanosomátidos. Las regiones codificantes se muestran en color azul claro mientras que los elementos de DNA que son requeridas para el inicio de la transcripción están en color azul marino. A) Gen del miniexón de *L. tarentolae* con sus dos dominios a -60 y a -30. B) Cromosoma 1 de *L. major* con su región SSR a partir de la cual inicia la transcripción de manera bidireccional. C) Locus del U6 snRNA y tRNA de *T. brucei*. D) Gen del 5S rRNA, E) Unidad del rRNA que corresponde a *L. donovani* (modificado de Martínez-Calvillo *et al.*, 2010).

1.4 ANTECEDENTES.

Mediante la técnica de purificación por afinidad en tándem (TAP-tag), usando ABC23 como blanco, fueron aislados complejos transcripcionales de la RNA Pol III en *L. major* (Martínez-Calvillo *et al.*, 2007). El análisis de espectrometría de masas de dichos complejos permitió la identificación de 12 subunidades de RNA Pol III: C160, C128, C82, C53, C37, C34, C17, AC40, AC19, ABC27, ABC23 y ABC14.5. Dichos complejos contenían también nueve subunidades de Pol II, pero ninguna subunidad específica de Pol I, lo cual indicó que la isoforma ABC23 es exclusiva de Pol II y III, mientras la otra isoforma presente en *Leishmania* (ABC23z) podría estar restringida a RNA Pol I. Esto fue confirmado en *T. brucei* mediante experimentos de co-inmunoprecipitación (Nguyen *et al.*, 2006). Análisis *in silico* posteriores permitieron la identificación del resto de las 17 subunidades de Pol III en *Leishmania*, con excepción de la subunidad C31 (Barry, 2007). En lo referente a factores de transcripción de la RNA Pol III en *Leishmania* y otros tripanosomátidos, resulta muy interesante el hecho de que no han sido identificados los factores TFIIIA ni TFIIIC, que en otros organismos son esenciales para el crecimiento celular. Sin embargo, análisis *in silico* han permitido la identificación de las tres subunidades de TFIIIB: Brf1, Bdp1 y TBP (Ivens *et al.*, 2005). Debido al papel esencial que lleva a cabo TFIIIB en la transcripción de la RNA Pol III, la caracterización de sus subunidades en *Leishmania* resulta necesaria para tener un mejor entendimiento de los procesos de expresión génica en los protozoos parásitos de la familia Trypanosomatidae.

Así, este estudio ampliará los conocimientos de la transcripción en este importante grupo de organismos patógenos.

2. OBJETIVOS.

Objetivo general.

Analizar molecularmente el gen y los transcritos de Bdp1, una de las subunidades del factor de transcripción TFIIIB, en el protozooario parásito *L. major*.

Objetivos particulares.

- Analizar *in silico* las secuencias de DNA y de aminoácidos de Bdp1.
- Determinar el tamaño y la abundancia de los transcritos de Bdp1 en cultivos de *L. major* en fase media de crecimiento logarítmico y en fase estacionaria.
- Aislar y secuenciar clonas de cDNA para identificar las secuencias de procesamiento (sitio aceptor del miniexón y región de poliadenilación) del RNAm de Bdp1.
- Determinar la vida media del mRNA de Bdp1.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1 Análisis *in silico*.

La secuencia de Bdp1 de *L. major* y sus ortólogos en otras especies se obtuvieron de las bases de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y GeneDB (<http://www.genedb.org>). Éstas fueron analizadas mediante los programas bioinformáticos Blast 2.0 (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), Clustal W 1.82 (<http://.ebi.ac.uk/clustalw>), Chromas 2.33 y DNAMAN 3.0.

3.2 Cultivo y conteo de promastigotes de *Leishmania*.

Promastigotes de la cepa *L. major* Friedlin fueron crecidos a 27°C en medio BM (Infusión corazón-cerebro 2X, M199 5X, hepes 1 M pH 7.5, hemina 2 mg/ml, penicilina 10,000 u/ml y estreptomicina 10 mg/ml) hasta alcanzar la fase media de crecimiento logarítmico. Para mantener a los parásitos en dicha fase se tomó 0.5 ml de cultivo y se diluyó en 4.5 ml de medio BM fresco dejando incubar a 27°C. Para contar los parásitos se tomaron 50 µl de cultivo diluyéndolos en 450 µl de formaldehído al 2%. De la dilución se tomaron 10 µl y se colocaron en una cámara de Neubauer, contando el número de parásitos ubicados en los cuadros en diagonal de cada cuadrante de la esquina (Figura 14). El resultado se multiplicó por 10^5 para así obtener el número de parásitos por ml de cultivo.

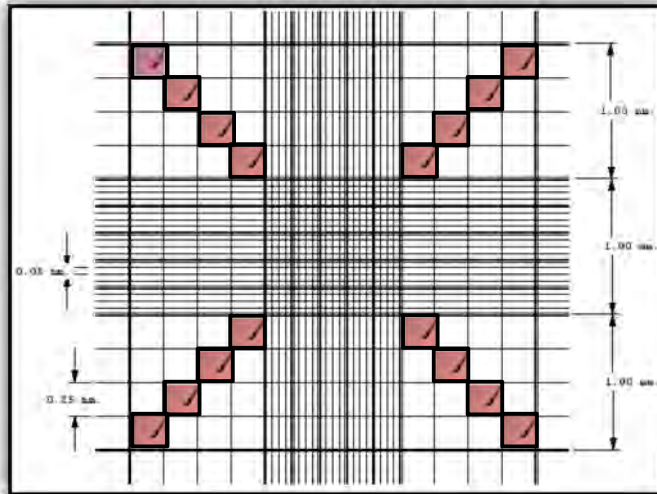


Figura 14. Diagrama de la cámara de Neubauer. Se señala en rosa los cuadros en los que se contaron los parásitos.

3.3 Extracción de DNA genómico.

Partiendo de cultivos de promastigotes en fase media logarítmica se centrifugaron 3×10^8 células a 5,000 rpm durante 10 minutos a 4°C, luego se resuspendió la pastilla en 5 ml de una solución de lisis que contiene 5 µl de SSC 1X (NaCl 3 M y citrato de sodio 0.6 M), 4.5 µl de TNE (Tris 40 mM pH 7.6, EDTA 1 mM pH 8.0 y NaCl 15 M), 0.5 ml de Sarcosyl al 10%, y 100 µg de proteinasa K. Se agitó en vortex (Daigger Genie 2) y se mantuvo a 55°C durante 2 h. Posteriormente se le adicionó 0.5 vol de fenol y 0.5 vol de cloroformo y se centrifugó a 4,000 rpm durante 8 minutos a 4°C; se transfirió la fase superior acuosa a un tubo nuevo y se precipitó con 0.1 vol de acetato de sodio 3 M y 2.5 vol de etanol absoluto a -20°C toda la noche. Al día siguiente se centrifugó a 9,000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se lavó la pastilla con etanol al 70%. Finalmente el DNA se resuspendió en 300 µl de TE (Tris-HCl 10 mM pH 7.6 y EDTA 0.2 mM pH 8.0). La concentración del DNA fue determinada en un espectrofotómetro a 260 nm (1 D.O. a 260 nm = 50 µg/ml).

3.4 Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

El DNA de los diferentes experimentos fue analizado en geles de agarosa (Agarose D-1 low EEO PRONADISA) preparados a diferentes concentraciones (de 0.5 - 2%) con amortiguador TBE 1X (Tris Base-HCl 5.4%, ácido bórico 2.74% y EDTA 0.46%) y 0.1 µg/ml de bromuro de etidio, el cual es un agente intercalante que sirve para visualizar los ácidos nucleicos bajo la luz ultravioleta. Los geles se dejaron polimerizar durante 20 minutos y se corrieron inmersos en amortiguador TBE 1X dentro de una cámara de electroforesis a 100 voltios durante tiempo variable. Las muestras de DNA fueron resuspendidas en amortiguador de carga 1X (azul de bromofenol 0.25%; xilen-cianol 0.25%; glicerol 30%) y fueron visualizadas junto con marcadores de peso molecular (escalera de 100 pb de PROMEGA, o escalera de 1 kb DNA de Invitrogen) en un transiluminador de luz ultravioleta (Transilluminator M-26 UVP) y fotografiadas en un aparato FUJIFILM FLA-500.

3.5 Purificación de DNA de geles de agarosa.

Se utilizó el kit NucleoSpin Extract II (Macherey Nagel) para purificar el DNA inmerso en el gel de agarosa, por lo que se visualizó la banda de interés en el transiluminador y se cortó cuidadosamente tomando la mínima cantidad de gel posible. El fragmento se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se pesó para adicionarle 200 µl de buffer NT por cada 100 mg de agarosa, se incubó a 50°C durante 10 minutos vortexeando para disolver y homogenizar la muestra durante la incubación. Cuando la agarosa se disolvió completamente las muestras se colocaron en una columna incluida en el kit que tiene una membrana de sílica que retiene las moléculas de DNA, ésta se colocó dentro de un tubo colector y se centrifugó a 1,000 x g durante 1 minuto eliminando el excedente retenido en el tubo. Después se adicionaron 600 µl del Buffer NT3, se centrifugó a 11,000 x g durante 1 minuto y se volvió a eliminar el excedente del tubo colector. Para secar

la membrana se volvió a centrifugar a 11,000 x g durante 2 minutos y finalmente el DNA en las columnas se resuspendió en un volumen de 30 µl en un tubo eppendorf nuevo y estéril.

3.6 Eliminación de sales de muestras de DNA.

La desalación de las muestras se realizó con el kit NucleoSpin Extract II (Macherey Nagel). Este método es utilizado para remover sales, enzimas y dNTPs de muestras de DNA. Se usaron 2 volúmenes del buffer NT por cada volumen de muestra y se colocó en una columna con membrana de sílica incluida en el kit, ésta a su vez se posicionó dentro de un tubo colector y se centrifugó a 11,000 x g durante 1 minuto, luego se agregaron 600 µl del buffer NT3 y se volvió a centrifugar a 11,000 x g durante 1 minuto y de igual manera se eliminó el excedente. Finalmente para eliminar el excedente de líquido en la membrana se centrifugó a 11,000 x g durante 2 minutos colocando posteriormente la columna en un tubo eppendorf nuevo para resuspender el DNA en 30 µl de buffer de elución.

3.7 Amplificación de DNA por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para amplificar secuencias específicas de DNA se realizaron múltiples reacciones de PCR utilizando la DNA polimerasa RED Taq (1U/ µl, Sigma). Para esto, las reacciones se hicieron en tubos de PCR donde se añadieron 5 µl de Buffer RED Taq PCR 10 X (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl, 11 mM MgCl₂ y 0.1% gelatin), mezcla de dNTPs 10 mM, los oligonucleótidos sentido y antisentido específicos (10 µM), el DNA templado (10-100 ng), diferentes concentraciones de MgCl₂, la enzima RED Taq y finalmente la reacción se llevó a un volumen final de 50 µl con agua, se mezcló pipeteando suavemente y el tubo se introdujo en al termociclador (Cycler Corbett Research). Las reacciones generalmente

consistieron en 30 ciclos que incluyeron: desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineamiento durante 1-2 minutos a temperaturas variables (45-62°C), extensión a 72°C durante 1-2 minutos y un ciclo de extensión a 72°C durante 7 minutos. En la Tabla V se muestran los oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen Bdp1, así como los usados para localizar el sitio aceptor del miniexón y la región de poliadenilación del mRNA de Bdp1.

Tabla V. Oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen Bdp1 y para determinar las secuencias de procesamiento del mRNA de Bdp1.

Oligonucleótido	Secuencia
Bdp1 XmaI 5´	ATCCCGGGATGGACGACAACGAGTTCGAA
Bdp1 XbaI 3´	ATTCTAGACTCAAACGAGAAGTCCGAGTC
Bdp1 ME-1	GTGTTCGAGTGGAATCTGTG
Bdp1 ME-2	TTAGCAGCCGGATACGCAA
Bdp1 PA-1	AGTCGAAACGCGCAACCAA
Bdp1 PA-2	CGTTCTTCGACATGGTCGTA
miniexón	AACGCTATATAAGTATCAGTT
B1	CCTCTGAAGGTTCCACGGAT
B2	CACGGATCCACATCTAGAT
NESTED-(dT)	CCTCTGAAGGTTCCACGGATCCACATCTAGATTTTTTTTTTTTTTTTT

3.8 Ligaciones de DNA.

La secuencia de DNA amplificada por PCR y purificada fue ligada en pGEM-T Easy (Promega), un vector utilizado para la clonación directa de productos de PCR que posee dos genes de selección para bacterias transformadas (resistencia a ampicilina y el gen LacZ, que codifica para la enzima β -galactosidasa). El mapa del vector y sus sitios de reconocimiento se muestran en la figura 15. Las reacciones se prepararon con 100-200 ng de inserto, 37.5 ng de vector pGEM-T Easy, 1 μ l de T4 DNA (3U/ μ l) y 5 μ l de buffer Rapid Ligation

2X, llevándolo a un volumen final de 10 µl con agua desionizada, e incubando a 4°C toda la noche.

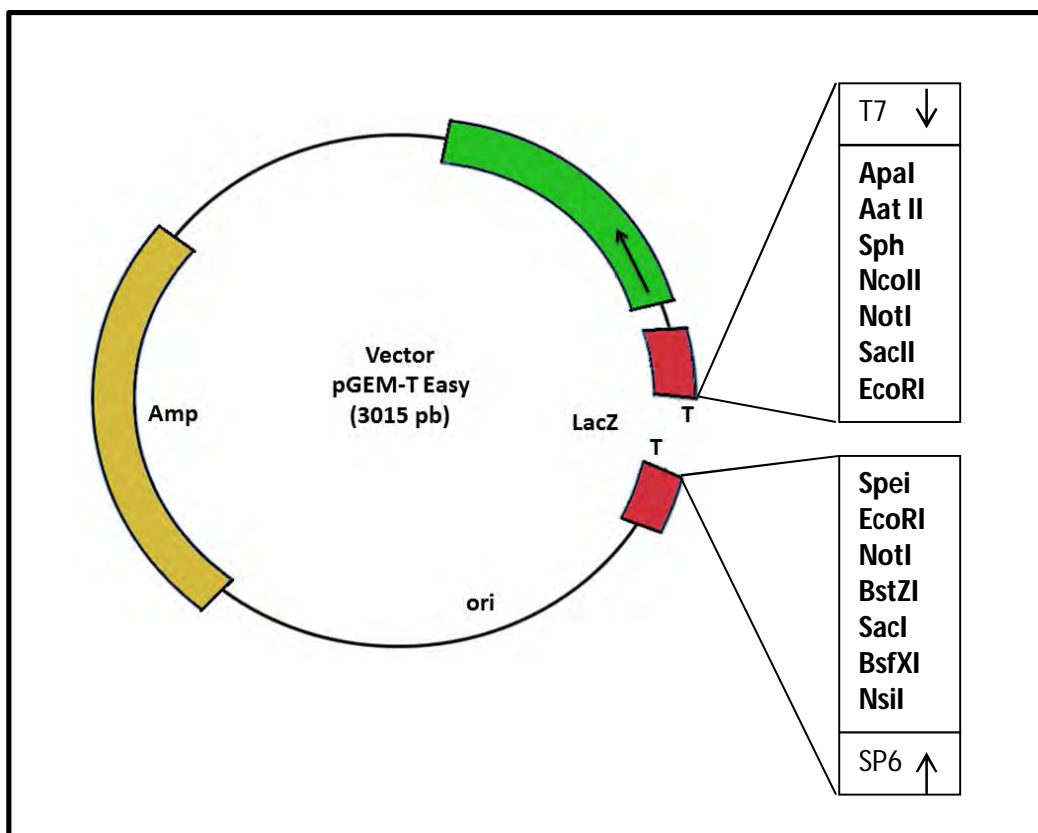


Figura 15. Mapa del vector pGEM-T Easy con sus sitios de reconocimiento.

3.9 Transformaciones de células competentes de *E. coli*.

Se descongelaron células competentes de *E. coli* JM109 de alta eficiencia ($>1 \times 10^7$ ufc/µg de DNA, Promega) de -70°C y se transfirieron 50 µl al fondo de un tubo de polipropileno (Falcon) de 10 ml previamente enfriado, se añadieron 3 µl del producto de ligación y se mezclaron suavemente colocando el tubo en hielo durante 20 minutos. Luego se dio un choque térmico a 42°C por 45 segundos y la reacción se puso nuevamente en hielo por 2 minutos. Después se le adicionaron 950 µl del medio SOC (triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, KCl 2.4 mM, MgCl₂ 1% y glucosa 2%) y se incubó durante hora y media a 37°C con

agitación de ~225 rpm. Después las células fueron centrifugadas a 15,000 rpm durante 30 segundos y la pastilla fue resuspendida en 100 µl del medio SOC y sembrada en cajas Petri con medio LB agar (Peptona de caseína 1%, extracto de levadura 0.5% y NaCl 0.5%, ajustado a un pH 7.5) suplementado con ampicilina (0.01%), IPTG (100 mM) y X-Gal (50 mg/ml) utilizando un asa triangular. Las células se dejaron crecer toda la noche a 37°C.

