



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y
DE LA SALUD ANIMAL**

**CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DEL GEN *LYT1*
INVOLUCRADOS EN EL PROCESO DE INFECCIÓN Y DE TRANSICIÓN DE
ESTADIO DE *Trypanosoma cruzi***

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. GILBERTO BALLESTEROS RODEA

TUTORA:

DRA. REBECA G. MANNING CELA

**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico
Nacional, Unidad Zacatenco**

COMITÉ TUTORAL:

DRA. MARÍA DOLORES CORREA BELTRÁN

Instituto Nacional de Pediatría

DR. ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Universidad Nacional Autónoma de México

México, D.F., diciembre 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.



El presente trabajo fue realizado bajo la dirección de la Dra. Rebeca Georgina Manning Cela, en el Laboratorio de Biología Molecular de Parásitos del Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.



Durante el presente trabajo de investigación el alumno Gilberto Ballesteros Rodea recibió el apoyo por parte del Programa de Becas para estudios de Posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

DEDICATORIA

A mis abuelos por ser siempre una luz en mi camino.

A mis padres, Soledad Rodea Juárez y Rafael Ballesteros Chávez por darme la vida, por inculcarme los valores que me hacen ser quien soy y por estar siempre pendientes de mí.

A mi Tía Celia Rodea Juárez, por ser como una madre, por su confianza, su cariño y estar siempre ahí para mí.

A mis tíos Virginia Rodea y Héctor González por su gran apoyo y por estar siempre cerca.

A mi tía Feliza Rodea por estar siempre pendiente de todos.

A mis hermanos Laura y Rafael por ese lazo que nos une y que va más allá de nuestra propia sangre.

A mis cuñados Gabriela Arenas y Alfredo Garduño por ser como unos hermanos para mí.

A mis sobrinos María Fernanda, Andrea, Atenea y Rodrigo por llenar con su luz nuestras vidas.

A mis primos Fernando, Rosy, Jesús, Mary, Yola, Fausto, Lety, Marcos, Jorge, Margarita, Vero, Loilita, Raúl, Pépe, Alicia, Tavo, Marytoña y Rodolfo, por su apoyo y enseñarme siempre algo de ustedes.

A mi Familia Jarocha, Doña Chabe, Ayesha, Adan y mi tocallo Beto, gracias por ser parte de mi familia y estar siempre pendiente de los abuelos.

A Armando y Gil Sánchez por todas las vivencias que nos hacen tener un lazo de amistad cada vez más fuerte.

A Aldo Ecobedo por estar siempre ahí, en las buenas y en las malas.

A Angelita Gaytán por su invaluable ayuda, por ser parte de mi familia.

A Itandehui Vázquez Borbón, por estar conmigo y darme la esperanza de ver hacia el futuro.

A la señora Silvia Borbón por su apoyo incondicional, por hacerme sentir como en casa.

Israel Coronel por todos esos momentos vividos que nos hacen sentir como hermanos.

Manuel Arceo, por compartir con nosotros tu increíble forma de ser.

A Amelia del Carmen Manjarrez por permitirme estar en tu vida.

A mi partner Marisa Cruz Aguilar y Juan Carlos Jimenez, por todos los momentos compartidos, por la amistad que siempre está ahí.

A Carla Angúlo mi partner por todas las vivencias compartidas.

A Andrés Zárate, por brindarme su amistad y ayuda en momentos difíciles.

A los de abajo, Horacio Zamudio y Januz Franco por su constante apoyo, por esas tardes de compartir el café.

A Deyanira, por nuestra amistad en la eternidad.

A Luis Alberto Hernández Osorio por el gran apoyo de siempre, a Maggy y Natalia por su hospitalidad.

Luis Enrique Florencio Martínez, por su apoyo y la amistad que nos une más allá del tiempo.

A mi querida amiga Norma Edith Padilla por estar siempre.

A mi compadre David Esaú Fragoso por su apoyo incondicional, por todas esas diferencias que nos unen.

A Julio García Cordero, hermano lobo por todas las vivencias que nos acercan.

A Tere Itandehui Martínez y Alberto Antonio por compartir conmigo su entusiasmo y su amistad.

Gabriel Noris por brindarme su amistad sin reservas.

Daniel Sánchez por su apoyo y amistad.

Margarita Rubio por compartir esos días en el laboratorio.

A Olga Beltrán, Luis Fernádo, Adriana, JM, Elizabeth, Natalia y Fernando por su gran apoyo, por los momentos que nos han unido a través de la distancia y el tiempo.

A Ernesto Jimenez, porque Guanajuato también es puerto.

“La verdadera amistad es la que sigue a tu lado incluso cuando no te queda nada por ofrecer, salvo tu compañía”

Anónimo

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México mi "*alma mater*", por ayudarme a crecer, por marcar mi vida y por cambiar mi percepción del mundo.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por impulsar y desarrollar mi formación personal, profesional y de posgrado.

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, en particular al Departamento de Biomedicina Molecular por el gran apoyo otorgado para la realización de este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el otorgamiento de la beca para estudios de posgrado durante la realización de este trabajo de investigación.

A mi Tutora, la Dra. Rebeca Manning Cela por su gran apoyo, por su confianza, por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por su guía y sus enseñanzas, por transmitirme sus conocimientos y por ser clave fundamental en mi crecimiento tanto personal, como académico.

A mis asesores: Dra. María Dolores Correa Beltrán y Dr. Antonio Verdugo Rodríguez por su ayuda incondicional, por el impulso y el seguimiento a mi formación de posgrado.

A los miembros del honorable jurado: Dr. Froylán Ibarra Velarde, Dr. Sergio Rodríguez Camarillo, Dr. Julio Figueroa Millán, Dr. Fernando Alba Hurtado, Dra. María Dolores Correa Beltrán, Dra. Rebeca Manning Cela y Dr. Antonio Verdugo Rodríguez, por las aportaciones realizadas para mejorar este trabajo.

Al Dr. Héctor Quiroz Romero por sus enseñanzas, su apoyo incondicional y despertar en mí el interés por la investigación.

Al Dr. Roberto A. Cervantes Olvera por sus enseñanzas y ayuda.

A los integrantes del Departamento de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México: Dr. Juan Antonio Figueroa Castillo, Dr. Alberto Ramírez Guadarrama, Dra. Yazmín Alcalá Cantó, Dra. María Teresa Quintero Martínez, Dra. Cristina Guerrero Molina, Dra. Evangelina Romero Callejas, Dra. Irene Cruz Mendoza, Dra. Jimena Otero Negrete, M.en C. Alejandro Besné, Nieves Cruz Ortega, Gabriel Beltrán Vergara y Antonio Yáñez Ramírez, por su amistad y su apoyo durante todos estos años.

Al Dr. Rigoberto Hernández Castro por su amistad y su invaluable apoyo.

Al Dr. Raúl Romero Cabello por sus enseñanzas y su amistad.

A la Dra. Xochitl Vega Manríquez por su amistad, su interés, su ayuda y por ser una parte importante de mi conciencia.

A la Dra. Carmen Guzmán Bracho por su apoyo incondicional.

Al Dr. Santiago Martínez Calvillo por su invaluable ayuda en este proyecto.

A la Dra. Ana María Cevallos por sus comentarios y estar siempre al pendiente.

A Dra. Rosaura Hernández Rivas, Dr. Miguel Ángel Vargas Mejía, Dra. Leticia Cedillo Barrón, Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete, Dr. Nicolás Villegas, Dr. Leopoldo Santos, Dra. Teresa Estrada García, Dra. Isaura Meza Gómez Palcio, María del Carmen Domínguez Robles. Elizabeth Franco Martínez y Manuel Arceo Rodríguez del Departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV, Unidad Zacatenco por sus enseñanzas y apoyo.

Dr. Ricardo Mondragón del Departamento de Bioquímica del CINVESTAV-IPN, por su gran apoyo para la obtención de las imágenes de microscopía electrónica de barrido y de transmisión para el presente trabajo.

Al M. en C. Julio García Cordero por su apoyo técnico y su amistad.

A Víctor Rosales por su apoyo técnico en el uso del FACS.

A Iván Galván por su apoyo en el uso del microscopio confocal.

A Benjamin Ortiz López por su apoyo técnico y su amistad.

A Sandra Medina Dávila por su ayuda en los trámites burocráticos.

Al Dr. Bruno Escalante, Dr. Moisés Santillán Zerón y Dr. Jesús Rodríguez González del CINVESTAV Unidad Monterrey por su gran apoyo para la realización de la parte matemática del presente trabajo.

Al Dr. Juan Carlos Vázquez Chagoyán, Dr. Alberto Barbosa, M. en C. José Esteban Burgos Aparicio y Biol. Laucel Ochoa de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México por la retroalimentación, colaboración y su amistad.

A la QFB Claudia Márquez por el apoyo técnico proporcionado para la realización de este proyecto.

Al Técnico José Isaías Carrasco Cerón por su amistad y el gran apoyo técnico durante mi estancia en el laboratorio.

A todos aquellos que participaron, directa o indirectamente, en la realización de este trabajo.

"Si he visto más lejos ha sido porque he subido a hombros de gigantes."
Isaac Newton

ÍNDICES.

“Caminante no hay camino, se hace camino al andar...”