3.10 Purificación de plásmidos en escala pequeña (Miniprep).

Colonias bacterianas blancas (resistentes a la ampicilina y sin capacidad de digerir X-Gal) fueron inoculadas en tubos de ensayo con 5 ml de medio LB adicionado con 5 µl de ampicilina (100 µg/ml) y se incubaron a 37°C con agitación a 220 rpm durante toda la noche. Para purificar los plásmidos se utilizó el kit NucleoSpin Plasmid (Macherey Nagel). Para ello se centrifugaron las células en un tubo eppendorf de 1.5 ml a 11,000 x g durante 30 segundos para obtener el pellet celular y eliminar el medio LB restante, después se añadieron 250 µl del buffer de resuspensión A1 y se agitó vigorosamente en vortex; luego se adicionaron 250 µl del buffer de lisis A2 y se mezcló invirtiendo el tubo de 6-8 veces, se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos y se adicionó el buffer neutralizador A3 que crea las condiciones apropiadas para la unión del DNA en la membrana de sílica de la columna. Se mezcló invirtiendo de 6-8 veces y se centrifugó a 11,000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Por otro lado se colocó una columna con la membrana de sílica en un tubo colector y se le agregó la mezcla, se centrifugó a 11,000 x g durante 1 minuto y se eliminó la descarga que quedó en el tubo colector. Para lavar la membrana de sílica se colocó nuevamente la columna en el tubo colector y se le adicionó el Buffer de lavado A4 y se centrifugó a 11,000 x g durante otro minuto. Para secar la membrana de sílica, simplemente se centrifugó a 11,000 x g durante 2 minutos. Finalmente la columna se colocó en un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml y se le adicionaron 50 µl del buffer de elución AE, que se dejó actuar durante un minuto a

temperatura ambiente, luego se centrifugó a 11,000 x g durante un minuto obteniendo 50 μ l del plásmido purificado.

Los insertos de interés fueron liberado del vector pGEM-T Easy utilizando la enzima *EcoRI*, la cual es una endonucleasa que crea extremos cohesivos al reconocer y seccionar la secuencia GAATTC (Figura 18). Las reacciones se llevaron a cabo en tubos eppendorf de 1.5 ml con 5 μ l (~ 1 μ g) de plásmido purificado y 10 unidades de enzima, en presencia del buffer correspondiente, por alrededor de 5 horas a 37°C.

3.11 Marcaje de DNA con High Prime.

El marcaje de DNA se llevó a cabo usando un kit de High Prime (Roche). Para ello se colocaron 25 ng de DNA en un tubo eppendorf de 1.5 ml estéril y se adicionó agua desionizada para obtener un volumen final de 11 μ l, posteriormente se calentó a punto de ebullición durante 10 minutos para desnaturalizar el DNA y luego se colocó en hielo por 30 segundos. Después se adicionaron 4 μ l de solución High Prime y 5 μ l (50 μ Ci) de dCTP (α -³²P) pipeteando suavemente para mezclar la reacción y se centrifugó brevemente para desprender los residuos de las paredes del tubo. La reacción se incubó a 37°C por 10 minutos y para detener la reacción se adicionó 2 μ l de EDTA 0.2M, pH 8.0.

3.12 Cromatografía con columnas de Sefadex G-50.

Para remover la radioactividad no incorporada al DNA, la mezcla se ajustó a un volumen final de 50 μ l con el buffer STE 150 mM, pH 8.0 (NaCl y TE). Por otro lado se prepararon las micro columnas ProbeQuant -50 (Amersham), se desprendió el broche inferior y se colocó en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml, se centrifugó durante 1 minuto a 735 x g y se transfirieron los 30 μ l de sonda radioactiva, nuevamente se centrifugó a la misma velocidad durante 2 minutos para coleccionar la muestra en el fondo del tubo y almacenarla a -20°C, luego se cuantificó en un contador de centelleo (Wallac 1450 MicroBeta, Perkin Elmer).

3.13 Extracción de RNA total.

Se centrifugaron células en fase media logarítmica a 5,000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el pellet restante fue lisado con 750 μ l del reactivo TRIZOL (Invitrogen) por cada 5×10^7 células. La muestra se pipeteó suavemente para homogenizar. Después, la muestra se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos, se le adicionó 200 μ l de cloroformo por cada 750 μ l de TRIZOL y se agitó vigorosamente durante 15 segundos para después incubarlo por 15 minutos a temperatura ambiente y centrifugarlo a 12,000 x g durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente se tomó la fase superior (acuosa) que contenía el RNA y se transfirió a un tubo eppendorf nuevo. La muestra se mezcló con 500 μ l de alcohol isopropílico por cada 750 μ l de TRIZOL ocupado anteriormente. Después se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos y se centrifugó a 12,000 x g a 5°C. Posteriormente se retiró el sobrenadante y la pastilla de RNA se lavó con etanol al 75%. Se dejó secar por 10 minutos a temperatura ambiente para finalmente resuspender el RNA en un volumen de entre 20-50 μ l de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC). La concentración del RNA se determinó con un espectrofotómetro a 260 nm (1 D.O. a 260 nm = 40 μ g/ml).

3.14 Ensayos de RT-PCR.

3.14.1 Tratamiento de RNA con DNasa I.

Para eliminar el DNA contaminante de la muestra de RNA, en un tubo eppendorf de 0.6 ml se trataron 5 µg de RNA total con DNasa I. Para esto se adicionaron 4 µl de Buffer 10X de DNasa I, 3 µl de DNasa I (3 unidades, Invitrogen) y se llevó a un volumen final de 40 µl con agua DEPC. Se mezcló la reacción y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Para inactivar a la DNasa I, se agregaron 2 µl de EDTA 25 mM y se calentó a 65°C por 10 minutos. Finalmente, el RNA se precipitó con 0.1 vol de acetato de sodio 3 M y 2.4 vol de etanol absoluto durante toda la noche a -20°C. Después se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 minutos a 4°C y la pastilla se dejó secar y se resuspendió en 5 µl de agua DEPC.

3.14.2 Síntesis de cDNA.

Para amplificar los transcritos a partir de RNA total, primero se trataron 2.5 µg de RNA de *L. major* con DNasa I en un tubo para PCR, se añadió 1 µl del oligonucleótido NESTED-(dT), 1 µl de dNTPs y se llevó a un volumen final de 13 µl. Posteriormente se dejó incubando a 65°C durante 5 minutos e inmediatamente en hielo por otros 5 minutos, se le adicionaron 4 µl del Buffer First Strand 5X, 1 µl de DTT 0.1 M, 1 µl de RNAsin y 1 µl de la enzima Transcriptasa Reversa SuperScript III (200 U/µl), se mezcló pipeteando y se incubó a 55°C durante 60 minutos y luego a 70°C durante 15 minutos, para finalmente agregar 1 µl de RNasa H (2 U/µl).

3.15 PCRs para la localización de los sitios de procesamiento.

Para determinar los sitios de adición del miniexón y de poliadenilación en el transcrito de Bdp1 se realizaron ensayos RT-PCR con oligonucleótidos específicos del gen Bdp1 para amplificar en dirección 5´ hasta el miniexón y en dirección 3´ hasta la cola de poliadenilación.

3.15.1 Identificación del sitio aceptor del minexón

Se sintetizó cDNA a partir de cultivos de promastigotes de *L. major* utilizando los oligonucleótidos específicos Bdp1-ME1 y Miniexón para amplificar un fragmento que incluye parte del gen de Bdp1, la región UTR 5´ y al miniexón. Posteriormente el producto de dicha reacción se ocupó como templado para realizar un ensayo PCR utilizando los oligonucleótidos Bdp1-ME2 y Miniexón y así hacer más específico el amplificado. El producto de este último PCR se corrió en un gel de agarosa para la purificación del fragmento de interés y su clonación en el vector pGEM-T Easy. Finalmente se secuenció para realizar un análisis *in silico* para ubicar el sitio aceptor del miniexón.

3.15.2 Identificación del sitio aceptor de poliadenilación

Se sintetizó cDNA a partir de cultivos de promastigotes utilizando el oligonucleótido Nested dT. El producto se ocupó como templado para realizar un primer ensayo PCR con los oligonucleótidos específicos Bdp1-PA1 y B1. Finalmente se utilizó el producto de ésta segunda reacción y se ocupó como templado para un tercer ensayo PCR y amplificar la región de interés con los oligonucleótidos Bdp1-PA2 y B2. De igual manera que con el miniexón el producto de PCR se corrió en un gel de agarosa, se purificó y clonó en el vector pGEM-T

Easy para mandarlo a secuenciar para hacer el análisis *in silico* y ubicar la región de poliadenilación.

3.16 Ensayo tipo Northern-Blot.

Se extrajo RNA total de promastigotes de *L. major* en fase media logarítmica y estacionaria, como se indica en la sección 3.13. Posteriormente, 12 µg se precipitaron con 0.1 vol. de acetato de sodio y 2.5 vol. de etanol y se resuspendieron en 2 µl de agua DEPC.

3.16.1 Electroforesis de RNA en un gel desnaturizante.

Las muestras de RNA se corrieron en un gel desnaturizante al 1%. Para preparar dicho gel se disolvió agarosa de rutina (SIGMA), buffer Mops/EDTA 10X pH 7.0 (Mops 0.5 M y EDTA 0.001 M), formaldehído al 37% y agua DEPC. Al RNA se les adicionaron 2 µl de buffer A (Mops/EDTA 10X pH 7.0 y agua DEPC), 2 µl de Formaldehido, 5 µl de Formamida (formalehido 37%. 12.3 M y formamida desionizada) y 2 µl de GLB (*gel loading buffer*). Se utilizó un marcador de corrida de RNA de 10 Kb (MILLENIUM) y la corrida se realizó a 80 volts. Finalizada la corrida, la parte del gel que contenía el marcador de peso molecular se tiñó con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) durante 5 minutos y se fotografió junto con una regla en un analizador de imágenes (FLA-5000, de FUJIFILM). El resto del gel fue transferido a una membrana de nylon.

3.16.2 Transferencia por capilaridad de RNA a los filtros.

Se montó la cama de transferencia que consiste en papel Whatman, la membrana de Hybond (Amersham), el gel y sanitas. La transferencia se realizó

por 24 h en solución de transferencia SSC 10X. Después se desmontó la cama y los filtros se secaron a temperatura ambiente. El RNA se fijó con radiación UV en el Stratalinker (Stratagen).

3.16.3 Prehibridación e hibridación.

La membrana se colocó en una botella del horno de hibridación de 16 cm de largo (Hybaid Sake n Stack, Termo Electron) y se adicionaron 20 ml de solución de hibridación (Formamida 50%, SSC 5 X, SDS 0.2% y solución Denharts 4 X; para este último se mezclaron Ficoll 400 0.08%, PVP-40 0.08% y albúmina sérica bovina 0.08%) y 200 µl de DNA de esperma de salmón (100 µg/ml) previamente desnaturalizado en agua a punto de ebullición durante 10 minutos. Se dejó prehibridando durante 2 horas a 42°C en el horno de hibridación. Luego se extrajeron 5 ml de la solución y se añadió la sonda radioactiva (5×10^6 cpm) previamente desnaturalizada. Se dejó hibridar durante 24 horas a 42°C en el horno de hibridación.

3.16.4 Lavado de filtros radioactivos.

Los filtros se lavaron por tres minutos a temperatura ambiente en SSC 2X y SDS 0.2%. Se repitió el lavado durante 30 minutos a 65°C. Dos últimos lavados se realizaron con SSC 0.1 X y SDS 0.1% a 65°C por 30 minutos y finalmente se secó la membrana sobre papel Whatman y se envolvió en plástico adherente transparente. Se obtuvo la autorradiografía mediante la exposición en placas de rayos X (BioMax MS, Kodak) durante 24 h.

3.17 Ensayo con actinomicina D.

Se llevaron a cabo ensayos Northern-blot para determinar la vida media del mRNA de Bdp1. Para ello se se agregó el fármaco actinomicina D (inhibidor de la transcripción) a una concentración de 10 $\mu\text{l/ml}$ en cultivos de promastigotes procíclicos en fase media y en fase estacionaria para bloquear la transcripción. Posteriormente se tomaron alícuotas a distintos tiempos (0, 1, 2, 6, 8 y 16 h) y se extrajo el RNA lisando con TRIZOL. Se analizó su concentración y calidad en un gel desnaturizante de agarosa. Las muestras de RNA fueron corridas en geles desnaturizantes de agarosa, transferidas a membranas de nylon e hibridadas con una sonda radioactiva correspondiente al gen de Bdp1 o con el gen de la subunidad C160 de la RNA Pol III (ver sección ZZ). Se obtuvieron imágenes en el phosphorimager (FUJI). La intensidad de las bandas correspondientes al mRNA de Bdp1 y C160 fue cuantificada por densitometría a través del programa MultiGauge 6.0 y graficada en una grafica de dispersión para establecer el tiempo en la que el transcrito reduce su concentración a la mitad. Como control de carga, las membranas fueron rehibridadas con un fragmento del gen del rRNA 18S.

4. RESULTADOS.

4.1 Análisis de la secuencia de Bdp1 en *L. major* y otros eucariontes.

Bdp1 es una de las subunidades que conforman el factor de transcripción TFIIIB y se caracteriza por poseer un dominio conocido como SANT, que consta de ~50 aa (Aasland, 1995). Esta proteína ha sido caracterizada en diferentes especies, desde levaduras hasta mamíferos, encontrándose que su tamaño y secuencia varían considerablemente. Por ejemplo, en *Schizosaccharomyces pombe* Bdp1 tiene un tamaño de 520 aa, mientras que en *Homo sapiens* presenta 2621 aa. El porcentaje de identidad de Bdp1 entre estas dos especies es de sólo 3%. El porcentaje de identidad es mucho mayor (53%) al comparar la secuencia de aa de Bdp1 entre organismos más cercanos evolutivamente, como es el caso de *H. sapiens* y *Mus musculus* (ratón) (Tabla VI).

Tabla VI. Tamaño y porcentaje de identidad de la proteína de Bdp1 de diferentes especies de eucariontes.

	Dm	Sp	Sc	At	Mm	Hs
<i>L. major</i> (397aa)	12 %	11%	8.4%	8%	3%	3%
<i>D. melanogaster</i> (695 aa)	-	11.3%	11.4%	11.7%	5%	3%
<i>S. pombe</i> (520 aa)	-	-	18%	16%	3%	3%
<i>S. cerevisiae</i> (594 aa)	-	-	-	16%	4%	4%
<i>A. Thaliana</i> (545 aa)	-	-	-	-	3%	3%
<i>M. musculus</i> (2467 aa)	-	-	-	-	-	53%
<i>H. sapiens</i> (2621 aa)	-	-	-	-	-	-

La única región de Bpd1 altamente conservada entre todas las especies analizadas corresponde al dominio SANT (Figura 16). Esta región presenta un 42% de identidad entre *S. pombe* y humano, y del 100% entre humano y ratón (Tabla VII).

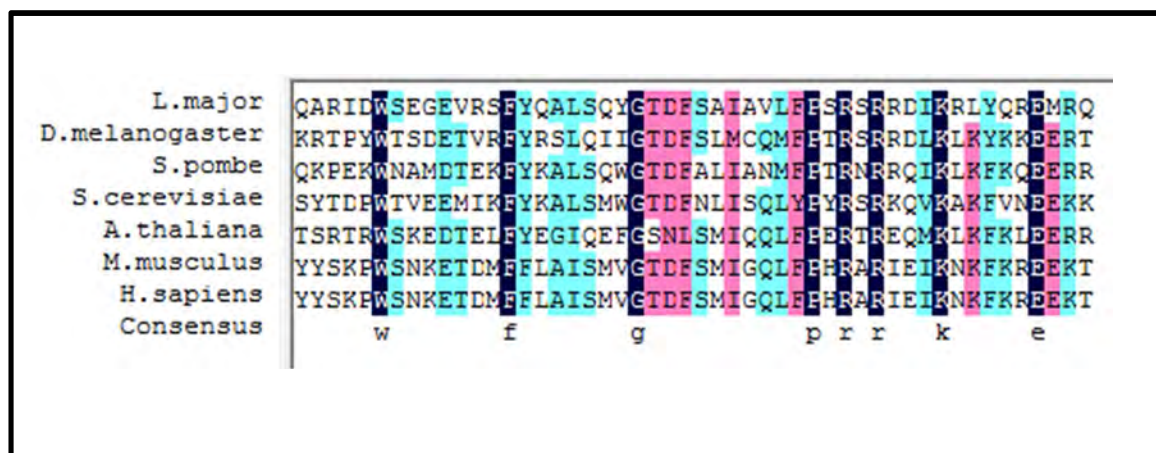


Figura 16. Alineamiento de las secuencias proteicas del dominio SANT de Bpd1 de *L. major*, *Saccharomyces cerevisiae* (levadura), *Schizosaccharomyces pombe* (levadura), *Arabidopsis thaliana* (Crucifera), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), *Mus musculus* (ratón común) y *Homo sapiens* (hombre). Los residuos resaltados en azul marino comparten un 100% de identidad, en rosa el 75% de identidad y en color azul claro el 50% de identidad. Se señalan los residuos 100% conservados: triptófano (w), fenilalanina (f), glicina (g), arginina (r), prolina (p), lisina (k) y ácido glutámico (e).

Tabla VII. Porcentajes de identidad del dominio SANT (50 aa) entre eucariontes. Se subraya el porcentaje más bajo y el más alto.