Antonio Machado

ÍNDICE GENERAL	Página
ABREVIATURAS	I
RESUMEN	III
ABSTRACT	VI
I. INTRODUCCIÓN	1
1. Generalidades	2
1. 1 Ciclo Biológico de <i>T. cruzi</i>	3
1.2 Epidemiología	6
1.3 Signos y Síntomas	9
1.3.1 Fase Aguda	9
1.3.2 Fase Crónica	10
1.3.2.1 Etapa Indeterminada	10
1.3.2.2 Etapa Sintomática	10
1.4 Inmunología	11
1.5 Diagnóstico	12
1.6 Tratamiento	15
2. Características Estructurales de <i>T. cruzi</i>	16
2.1 Núcleo	16
2.2 Superficie Celular	18
2.3 Microtúbulos	18
2.4 Flagelo	19
2.5 Saco Flagelar	20
2.6 Reservosomas	20
2.7 Vía Secretora	21
2.8 Mitocondria y Cinetoplasto	21
2.9 Glicosomas	23
3. Transcripción en <i>T. cruzi</i>	25
3.1 Procesamiento Postranscripcional	25
3.1.1 <i>Splicing</i>	25
3.1.2 <i>Trans-splicing</i>	26
4. Sistemas de Transfección	27
5. Genes Reporteros	28

5.1 Proteína Verde Fluorescente (Green Fluorescent Protein-GFP)	29
6. Proceso de Infección de <i>T. cruzi</i>	32
6.1 Adhesión	33
6.2 Invasión	35
6.3 Multiplicación	36
6.4 Liberación	37
7. Antecedentes Directos	38
II. JUSTIFICACIÓN	41
III. HIPÓTESIS	43
IV. OBJETIVO GENERAL	45
V. OBJETIVOS PARTICULARES	47
1. Obtener Parásitos <i>Knock-in</i> de LYT1	48
2. Determinar la Localización de los Productos LYT1(s+n, s y n) en los Parásitos <i>Knock-in</i>	48
3. Caracterizar a los Parásitos <i>Knock-in</i> que expresan LYT1(s+n, s y n)-EGFP	48
4. Evaluar la Localización de LYT1 en Vesículas Involucradas en el Tráfico Vesicular del Parásito	49
5. Analizar las Características Morfológicas de los Parásitos Control (WT y <i>Knock-out</i> de LYT1) y <i>Knock-in</i> de LYT1 por Microscopía Electrónica de Barrido y de Transmisión	49
6. Determinar los Índices de Infectividad <i>in vivo</i> con Parásitos <i>Knock-in</i> de LYT1	49
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	50
1. Parásitos	51
2. Bacterias	51
3. Técnicas de ADN Recombinante	52
4. Extracción de ADN	53
5. Análisis de ADN por Electroforesis	53
6. Construcciones de los Vectores pEGFP-N1-LYT1	54
6.1. LYT1s+n	56
6.2. LYT1s	56

6.3. LYT1n	59
7. PCR	60
8. Digestión con Enzimas de Restricción	61
9. Purificación del ADN	62
10. Ligación	62
11. Células Calcio Competentes	63
12. Transformación Bacteriana	63
13. Extracción de ADN por STET	64
14. Comprobación de las Clonas Positivas por Mapas de Restricción	65
15. Subclonación de LYT1(s+n, s y n)-EGFP en el Vector pTREXn	65
16. Análisis por Mapas de Restricción de pTREXn-LYT1(s+n, s y n)-EGFP	66
17. Extracción de ADN por Cloruro de Cesio (CICs)	68
18. Cuantificación de ADN	69
19. Secuenciación de pTREXn-LYT1(s+n, s y n)-EGFP	69
20. Transfección de Epimastigotes por Electroporación	71
21. Obtención de Clonas de Parásitos Resistentes a G418	71
22. Obtención de Extractos Protéicos Totales (EPT) de <i>T. cruzi</i>	72
23. Análisis de la Expresión de las Proteínas Quiméricas LYT1(s+n,s y n)-EGFP en los Parásitos <i>Knock-in</i> por <i>Western blot</i>	73
24. Determinación de la Localización de las Proteínas Quiméricas por Epifluorescencia	74
25. Cultivo de Parásitos <i>in vitro</i>	75
26. Curva de Crecimiento	75
27. Análisis de Exclusión por Azul de Tripano	75
28. Análisis del Movimiento de los Parásitos Transfectados	76
29. Análisis del Movimiento de los Parásitos no Transfectados	76
30. Análisis Morfométrico del Flagelo de los Parásitos Transfectados	77
31. Análisis Vectorial del Movimiento	77

32. Análisis de Varianza (ANOVA)	79
33. Análisis por Microscopía Electrónica de Barrido	79
34. Análisis por Microscopía Electrónica de Transmisión	79
35. Ensayos de Endocitosis con FM4-64	80
36. Cultivo Celular	81
37. Infección Primaria de Fibroblastos 3T3 con <i>T. cruzi</i>	82
38. Purificación de Tripomastigotes y Amastigotes	82
39. Índice de Infectividad <i>in vivo</i> de Parásitos <i>Knock-out</i> y <i>Knock-in</i> de LYT1	83
VII. RESULTADOS	84
1. Construcción de los Plásmidos pTREXn-EGFP y pTREXn LYT1(s+n, s y n)-EGFP	85
1.1. Amplificación del Fragmento <i>LYT1s+n</i> por PCR	86
1.2. Amplificación del Fragmento <i>LYT1s</i> por PCR	87
1.3. Amplificación del Fragmento <i>LYT1n</i> por PCR	89
1.4. Construcción del Vector pEGFP-N1-LYT1(s+n, s y n)	90
1.5. Subclonación de los Fragmentos <i>LYT1(s+n, s y n)-EGFP</i> en el Vector pTREXn	91
2. Secuenciación del ADN de pTREXn-LYT1(s+n, s y n)-EGFP	94
3. Análisis de la Expresión de las Proteínas Quiméricas LYT1(s+n, s y n)-EGFP en los Parásitos <i>Knock-in</i> por <i>Western blot</i>	96
4. Localización de las Proteínas Quiméricas LYT1(s+n, s y n)-EGFP por Epifluorescencia	98
5. Localización de las Proteínas Quiméricas LYT1(s+n, s y n)-EGFP por Microscopía Confocal	100
6. Determinación del Porcentaje de Colocalización	100
7. Curva de Crecimiento de los Parásitos <i>Knock-in</i>	103
8. Determinación de la Motilidad de Epimastigotes WT y Transfectados	105
9. Análisis Cuantitativo del Movimiento en Parásitos Transfectados	107

10. Determinación de la Motilidad de Tripomastigotes WT y Transfectados	111
11. Análisis Vectorial del Movimiento	111
11.1 Velocidad	111
11.2 Cambio Angular de Dirección	112
12. Análisis de Varianza (ANOVA)	114
13. Ensayos de Endocitosis con FM4-64	115
14. Análisis por Microscopía Electrónica	116
15. Índices de Infectividad <i>in vivo</i> de Parásitos <i>Knock-out</i> y <i>Knock-in</i> de LYT1	119
VIII. DISCUSIÓN	122
IX. CONCLUSIONES	134
X. PERSPECTIVAS	136
XI. BIBLIOGRAFÍA	138
ANEXO I	163
ARTÍCULO I	164
ARTÍCULO II	165
ANEXO II	166
RELACIÓN DE ARTÍCULOS PUBLICADOS	167
APÉNDICE I	168
Secuencia Completa del Alelo <i>b</i> de LYT1	169

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Cepas de Parásitos	51
Tabla 2.	Cepas Bacterianas	52
Tabla3.	Plásmidos pEGFP-N1-LYT1(s+n, s y n)	54
Tabla 4.	Oligonucleótidos	57
Tabla 5.	Mezcla de Reacción para Digestión con Enzimas de Restricción	61
Tabla 6.	Reacción de Ligación con una Relación Inserto: Vector de 1:5 para las Construcciones pEGFP-N1-LYT1	62
Tabla 7.	Plásmidos pTREXn-LYT1(s+n, s y n)-EGFP	66
Tabla 8.	Mezcla de Reacción para Digestión con enzimas de Restricción	66
Tabla 9.	Promedio de los Porcentajes de Colocalización de LYT1(s+n, s y n)-EGFP en Núcleo y Cinetoplasto en los Epimastigotes <i>Knock-in</i>	102
Tabla 10.	Promedio de la Distancia Recorrida y Porcentaje de Reducción de la Motilidad de Parásitos <i>Knock-in</i>	106
Tabla 11.	Porcentaje de Parásitos por Rangos de Distancia Recorrida en Parásitos WT, Parásitos Expresando EGFP, LYT1(s+n, s y n)-EGFP y Parásitos <i>Knock-out</i> de LYT1	108
Tabla 12.	Promedio del Largo del Flagelo de Parásitos WT, Parásitos Expresando EGFP, LYT1(s+n, s y n)-EGFP y Parásitos <i>Knock-out</i> de LYT1	110
Tabla 13.	ANOVA del Promedio de la Velocidad (v_i) y del Cambio Angular de Dirección (θ_i) de Parásitos Control (WT, EGFP), <i>Knock-in</i> (EGFP, LYT1s+n, s y n)-EGFP y Parásitos <i>Knock-out</i> (L14 y L16)	115

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1	Diferentes Estadios de <i>T. cruzi</i>	3
Fig. 2	Principales Géneros de Vectores Transmisores de <i>T. cruzi</i>	3
Fig. 3	Ciclo Biológico de <i>T. cruzi</i>	5
Fig. 4	Distribución Geográfica de <i>T. cruzi</i>	8
Fig. 5	Chagoma y Signo de Romaña	9
Fig. 6	Cardiomegalia, Megaesófago y Megacolon	10
Fig. 7	Esquema de los Organelos en el Estadio de Epimastigote de <i>T. cruzi</i>	24
Fig. 8	Proceso de <i>Trans-splicing</i>	27
Fig. 9	Epimastigote de <i>T. cruzi</i> Expresando EGFP	32
Fig. 10	Esquema del Mecanismo de Infección de <i>T. cruzi</i> en Células no Fagocíticas	37
Fig. 11	Esquema de la Secuencia de Aminoácidos de LYT1	38
Fig. 12	Diagramas de las Construcciones pTREXn-LYT1s+n-EGFP, pTREXn-LYT1s-EGFP, pTREXn-LYT1n-EGFP y pTREXn-EGFP, así como de los Productos Obtenidos de <i>LYT1</i> Fusionados a <i>EGFP</i>	55
Fig. 13	Esquema del Vector pEGFP-N1-LYT1s+n	58
Fig. 14	Esquema del Producto de la Primera Reacción de PCR de LYT1s	58
Fig. 15	Esquema del Producto de la Segunda Reacción de PCR de <i>LYT1s</i> y del Vector pEGFP-N1-LYT1s	59
Fig. 16	Esquema del Vector pEGFP-N1-LYT1n	60
Fig. 17	Condiciones para la Amplificación de LYT1 por PCR para la Construcción de los Vectores Requeridos	61
Fig. 18	Esquema de las Tres Diferentes Construcciones pTREXn-LYT1(s+n, s y n)-EGFP	67
Fig. 19	Amplificación del Fragmento <i>LYT1s+n</i> por PCR y Digestión de su Producto de PCR y Digestión de pEGFP-N1	86
Fig. 20	Amplificación del Primer Producto de PCR del Fragmento <i>LYT1s</i>	88

Fig. 21	Amplificación del Fragmento <i>LYT1s</i> por PCR y Digestión de su Producto de PCR y Digestión de pEGFP-N1	88
Fig. 22	Amplificación de <i>LYT1n</i> por PCR y Digestión de su Producto de PCR y Digestión de pEGFP-N1	89
Fig. 23	Análisis de Restricción del ADN de pEGFP-N1-LYT1(s+n, s y n)	90
Fig. 24	Análisis del Mapa de Restricción del Vector pEGFP-N1-LYT1	91
Fig. 25	Digestión y Purificación del ADN del Inserto <i>LYT1(s+n, s y n)-EGFP</i> y del Vector pTREXn	92
Fig. 26	Análisis del Mapa de Restricción de pTREXn-LYT1(s+n, s y n)-EGFP	93
Fig. 27	Secuenciación de las Construcciones pTREXn-LYT1(s+n, s y n)-EGFP Mostrando el Sitio de Inicio de la Traducción	94
Fig. 28	Secuenciación de las Construcciones pTREXn-LYT1(s+n, s y n)-EGFP Mostrando el Sitio de Fusión de LYT1 con EGFP	95
Fig. 29	Análisis por <i>Western blot</i> de la Expresión de las Proteínas Quiméricas LYT1(s+n, s y n)-EGFP en los Parásitos <i>Knock-in</i>	97
Fig. 30	Análisis por Microscopía de Epifluorescencia de Epimastigotes Transfectados con pTREXn-LYT1-EGFP	99
Fig. 31	Análisis por Microscopía de Epifluorescencia para la Observación Indirecta de Proteínas Endógenas LYT1 por Medio de Anticuerpos Policlonales Contra LYT1	99
Fig. 32	Análisis de la Colocalización por Microscopía Confocal	101
Fig. 33	Análisis de la Trayectoria y Distancia Recorrida por Epimastigotes <i>Knock-in</i> Mediante Videomicroscopía	106
Fig. 34	Análisis de Endocitosis Mediante FM4-64 en Parásitos Expresando LYT1s+n-EGFP de Forma Exógena	116
Fig. 35	Análisis por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) en Parásitos Control (WT y EGFP), Parásitos Expresando LYT1(s+n, s y n)-EGFP y Parásitos <i>Knock-out</i> nulos de LYT1(L-16)	117

Fig. 36 Análisis por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) en Cortes de Parásitos Control (WT y EGFP), Parásitos Expresando LYT1(s+n, s y n)-EGFP y Parásitos *Knock-out*(L-16)

118

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Promedio de los Porcentajes de Colocalización de LYT1(s+n, s y n)-EGFP en Núcleo y Cinetoplasto de Epimastigotes <i>Knock-in</i>	102
Gráfica 2. Curva de Crecimiento de Epimastigotes de <i>T. cruzi</i> WT y Transfectados (Con Agitación)	104
Gráfica 3. Curva de Crecimiento de Epimastigotes de <i>T. cruzi</i> WT y Transfectados (Sin Agitación)	104
Gráfica 4. Promedio de la Distancia Recorrida por los Parásitos WT, EGFP, LYT1(s+n, s y n)-EGFP y Parásitos <i>Knock-out</i> L-14 y L-16	107
Gráfica 5. Porcentaje de Parásitos por Rangos de Distancia Recorrida en Epimastigotes WT, Parásitos expresando EGFP, LYT1(s+n, s y n)-EGFP y Parásitos <i>Knock-out</i> de LYT1	109
Gráfica 6. Promedio de la Longitud del Flagelo de Parásitos WT, EGFP, LYT1(s+n, s y n)-EGFP y Parásitos <i>Knock-out</i> de LYT1	110
Gráfica 7. Histogramas de Velocidad	112
Gráfica 8. Histogramas del Cambio Angular de Dirección	113
Gráfica 9. Trazos de Velocidad y Cambio Angular de Dirección	114
Gráfica 10. Parasitemia de Ratones Balb/c Infectados con Parásitos <i>Knock-out</i> de LYT1	120
Gráfica 11. Parasitemia de Ratones Balb/c Infectados con Parásitos <i>Knock-in</i> de LYT1	121

ABREVIATURAS.

"Las palabras antiguas son las mejores, y las breves, las mejores de todas."

Winston Churchill

ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
AD	Aglutinación directa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNm	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
ANOVA	Análisis de varianza (siglas en inglés de-Analysis of Variance)
ARN	Ácido ribonucleico
ARNg	Ácido ribonucleico guía
ARNi	Ácido ribonucleico de interferencia
ARNm	Ácido ribonucléico mensajero
ARNr	Ácido ribonucléico ribonucleíco
BSA	Albúmina sérica bovina (siglas en inglés de- <i>Bovine Serum Albumine</i>)
°C	Grados centígrados
CAT	Cloranfenicol acetiltransferasa
CETS	Centros Estatales de Transfusión Sanguínea
C9	Molécula C9 del sistema del complemento
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindole
DO	Densidad óptica
EDTA	Acido Etilendiaminotetra-Acético
EGFP	Proteína de fluorescencia verde amplificada (siglas en inglés de- <i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>)
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FAZ	<i>Zona de unión del flagelo (siglas en inglés de-Flagellum Attachment Zone)</i>
g	Gramo
gp	Glicoproteína
GFP	Proteína de fluorescencia verde (siglas en inglés de- <i>Green Fluorescent Protein</i>)
GPI	Glicosil-Fosfatidil-Inositol
GUS	β -Glucoronidasa
HAI	Hemoaglutinación indirecta
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-10	Interleucina 10
INDRE	Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica
KCl	Cloruro de potasio
kDa	Kilodaltones
KO	Carente de uno o ambos alelos de un gen (siglas en inglés de- <i>Knock-out</i>)
L-13	Línea de parásitos con comportamiento de mutante dominante negativa de <i>LYT1</i>
L-14	Línea de parásitos KO para el alelo <i>a</i> de <i>LYT1</i>
L-16	Línea de parásitos doble KO de <i>LYT1</i>
LB	Medio Luria Bertani para bacterias
LIT	Medio de infusión de hígado y triptosa para <i>T. cruzi</i> (siglas en inglés de- <i>Liver Infusión and Tryptose</i>)
l	Litro

LUX	Luciferasa
LYT1	Gen <i>LYT1</i> de <i>T. cruzi</i>
LYT1-EGFP	Fusion de <i>LYT1</i> con <i>EGFP</i>
LYT1	Se refiere a los productos en general del gen <i>LYT1</i> de <i>T. cruzi</i> a menos que se especifique si se refiere al que cuenta con una secuencia señal o al que carece de ésta
LYTs+n	Productos del gen <i>LYT1</i> de <i>T. cruzi</i> que contienen tanto la secuencia señal como la secuencia nuclear
LYTs	Productos del gen <i>LYT1</i> de <i>T. cruzi</i> que contienen únicamente la secuencia señal
LYTn	Productos del gen <i>LYT1</i> de <i>T. cruzi</i> que contienen la secuencia nuclear y no la secuencia señal
LYT1s+n-EGFP	Parásitos WT transfectados con pTREXn-LYTs+n-EGFP
LYT1s+n-EGFP	Parásitos WT transfectados con pTREXn-LYTs+n-EGFP
LYT1s+n-EGFP	Parásitos WT transfectados con pTREXn-LYTs+n-EGFP
MEB	Microscopía electrónica de Barrido
MET	Microscopía electrónica de Transmisión
µg	Microgramos
µg /ml	Microgramos por mililitro
µl	Microlitros
M	Molar
ml	Mililitro
µM	Micromolar
MgCl	Cloruro de Magnesio
mM	Milimolar
Mpb	Mega pares de bases
Na₂HPO₄	Fosfato de sodio monobásico
NaCl	Cloruro de sodio
Nm	Nanómetros
OMS	Organización mundial de la salud
PBS	Buffer salino de fosfatos (siglas en inglés de- <i>Phosphates Buffer Solution</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (siglas en inglés de - <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
RE	Retículo endoplásmico
RNA	Ácido ribonucleico (siglas en inglés de-Ribonucleic Acid)
rpm	Revoluciones por minuto
SFB	Suero Fetal Bovino
SL	Mini Exón (del inglés- <i>Splice Lider</i>)
SLN	Secuencia de localización nuclear
SS	Secuencia de Secreción
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
Th1	Células T cooperadoras tipo 1
Th2	Células T cooperadoras tipo 2
TYM	Medio Modificado de Dulbecco (del inglés- <i>Medio Dulbecco's modified Eagle Medium</i>)
UV	Ultravioleta
WT	Tipo silvestre (siglas en inglés de- <i>Wild Type</i>)

RESUMEN.