	Dm	Sp	Sc	At	Mm	Hs
<i>L. major</i>	42 %	44%	38%	<u>32%</u>	42%	42%
<i>D. melanogaster</i>	-	48%	40%	38%	40%	40%
<i>S. pombe</i>	-	-	48%	44%	42%	42%
<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	34%	48%	48%
<i>A. thaliana</i>	-	-	-	-	42%	42%
<i>M. musculus</i>	-	-	-	-	-	<u>100%</u>

El análisis *in silico* de las bases de datos de GeneDB y NCBI reveló que en *L. major* el gen Bdp1, cuyo nombre oficial LmjF36.6530, se ubica en la unidad policistrónica de mayor tamaño del cromosoma 36 (Figura 17), entre los nucleótidos 2530495 y 2531688, en la cadena negativa del DNA. El gen tiene un tamaño de 1194 pb, no presenta intrones, y codifica una proteína de sólo 397 aminoácidos, con una masa predicha de 44 kDa y un punto isoeléctrico de 5.4. Bdp1 es codificado por un gen de copia única, pero hay que recordar que *L. major* es un organismo diploide (Rogers *et al.*, 2011) por lo que cuenta con dos copias alélicas de Bdp1 en total.

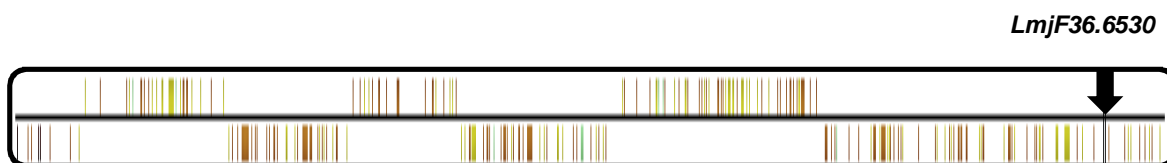


Figura 17. Representación esquemática del cromosoma 36 de *L. major*. Se conforma de siete unidades policistrónicas, siendo en la más grande donde se ubica el gen Bdp1 (señalado con una flecha).

Como era de esperarse, la secuencia de aa de Bdp1 de *L. major* mostró una baja similitud al compararse con otras especies. Los porcentajes de identidad fueron de entre el 3% (al comparar con humano y ratón) y 12% (comparando con *D. melanogaster*) (Tabla VI). Sin embargo, el dominio SANT de Bdp1 de *L. major* está altamente conservado, como puede observarse en la figura 17. Un total de 7 aa están presentes en todas las especies analizadas. Los porcentajes de identidad de este dominio entre *L. major* y otros eucariontes están en un intervalo de 32 al 44% (Tabla VII).

En la figura 18 se muestra una gráfica representativa del nivel de hidrofobicidad del dominio SANT (50 aa) de algunas de las especies eucariontes aquí analizadas y se puede observar que el patrón hidrofóbico es similar entre todas ellas. Cabe señalar que en la zona media sobresalen dos picos mayormente hidróficos y que para *H. sapiens* (línea la azul) es predominante el primero, mientras que en *L. major* (línea negra) resalta más el segundo pico.

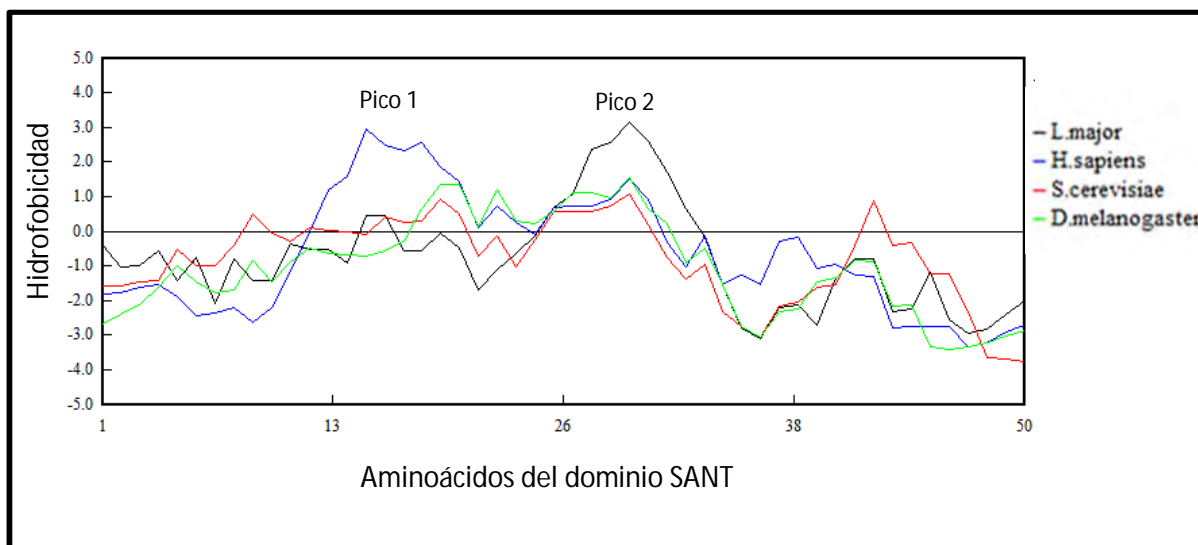


Figura 18. Gráfica representativa de la hidrofobicidad del dominio SANT en las especies eucariontes *L. major*, *D. melanogaster*, *S. cerevisiae*, *M. musculus* y *H. sapiens*. El eje de las ordenadas representa el nivel de hidrofobicidad y el de las abscisas la posición de los aminoácidos que conforman el dominio SANT. Se observa en la gráfica que el patrón de hidrofobicidad se conserva, exhibiendo dos picos significativos a ~16 y 28 residuos en el dominio SANT. Las líneas representativas de *H. sapiens* y *M. musculus* se sobrelapan, ya que comparten el 100% de homología en el dominio.

4.2 Análisis de secuencia de Bdp1 en tripanosomátidos.

Para determinar la presencia del gen de Bdp1 en otros tripanosomátidos, se llevaron a cabo búsquedas tipo BLAST en las bases de datos correspondientes. Así, se encontró que el gen se localiza en el cromosoma 36 en otras especies de

Leishmania, como *Leishmania infantum* (en donde Bdp1 tiene el nombre oficial de LinJ36.6840), *Leishmania mexicana* (LmxM.36.6530) y *Leishmania tarentolae* (LtaP36.6760). En *L. braziliensis* Bdp1 (LbrM.35.6890) se localiza en el cromosoma 35. Por otra parte, en *T. brucei* se localizó el gen de Bdp1 (Tb927.10.7840) en el cromosoma 10, mientras que en *T. cruzi* (TcCLB.503779.50) se identificó en el contig 4748 (cabe señalar que en esta especie aún no han sido ensamblados todos los contigs en cromosomas completos). Al analizar el contexto genómico en el que se encuentra el gen de Bdp1 en *L. major*, se observó que hacia el lado 5' está flanqueado por el gen LmjF.36.6525, el cual codifica para una proteína hipotética, y hacia el lado 3' está flanqueado por LmjF.36.6540, que codifica para una glicoproteína del tipo endo-1-like. Estos mismos genes se encuentran flanqueando a Bdp1 en todas las especies de *Leishmania* analizadas (Figura 19). De hecho, la conservación en el orden de los genes (sintenia) se extiende hacia ambos flancos, incluyendo muchos otros genes, lo que confirma el elevado grado de sintenia entre diferentes especies de *Leishmania* (Ivens *et al.*, 2005). En contraste, aunque se presenta cierto grado de sintenia entre *L. major* y los tripanosomas, en *T. brucei* y *T. cruzi* se encuentran ausentes los genes de la glicoproteína del tipo endo-1-like y LmjF36.6560, que codifica para una proteína hipotética (Figura 19).

Con el objetivo de comparar las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de Bdp1 de *L. major* con las de otros tripanosomátidos, se utilizó el programa DNAMAN para efectuar alineamientos. En principio, se observó que el gen tiene el mismo tamaño (1194 pb) y codifica para una proteína de 397 aa en *L. major*, *L. infantum* y *L. mexicana*. Los porcentajes de identidad entre estas especies fueron del 94-95% a nivel de nucleótidos, y del 92% a nivel de aminoácidos (Tabla VIII). La identidad entre *L. major* y las otras especies de *Leishmania* (*L. tarentolae* y *L. braziliensis*) también fue alta (80-86%). Estos resultados concuerdan con la relación filogenética que guardan las especies de *Leishmania* (Peacock *et al.*, 2007). Por otro lado se observó un alto grado de

divergencia con el género *Trypanosoma*, donde *T. brucei* mostró el menor porcentaje de identidad con *L. major*, tanto a nivel de nucleótidos (57%) como a nivel de aminoácidos (28%) (Tabla VIII).

Tabla VIII. Porcentaje de identidad del gen (número superior) y la proteína (número inferior) de Bdp1 entre tripanosomátidos. Se subrayan el porcentaje de identidad más alto y el más bajo con respecto a *L. major*.

	Lin	Lmx	Lta	Lbr	Tc	Tb
<i>L. major</i> (1194 pb) (397 aa)	<u>95%</u> <u>92%</u>	94% 92%	86% 83%	84% 80%	58% 31%	<u>57%</u> <u>28%</u>
<i>L. infantum</i> (1194 pb) (397 aa)	-	94% 92%	86% 82%	84% 79%	58% 31%	57% 27%
<i>L. mexicana</i> (1194 pb) (397 aa)	-	-	87% 84%	84% 80%	59% 31%	57% 25%
<i>L. tarentolae</i> (1182 pb) (393 aa)	-	-	-	80% 73%	60% 28%	60% 26%
<i>L. braziliensis</i> (1185 pb) (394 aa)	-	-	-	-	61% 28%	57% 26%
<i>T. cruzi</i> (948 pb) (315 aa)	-	-	-	-	-	57% 40%
<i>T. brucei</i> (897 pb) (298 aa)	-	-	-	-	-	-

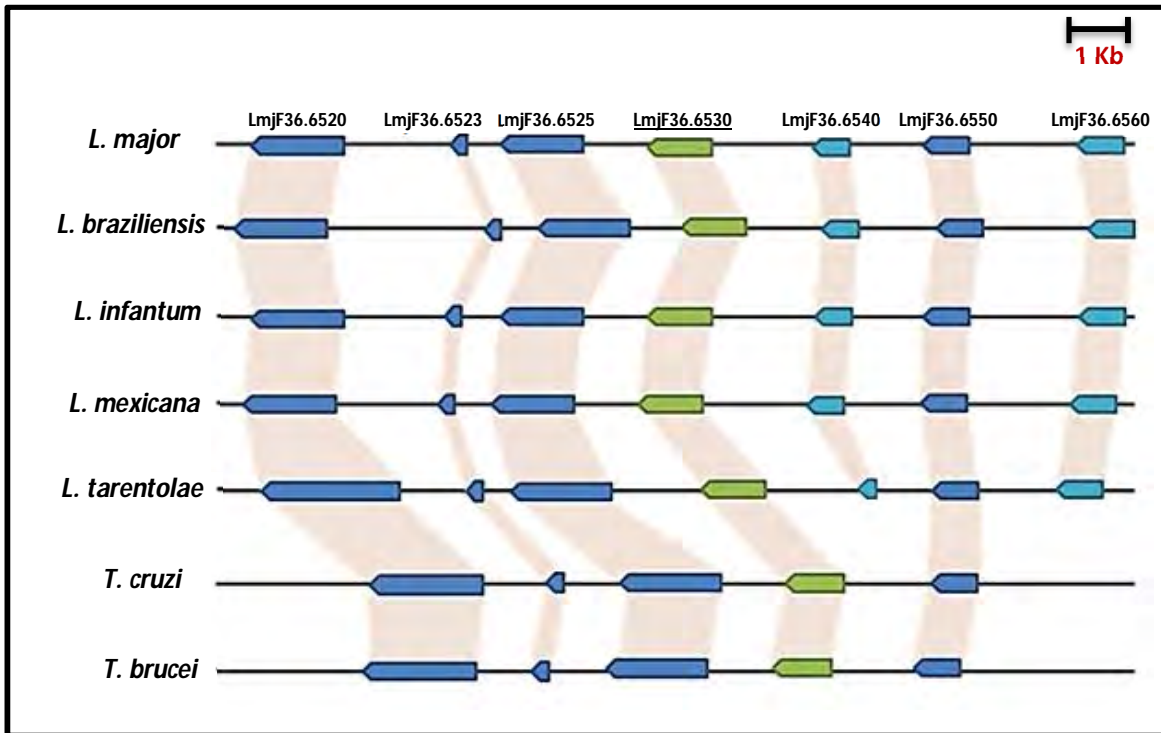


Figura 19. Conservación del orden del gen Bdp1 entre tripanosomátidos. Se muestra una representación esquemática de la región cromosomal que contiene al gen de Bdp1 (en verde) en *L. major* y otros tripanosomátidos. La sombra clara une los genes ortólogos entre las diferentes especies. Se muestran únicamente los nombres de los genes de *L. major*, en la parte superior. En azul claro se muestran los genes LmjF.36.6540 (que codifica para una glicoproteína del tipo endo-1-like endo-1-like) y LmjF36.6560 (proteína hipotética), los cuales no están presentes en *T. cruzi* y *T. brucei*.

El alineamiento de la secuencia completa de aminoácidos de Bdp1 entre tripanosomátidos mostró que la región más conservada es la que corresponde al dominio SANT (Figura 20). De los 50 residuos que forman al dominio 23 se mantuvieron conservados entre las siete especies alineadas, siendo *T. brucei* la especie que presentó mayor divergencia.

Para el caso del género *Leishmania*, la similitud que hubo en el dominio SANT entre *L. major*, *L. infantum*, *L. mexicana*, *L. tarentolae* y *L. braziliensis* fue casi del 100%, como se observa en al Figura 21, donde los aminoácidos de color azul marino están 100% conservados. Utilizando el programa *Bioinformatics Groups de UCL Department of Computer Science* se predijo un arreglo de tres alfas hélices para la secuencia de aminoácidos que constituye al dominio SANT de Bdp1 en *Leishmania* (Figura 21), el cual también se conserva en otras especies de eucariontes (Aasland, 1995).

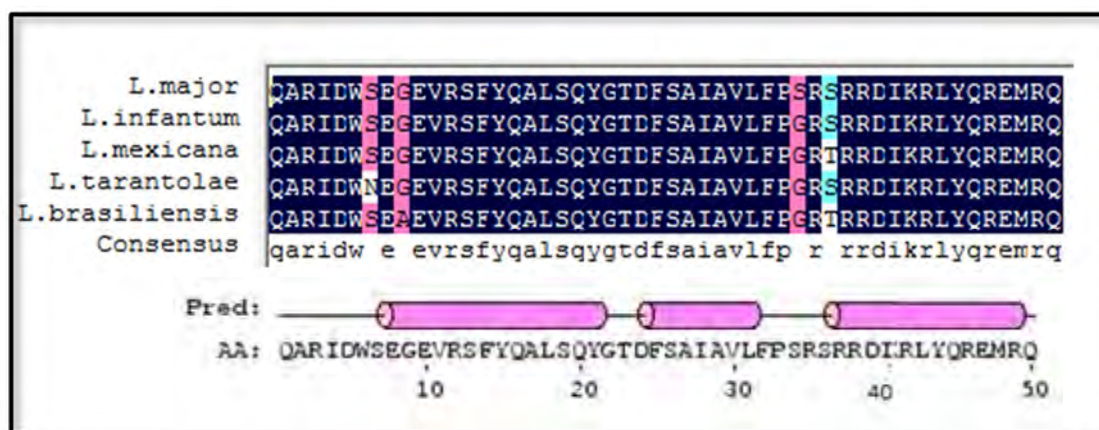


Figura 21. Alineamiento del dominio SANT (50 aa) entre especies de *Leishmania*. Los aminoácidos de color azul marino conservan un 100% de identidad, de color rosa un 75% y de color azul cielo un 50%. Utilizando el programa *Bioinformatics Groups de UCL Department of Computer Science* se predijo un arreglo de tres alfas hélices para la secuencia de aminoácidos que constituye al dominio SANT de Bdp1 en *Leishmania*.

4.3 Clonación del gen de Bdp1 de *L. major*.

El gen completo de Bdp1 de *L. major* fue clonado en el vector pGEM-T Easy. Para ello, inicialmente fue amplificado mediante PCR el gen de Bdp1, usando dos oligonucleótidos específicos (Bdp1 XmaI 5' y Bdp1 XbaI 3') y DNA genómico como molde. El producto de PCR tuvo el tamaño esperado de ~1.2 Kb (Figura 22 A), por lo que fue purificado del gel y ligado en el vector pGEM-T Easy. La mezcla de ligación fue usada para transformar células competentes JM109 de *E. coli* y de

varias de las colonias obtenidas se aislaron los plásmidos por el método de minipreps. Éstos fueron digeridos con *EcoRI*, para separar al inserto del vector de clonación (Figura 22 B). Una de las clonas que tuvo el inserto del tamaño correcto fue enviada a secuenciar (Unidad de Secuenciación de la UBIPRO, FES Iztacala) para verificar la identidad del gen de Bdp1. De esta clona se purificó posteriormente el inserto y se analizó en un gel de agarosa la cantidad del mismo (Figura 22 C). De esta manera, el fragmento con el gen de Bdp1 quedó listo para usarse como sonda en los experimentos Northern-blot.