“La brevedad es loable cuando no se dice más ni menos de lo necesario.”

Marco Fabio Quintalano

RESUMEN

La Tripanosomosis* Americana es una enfermedad ocasionada por *Trypanosoma cruzi*, que es un parásito intracelular obligado que infecta una gran variedad de células del huésped mamífero. El proceso de infección es un evento complejo en el que se ha sugerido participan diversas moléculas, tanto del parásito como de la célula hospedero; sin embargo, muy pocas han sido caracterizadas a la fecha. Nuestro grupo caracterizó a LYT1, que es una molécula que presenta actividad lítica en condiciones ácidas y demostró, en parásitos *knock-out*, que participa en el proceso de infección y de transición de estadio. También demostramos, que esta diferente funcionalidad es resultado de la producción de tres transcritos distintos obtenidos por *trans-splicing* alternativo, dos de los cuales codifican para una proteína completa conteniendo tanto una secuencia señal amino-terminal como una secuencia nuclear; y el otro, que codifica para una proteína truncada conteniendo únicamente la secuencia nuclear.

A fin de evaluar si los diferentes transcritos de *LYT1* efectivamente codifican para proteínas distintas con posible localización y función diferencial, en el presente trabajo se obtuvieron y analizaron parásitos *knock-in* que expresan una copia exógena de *LYT1* fusionada a *EGFP*, expresando las dos proteínas LYT1s+n o únicamente la proteína completa LYT1s o la proteína truncada LYT1n. Los diferentes parásitos *knock-in* mostraron que los distintos productos de *LYT1* presentan diferente localización en epimastigotes. Mientras que los parásitos LYT1s-EGFP presentaron la fluorescencia en núcleo, cinetoplasto, flagelo, reservosoma, vacuolas y frecuentemente en membrana; los parásitos LYT1n-EGFP mostraron la fluorescencia en núcleo, cinetoplasto, reservosoma y ocasionalmente en vesículas. Finalmente, como era esperado, los parásitos LYT1s+n-EGFP mostraron un patrón de localización que corresponde a la sumatoria de los parásitos anteriores, ya que éstos expresan ambas formas de la proteína. Un patrón distribución similar se observó en núcleo y cinetoplasto de tripomastigotes y amastigotes.

*Standardized Nomenclature of Animal Parasitic Diseases (SNOAPAD). Kassai, *et al.*, 1988.

La expresión exógena de LYT1s+n y LYT1s produjo un defecto en la motilidad de los parásitos, observándose una reducción en su movimiento de aproximadamente 84% y 78% respectivamente y recorrieron distancias menores (hasta 40 μm / LYT1s+n y 100 μm / LYT1s) que los parásitos control (hasta 400 μm). Para determinar las causas en los cambios de motilidad observados, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de la velocidad (v_i) y del cambio angular de dirección (θ_i) de los parásitos. Los resultados mostraron que los parásitos LYT1n+s-EGFP presentaron una reducción en la v_i (30%) y un aumento en θ_i (26%), mientras que los parásitos LYT1s-EGFP solo disminuyeron su v_i (43%) con respecto a los parásitos control. No se observó un cambio significativo en la motilidad de los parásitos que expresan a LYT1n-EGFP comparado con los parásitos control indicando que la expresión de la proteína completa de LYT1 es la responsable del fenotipo observado.

Como los parásitos *knock-out* de LYT1 no presentaron defectos en la motilidad, nuestros resultados sugieren que LYT1 aparentemente tiene una participación indirecta en el proceso de motilidad del parásito. Esta hipótesis esta apoyada por los resultados obtenidos con FM4-64 que sugieren que LYT1 es transportado en las mismas estructuras vesiculares involucradas en el transporte vesicular del parásito. Además, experimentos de microscopía electrónica de barrido y transmisión, mostraron defectos en la morfología de las vesículas de secreción, base del flagelo y estructura flagelar de los parásitos LYT1s+n y LYT1s, que no se observaron en los parásitos control y *knock-out* de LYT1, apoyando la hipótesis anterior. Los tripomastigotes *knock-in* de LYT1 no mostraron cambios en su motilidad, sugiriendo un efecto deletéreo específico de estadio.

La expresión exógena de LYT1 disminuyó la capacidad infectiva de los parásitos en un modelo murino, mostrando además un retardo en la cinética de infección.

En conjunto nuestros resultados indican que los diferentes productos de LYT1 presentan una localización y función diferencial, en donde la forma completa de la proteína tiene aparentemente una participación indirecta en el proceso de motilidad del parásito.

ABSTRACT.

"There is no more valuable than talent to not use two words when one is enough."

Thomas Jefferson

ABSTRACT

The American Trypanosomiasis is a disease caused by *Trypanosoma cruzi*, which is an intracellular parasite that infects a wide variety of cells in the mammalian host. The infection process is a complex event in which it has been suggested that several molecules from the parasite and the host cell are involved; however, very few have been characterized to date. Using knock-out parasites our group reported the characterization of LYT1, which is a lytic molecule in acidic conditions that is involved in the infection process and in the developmental stage process of the parasite. We also showed that this different functionality is the result of the production of three different transcripts processed by alternative trans-splicing. Two of them encode for a complete protein containing the amino-terminal signal sequence and the nuclear sequence and a third one which encode a truncated protein containing only the nuclear sequence.

In order to know if the different transcripts of *LYT1* effectively produce different proteins with differential location and function, in this work were obtained and characterized knock-in parasites that express an exogenous sequence of *LYT1* fused to *EGFP*. Then, one of the transgenic parasites express both forms of the proteins LYT1s+n while the others two expresses only the complete protein LYT1s or the truncated protein LYT1pn respectively. The different knock-in parasites showed that the different LYT1 products show differential localization in epimastigotes. While the LYT1s-EGFP parasites showed the fluorescence in the nucleus, kinetoplast, flagellum, reservosome, vacuoles and mainly in membrane, the LYT1n-EGFP parasites showed the fluorescence in the nucleus, kinetoplast and reservosome and occasionally in vesicles. Finally, as expected, the LYT1s+n-EGFP parasites showed a pattern of location that corresponds to LYT1s-EGFP plus LYT1n-EGFP parasites.

Similar patterns of distribution were observed in the nucleus and kinetoplast of trypomastigotes and amastigotes.

The exogenous expression of LYT1s+n and LYT1s, produced a defect in the parasite motility resulting in approximately 84% and 78% motion reduction respectively and smaller distances traveled (up to 40 microns / LYT1s+n and 100 microns / LYT1s) than control parasite (up to 400 microns).

To determine the possible causes for the motility defect, we performed a variance analysis (ANOVA) of parasite velocity (v_i) and rotational angles (θ_i). The results showed that LYT1n+s-EGFP parasites had a v_i reduction (30%) and θ_i increase (26%), whereas LYT1s-EGFP parasites only had a v_i (43%) decrease compared to control parasites. No significant change was observed in the motility of parasites that express LYT1n-EGFP compared with control parasites thus indicating that the expression of the complete LYT1 protein is responsible for the observed phenotype.

As LYT1 knock-out parasites did not present defects in motility, our results suggest that LYT1 apparently has an indirect participation in the parasite motility process. This hypothesis is supported by the results obtained with FM4-64 which suggests that LYT1 is transported in the same vesicular structures involved in the parasite vesicular transport. Furthermore, transmission and scanning electron microscopy experiments, showed defects in the secretory vesicles morphology, base of the flagellum and flagellar structure in LYT1s+n and LYT1s parasites that not were observed in control and knock-out LYT1 parasites, supporting the above hypothesis. The LYT1 knock-in trypomastigotes not show changes in their motility, suggesting a deleterious effect stage specific.

The exogenous expression of LYT1 decreased the parasite infectivity in a murine model, showing also a delay in the infection kinetics.

Taken together, our results indicate that different LYT1 products exhibit differential localization and function, where the full form of the protein appears to have an indirect participation in the parasite motility process.

I. INTRODUCCIÓN.

“Quien no haya experimentado la irresistible atracción de la ciencia, no podrá comprender su tiranía”.

Mary Shelley

I. INTRODUCCIÓN.

1. Generalidades.

La Tripanosomosis Americana es una enfermedad parasitaria ocasionada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* que afecta a varias especies de mamíferos y es considerada una importante zoonosis (Salazar *et al.*, 1988) (Tay *et al.*, 1992). Dependiendo del estadio de desarrollo, el parásito puede medir de 16-27 μm de largo por 3-5 μm de ancho. Se caracteriza por presentar una sola mitocondria en la que se sitúa el cinetoplasto, el cual está formado por una red de fibras circulares de ADN que constituye aproximadamente el 25% del ADN total del parásito y que se localiza cercano al sitio de nacimiento del flagelo (Cevallos y Hernández, 2002). El tamaño y la posición del cinetoplasto varían con respecto al núcleo y junto con la presencia o ausencia de la membrana ondulante, determinan los diferentes estadios de desarrollo del parásito. El flagelo de *T. cruzi* está conectado al cuerpo basal y emerge de una invaginación especializada denominada *pocket* (o saco) flagelar, en el cual se llevan a cabo la ingestión y la captación de nutrientes del medio externo, así como de los procesos de secreción del parásito (de Souza, 1984; de Souza, 1999; Stoppani, 1983; Schmidt y Roberts, 1989).

T. cruzi presenta cuatro estadios de desarrollo: tripomastigote sanguíneo, epimastigote, tripomastigote metacíclico y amastigote. El tripomastigote que es la forma infectiva no replicativa, presenta forma de tirabuzón con su cinetoplasto en posición anterior y se encuentra tanto en la ampolla de la chinche (forma metacíclica) como en la sangre de los mamíferos (forma sanguínea). El epimastigote, es la forma replicativa localizada en el intestino del vector, tiene una morfología alargada, flagelo libre en uno de los extremos y su cinetoplasto está situado en la región anterior con respecto al núcleo. El amastigote, que es la forma intracelular replicativa en el mamífero, es de forma redondeada y carece de flagelo (Maria *et al.*, 1972; de Souza y Souto, 1980; Tyler y Engman, 2000; Tyler y Engman 2001) (**Figura 1**).

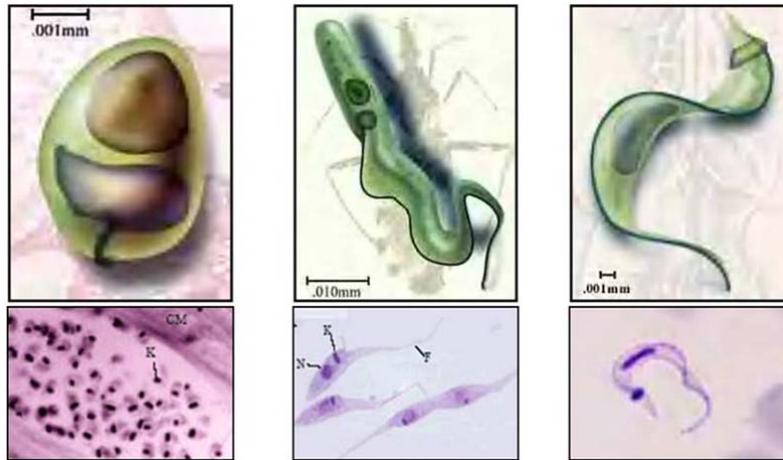


Figura 1. Diferentes Estadios de *T. cruzi*. De izquierda a derecha: amastigote (2-5 μm), epimastigote (20-40 μm) y tripomastigote (25-27 μm).

1.1 Ciclo Biológico de *T. cruzi*.

Los vectores involucrados en el ciclo de *T. cruzi* son insectos del orden *Hemiptera*, familia *Reduviidae* y subfamilia *Triatominae*. Se agrupan en 130 especies, de las cuales 53 pueden adquirir de manera natural al parásito. Existen más de 30 especies de triatóminos en México, de las cuales al menos 10 están involucradas en el proceso de infección en el humano (Cruz y Pickering, 2006). Los géneros más importantes son: *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus*, los cuales ingieren al parásito al alimentarse de sangre humana o animal que contiene parásitos circulantes (Miles, 2003; Cruz y Pickering, 2006) (**Figura 2**).



Figura 2. Principales Géneros de Vectores Transmisores de *T. cruzi*: *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus* respectivamente.

Los tripomastigotes ingeridos se transforman en epimastigotes en el intestino medio del vector y se multiplican por fisión binaria longitudinal. Posteriormente se diferencian en el intestino grueso del insecto, transformándose en tripomastigotes metacíclicos infectantes después de 8-10 días de ser ingeridos.

El ciclo de transmisión inicia cuando un vector infectado se alimenta de sangre del huésped mamífero y libera tripomastigotes metacíclicos en las heces y orina, los cuales pueden penetrar a través del sitio de la picadura, heridas o a través de la mucosa intacta, tal como la conjuntiva. Dentro del huésped los tripomastigotes pueden penetrar en cualquier tipo celular en donde pueden ser encontrados en el interior de una vacuola parasitófora. Las células más frecuentemente invadidas activamente por *Trypanosoma cruzi* son las células reticuloendoteliales del bazo, hígado y ganglios linfáticos, así como células del corazón, del músculo liso y esquelético, aunque también en algunos casos puede infectar células del sistema nervioso, piel, gónadas, mucosa intestinal, médula ósea y placenta. Los tripomastigotes también pueden entrar a través de fagocitosis por medio de los macrófagos. Después de algún tiempo se transforman al estadio de amastigote, en el citoplasma de la célula.

Aproximadamente 35 horas después de la infección, se inicia el proceso de división celular binaria, que prosigue por varios días dependiendo de la cepa de *T. cruzi* y del tipo celular del huésped. El tiempo de generación es de aproximadamente 14 horas. Después de 5 días, cuando la célula contiene alrededor de 500 amastigotes, se inicia un proceso casi sincronizado de transformación a la forma de tripomastigote sanguíneo, pasando por un estado intermedio. Una vez que la célula huésped se rompe, los parásitos son liberados al espacio extracelular donde pueden infectar a las células vecinas o alcanzar el torrente sanguíneo por donde infectarán a nuevas células en diferentes tejidos o bien, pueden ser ingeridos por un nuevo insecto vector cerrando así el ciclo de vida. Los tripomastigotes circulantes en sangre no se replican (García y Azambuja, 1991; Kolien y Schaub, 2000; Tyler y Engman, 2001) **(Figura 3)**.

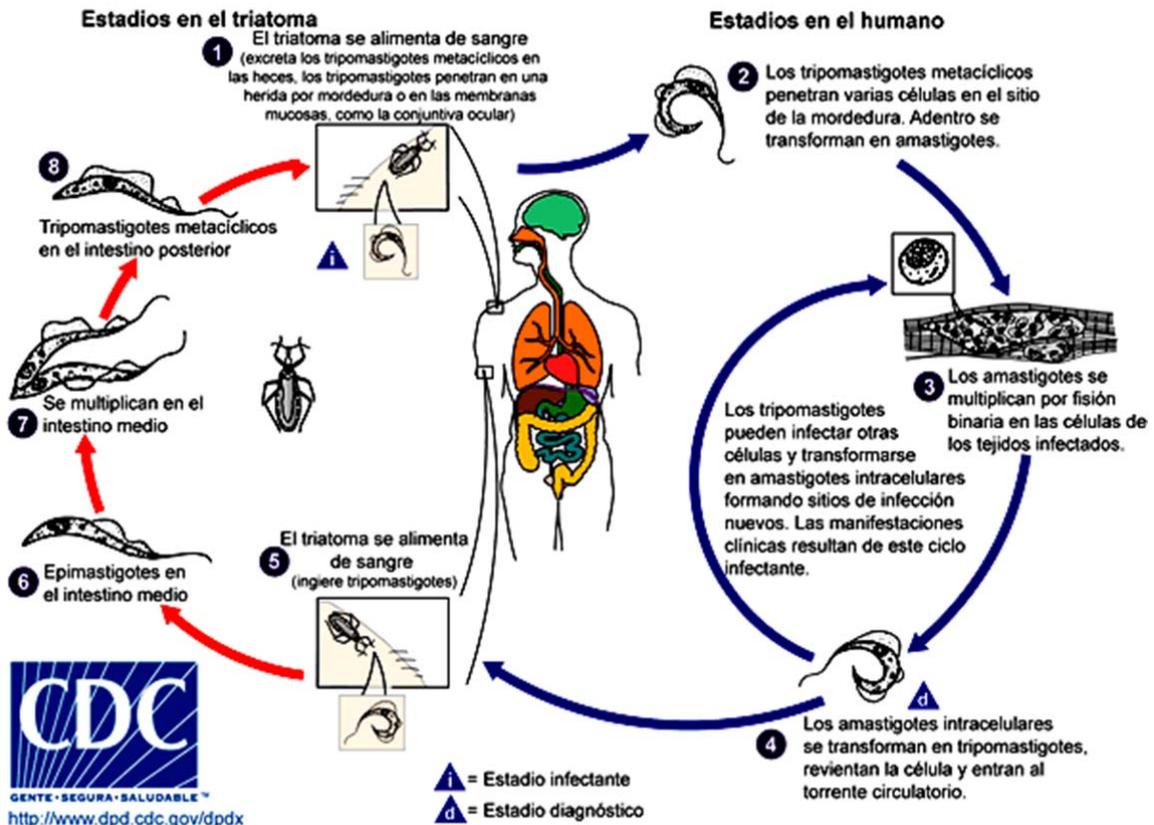


Figura 3. Ciclo Biológico de *T. cruzi* ([http:// dpd.cdc.gov/dpdx](http://dpd.cdc.gov/dpdx), 2004).

La enfermedad de Chagas se transmite también a través de transfusiones sanguíneas, transplantes de órganos, a través de la placenta y por accidentes de laboratorio (Brener, 1973; de Souza, 1984; Vickerman, 1985; Bittencourt *et al.*, 1988; Schmuñis, 1991; Tanowitz *et al.*, 1992; CDC, 2000; Coura, 2007).

Ocurre un ciclo de vida alternativo, en donde los amastigotes liberados por la lisis prematura de células infectadas (intracelulares) o por la diferenciación en torrente sanguíneo de tripomastigotes a amastigotes (extracelulares) son capaces de invadir células fagocíticas profesionales o no profesionales, sobreviviendo y continuando con su ciclo (Pan, 1978; Hudson, 1984; Ley *et al.*, 1988; Mortara, 1991; Barros *et al.*, 1997).

1.2 Epidemiología.

La enfermedad de Chagas se encuentra a lo largo del continente americano desde el sur de los Estados Unidos hasta el sur de Argentina, la mayor parte en áreas pobres y rurales del centro y sur de América. Las zonas endémicas están estrechamente relacionadas con la presencia del vector, que como se dijo anteriormente, corresponden a chinches del género *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus* (Monfort *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2001).