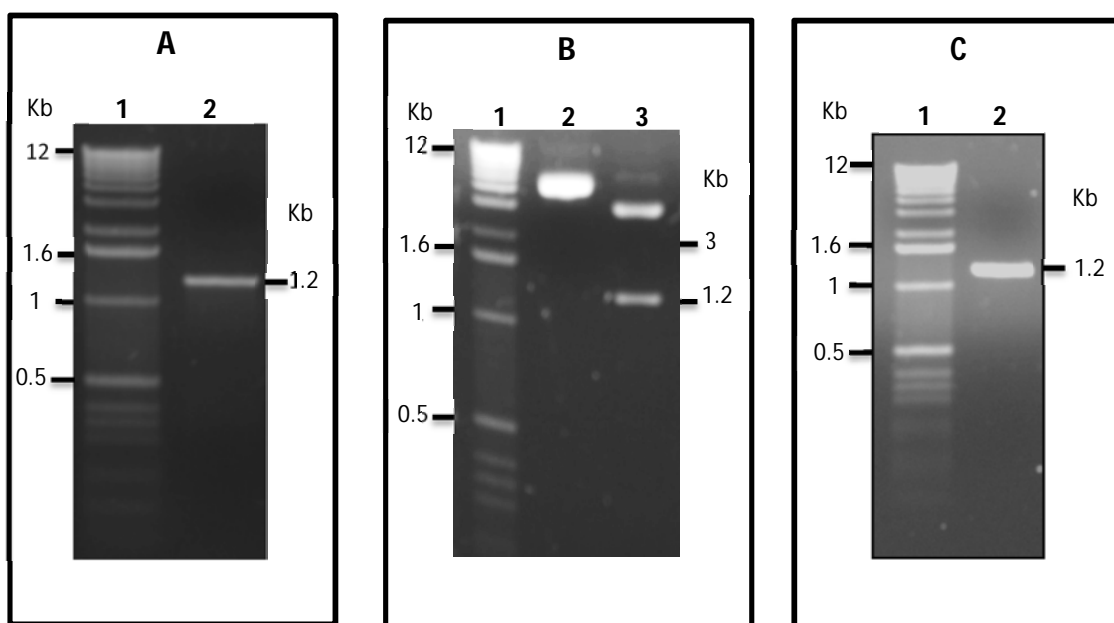


Figura 22. Amplificación y clonación del gen completo Bdp1 de *L. major*. A) Reacción de PCR para amplificar el gen, que consta de 1194 pb. B) El gen fue clonado en el vector pGEM-T Easy (carril 2) y digerido con la enzima *EcoRI* (carril 3). La banda de 3 kb corresponde al vector. C) Se muestra el inserto fue purificado. En los carriles 1 se muestra el marcador de peso molecular (escalera de 1 kb de Invitrogen).

4.4 Análisis del tamaño del mRNA de Bdp1.

Se procedió entonces a realizar un ensayo Northern-blot para conocer el tamaño de los transcritos de Bdp1 en *L. major*. Para ello se extrajo el RNA total de cultivos de promastigotes en fase media logarítmica y se corrió una alícuota de 3 μ l del RNA en un gel de agarosa al 1% para corroborar su calidad (Figura 23). Se apreciaron claramente las tres moléculas de rRNA mayores (18S, 24S α y 24S β), lo que indicó que el RNA se encontraba íntegro para usarse en ensayos Northern-blot y RT-PCR.

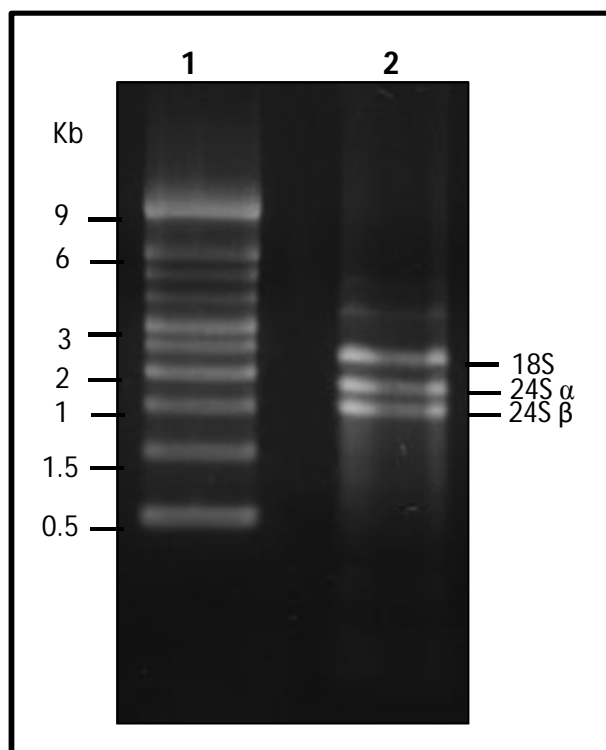


Figura 23. Perfil electroforético del RNA total de *L. major*. El carril 1 corresponde al marcador de RNA Millenium™ de 9 kb. El carril 2 corresponde a 3 μ g del RNA total, indicando del lado derecho las bandas de mayor abundancia, que corresponden a las moléculas de rRNA mayores. Gel de agarosa al 1%.

El RNA total se corrió en un gel desnaturizante de agarosa al 1% (Figura 24 A) y posteriormente se transfirió por capilaridad a una membrana de nylon. El RNA se fijó con luz UV y se hibridó con el gen de Bdp1 marcado radioactivamente. Finalmente se lavaron los filtros y se obtuvo la autorradiografía mediante la exposición en placas de rayos X (Figura 24 B). El transcrito observado tuvo un

tamaño de ~3.8 Kb, el cual es más de 3 veces mayor que el tamaño del gen (1194 pb). Esto indica que el mRNA de Bdp1 de *L. major* tiene regiones 3' y 5' UTRs grandes. Para verificar esto, se procedió a localizar los sitios de procesamiento del mRNA.

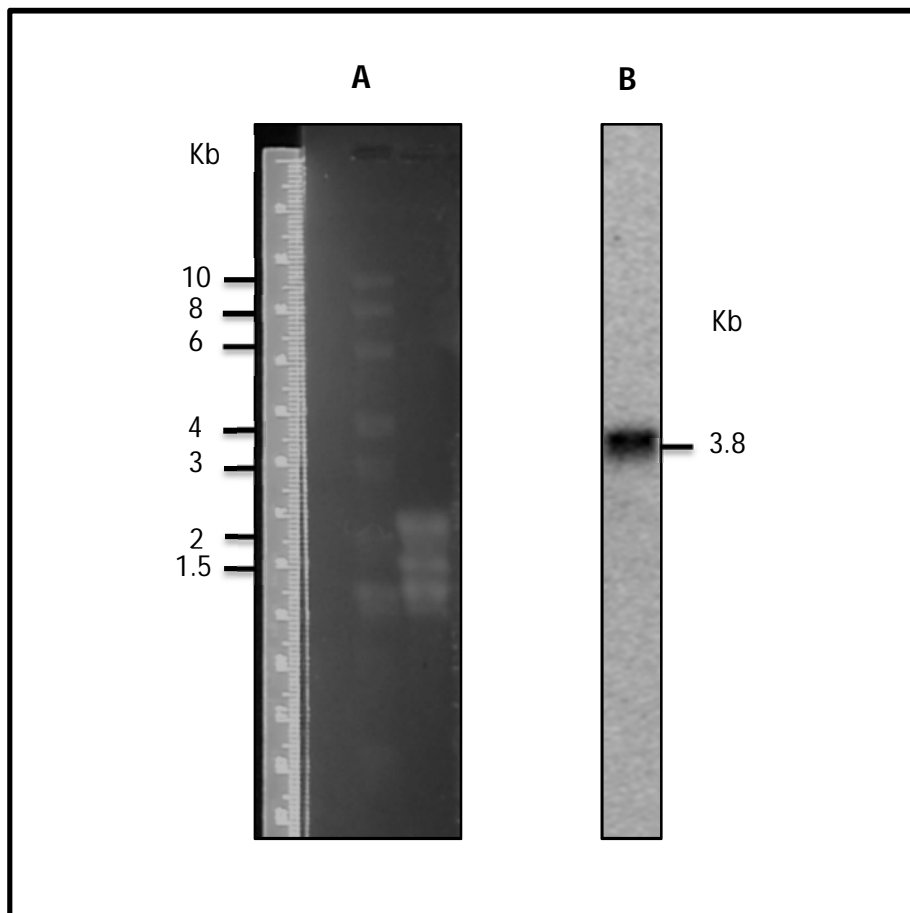


Figura 24. Análisis tipo Northern-blot de Bdp1 de *L. major*. A) Electroforesis del marcador de peso molecular de RNA de 10 Kb (carril 1) y de RNA total de *L. major* (carril 2). B) Autorradiografía del Northern-blot donde se observa el transcrito de Bdp1 de *L. major* (~3.8 Kb). La sonda correspondió al gen de Bdp1 marcado radioactivamente.

4.5 Ubicación de los sitios de procesamiento de Bdp1.

Es bien sabido que los mRNAs en tripanosomátidos dependen de un proceso posttranscripcional conocido como *trans-splicing* para su maduración, que

consiste en adicionar una secuencia de 39 nt (miniexón) en el extremo de la región 5´ UTR del mRNA. Además, en el extremo 3´ del mRNA debe agregarse una cola de poli-A, como ocurre en otros eucariontes. Para identificar los sitios específicos en donde son añadidos el miniexón y la cola de poli A, fueron analizados los transcritos de Bdp1 mediante ensayos RT-PCR con oligonucleótidos específicos. Para amplificar la región del miniexón se utilizaron los oligonucleótidos Bdp1-ME1 y Bdp1-M2. Para la región de poliadenilación se utilizaron los oligonucleótidos Bdp1-PA1 y Bdp1-PA2 (Figura 25).

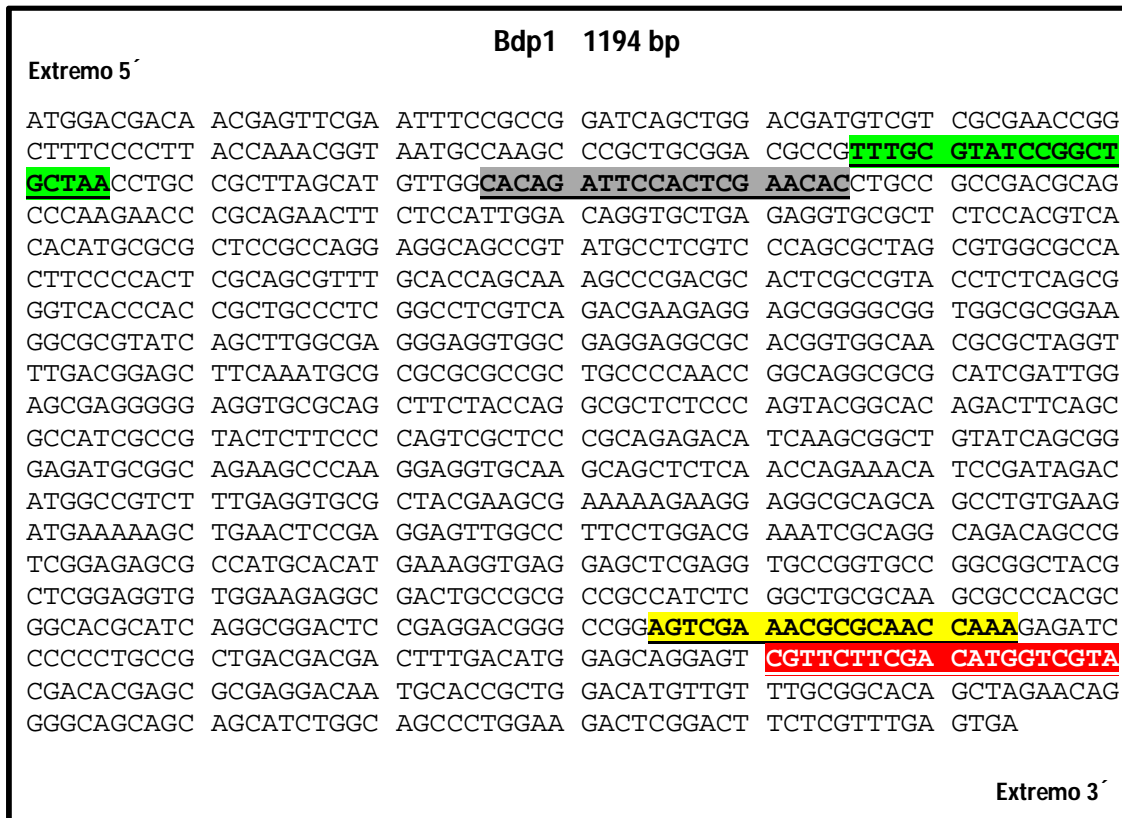


Figura 25. Secuencia de 1194 pb del gen de Bdp1 de *L. major*. El oligonucleótido Bdp1-ME1 se marca en gris, Bdp1-ME2 en color verde, Bdp1-PA1 en color amarillo y Bdp1-PA2 en color rojo.

4.6 Localización del sitio aceptor del miniexón del mRNA de Bdp1.

Para localizar el sitio aceptor del miniexón, se preparó cDNA con la enzima transcriptasa reversa y el oligonucleótido Bdp1-ME1 a partir de RNA total obtenido de un cultivo de promastigotes de *L. major* en fase media logarítmica. Después se llevó a cabo una reacción de PCR con la enzima DNA polimerasa Red Taq, usando los oligonucleótidos Bdp1-ME2 y Miniexón. Se obtuvo entonces un barrido en donde sobresalieron fragmentos de tres diferentes tamaños: ~0.6, 1 y 1.2 Kb (Figura 26).

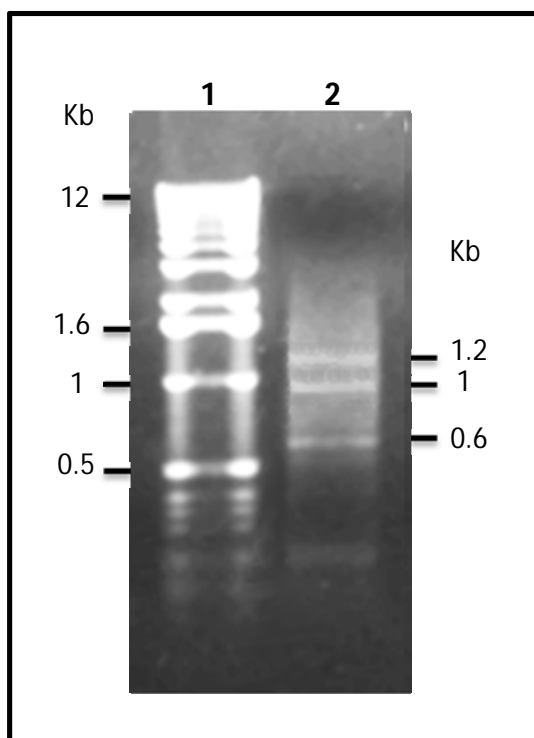


Figura 26. Amplificación de la región del miniexón de Bdp1 mediante RT-PCR. Reacción PCR con los oligonucleótido Miniexón y Bdp1-ME2 a partir de cDNA obtenido con el oligonucleótido Nested (dT) (carril 2). En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen).

Las tres bandas obtenidas (~0.6, 1 y 1.2 Kb) fueron purificadas del gel con el kit NucleoSpin Extract II y ligadas en el vector pGEM-T Easy. En la Figura 27 se muestra un gel de agarosa al 1% con alícuotas de 5 µl de las bandas purificadas.

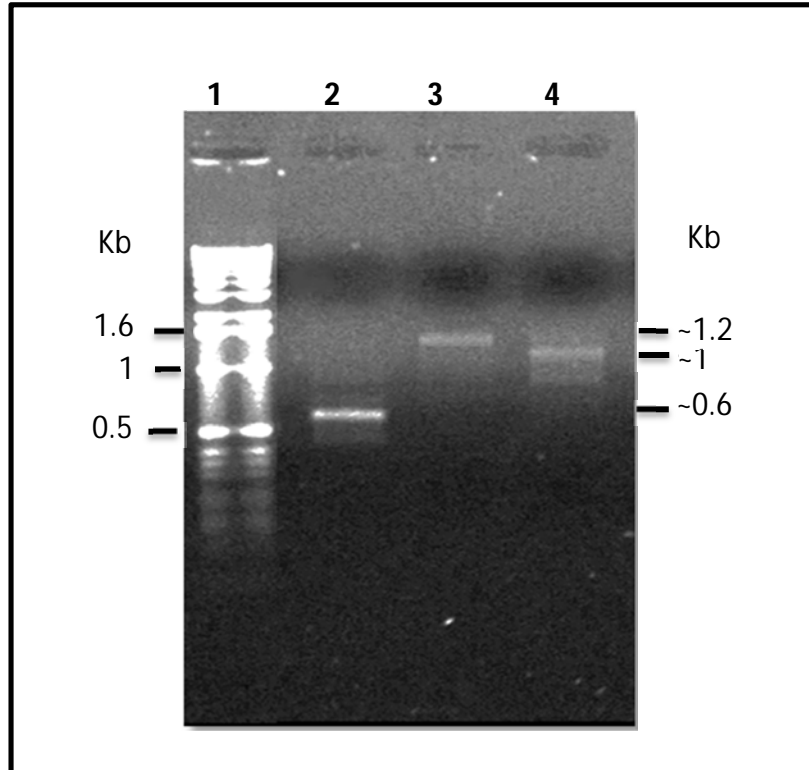


Figura 27. Purificación de los fragmentos obtenidos en el RT-PCR para la región del miniexón de Bdp1. Estos corresponden a ~0.6 Kb (carril 2), 1.2 Kb (carril 3) y 1 Kb (carril 4). El carril 1 exhibe el marcador de peso molecular de 1 Kb.

Las mezclas de ligación se transformaron en células competentes JM109 de *E.coli*. Se seleccionaron 16 colonias para la banda de 600 pb (ME1), 20 colonias para la banda de 1 Kb (ME2) y 20 colonias para la banda de 1.2 Kb (ME3). Los plásmidos se purificaron con el kit NucleoSpin Extract II, se analizaron por restricción con la enzima *EcoRI* y se corrió una alícuota en un gel de agarosa al 1%. En todos los carriles se observó una banda de 3 Kb que corresponde al vector pGEM-T Easy y bandas de los insertos clonados (Figura 28). Fueron enviadas a secuenciar varias de las clonas, pero sólo la clona ME3-C15 resultó positiva a Bdp1.

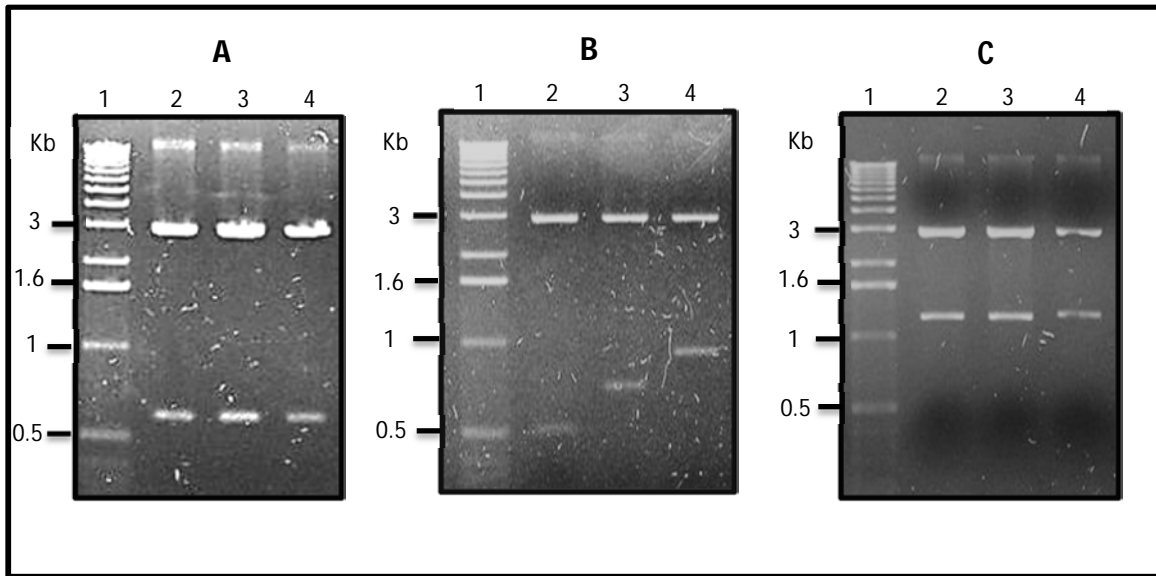


Figura 28. Análisis de restricción con *EcoRI* de clonas obtenidas para identificar el sitio aceptor del miniexón de *Bdp1*. Se corrió un alícuota en un gel de agarosa al 1% de algunas de las clonas **ME1 (A)**, **ME2 (B)** y **ME3 (C)**. Las bandas de 3 Kb constituyen al vector pGEM-T Easy. El primer carril de cada panel contiene el marcador de peso molecular de 1 Kb. A) Clonas de ME1 donde se aprecia el fragmento de ~0.6 Kb en los tres carriles. B) Clonas de ME2, donde sólo la clona del carril 4 tuvo el inserto del tamaño esperado. C) Clonas de ME3 donde se aprecian bandas mayores a 1 Kb, resultando la clona ME3-15 (carril 4) positiva a *Bdp1*.

La clona positiva para la región del miniexón fue analizada mediante comparaciones tipo BLAST en la base de datos TriTryps, donde fue reconocida como similar en un 100% a la región del cromosoma 36 de *L. major* que corresponde al gen *Bdp1*. El análisis detallado de la secuencia permitió la identificación de los oligonucleótidos usados para la amplificación, así como del codón de inicio (ATG) (Figura 29). También se detectó el resto de la secuencia del miniexón (39 nt), la cual se sombrea en gris en la misma figura. Así, la región 5'-UTR inicia al final de la secuencia del miniexón, en la base C localizada 1064 ríos arriba del ATG del gen *Bdp1* (subrayada y en negritas en la Figura 29).

```

.....
AGTGATTAAACGCTATATAAGTATCAGTTTCTGTACTTTATTGCATGCTCTTCGCGTGCGGCTGTAA
.....
TTCGCACACACTTGCTTTAGGTAGCTTGGTTTCGGTCAAAGAGAGTCACCCAACAACGAGGTGGAC
CAAGCACCCCTCACACCAGCACACGTACAAAGCAGCGCCGCGTATCGCTTGTGCGTTCACGCACGGTT
ACACGTCTTGGATTCCCCTGCAAGGAGCTCACGCGCGTACTCGAAGACGCAGACACGCACAGACAT
CGGTGCACTGTGGACGAATACAACGCCCCCTCTCTCTCTCTCGCTCTGGCGGCGTTCACTGAAGG
ACTACACCACCGACCGAGCGTCTCTATGGGTGTGTCTTGCCTAGTGGCGGACCCGAAGGGCTGA
GCCGTACGAGAACGAACAGCCTCAGCTTTGTACGTGGAGATCGTTTCTCTCTGTTGTTCCCCTCTT
CTCCTCTTTTCTCTCATTGTTGGCAACTTGCCACCGTTAGTGTGCTGTGTGTCTGTGCGCGTACG
TGCGGCTGGAGCGTCGGCCGTTGCGCTTCTCATTTTTGGTGCTCCTCCTTGTCATTGTGGTGCTGT
GGATCGTCGCGCTCTCTGCGTGTGTCTGACGTGTTGAAAGCACTTCTACTCCTTTCTCTCTCTCT
CTCTCTCGCTTCTATTATCCATCTCACCCATTCAATTGTCGCCGCGCTGGACCCCTTAATTCTTTGT
CGCTTGTGTCTTCCCTCAACTCTCTCCTACTCTCCCTCTCTCTGTAGTTGTTGCGCTGTTTCTAC
ATCAACAACCCTCCCACCCCTCTGCATCGACCCCGGCGTAGTCGCTGGGTTTGGACATCTTG
CCTCTGCTCTGAAGCTAAGGGTAGGGTGCATCCCACCAATTTCTGATTCTCGCTCTGTGTCTCCTCG
TTCTTTTCTTTTCGAGGCCGAGGGGTTCCCCACTCGTCGCCGCGCCTCACGTCCTTTCTCGACA
ACAGCTTGCTGCGGACGAGTAGGTGTTTCGCTTGCCTCTGCTCCTTTGGCGTGTGCGCGTGCGTCT
GGCATTAGCCGTCGAAGTTTCGTACACGCGGATACGCACCGGTGGAGCCATCGACGACAACGAG
TTCGAATTTCCGCCGGATCAGCTGGACGATGTCGTGCGCAACCGGCTTTCCCCTTACCAAACGGTA
ATGCCAAGCCCCTGCGGACGCCGTTTGCATATCCGGCTGCTAAAATCGAATTCGCCGCGGCCCA
TGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTCGGCCCAA TCGCAT

```

Figura 29. Secuencia nucleotídica de la clona ME3-15. En ella se encierra en un rectángulo punteado la secuencia del oligonucleótido Miniexón y se sombrea con gris la secuencia restante del miniexón. La C que corresponde al primer nucleótido de la región 5'-UTR se muestra subrayada. El cuadro negro señala el codón de inicio (ATG) del gen (subrayado). El oligonucleótido Bdp1 ME2 se señala en un rectángulo.

Al comparar la secuencia obtenida (cDNA) con la del gen de Bdp1, se encontró el dinucleótido AG en la región donde fue agregado en miniexón (Figura 30). Este AG corresponde, por lo tanto, al sitio aceptor del miniexón. También se localizaron cuatro trectos de pirimidinas a 16, 44, 70 y 119 pb río arriba del AG, los cuales tienen un tamaño de 11, 13, 11 y 24 pb, respectivamente (Figura 30). Estos trectos de pirimidinas son necesarios para que se lleve a cabo el *trans-splicing*. En conclusión, fue localizado el sitio aceptor del miniexón del mRNA de Bdp1 de *L. major* a 1064 pb del codón de inicio de la traducción. Con esto se confirma que la

región 5'-UTR del mRNA es muy larga, como lo indicó el experimento Northern-Blot.



Figura 30. Secuencia nucleotídica de la región 5' de Bdp1 de *L. major*. Se encierra en un círculo el dinucleótido AG que representa el sitio aceptor del miniexón y el codón de inicio ATG se sombrea en negro. El gen Bdp1 se subraya con una línea simple a partir del ATG. La región 5'-UTR se sombrea en gris y las cinco regiones ricas en pirimidinas se subrayan con doble línea.

4.7 Determinación de la región de poliadenilación de Bdp1.

Para localizar la región de poliadenilación del mRNA de Bdp1 se preparó cDNA con el oligonucleótido NESTED-dT a partir de RNA total obtenido de un cultivo de promastigotes de *L. major*. Posteriormente se realizó una primera reacción de PCR con la DNA polimerasa Accupol utilizando como templado el cDNA antes obtenido y los oligonucleótidos específicos Bdp1-PA1 y B1 (Figura 25). Se lograron amplificar tres bandas de ~0.5, ~0.8 y ~1.5 Kb (Figura 31 A).

Para lograr mayor especificidad se realizó una segunda reacción de PCR con los oligonucleótidos Bdp1-PA2 (Figura 25) y B2 utilizando como templado la primera reacción de PCR. Se obtuvo una banda predominante de ~1.4 Kb, la cual corresponde a lo esperado para Bdp1 (Figura 31 B). Dicha banda fue purificada y clonada en pGEM-T Easy. Varias clonas fueron analizadas por restricción (Figura 32) y enviadas a secuenciar, pero sólo una resultó positiva.

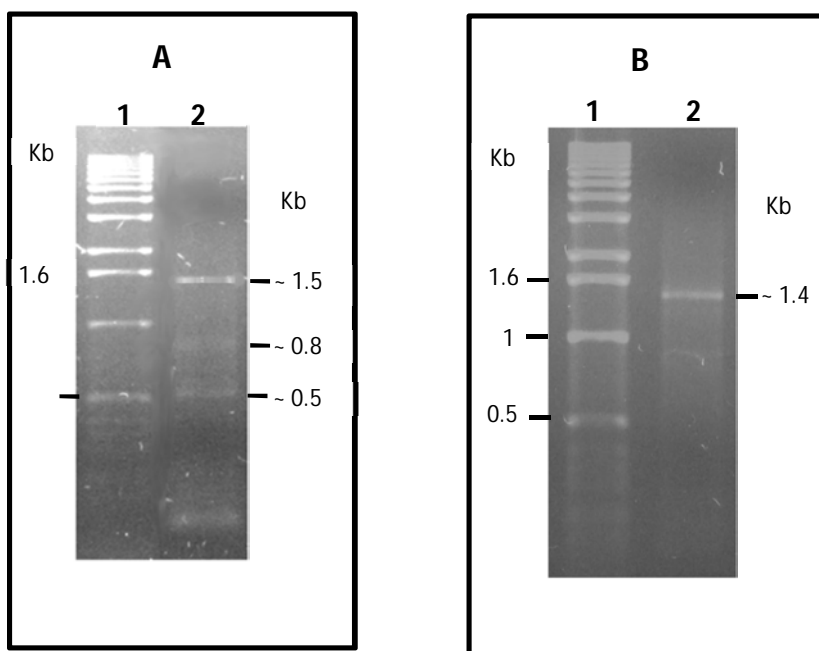


Figura 31. Amplificación y purificación de la región de poliadenilación de Bdp1 mediante RT-PCR. A) Reacción PCR con los oligonucleótidos Bdp1-PA1 y B1 logrando amplificar tres bandas de ~0.5 Kb, 0.8 Kb y 1.3 Kb. B) Reacción PCR con los oligonucleótidos Bdp1-PA2 y B2 logrando amplificar una banda predominante de ~1.4 Kb.

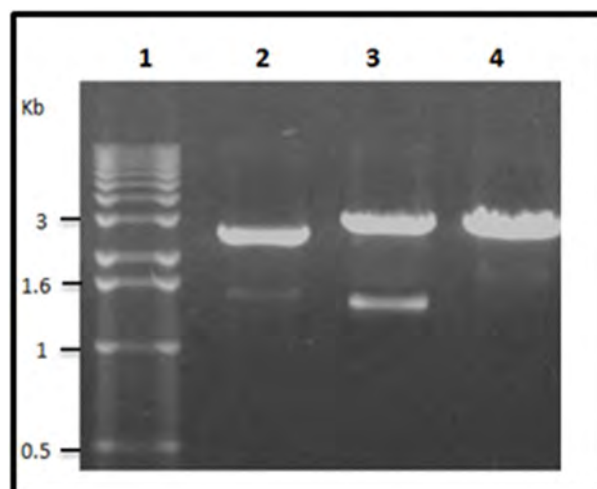


Figura 32. Análisis de restricción con *EcoRI* de clonas obtenidas para identificar la región de poliadenilación de Bdp1. Se corrió un alícuota en un gel de agarosa al 1% de algunas de las clonas. Las bandas de 3 Kb constituyen al vector pGEM-T Easy. El primer carril corresponde al marcador de peso molecular de 1 Kb. En el carril 3 se presenta la clona positiva.

De igual manera que como se analizó la clona positiva con la región del miniexón, la clona positiva para la región de poliadenilación mostró las secuencias de los oligonucleótidos Bdp1 PA 1 y 2 (en negritas en la figura 33) y la de B2 (enmarcada en la misma figura). Así, la cola de poli-A fue adicionada en una G localizada 1091 pb río abajo del codón de término (TGA), (Figura 33). Río abajo de la base donde se agregó la cola de poli A se identificaron regiones ricas en pirimidinas (datos no mostrados), las cuales se requieren para que pueda llevarse a cabo la poliadenilación.

```

GGCACGCATCAGGCGGACTCCGAGGACGGGCCGGAGTCGAAACGCGCAACCAAAGAGATC
CCCCCTGCCGCTGACGACGACTTTGACATGGAGCAGGAGTCGTTCTTCGACATGGTCGTA
CGACACGAGCGCGAGGACAATGCACCGCTGGACATGTTGTTTGCGGCACAGCTAGAACAG
GGCAGCAGCAGCATCTGGCAGCCCTGGAAGACTCGGACTTCTCGTTTGAGTGA CGGTAG
AACCAAAAAGTTCGGGAGCGACGGACTTACCTGGAGAAGAGGCGGTGGAAGCACGCGAAA
CGGAAAGGAGTGTAAATTTGTATCTCTGTGGGTGTGGGTGGAGGGATGTGGAGAGGCAA
TAGGGATGAGCCTCCTCCTTCTCTTCCCCTTCGTATGTCTCTCCTATCACCGTCTACGCG
GCTGTCGTTTCGCTTTCGCTTCTCTGTACGGCTTCGTAATCTACACTAGTGCACGTGGGG
GAGGAGGGAGGGAGTGTAGACCTGCAGTAACAGCACCGCTCATCGATGCTTCTTCTCCCT
CGCATAACGCGTTCAGTTCACGTCTCTTCCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCCCCT
CCCCCCTCCCCCCCCCACACACACCTCCGCGCCTCCTGTTTGTTGCCAGCACCTTTCC
CCCTTTTCTCTGTCTTTAAATTTGTTTACTCCCTCTCATCTTCTTGACGGTTTTCTT
CTGCGGGCCTCTTGGCCCTCCTCCCTCCGTCTCAAAGGCCTCTTCTTTCGCTGTCCGACT
TATATTGTGACCGTTGGCTCTTCCCTCCTCCTCGCTCTCATTTTCGGTTCAGTGGTTCGT
TCCAACGTGGCGGTACTGTGTTGCCGCCGTAGAGATGTTTAGTCCTCATTTTTGAGAAG
GAGTGGAGATGCCGTTCTTTACCCATGAAAGGAATGGCGGAGGGAGTCGAGGGCTAGTCT
TGCCTCTCTGCGGTCACGCACGCGCGCATCTGGCTTTCTCTTCTCCTCGGTGTGC
TTTTCGTGTGTAACCTCTGCGTCTTTCAACGGGCTGTGTGCCACCAATCTTGTCTTGTGTT
CTGGCAGTTTTTTGTTCTGCTCTCCCGTGGGTGTACCTCTTGCTTGTTTTGTCTCTCTAT
CTGCCAGTGGTGTGGAGGCGGTGATGAGTGAGCCGGTGGAGTTGTTGAGAGAGAGAGAGA
GAAACAGGCCGAGCCAGTCAGCGGCCGCTGTGCGGCCGCTGTATCATCATCTCCATGCGC
ATCGCGCCTGTGACGGTGGCGTCATCTCGCTCCTCATGGGCGGAAAGAGCCGCAGGGAAT
CGAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAATCTAGATGTGGATCCGTGAATCGAATTCGCGGCCG
CCATGGCGGCCGGGAGCCATGGGAATTTTGGGG

```

Figura 33. Secuencia nucleotídica de la clona positiva de la región de poliadenilación de Bdp1. En ella se enmarca en un rectángulo la secuencia del oligonucleótido B2 y se subrayan las adeninas correspondientes a parte de la cola de poli-A. El cuadro negro señala el codón de término (TGA) del gen (subrayado). Los oligonucleótidos Bdp1 PA 1 y 2 se muestran en negritas río arriba del TGA. La G en la que se adicionó la cola de poli-A se muestra en negritas y subrayado.