El humano es el principal reservorio en el ciclo domiciliario, seguido por animales domésticos como el perro, el gato y algunos roedores domésticos. Numerosas especies de mamíferos pueden estar infectadas de manera natural en zonas endémicas. Por tanto, los animales que invaden las viviendas y las zonas peri-domiciliarias como los mapaches y los roedores, pueden ser un riesgo de transmisión de la enfermedad para los humanos (Salazar *et al.*; 1987., Cruz y Pickering, 2006). Se estima un total de entre 16 y 18 millones de personas infectadas en 21 países de Latinoamérica (Castillo, 2003). Argentina, Honduras, Paraguay y el Salvador presentan entre el 5 y el 10% de la población infectada con el parásito, mientras que en Chile, Colombia, Ecuador y Venezuela presentan entre el 1 y el 5% (Wendel, 1992; Clark y Pung 1994; Pung *et al.*, 1995; WHO, 1995; Pung *et al.*, 1998; Schmuñis, 1991).

En México, estudios recientes muestran que el porcentaje de infección con *T. cruzi* en población abierta es de 1.65%. Además, se ha observado una amplia variación en los valores de sero-prevalencia encontrados en bancos de sangre en la República Mexicana, que versan desde un 0.5 hasta un 20% en diversos puntos del País. Por otro lado, en un estudio a nivel nacional realizado por el Instituto de Diagnostico y Referencia Epidemiológica (INDRE) en colaboración con los Centros Estatales de Transfusión Sanguínea (CETS), se mostró que el 1.5% de las muestras de donación contenían anticuerpos anti-*T. cruzi* (Guzmán, *et al.*, 1998; Guzmán-Bracho, 2001).

En base a estos porcentajes de sero-prevalencia y al número de habitantes de nuestro país se estima que 1'768,376 personas están infectadas con *T. cruzi*, concentrándose un 69% de los casos sero-positivos (931,643 individuos) en los estados de Chiapas, Veracruz, Guanajuato, Hidalgo, Puebla, Michoacán, México y Oaxaca. El 31% restante del total de los casos seropositivos está distribuido en los estados de Sinaloa, Jalisco, Tamaulipas, San Luís Potosí, Guerrero, Yucatán, Zacatecas, Tabasco, Nayarit, Nuevo León, Aguascalientes, Campeche, Morelos, Chihuahua, Querétaro, Quintana Roo y Colima. Además el 57% del total de la población infectada en el país es residente de zonas rurales, 34.1% de zonas urbanas y 8.9% de zonas suburbanas (Zavala, *et al.*, 1996; Velasco, *et al.*, 1991; Dumontiel, 1999; Guzmán-Bracho, 2001).

A finales de la década de los 80's, el número documentado de los inmigrantes latinoamericanos en los Estados Unidos procedentes de países endémicos para *T. cruzi* fue de 2.24 millones, de los cuales 1.55 millones provenían de México (resumen estadístico de los Estados Unidos, 1989). Más de 7 millones de personas originarias de los países endémicos de *T. cruzi* se convirtieron en residentes legales entre 1981 y 2005 (Oficina del Censo de E.E.U.U., 2007). La infección se encuentra más frecuentemente asociada a inmigrantes de México, Centro América y Sudamérica; se estima que existen entre 100 mil y 600 mil inmigrantes latinoamericanos infectados con la enfermedad de Chagas en Estados Unidos (Espinoza y Manning-Cela, 2007). Aproximadamente 250,000; 8,000; 200,000 inmigrantes procedentes de América Latina vivían en Europa, Australia y Japón respectivamente a finales de los años 80's (Schmuñis, 1991). Los inmigrantes en Japón son principalmente brasileños de ascendencia japonesa cuyas condiciones de vida en Brasil hace poco probable que hayan sido infectados con *T. cruzi*. En Europa, España se ha convertido en un imán para los inmigrantes procedentes de América Latina (Schmuñis, 2007) (**Figura 4**). Las muertes por causa de esta enfermedad se calculan entre 45 mil y 50 mil cada año, siendo la miocardiopatía chagásica crónica la principal causa.

La mortalidad durante la fase aguda ocurre aproximadamente en el 5% de los niños menores de 2 años, debido a miocarditis aguda o meningoencefalitis (Barreto y Andrade, 1994; Guzmán-Bracho, 2001; Cubillos *et al*; 2004; Torrico *et al*; 2004).



Figura 4. Distribución Geográfica de *T. cruzi* (Schmuñis, 1991).

1.3 Signos y Síntomas.

La enfermedad de Chagas presenta dos diferentes fases: aguda y crónica. La fase crónica, a su vez, se divide en dos etapas: la etapa indeterminada y la etapa clínica.

1.3.1 Fase Aguda.

La fiebre, frecuentemente es un signo sugerente de infección en la fase aguda. La lesión en el sitio de entrada del parásito: chagoma (lesión furunculoide en la piel) o signo de Romaña (entrada a través de la conjuntiva) está presente del 20 al 50% de los casos agudos. En niños se ha observado hepatomegalia, esplenomegalia, edema subcutáneo generalizado o localizado en la cara y extremidades inferiores, en un 30 a 50% de los casos. Del 30 al 80% de los pacientes desarrollan taquicardia persistente. Las manifestaciones de la fase aguda se solucionan espontáneamente en un plazo de entre 3 y 8 semanas en, aproximadamente, el 90% de los individuos que han sido infectados (Prata, 2001; Cubillos *et al.*, 2004; Torrico *et al.*; 2004) **(Figura 5)**.



Figura 5. Chagoma y Signo de Romaña.

1.3.2 Fase Crónica.

1.3.2.1 Etapa Indeterminada.

Es una progresión directa entre la fase aguda y la fase definida (sintomática). Aproximadamente, del 50 al 70% de los pacientes en la fase indeterminada nunca desarrollan lesiones y permanecen asintomáticos. Del 30 al 50% restante de los pacientes desarrollan una disfunción cardíaca o digestiva de 10 a 30 años después de la fase aguda (Rassi, *et al*; 2000; Cubillos *et al*; 2004; Torrico *et al*; 2004).

1.3.2.2 Etapa Sintomática.

Se caracteriza por presentar palpitaciones, mareos, síncope y convulsiones, debidos a una insuficiencia circulatoria aguda por disminución del ritmo cardíaco, taquicardia ventricular o paro cardíaco. En la insuficiencia cardíaca se puede observar arritmia, dolor precordial atípico sin evidencia de enfermedad coronaria y disnea. En la presencia de megaesófago hay regurgitación y aspiración de comida, hipertrofia de glándulas salivales, pérdidas de peso, caquexia, signos de ruptura esofágica y aumento en la incidencia de cáncer de esófago. En el caso de Megacolon existe distensión asimétrica del abdomen, meteorismo, oclusión intestinal y vólvulo del colon sigmoides (Prata, 2001; Cubillos *et al*; 2004; Torrico *et al*; 2004) (**Figura 6**).



Figura 6. Cardiomegalia, Megaesófago y Megacolon.

1.4 Inmunología.

La respuesta humoral a *T. cruzi* está dada por múltiples mecanismos efectores, entre los que se incluyen una potente respuesta de anticuerpos contra las formas extracelulares y una respuesta celular eficaz contra el estadio intracelular, con estímulos constantes del sistema inmune que determinan la respuesta del huésped durante la fase de la enfermedad.

Por otra parte, en los estadios iniciales de la infección, es esencial la respuesta innata o inespecífica a través de sus efectores y moduladores celulares y moleculares. Las citocinas y mediadores solubles juegan un papel fundamental durante la infección, ya que su actividad determina en gran medida el inicio, duración y composición de las distintas vías efectoras de la respuesta inmune (Fresno *et al.*, 1997).

En la infección aguda, la respuesta inmune por células Th1 (Células T cooperadoras tipo 1) es estimulada por Interleucina 2 (IL-2) e Interferón gama (IF γ), lo cual se relaciona con el daño tisular generado en el huésped (Reed, 1988; Torrico *et al.*, 1991). Por otro lado, la inducción de una respuesta tipo 1 por parte de las células T cooperadoras de tipo 2 (Th2), por aumento de Interleucina 4 (IL-4) e Interleucina 10 (IL-10), hace al huésped más susceptible a la infección por *T. cruzi*. Al igual que en cualquier infección por agentes patógenos, el grado de susceptibilidad del huésped y el daño tisular generado depende de la inmunorregulación de la respuesta inmune Th1-Th2 y del predominio en la acción de las diferentes citocinas (Reed *et al.*, 1994; Zhang y Tarleton, 1996).

La enfermedad de Chagas con frecuencia resulta ser letal en niños y personas de la tercera edad, debido posiblemente a las condiciones de su sistema inmune que no les permite montar una respuesta inmunoprotectiva. En adultos, por el contrario, frecuentemente la enfermedad evoluciona a la fase crónica, que después de un largo periodo de tiempo resulta en el desarrollo de megavísceras, resultando en la disfunción de estos órganos y la posterior muerte del paciente como consecuencia.

Durante el transcurso de la enfermedad, en el parásito aparentemente operan un amplio rango de mecanismos para evadir la respuesta inmune; se ha propuesto la asociación de la supresión de la respuesta inmunológica del organismo, que se hace más evidente conforme la parasitemia avanza en tejido y sangre (Tafari, 1999; Umekita y Mota, 2000; DosReis *et al.*, 2005; Dutra *et al.*, 2005).

Existe también una reacción autoinmune durante la fase crónica que ocasiona daño al tejido del huésped en su relación con el parásito, lo que podría estar dado por el mimetismo molecular del parásito con relación a las moléculas del propio huésped, originando la reactivación del sistema inmune (Tarleton, 1997; Tarleton, 2001; Tarleton, 2003; Shevac, 2000).

1.5 Diagnóstico.

El diagnóstico está dado principalmente por la historia clínica del paciente, además de estudios de gabinete y de laboratorio. Los estudios de gabinete son principalmente radiológicos (torácico-abdominal), electrocardiograma, ultrasonido y ecocardiograma que son de mayor utilidad en la fase crónica de la enfermedad.

En la etapa aguda, los estudios están centrados en la búsqueda del parásito en sangre. Debido a que la sensibilidad de los métodos utilizados es variable, se aconseja seguir con una rutina diagnóstica predeterminada (Dumontiel, 1999; Rassi, *et al.*, 2000):

* *Examen directo*: búsqueda de *T. cruzi* en sangre periférica. Es un método 100% específico, pero de muy baja sensibilidad, dando numerosos falsos negativos.

* *Método de Strout*: este método concentra los elementos parasitarios mediante centrifugación. La especificidad es de 100% y la sensibilidad de 95%.

* *Microhematocrito*: la sangre es extraída por capilaridad mediante punción digital o plantar en tubos de microhematocrito, centrifugándose posteriormente. Este método es recomendado en los recién nacidos, por la escasa cantidad de sangre utilizada. Su sensibilidad es de 95% y su especificidad de 100%.

* *Xenodiagnóstico*: un insecto libre de patógenos criado en el laboratorio es llevado a succionar sangre de un paciente. El contenido del intestino del insecto se examina después en busca de la presencia del patógeno, este método continúa siendo el de elección en la etapa aguda, por su especificidad de 100% y sensibilidad cercana a 100%, debido a la amplificación parasitaria producida.

* *Hemocultivo*: consiste en la siembra de sangre venosa en un medio apropiado en busca de crecimiento parasitario. La especificidad es de 100% y la sensibilidad cercana a 100%.

En la *etapa crónica* de la enfermedad la parasitemia es transitoria, esto hace que la probabilidad de detectar al parásito en sangre sea muy baja y que el diagnóstico se base en la detección de anticuerpos circulantes anti-*T. cruzi*. El diagnóstico serológico se realiza de manera rutinaria, se lleva a cabo la determinación de IgM en la etapa aguda de la enfermedad, y de IgG en la etapa crónica. Se recomienda utilizar por lo menos dos técnicas complementarias al mismo tiempo para identificar a un paciente como chagásico, y de acuerdo a pautas establecidas por la OMS una de ellas debe ser la inmunofluorescencia indirecta (IFI). Esta técnica posee una sensibilidad del 100% y una especificidad cercana a 100%. Se consideran títulos significativos las diluciones superiores a 1:30. Los demás métodos serológicos utilizados son:

* *Hemaglutinación indirecta (HAI)*: se consideran títulos significativos los superiores a la dilución 1:16.

* *ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)*: se destaca su utilización para “*screening*” por su alta sensibilidad.

* La reacción en cadena de la polimerasa (*PCR-Polimerase Chain Reaction*) detecta al parásito por medio de la amplificación de un fragmento de ADN del cinetoplasto, de regiones repetidas nucleares específicas o de la secuencia del miniexón (Montiel y Díaz 2002; Guhl *et al.*, 2002).

Para el caso de Chagas congénito, es sumamente importante tener en cuenta que sólo es posible realizar un tratamiento curativo de la enfermedad en su etapa aguda, por lo que los métodos de elección serán aquellos basados en la observación directa del parásito en la sangre del neonato, constituyéndose así un diagnóstico de certeza. Los métodos inmunoserológicos permiten detectar la presencia de IgM fetal específica y la presencia de IgG materna específica en los primeros seis meses y propia del producto luego del sexto mes de vida. La totalidad de los recién nacidos hijos de madre chagásica tienen serología convencional positiva, por pasaje transplacentario de anticuerpos IgG, durante los primeros seis meses de vida. Las IgM específicas son detectadas por IFI, aglutinación directa (AD) o ELISA de captura.

Si estos resultados resultan positivos se debe intensificar la búsqueda del parásito, ya que antes de los seis meses de vida sólo deben ser tratados aquellos niños en quienes se haya comprobado la presencia del parásito. Los métodos serológicos mencionados anteriormente utilizan antígenos de epimastigotes de *T. cruzi* semi-purificados, lo que conduce en algunas ocasiones a tener falsos positivos o resultados no concluyentes, sobre todo en casos de co-infección de *T. cruzi* y *Leishmania*. Estos métodos también distan bastante de ser ideales para la determinación de la enfermedad en su fase aguda temprana, y en individuos con bajos títulos de anticuerpos anti-*T. cruzi*.

1.6 Tratamiento.

El tratamiento etiológico en la enfermedad de Chagas está dirigido a erradicar el parásito, evitar la aparición o progresión de lesiones viscerales e interferir en la cadena de transmisión. Dicho tratamiento se indica en: infección aguda, infección congénita, reactivaciones en inmunodeprimidos e infección crónica indeterminada (exclusivamente en niños y menores de 14 años). Antes de realizar el tratamiento, la infección debe ser confirmada mediante técnicas de referencia *cuantitativas*, ya que la disminución de los títulos pos-tratamiento constituye un indicador de buena respuesta terapéutica en los casos agudos.

La terapia para la enfermedad de Chagas ha dependido de dos drogas nitro-heterocíclicas: Nifurtimox y Benznidazol. El primero es un nitrofurano, introducido en la década de los 60's, para el tratamiento de la patología en el estado agudo, es una droga tripanocida fundamentalmente para los tripomastigotes circulantes, y es mejor tolerada en pacientes jóvenes. El Benznidazol es un 5'-nitroimidazol, que se dio a conocer en la década de los 70's, y su efecto se produce a través de la unión a macromoléculas produciendo daño a nivel del ADN. El mecanismo de acción de Nifurtimox involucra un metabolismo reductivo que lleva a la formación de radicales libres del oxígeno altamente tóxicos (Packchian, 1957). El tratamiento específico con Nifurtimox es de 8-16 mg/Kg dividido en tres dosis por 50-120 días y con Benznidazol es de 5-7 mg/Kg por 60 días, de los cuales este último es el de elección.

Debido a que los tratamientos con ambas drogas son prolongados, producen serios efectos secundarios y su eficacia es parcial (ya que no son efectivos para el tratamiento del Chagas crónico), el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos se ha convertido en una problemática de carácter urgente para la comunidad científica. En la etapa aguda el tratamiento se debe administrar con rapidez, observando una mejora en los síntomas así como una notable disminución de parásitos en sangre periférica, cinco días después del tratamiento; las pruebas serológicas y el xenodiagnóstico deben ser negativos

en días posteriores. En casos crónicos se logra la reducción de la parasitemia, pero las pruebas serológicas pocas veces se vuelven negativas.

El tratamiento no mejora la función cardíaca, las manifestaciones clínicas ni la progresión de la enfermedad. Los resultados obtenidos en diferentes países difieren, tal vez debido a que son otras cepas y a la diferente susceptibilidad de los medicamentos. Los efectos secundarios que ocasiona el Nifurtimox son anorexia, pérdida de peso, nerviosismo, insomnio, temblor, y neuritis periférica; las alucinaciones y convulsiones son raras. Con la administración del Benznidazol los efectos secundarios son náuseas, cefalea, anorexia, dolor abdominal, pérdida de peso, mareos, vómito, dermatitis exfoliativa y trombocitopenia (Cabello, 1998; Cevallos y Hernández, 2002).

2. Características Estructurales de *T. cruzi*.

2.1 Núcleo.

La forma del núcleo depende del estadio del parásito. Tal como se mencionó anteriormente, en tripomastigotes metacíclicos y sanguíneos es alargado y se encuentra ubicado en la parte central de la célula; en epimastigotes y amastigotes, en cambio, posee forma redondeada. Se encuentra rodeado por una membrana nuclear típica, y se ha determinado la existencia de continuidad entre la membrana nuclear externa y el retículo endoplásmico (RE). El nucléolo posee una ubicación algo excéntrica y deja de ser observado cuando la célula entra en división (**Figura 7**).

El genoma de *T. cruzi* posee un tamaño aproximado de 45-50 Mpb, y una característica particular de este parásito es que el ADN nuclear no se condensa para formar cromosomas en ninguna de sus formas de vida; solamente es posible observar, durante la interfase, ciertos acumulos de cromatina en la periferia del núcleo por debajo de la membrana nuclear interna. Sin embargo, el desarrollo de la técnica de electroforesis de campos pulsados ha permitido identificar en epimastigotes de *T. cruzi*, de 30-40 “bandas

cromosomales” que poseen un tamaño de entre 0.45 y 4 Mpb (de Souza, 2002).

En tripanosomátidos los genes nucleares carecen de intrones y aparecen generalmente dispuestos en densos grupos que contienen repetidos de un mismo gen, con marcos abiertos de lectura (*ORF* por sus siglas en inglés) no relacionados interpuestos. Los genes sucesivos están separados entre sí por secuencias cortas denominadas secuencias intergénicas. Debido a la existencia de tan solo unos pocos promotores para la transcripción, estos genes son transcritos por la ARN polimerasa II como largas unidades policistrónicas (Onn *et al.*, 2006).

Los transcritos primarios así generados, son posteriormente procesados mediante un mecanismo de cortado y pegado para dar lugar a ARNm maduros e individuales correspondientes a cada uno de sus genes. Este proceso involucra la adición de una cola de adeninas en el extremo 3' de los transcritos (poliadenilación) y de 35 nucleótidos estrictamente conservados, denominados mini exón o *splice leader*, en el extremo 5' (Ochsenreiter *et al.*, 2007). Ya que el mini exón previamente sufrió el proceso de *capping*, la adición del CAP a cada uno de los transcritos maduros ocurre de manera simultánea con el *trans splicing*. Tanto la poliadenilación como el *capping* no se llevan a cabo en un lugar fijo de la región intergénica, sino que pueden ocurrir en varios lugares dentro de una ventana relativamente estrecha de la misma, y están influenciados por la presencia de trectos de polipirimidinas que interactúan con aquellas proteínas involucradas en el procesamiento del ARN.