4.8 Determinación de la vida media del transcrito de Bdp1 de *L. major*.

Para determinar de manera preliminar la vida media del mRNA de Bdp1 en cultivos creciendo activamente (en fase media logarítmica) y en cultivos que han dejado de crecer (en fase estacionaria) se llevaron a cabo ensayos Northern-blot, usando células creciendo en medio de cultivo con actinomicina D, el cual es un inhibidor de la transcripción. Así, cultivos de promastigotes procíclicos de *L. major* en fase media logarítmica y estacionaria se trataron con el fármaco actinomicina D para bloquear la transcripción a distintos tiempos: 1, 2, 4, 8 y 16 h. A cada tiempo se extrajo el RNA total y se corrió en un gel de agarosa. El RNA del gel se transfirió a una membrana de nylon para posteriormente hibridar con el gen Bdp1 marcado radioactivamente y así determinar la abundancia y la vida media del mRNA de Bdp1. Se utilizó como control una muestra de RNA extraída después de incubar un cultivo por 2 horas con DMSO, que es el compuesto en el que se preparó la actinomicina D (muestra C2). En la Figura 34 A se muestra del lado izquierdo el resultado obtenido con células en fase media logarítmica y de lado derecho se muestra el resultado con células en fase estacionaria. Como control de carga, las membranas fueron rehibridadas con el gen del rRNA 18S marcado radioactivamente. Como puede observarse en la Figura 34 B, la señal fue muy similar en todos los carriles, indicando que en todos los casos se utilizó la misma cantidad de RNA.

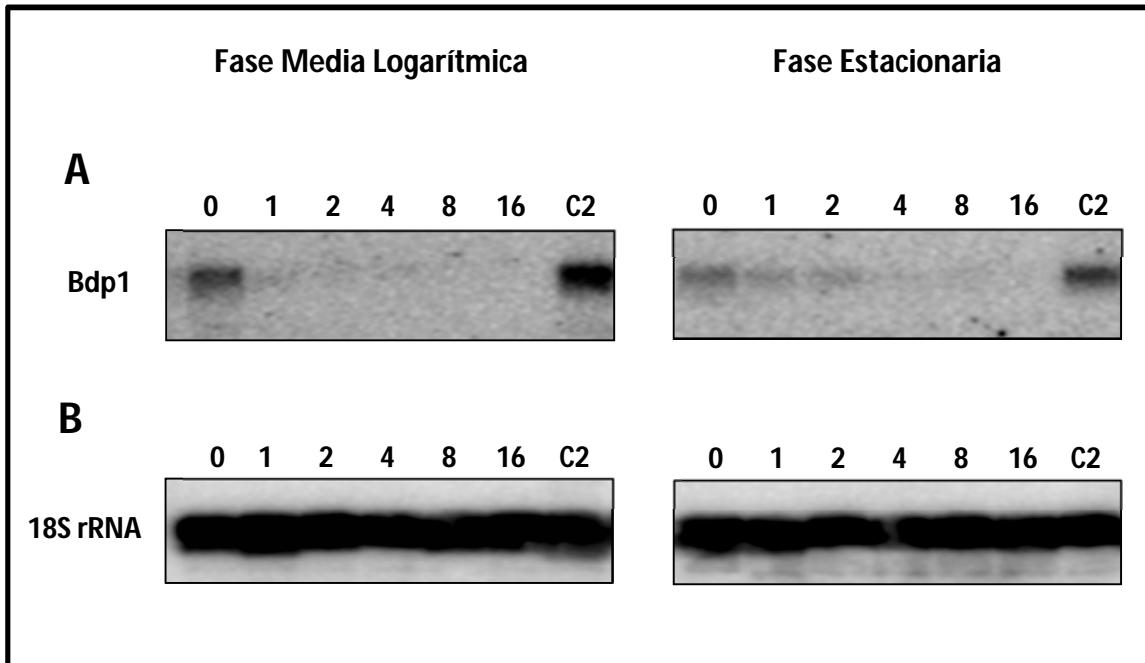


Figura 34. Cinética de decaimiento del mRNA de Bdp1. (A) Northern-blot con RNA total aislado de cultivos crecidos a distintos tiempos con actinomicina D (0, 1, 2, 4, 8 y 16 horas) en fase media logarítmica (panel de la izquierda) y fase estacionaria (panel de la derecha), donde se usó el gen Bdp1 como sonda. (B) Las membranas mostradas en el panel A fueron rehibridadas con una sonda correspondiente al 18S rRNA, como control de carga de RNA. Se utilizó también como control una muestra de RNA extraída después de incubar un cultivo por 2 horas con DMSO, que es el compuesto en el que se preparó la actinomicina D (carril C2); aquí se demuestra que el DMSO no afecta la abundancia del mRNA de Bdp1.

Para la determinación de la vida media del transcrito de Bdp1 de *L. major* se llevó a cabo la cuantificación de la intensidad de cada banda utilizando el programa Multi Gauge 6.0. La señal obtenida en el tiempo 0 fue considerada como el 100%. Se comparó dicha señal con la obtenida a los distintos tiempos después de la adición de actinomicina D. Se graficaron los datos para establecer el tiempo en el que la abundancia del transcrito se redujo a la mitad (Figura 35). De esta manera se determinó que la vida media del mRNA de Bdp1 para la fase media

logarítmica es de ~50 min, mientras que en fase estacionaria es de ~2 horas (Figura 35). Esto indica que el mRNA de Bdp1 se estabiliza durante la fase estacionaria.

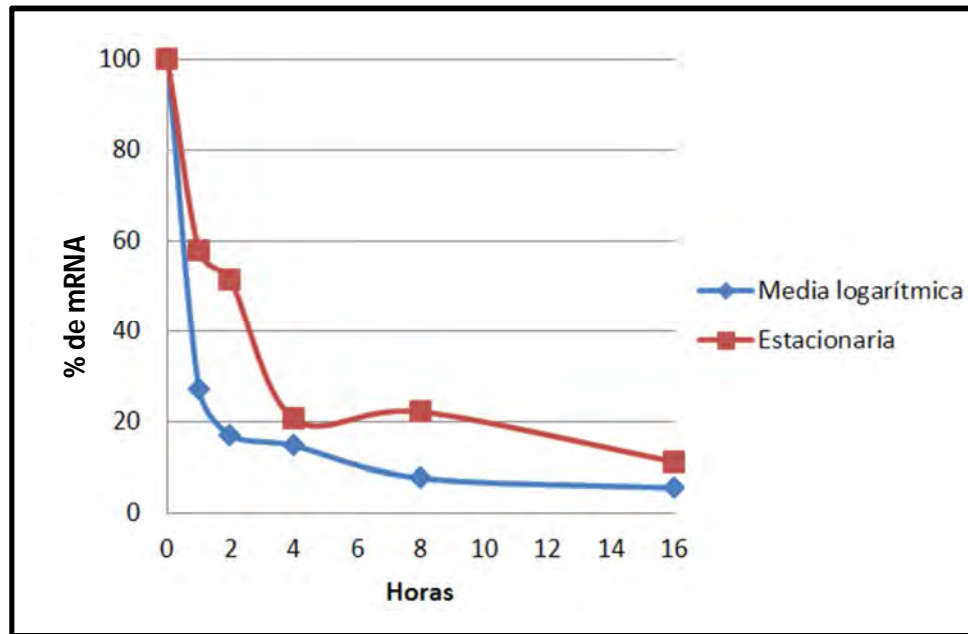


Figura 35. Gráfica de la vida media del mRNA de Bdp1 de *L. major*. Las bandas obtenidas en el Northern-blot de la figura 34 fueron cuantificadas. La señal obtenida en el tiempo 0 fue considerada como el 100%. Se comparó dicha señal con la obtenida a los distintos tiempos después de la adición de actinomicina D. La línea azul representa la fase media logarítmica y la roja la fase estacionaria. Se observa que la vida media del mRNA de Bdp1 en fase media logarítmica es menor a una hora, mientras que en fase estacionaria es de ~ 2 h.

Para poder comparar el resultado preliminar de la vida media del mRNA de Bdp1 con la de otros componentes de la maquinaria transcripcional de Pol III, se decidió analizar la vida media del mRNA de C160, que es la subunidad mayor de Pol III. Para ello se realizaron ensayos similares a los descritos para Bdp1. El análisis de los resultados (Figuras 36 y 37) reveló que la vida media del mRNA de C160 es de ~1 h en fase media y de ~2 h en fase estacionaria. Esto es, la vida media del mRNA de Bdp1 (subunidad de TFIIB) es muy similar a la del mRNA de

C160 (subunidad de Pol III), tanto en fase media como en fase estacionaria. Esto sugiere que la estabilidad y abundancia de los mRNAs de las proteínas involucradas en la transcripción de Pol III se regula de manera muy parecida en *L. major*.

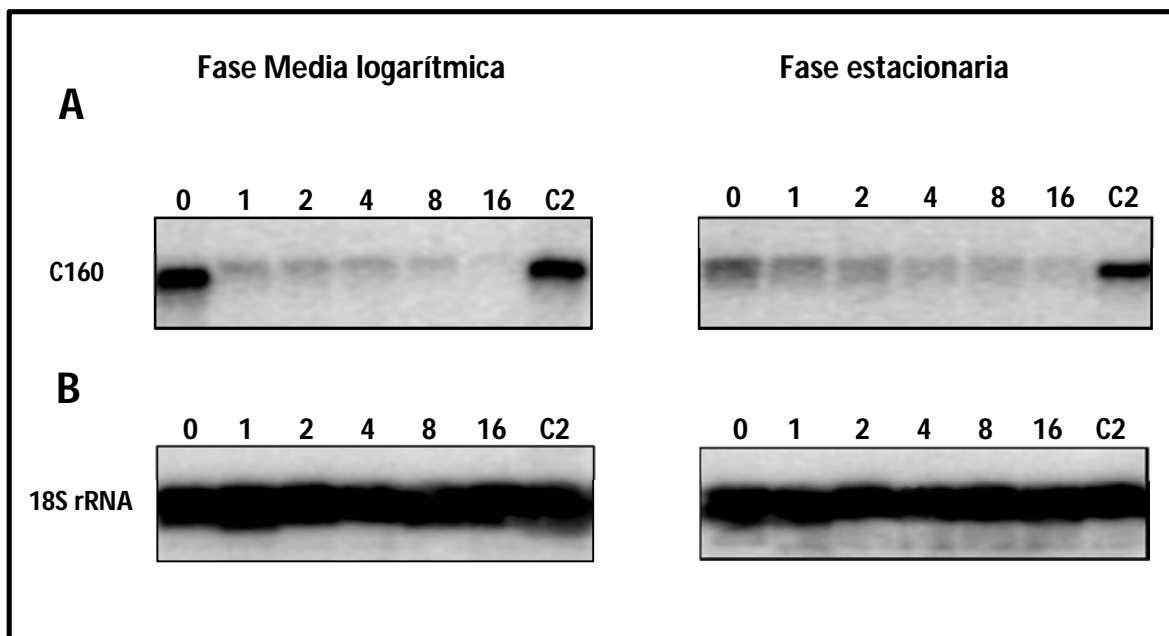


Figura 36. Cinética de decaimiento del mRNA de C160. (A) Northern-blot con RNA total aislado de cultivos crecidos a distintos tiempos con actinomicina D (0, 1, 2, 4, 8 y 16 h) en fase media logarítmica (panel de la izquierda) y fase estacionaria (panel de la derecha), donde se usó parte del gen de C160 como sonda. (B) Las membranas mostradas en el panel A fueron rehibridadas con una sonda correspondiente al 18S rRNA, como control de carga de RNA. Se utilizó también como control una muestra de RNA extraída después de incubar un cultivo por 2 horas con DMSO, que es el compuesto en el que se preparó la actinomicina D (carril C2); aquí se demuestra que el DMSO no afecta la abundancia del mRNA de C160.

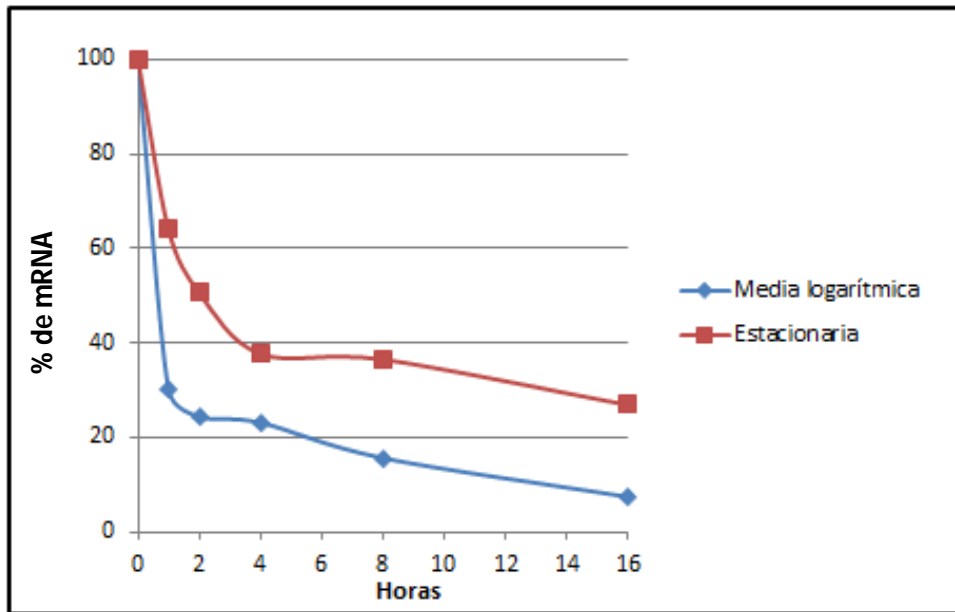


Figura 37. Gráfica de la vida media del mRNA de C-160 de *L. major*. Las bandas obtenidas en el Northern-blot de la figura 36 fueron cuantificadas. La señal obtenida en el tiempo 0 fue considerada como el 100%. Se comparó dicha señal con la obtenida a los distintos tiempos después de la adición de actinomicina D. La línea azul representa la fase media logarítmica y la roja la fase estacionaria. Se observa que la vida media del mRNA de C160 en fase media logarítmica es menor a una hora, mientras que en fase estacionaria es de ~ 2 h.

5. DISCUSIÓN.

Bdp1 corresponde a una de las tres subunidades que conforman al factor de transcripción TFIIIB y resulta esencial para el correcto reclutamiento e inicio de la transcripción de la RNA polimerasa III, tanto en eucariontes inferiores como en superiores (Geiduschek y Kassavetis, 2001; Teichmann y Seifart, 1995; Tsihlis y Grove, 2006). Esta proteína se caracteriza por poseer un dominio de ~ 50 aminoácidos, conocido como SANT (Aasland, 1996). La primera observación obtenida al realizar los alineamientos de secuencias de Bdp1, fue que existe una considerable divergencia de la proteína, asociada a las distancias evolutivas de los organismos en el árbol filogenético. Se usaron como ejemplos representativos especies estrechamente relacionadas como *H. sapiens* y *M. musculus*, quienes presentaron el porcentaje de identidad más alto (53%), y especies no tan cercanas como *H. sapiens* y *S. pombe*, quienes exhibieron uno de los porcentajes de identidad más bajos (3%) (Tabla VI). Así, parece ser que el gen de Bdp1 ha estado sometido a constantes mutaciones en el transcurso de la evolución de las especies de eucariontes. Aunque en todas las especies Bdp1 parece participar en la transcripción de Pol III, en algunas especies podría llevar a cabo otras funciones adicionales (Mahmood *et al.*, 1999). De hecho, Bdp1 se ha involucrado en la remodelación de la cromatina en algunos eucariontes superiores (Boyer *et al.*, 2006).

Como era de esperarse, el dominio SANT mantuvo un porcentaje de identidad alto entre las especies aquí analizadas, incluso del 100% entre *H. sapiens* y *M. musculus*, y del 42% entre *H. sapiens* y *S. pombe* (Tabla VII). Estos datos reflejan que el dominio SANT constituye una región esencial para la proteína Bdp1, pues se ha conservado desde eucariontes inferiores hasta

superiores, cumpliendo, hasta donde se sabe, con la función de estabilizar el complejo TFIIIB y reclutar a la RNA polimerasa III (Kassavetis *et al.*, 2006). Sin embargo, también hay que considerar que las regiones aledañas al dominio SANT permiten el correcto plegamiento de la proteína, favoreciendo así las interacciones con las moléculas correctas (Kapler *et al.*, 1987). La conservación del dominio SANT fue menos evidente entre especies alejadas evolutivamente, como en el caso de *L. major* y *A. thaliana* que presentaron 32% de identidad. No obstante, dicho dominio exhibió el mismo patrón de hidrofobicidad en todas las especies (Figura 18), lo que podría indicar que comparte la misma clase de interacciones con otras moléculas en distintos organismos, debido principalmente a las cargas de sus aminoácidos. Esto se sugiere al realizar un alineamiento del dominio SANT de *S. cerevisiae* y *L. major*, retomando que en el primero ya se han documentado las interacciones que tiene con Brf1, otra subunidad de TFIIIB. Dicho alineamiento mostró que la mayoría de los aminoácidos presentes en el motivo proteico entre estas dos especies varían (38% de identidad), aunque son predominantemente hidrofóbicos; sin embargo, los aminoácidos con interacción a Brf1 en *S. cerevisiae* resultaron ser de carga positiva (Saïda, 2008). Los aminoácidos análogos en el dominio SANT de *L. major* conservaron dicha carga, lo que podría sugerir que aunque el dominio sea predominantemente hidrofóbico y muestre variaciones entre especies, los aminoácidos que tienen interacción con otros aminoácidos o incluso con el DNA poseen carga positiva (Grune *et al.*, 2003). Esto concuerda con lo reportado por Kassavetis *et al.*, (2006), donde se establece que la hélices dos y tres del dominio SANT de Bdp1 en *S. cerevisiae* tienen interacción con el DNA.

La secuenciación de los genomas de los parásitos *Trityps* (*L. major*, *T. cruzi* y *T. brucei*) comenzó a inicios de los 90s (El-Sayed *et al.*, 2005). En 1996 se publicó un primer análisis de mRNAs de bibliotecas de cDNA de promastigotes de *L. major* (Levick *et al.*, 1996) y en 1999 se publicó la secuencia completa del cromosoma 1 de *L. major*, revelándose que poseía una distribución policistrónica inusual de los genes codificadores de proteínas, que resulta ser reminiscente de los operones de bacterias (Myler *et al.*, 1999). La secuencia del genoma completa

de *L. major* se publicó en el 2005 (Ivens *et al.*, 2005), gracias a lo cual hoy en día se pueden llevar a cabo análisis bioinformáticos en busca de genes y de sus probables dominios funcionales, así como de homologías a lo largo del genoma de la misma especie o en otros genomas ya secuenciados.

El análisis *in silico* mostró que el gen de Bdp1 en *L. major* es de copia única y se ubica cerca de la región subteloamérica del cromosoma 36, en la cadena negativa del DNA, como se logra apreciar en la figura 17. Bdp1 codifica para la segunda subunidad más grande de TFIIB (con un tamaño de 397 aa en *L. major*), después de Brf1 (703 aa). TBP por su lado, corresponde a la subunidad más pequeña de TFIIB, con 293 aa en *L. major* (www.NCBI.com). La conservación en el orden del gen de Bdp1 y genes flanqueantes en el cromosoma 36 fue muy clara entre las especies del subgénero *Leishmania* analizadas (*L. major*, *L. infantum*, *L. mexicana* y *L. tarentolae*). Al comparar con *L. braziliensis*, que pertenece al subgénero *Viannia*, se observó de igual manera la sintenia, aunque también se observó una mayor divergencia en la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de Bdp1 con relación a las otras especies de *Leishmania* (tabla VIII). Esto concuerda con la posición filogenética que presenta *L. braziliensis* en relación a otras especies de *Leishmania* (Lye *et al.*, 2010; Peacock *et al.*, 2007). Además, Bdp1 se ubicó en el cromosoma 35 de *L. braziliensis*, pero esto debido a que en su genoma se redujo el número cromosómico debido a una fusión entre los cromosomas 20 y 34 (Rogers *et al.*, 2011).

La región que contiene el gen de Bdp1 también resultó ser altamente sinténica entre *Leishmania*, *T. cruzi* y *T. brucei*, a pesar de que algunos genes se perdieron en los tripanosomas (Figura 19). Asimismo, el porcentaje de identidad de la proteína fue menor del 50% al comparar *L. major* y *T. brucei*. Esto concuerda con los resultados de análisis filogenéticos basados en el rRNA 18S, que establecen que *T. brucei* ha sufrido una divergencia independiente a otras

especies de tripanosomátidos, presentando patrones evolutivos únicos debido a su confinamiento en el continente africano (Stevens *et al.*, 1999). A pesar de estas diferencias entre *Leishmania* y *Trypanosoma*, la conservación del orden génico de Bdp1 no resultó extraña, ya que estudios han revelado una alta tasa de preservación sinténica de un gran grupo de genes (~ 6,200) en *L. major*, *T. cruzi* y *T. brucei*, conocidos como genes *core*, que fueron identificados por la secuenciación de sus genomas en el 2005 (Berriman *et al.*, 2005; Ivens *et al.*, 2005). También se han encontrado mas de 1000 genes que han resultado ser específicos entre especies del género *Leishmania* (Peacock *et al.*, 2007). Uno de estos genes es el que codifica para la glicoproteína del tipo endo-1-like (llamado LmjF36.6540 en *L. major*), el cual se perdió en especies del género *Trypanosoma*, como puede apreciarse en el mapa de sintenia de Bdp1 (Figura 19).

En la secuencia completa de la proteína de Bdp1 de *L. major* y otros tripanosomátidos se identificó el dominio SANT (Figura 20). Se observó prácticamente un 100% de identidad de este dominio entre las distintas especies de *Leishmania*, presentando un arreglo de tres alfas hélices, lo que coincide con lo reportado para otros eucariontes (Aasland, 1996; Boyer *et al.*, 2004). La conservación del dominio SANT no es sorprendente, considerando que las funciones de Bdp1 radican principalmente en este dominio. Así, el dominio SANT se ha asociado a interacciones proteína-DNA y proteína-proteína, e incluso con la remodelación de la cromatina en eucariontes superiores (Boyer *et al.*, 2004). Resulta muy interesante que Bdp1, aunque exhiba variaciones hasta de un 97% desde *S. cerevisiae* hasta a *H. sapiens*, comparta la misma importancia en el reclutamiento de la RNA Pol III (Kassavetis *et al.*, 2006). Con base a lo estudiado en *S. cerevisiae* y *H. sapiens*, el dominio SANT en *L. major* podría ser la región de Bdp1 que tiene mayor nivel de acción para la estabilización del complejo de TFIIIB, interactuando con el DNA e incluso con alguna otra proteína, pudiendo ser las otras subunidades conformadoras de TFIIIB (Brf1 y TBP). No se descarta la

posibilidad de que Bpp1 participe también en remodelación de la cromatina en *L. major*.

Utilizando cultivos de promastigotes de *L. major* en fase media logarítmica y estacionaria que habían crecido a distintos tiempos (0, 1, 2, 4, 8 y 16 h) en presencia del fármaco actinomicina D, se realizó un ensayo tipo Northern-blot, usando al gen Bdp1 marcado radioactivamente como sonda. Esto con el objeto de determinar el tamaño y la vida media de su transcrito en ambas condiciones de crecimiento celular. Como resultado se detectó que el mRNA maduro de Bdp1 tiene un tamaño de ~3.8 Kb, tanto en fase media logarítmica como en estacionaria, sugiriendo que el procesamiento de los mRNAs en ambas fases no presenta diferencias. De manera interesante, el estudio preliminar de la vida media del transcrito de Bdp1 en fase estacionaria fue mayor (2 horas) que en la fase media logarítmica (menos de 1 hora). Asimismo, encontramos que los transcritos de C160, la subunidad mayor de la RNA Pol III, mostraron una vida media menor a una hora en fase media logarítmica y de 2 horas en la fase estacionaria. Resultados similares fueron obtenidos al analizar la vida media de los mRNAs de cuatro genes de mantenimiento en epimastigotes de *T. cruzi*: actina, proteína ribosomal S4, trifosfato isomerasa y tripanotión reductasa (Cevallos *et al.*, 2005). La vida media de estos mRNAs fue entre 3 y 7 veces mayor en fase estacionaria que en fase logarítmica. Cabe señalar que los epimastigotes pueden permanecer en fase estacionaria por períodos largos de tiempo, aunque se desconocen los mecanismos que les permiten sobrevivir. Después de un tiempo, los epimastigotes de fase estacionaria se transforman en tripomastigotes metacíclicos, que es un estadio no replicativo de *T. cruzi*. Se ha propuesto que los epimastigotes de fase estacionaria presentan un mecanismo de regulación global que podría proteger a los transcritos de la degradación, como una estrategia que les permitiera sobrevivir por periodos largos antes del proceso de diferenciación (Cevallos *et al.*, 2003; Cevallos *et al.*, 2005). Nuestros resultados de la vida media de Bdp1 y C128 sugieren que los promastigotes de *L. major* podrían presentar un mecanismo similar, considerando que los promastigotes procíclicos de fase

estacionaria pueden sobrevivir por períodos largos de tiempo antes de diferenciarse a promastigotes metacíclicos.

A través de ensayos RT-PCR se lograron obtener clonas de cDNA para localizar los sitios de procesamiento de Bdp1 en *L. major*. La secuenciación de dichas clonas permitió identificar al sitio aceptor de minexón, el dinucleótido AG, a 1064 pb del codón de inicio (ATG) del gen de Bdp1. Este dinucleótido está altamente conservado en prácticamente todos los genes de *Leishmania* y otros tripanosomátidos (Requena *et al.*, 2003) y también se ha reportado como semejante a la secuencia consenso para el *cis-splicing* en intrones de mamífero (Curotto de Lafaille *et al.*, 1992). Al comparar la secuencia que rodea al sitio aceptor del miniexón (de las bases -12 a +5) con una probable secuencia consenso para *L. major* previamente reportada (Requena *et at.*, 2003), se observó que existe identidad en cuatro de los 17 nucleótidos: la C ubicada a -8, la A ubicada a +2 y el di nucleótido AG ubicado a -2 y -1, respectivamente (Figura 38). Con esto se reitera la importancia del AG para la adición del miniexón.

	-12	-11	-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	+1	+2	+3	+4	+5
Bdp1	A	T	G	T	C	T	G	T	C	A	A	G	C	A	T	G	C
Sec. Cons.	C	C	N	C	C	C	N	C	N	C	A	G	N	A	N	C/T	N
					★						★	★		★			

Figura 38. Comparación de la región que rodea al sitio aceptor del miniexón de Bdp1 y una secuencia consenso para *L. major*. Se compara de las bases -12 a +5, considerando AG (dentro del recuadro) como posición -2 y -1, respectivamente. La letra N indica que puede tratarse de cualquiera de las bases. Las estrellas señalan los nucleótidos conservados.

Además se localizaron cuatro trectos de pirimidinas a 18, 46, 72 y 121 pb rio arriba del AG, abarcando tamaños de 11, 13, 11 y 24 pb, respectivamente (Figura 30). Éstos trectos resultan esenciales para un correcto procesamiento, como lo reportado por Huang y Van de Ploeg en 1991, donde la eficiencia del

trans splicing de la proteína PARP en *T. brucei* mostró ser extremadamente sensible a los cambios en secuencia y longitud de los trectos de polipirimidinas. Un estudio realizado en *L. chagasi* demostró que para la máxima eficiencia del proceso de *trans splicing* se requiere de la presencia de un tracto de pirimidinas de entre 31 y 69 nucleótidos río arriba del sitio aceptor del miniexón (Stiles *et al.*, 1999). Otros estudios han reportado trectos de pirimidinas con longitudes de 9 a 30 residuos a distancias variables del AG (Requena *et al.*, 2003).








Nuestros resultados también demostraron que la cola de poli-A se adiciona 1091 pb río abajo del codón de término de Bdp1. Regiones ricas en pirimidinas fueron identificadas río abajo de la región de poliadenilación, las cuales son también necesarias para este proceso. La cola de poli-A incrementa la estabilidad del mRNA y permite controlar los niveles de expresión génica durante el desarrollo del parásito (Palenchar y Bellofatto, 2006). Así, la región 3'-UTR del mRNA de bdp1 en *L. major* es muy larga. Las regiones 3'-UTR de los tripanosomátidos son muy importantes, pues contienen secuencias que controlan la estabilidad y abundancia de los mRNAs. Además, están involucradas en el control de la expresión estadio-específica.

Se conoce muy poco sobre los tamaños de las regiones UTR en *Leishmania*, pero en *T. brucei* se han reportado tamaños desde 7 pb (en el gen de la proteína ribosomal S16) hasta 1030 pb (en una proteína hipotética) (Benz *et al.*, 2005). Sin embargo la mayoría suelen tener un tamaño de 300 pb, con un promedio de 68 pb. De esta manera, resultan muy extensas las regiones 5'-UTR (1064 pb) y 3'-UTR (1102 pb) del mRNA de Bdp1 en *L. major*. Esto sugiere que el mRNA de Bdp1 se somete a algún tipo de regulación post-transcripcional mediada por secuencias presentes en las regiones UTR, las cuales suelen presentar dominios de interacción a proteínas (Boucher *et al.*, 2004). Análisis de secuenciación de los mRNAs de C160 y C128, las subunidades más grandes de la RNA Pol III, indican que sus regiones 5'-UTR tienen un tamaño menor, de 536 y

38 pb, respectivamente. Las regiones 3'-UTR tiene un tamaño de 46-136 pb en C128 y de 136-323 pb en C160.

Trabajos futuros nos permitirían determinar el papel específico que lleva a cabo Bdp1 en la transcripción de la RNA polimerasa III de *L. major* y otros tripanosomátidos. Debido a que muchos de los mecanismos de expresión presentes en estos parásitos son diferentes a los que tienen otros organismos eucariontes, no sería sorprendente que el factor de transcripción TFIIIB posea características atípicas. Esta hipótesis es apoyada por el hecho de que los factores de transcripción TFIIIA y TFIIIC, que interaccionan con TFIIIB y están presentes en todos los organismos estudiados hasta hoy, no han sido identificados en tripanosomátidos.

6. CONCLUSIONES Y LOGROS.

-  La secuencia predicha de aminoácidos Bdp1 de *L. major* contiene el dominio SANT, presente tanto en especies de eucariontes inferiores como en superiores, incluyendo a *H. sapiens*.
-  Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de Bdp1 de *L. major* presentan poca similitud con secuencias homólogas de otros organismos.
-  El locus de Bdp1 es altamente sinténico entre especies de tripanosomátidos pertenecientes al género *Leishmania* y *Trypanosoma*.
-  El gen completo de Bdp1 de *L. major* fue clonado en el vector pGEM-T Easy.
-  El mRNA de Bdp1 de *L. major* tiene un tamaño de ~ 3.8 Kb. Dicho tamaño es grande, considerando que el gen consta de 1192 pb.
-  Los sitios de procesamiento del transcrito de Bdp1 fueron identificados, ubicándose el sitio aceptor del miniexón (AG) a 1064 pb río arriba del codón de inicio del gen (ATG) y el sitio de poliadenilación a 1091 pb río abajo del codón de término del gen (TGA). Esto indica que las regiones no traducidas del mRNA de Bdp1 son muy grandes.
-  Se identificaron regiones ricas en pirimidinas río abajo de la región de poliadenilación y río arriba del sitio aceptor del miniexón, las cuales podrían ser necesarias para el *trans-splicing* y poliadenilación.



Se obtuvo un preliminar de la vida media del transcrito de Bdp1 que fue mayor en fase estacionaria (~2 h) que en fase media logarítmica (>1 h). Un resultado similar se obtuvo para C160. Esto sugiere que los promastigotes procíclicos de fase estacionaria presentan, como se ha reportado en *T. cruzi*, un mecanismo de regulación global que podría proteger a los transcritos de la degradación, como una estrategia que les permitiría sobrevivir por periodos largos antes de diferenciarse a promastigotes metacíclicos.

7. REFERENCIAS

Aasland, R., Stewart, A.F., y Gibson, T. (1996). The SANT domain: a putative DNA-binding domain in the SWI-SNF and ADA complexes, the transcriptional co-repressor N-CoR and TFIIIB. *Trends Biochem Sci* 21, 87-88.

Adl, S.M., Leander, B.S., Simpson, A.G., Archibald, J.M., Anderson, O.R., Bass, D., Bowser, S.S., Brugerolle, G., Farmer, M.A., Karpov, S., *et al.* (2007). Diversity, nomenclature, and taxonomy of protists. *Syst Biol* 56, 684-689.

Adl, S.M., Simpson, A.G., Farmer, M.A., Andersen, R.A., Anderson, O.R., Barta, J.R., Bowser, S.S., Brugerolle, G., Fensome, R.A., Fredericq, S., *et al.* (2005). The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol* 52, 399-451.

Ampuero, V.J. (2000). Leishmaniasis. In *Medica, Magíster en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias* (Universidad de Brasília, Brasil).

Andrau, J.C., Sentenac, A., y Werner, M. (1999). Mutagenesis of yeast TFIIIB70 reveals C-terminal residues critical for interaction with TBP and C34. *J Mol Biol* 288, 511-520.

Ardelli, B.F., Witt, J.D., y Woo, P.T. (2000). Identification of glycosomes and metabolic end products in pathogenic and nonpathogenic strains of *Cryptobia salmositica* *Dis Aquat Organ* 42, 41-51.

Balmer, O., Beadell, J.S., Gibson, W., y Caccone, A. (2011). Phylogeography and Taxonomy of *Trypanosoma brucei*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5.

Barry, D. (2007). *Trypanosomes: After The Genome*.

Bates, P.A. (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol* 37, 1097-1106.

Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renaud, H., Bartholomeu, D.C., Lennard, N.J., Caler, E., Hamlin, N.E., Haas, B., *et al.* (2005). The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* 309, 416-422.

Boucher, N., McNicoll, F., Laverdiere, M., Rochette, A., Chou, M.N., y Papadopoulou, B. (2004). The ribosomal RNA gene promoter and adjacent cis-acting DNA sequences govern plasmid DNA partitioning and stable inheritance in the parasitic protozoan *Leishmania*. *Nucleic Acids Res* 32, 2925-2936.

Boyer, L.A., Langer, M.R., Crowley, K.A., Tan, S., Denu, J.M., y Peterson, C.L. (2002). Essential role for the SANT domain in the functioning of multiple chromatin remodeling enzymes. *Mol Cell* 10, 935-942.

Boyer, L.A., Latek, R.R., y Peterson, C.L. (2004). The SANT domain: a unique histone-tail-binding module? *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 158-163.

Cevallos, A., Lopez, V.I., Espinosa, N., Herrera, J., y Hernández, R. (2003). *Trypanosoma cruzi*: allelic comparisons of the actin genes and analysis of their transcripts. *Experimental Parasitology* 103, 23-43.

Cevallos, A.M., Perez-Escobar, M., Espinosa, N., Herrera, J., Lopez-Villasenor, I., y Hernandez, R. (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.

Clayton, C.E. (2002). Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *The EMBO Journal* 21, 1881-1888.

Córdova, U.C., Albertos, A.N., Andrade, N.F., y Canto, L.S. (1993). Leishmaniasis: estudio epidemiológico preliminar en una localidad de la zona endémica del estado de Tabasco. *Salud Publica Mexicana* 35, 345-350.

CONDOR, the database of COnserved Non-coDing_Orthologous Regions.condor.nimr.mrc.ac.uk

Curotto de Lafaille, M.A., Laban, A., y Wirth, D.F. (1992). Gene expression in *Leishmania*: analysis of essential 5' DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 2703-2707.

Challbergj, S.S., y Englund, P.T. (1980). Heterogeneity of Minicircles in Kinetoplast DNA of *Leishmania tarentolae*. *Journal of Molecular Biology* 138, 447-472.

Debrabant, A., y Nakhasi, H. (2003). Programmed cell death in trypanosomatids: is it an altruistic mechanism for survival of the fittest? *Kinetoplastid Biology and Disease* 2, 1-2.

Dedet, P.J., y Francine, P. (2005). *Leishmania, Trypanosoma* and Monoxenous Trypanosomatids as Emerging Opportunistic Agents. *The Journal of Eucaryotic Biology* 47, 37-39.

Docampo, R., de Souza, W., Miranda, K., Rohloff, P., y Moreno, S.N. (2005). Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nat Rev Microbiol* 3, 251-261.

El-Sayed, N.M., Myler, P.J., Bartholomeu, D.C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A.N., Ghedin, E., Worthey, E.A., Delcher, A.L., Blandin, G., *et al.* (2005). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309, 409-415.

Esteller, M. (2005). Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 45, 629-656.

Fariñas, F.G., y Burgio, F. (2009). Una zoonosis emergente. *Instituto de Patología y Enfermedades Infecciosas* 110.

Fridberg, A., Buchanan, K.T., y Engman, D.M. (2006). Flagellar membrane trafficking in kinetoplastids. *Parasitology Research* 100, 205-212.

García, A.D. (2004). Leishmaniasis cutánea: Estudio en el área sanitaria de Toledo. In Departamento de Dermatología (Madrid, Universidad Complutense de Madrid).

Geiduschek, E.P., y Kassavetis, G.A. (2001). The RNA polymerase III transcription apparatus. *J Mol Biol* 310, 1-26.

González, S.N., Macias, P.M., López, N., Vázquez, T.O., y Grajales, B.A. (2008). Caso clínico de un niño con Leishmaniasis. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría. Caso clínico de un niño con Leishmaniasis* 85, 32-35.

Grimaldi, G., Jr., y Tesh, R.B. (1993). Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev* 6, 230-250.

Grune, T., Brzeski, J., Eberharter, A., Clapier, C.R., Corona, D.F., Becker, P.B., y Muller, C.W. (2003). Crystal structure and functional analysis of a nucleosome recognition module of the remodeling factor ISWI. *Mol Cell* 12, 449-460.

Hamilton, P.B., Stevens, J.R., Gaunt, M.W., Gidley, J., y Gibson, W.C. (2004). Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. *Int J Parasitol* 34, 1393-1404.

Hernández-Flores, J., Morales-Aguirre, J., y Zamora-Chávez, A. (2007). Leishmaniasis visceral tratada con anfotericina B. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México* 64, 43-48.

Herwaldt, B.L., y Berman, J.D. (1992). Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and review of pertinent clinical studies. *Am J Trop Med Hyg* 46, 296-306.

Herwaldt, B.T. (1999). Leishmaniasis. *he Lancet* 354, 1191 – 1199.

Ivens, A.C., Peacock, C.S., Worthey, E.A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., Sisk, E., Rajandream, M.A., Adlem, E., Aert, R., *et al.* (2005). The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 309, 436-442.

Juven-Gershon, T., y Kadonaga, J.T. (2010). Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery. *Dev Biol* 339, 225-229.

Kapler, G.M., Zhang, K., y Beverley, S.M. (1987). Sequence and S1 nuclease mapping of the 5' region of the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Leishmania major*. *Nucleic Acids Res* 15, 3369-3383.

Kassavetis, G.A., Driscoll, R., y Geiduschek, E.P. (2006). Mapping the principal interaction site of the Brf1 and Bdp1 subunits of *Saccharomyces cerevisiae* TFIIB. *J Biol Chem* 281, 14321-14329.

Kassavetis, G.A., Prakash, P., y Shim, E. (2010). The C53/C37 subcomplex of RNA polymerase III lies near the active site and participates in promoter opening. *J Biol Chem* 285, 2695-2706.

Keeling, P.J., Burger, G., Durnford, D.G., Lang, B.F., Lee, R.W., Pearlman, R.E., Roger, A.J., y Gray, M.W. (2005). The tree of eukaryotes. *Trends Ecol Evol* 20, 670-676.

Landfear, S.M., y Ignatushchenko, M. (2001). The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. *Molecular and Biochemical Parasitology* 115, 1-17.

Levick, M.P., Blackwell, J.M., Connor, V., Coulson, R.M., Miles, A., Smith, H.E., Wan, K.L., y Ajioka, J.W. (1996). An expressed sequence tag analysis of a full-length, spliced-leader cDNA library from *Leishmania major* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 76, 345-348.

Liao, Y., Moir, R.D., y Willis, I.M. (2006). Interactions of Brf1 peptides with the tetratricopeptide repeat-containing subunit of TFIIIC inhibit and promote preinitiation complex assembly. *Mol Cell Biol* 26, 5946-5956.

Lopes, H.A., Souto-Padróni, T., Dias, A.F., Gomes, T.M., Rodrigues, C.G., Zimmermann, T.L., Alves, L.T., y Vermelho, B.A. (2010). Trypanosomatids: Odd Organisms, Devastating Diseases. *The Open Parasitology Journal* 4, 30-59.

Lorenzen, K., Vannini, A., Cramer, P., y Heck, A.J. (2007). Structural biology of RNA polymerase III: mass spectrometry elucidates subcomplex architecture. *Structure* 15, 1237-1245.

Luque, J., y Herráez, A., eds. (2001). *Biología Molecular e Ingeniería Genética* (Madrid).

Lye, L.F., Owens, K., Shi, H., Murta, S.M., Vieira, A.C., Turco, S.J., Tschudi, C., Ullu, E., y Beverley, S.M. (2010). Retention and loss of RNA interference pathways in trypanosomatid protozoans. *PLoS Pathog* 6, e1001161.

Mahmood, R., Hines, J.C., y Ray, D.S. (1999). Identification of cis and trans elements involved in the cell cycle regulation of multiple genes in *Crithidia fasciculata*. *Mol Cell Biol* 19, 6174-6182.

Mair, G., Shi, H., Li, H., Djikeng, A., Aviles, H.O., Bishop, J.R., Falcone, F.H., Gabrilescu, C., Montgomery, J.L., Santory, M.I., *et al.* (2000). A new twist in tripanosome RNA metabolisms: cis-splicing of pre-mRNA *Eucaryot Cell* 6, 163-169.

Martinez-Calvillo, S., Nguyen, D., Stuart, K., y Myler, P.J. (2004). Transcription initiation and termination on *Leishmania major* chromosome 3. *Eukaryot Cell* 3, 506-517.

Martinez-Calvillo, S., Vizuet-de-Rueda, J.C., Florencio-Martinez, L.E., Manning-Cela, R.G., y Figueroa-Angulo, E.E. (2010). Gene expression in trypanosomatid parasites. *J Biomed Biotechnol* 2010, 525241-.

Martínez-Calvillo, S., Yan, S., Nguyen, D., Fox, M., Stuart, K., y Myler, P.J. (2003). Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Molecular Cell* 11, 1291-1299.

Marvin, R.P., y Robert, J.W. (2000). Transcription by RNA polimerases I and III. *Nucleic Acid Research* 28.

McDowell, M.A., Rafati, S., Ramalho-Ortigao, M., y Ben Salah, A. (2011). Leishmaniasis: Middle East and North Africa research and development priorities. *PLoS Negl Trop Dis* 5, e1219.

McHugh, C.P., Melby, P.C., y LaFon, S.G. (1996). Leishmaniasis in Texas: epidemiology and clinical aspects of human cases. *Am J Trop Med Hyg* 55, 547-555.

Michels, P.A., Bringaud, F., Herman, M., y Hannaert, V. (2006). Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochim Biophys Acta* 1763, 1463-1477.

Montalvo, A.A. (2010). Leishmaniasis: Interesting features on exotic parasitism for Cuba. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología* 40, 78-92.

Myler, P.J., y Audleman, T.D. (1999). *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 2902-2906.

Nakaar, V., Dare, A.O., Hong, D., Ullu, E., y Tschudi, C. (1994). Upstream tRNA genes are essential for expression of small nuclear and cytoplasmic RNA genes in trypanosomes. *Mol Cell Biol* 14, 6736-6742.

Nuernberger, P.S., y Ramos, V.C. (1974). Leishmaniasis visceral. *Revista Médica Hondureña* 42, 235-241.

Orioli, A., Pascali, C., Pagano, A., Teichmann, M., y Dieci, G. (2012). RNA polymerase III transcription control elements: themes and variations. *Gene* 493, 185-194.

Palenchar, J.B., y Bellofatto, V. (2006). Gene transcription in trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol* 146, 135-141.

Paule, M.R., y White, R.J. (2000). Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Res* 28, 1283-1298.

Peacock, C.S., Seeger, K., Harris, D., Murphy, L., Ruiz, J.C., Quail, M.A., Peters, N., Adlem, E., Tivey, A., Aslett, M., *et al.* (2007). Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet* 39, 839-847.

Pearson, R., y De Queiroz, S.A. (1995). Clinical spectrum of leishmaniasis. *Clinical infectious Diseases* 22, 1 - 13.

Raska, I., Koberna, K., Malinsky, J., Fidlerova, H., y Masata, M. (2004). The nucleolus and transcription of ribosomal genes. *Biol Cell* 96, 579-594.

Requena, J.M., Quijada, L., Soto, M., y Alonso, C. (2003). Conserved nucleotides surrounding the trans-splicing acceptor site and the translation initiation codon in *Leishmania* genes. *Exp Parasitol* 103, 78-81.

Rioux, J.A., Lanotte, G., Serres, E., Pratlong, F., Bastien, P., y Perieres, J. (1990). Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp* 65, 111-125.

Rivas, L., Moreno, J., Canavate, C., y Alvar, J. (2004). Virulence and disease in leishmaniasis: what is relevant for the patient? *TRENDS of Parasitology* 20, 297-301.

Rogers, M., Hilley, J., Dickens, N., Wilkes, J., Bates, P., DP, D., Harris, D., Her, Y., Herzyk, P., y Imamura, H. (2011). Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. *Genome Research* 21, 2129-2141.

Saïda, F. (2008). Structural Characterization of the Interaction between TFIIB Components Bdp1 and Brf1. *Biochemistry* 47, 13197-13206.

Salazar, M., y Castro, E. (2001). Leishmaniasis cutánea, mucocutánea y cutánea difusa. *Dermatología Peruana* 11.

Sanchez-Garcia, L., Berzunza-Cruz, M., Becker-Fauser, I., y Rebollar-Tellez, E.A. (2010). Sand flies naturally infected by *Leishmania (L.) mexicana* in the peri-urban area of Chetumal city, Quintana Roo, Mexico. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 104, 406-411.

Sánchez-Saldaña, L., Sáenz-Anduaga, E., Pancorbo-Mendoza, J., Zegarria-Del-Carpio, R., Garcés-Velasco, N., y Regis-Roggero, A. (2004). Leishmaniasis. *Dermatología Peruana* 14, 82-98.

Schimanski, B., Nguyen, T.N., y Gunzl, A. (2005). Characterization of a multisubunit transcription factor complex essential for spliced-leader RNA gene transcription in *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol* 25, 7303-7313.

Simpson, A.G., Stevens, J.R., y Lukes, J. (2006). The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol* 22, 168-174.

Simpson, L., Neckelmann, N., De la Cruz, V.F., Simpson, A.M., Feagin, J.E., Jasmer, D.P., y Stuart, J.E. (1987). Comparison of the maxicircle (mitochondrial) genomes of *Leishmania tarentolae* and *Trypanosoma brucei* at the level of nucleotide sequence. *The Journal of Biological* 262, 6182-6196.

Snustad, D.P., y Simmons, M.J. (2006). Principles of genetics, 4th edn (Hoboken, NJ, Wiley).

Soto, J., Rea, J., Balderrama, M., Toledo, J., Soto, P., Valda, L., y Berman, J.D. (2008). Efficacy of miltefosine for Bolivian cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 78, 210-211.

Stiles, J.K., Hicock, P.I., Shah, P.H., y Meade, J.C. (1999). Genomic organization, transcription, splicing and gene regulation in *Leishmania*. *Ann Trop Med Parasitol* 93, 781-807.

Tamarin, R.H. (1999). Principles of genetics, 6th edn (Boston, WCB/McGraw-Hill).

Teichmann, M., y Seifart, K.H. (1995). Physical separation of two different forms of human TFIIIB active in the transcription of the U6 or the VAI gene in vitro. *EMBO J* 14, 5974-5983.

Trejo, P.J., Miranda, N.M., Solorzano, S.F., Cabrera, M.L., y Díaz, P.H. (1993). Kala-azar in Mexico: report of 2 cases. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México* 50, 662-665.

Tsihlis, N.D., y Grove, A. (2006). The *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III recruitment factor subunits Brf1 and Bdp1 impose a strict sequence preference for the downstream half of the TATA box. *Nucleic Acids Res* 34, 5585-5593.

Verlinde, C.L., Hannaert, V., Blonsky, C., Wilson, M., Périé, J. J., Fothergill-Gilmore, L. A., Opperdoes, F. R., Gelb, M. H., Hol, W. G y Michels, P. A. (2001). Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs. *Drug Resistance Updates* 4, 1-14.

Vidyashankar, C., y Noel, G. (2002). Leishmaniasis. *Medicine Journal* 3, 1-19.

Widschwendter, M., Siegmund, K.D., Muller, H.M., Fiegl, H., Marth, C., Muller-Holzner, E., Jones, P.A., y Laird, P.W. (2004). Association of breast cancer DNA methylation profiles with hormone receptor status and response to tamoxifen. *Cancer Res* 64, 3807-3813.

WHO (2010) Leishmaniasis Burden of disease. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/es/index.html>

Wu, C., Lin, Y., y Chen, H. (2011). The TFIIIF-like Rpc37/53 Dimer Lies at the Center of a Protein Network to Connect TFIIIC, Bdp1, and the RNA Polymerase III Active Center. *Molecular and Cellular Biology*.

Yan, S., Lodes, M.J., Fox, M., Myler, P.J., y Stuart, K. (1999). Characterization of the *Leishmania donovani* ribosomal RNA promoter. *Mol Biochem Parasitol* 103, 197-210.

Zetina, J.J. (2008). *Dermatología Revista Mexicana*. *Leishmaniasis cutánea* en el estado de Quintana Roo, México 52.

Zurita, N.A. (2001). Búsqueda de proteínas antigénicas de *Leishmania braziliensis*. Aislamiento, caracterización génica y utilidad serodiagnóstica de la proteína de choque térmico de 70 kDa (Hsp70). In Departamento de Parasitología, Ecología y Genética (Universidad de la laguna).