Estas posiciones alternativas para el procesamiento de los mensajeros primarios hacen que existan distintos ARNm con regiones no traducidas (UTR) de distinta longitud para un mismo gen. Estas variaciones serían potencialmente importantes para la regulación de la expresión génica en tripanosomátidos, ya que a diferencia de otros organismos, los niveles en la expresión de proteínas en estos parásitos están controlados post-transcripcionalmente por un mecanismo que involucra estabilización o desestabilización de los ARNm (Vanhamme *et al.*, 1995). La posibilidad de

interferir con este proceso es considerada un posible blanco para el desarrollo de drogas (**Figura 7**).

2.2 Superficie Celular.

El parásito presenta, en todos los estadios una estructura muy delgada uniformemente distribuida en su superficie, denominada glucocaliz, que está constituida principalmente por mucinas que se encuentran implicadas tanto en el mecanismo de adhesión del parásito, como también en protegerlo contra el sistema inmunológico del vector y el hospedero (Buscaglia *et al.*, 2006).

Puede considerarse que la superficie celular de los tripanosomátidos posee dos componentes estrechamente asociados: la membrana plasmática, y una capa extensa de microtúbulos, denominados microtúbulos subpeliculares, asociados a ella. La membrana puede subdividirse en tres subdominios morfológicamente distintos, cada uno de los cuales posee funciones, composición proteica y lipídica diferentes: la membrana flagelar, la membrana del bolsillo flagelar y la membrana plasmática del cuerpo del parásito (de Souza 1999; Landfear *et al.*, 2001) (**Figura 7**).

2.3 Microtúbulos.

Los microtúbulos subpeliculares se extienden por debajo de la membrana plasmática a lo largo de todo el cuerpo del parásito, excepto en la región del bolsillo flagelar. Se encuentran unidos entre sí y a la membrana mediante filamentos cortos de naturaleza desconocida que le dan rigidez a la célula; están regularmente espaciados y su número está relacionado con el diámetro de la misma. De esta manera, en la parte posterior y anterior del parásito la cantidad de microtúbulos es menor, mientras que en la región central, entre el núcleo y el cinetoplasto donde se encuentra el aparato de Golgi, existe una gran acumulación de ellos. Están involucrados en los cambios morfológicos que sufre *T. cruzi* durante su ciclo de vida, y cumplen un rol

fundamental en la división celular (**Figura 7**). Debido a esto, el desarrollo de drogas que inhiban el ensamblado de los microtúbulos es un blanco quimioterapéutico potencial.

Se ha demostrado que son resistentes a los inhibidores clásicos de microtúbulos tales como colchicina y benzimidazoles, sin embargo algunos alcaloides y macrólidos han mostrado ser efectivos (de Souza, 2002). Los tripanosomátidos poseen transportadores de membrana que median la captación de nutrientes del medio (célula hospedadora) e intervienen en la internalización de drogas. En el primer caso, el diseño de compuestos que bloqueen específicamente dichos transportadores es considerado de gran importancia (Hasne *et al.*, 2000); mientras que en el segundo, el conocimiento de la estructura de las moléculas transportadoras es crucial para el desarrollo de drogas que puedan adaptarse mejor a ellas, y por lo tanto puedan ser internalizadas con mayor eficacia. Muchas de las proteínas estructurales de superficie de los tripanosomátidos, incluso las mucinas de *T. cruzi*, están unidas a la membrana mediante anclas de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI). Las enzimas parasitarias encargadas de la biosíntesis de dichas anclas difieren bastante de sus homólogas de mamíferos, y se ha demostrado que son esenciales para la sobrevivencia del parásito, mediante la utilización de inhibidores específicos (Ferguson *et al.*, 1999).

2.4 Flagelo.

Todos los miembros de la familia Tripanosomatidae poseen un flagelo que emerge del saco flagelar y le otorga movilidad al parásito. Posee una estructura básica similar a la de otros flagelos, presenta un axonema con un patrón de microtúbulos de 9+2, y una estructura filamentosa altamente organizada que lo acompaña en toda su longitud y que se denomina bastón paraflagelar (*paraflagellar rod*).

La longitud del flagelo varía de acuerdo al estadio del ciclo de vida del parásito, de esta manera, en amastigotes mide solamente 1µm, mientras que

en epimastigotes y tripomastigotes llega a medir 20 μm (Balber, 1990; de Souza, 1999; de Souza, 2002; Miranda *et al.*, 2006) (**Figura 7**).

2.5 Saco Flagelar.

El saco flagelar es una invaginación de la membrana plasmática ubicada en la región anterior del parásito desde donde emerge el flagelo; presenta diferente morfología en los distintos cinetoplástidos, y también varía de acuerdo al estudio del ciclo de vida del parásito; sin embargo, en todos los casos su función es similar. En epimastigotes y amastigotes de *T. cruzi* es una estructura con forma de túnel denominada complejo *citostomo-citoprاندix*, constituida por una profunda invaginación de la membrana plasmática que puede llegar hasta la región nuclear. La apertura del complejo, conocida como citostoma, posee un diámetro que puede llegar a los 0.3 μm (de Souza, 2002). En la región del saco flagelar existe solución de continuidad entre la membrana plasmática y la flagelar. Representa entre el 0.4 y el 3% de la superficie del parásito, su lumen ha demostrado estar constituido por un material electrodensito que contiene proteínas específicas y, debido a que es una región altamente especializada de la membrana, difiere en composición y distribución de proteínas con respecto al resto y carece de los microtúbulos subpelículaes (Balber, 1990).

Es el único sitio conocido, hasta el momento, en tripanosomátidos a través del cual se llevan a cabo los procesos de endocitosis, secreción de proteínas hacia el espacio extracelular, e integración de proteínas de membrana de la superficie del parásito (Webster y Rusell, 1993; Landfear *et al.*, 2001; de Souza, 2002) (**Figura 7**).

2.6 Reservosomas

Las moléculas a ser endocitadas por el parásito, inicialmente se unen al citostomo y luego son internalizadas en el fondo del citoprاندix, apareciendo en el citoplasma celular como pequeñas vesículas endocíticas que,

posteriormente, se fusionan entre si y generan estructuras tubulares que pueden observarse en la zona central del parásito. Más tarde las macromoléculas endocitadas son concentradas en estructuras denominadas reservosomas.

Cada epimastigote presenta varios reservosomas localizados en la región posterior de la célula, su forma puede variar de acuerdo a las condiciones de crecimiento del parásito, pero puede decirse que en general presentan forma esférica, que están rodeados por una membrana única y que poseen un diámetro aproximado de 0.7 μm . Tal como lo indica su nombre, los reservosomas son organelos de reserva que contienen lípidos y proteínas que son almacenados y utilizados por el parásito cuando se encuentra creciendo en un medio escaso de nutrientes. Una característica importante de los reservosomas es que acumulan grandes cantidades de cruzipaina, que es la cisteína proteinasa principal presente en *T. cruzi* (de Souza, 1999; Porto Carreiro *et al.*, 2000) (**Figura 7**).

2.7 Vía Secretora.

Los tripanosomátidos poseen un retículo endoplasmico (RE) extenso, disperso por todo el citoplasma celular, que posee solución de continuidad con la membrana nuclear externa. El aparato de Golgi es un organelo situado en el centro de la vía secretoria, cuya función es la de agregar carbohidratos complejos a lípidos de membrana y proteínas sintetizadas *de novo* en el RE que serán secretadas al medio extracelular o integradas a membranas. El complejo de Golgi se encuentra ubicado entre el núcleo y el cinetoplasto, posee de 4-6 sacos aplanados con una cara *cis*, de entrada de vesículas provenientes del RE y una cara *trans* de salida de vesículas (conteniendo lípidos y proteínas ya procesados) hacia el bolsillo flagelar (de Souza, 2002; Mc Conville, 2002) (**Figura 7**).

2.8 Mitocondria y Cinetoplasto.

Trypanosoma cruzi, al igual que el resto de los miembros de la familia tripanosomatidae, posee una única mitocondria que se extiende a lo largo del cuerpo celular del parásito. A diferencia de lo que ocurre en las células de mamíferos, la membrana mitocondrial de los tripanosomátidos presenta una alta cantidad de esteroides. Se ha demostrado que el tratamiento de parásitos con drogas que alteran la síntesis de ergosterol produce graves cambios morfológicos y funcionales en la mitocondria; esta característica hace que el desarrollo de nuevas drogas que inhiban la biosíntesis de esteroides sea considerado un blanco de quimioterapia muy promisorio (de Souza, 2002).

Otra característica importante de la mitocondria de los tripanosomátidos es su material genético, como se dijo anteriormente el ADN mitocondrial representa entre el 20 y el 25% del ADN total del parásito y se encuentra localizado cerca del cuerpo basal formando una estructura denominada cinetoplasto. Éste está constituido por una intrincada red de mini y maxi círculos de ADN (Shapiro *et al.*, 1995).

El cinetoplasto es una estructura en forma tubular o de disco particular del orden Cinetoplástida, esta estructura se encuentra localizada en la parte posterior del organismo dentro de la mitocondria y está organizada como una red de moléculas circulares de ADN grandes y pequeñas. Las moléculas grandes (maxicírculos) contienen el equivalente típico del ADN mitocondrial y en ellas se han encontrado codificados dos genes de ARN ribosomal y genes de proteínas tales como citocromos, apocitocromos o subunidades de la NADH deshidrogenasa. Durante mucho tiempo se desconoció la función de las moléculas pequeñas (minicírculos), pero se ha encontrado recientemente que codifican para unas pequeñas moléculas de ARN "guía" (ARNg), que participan en el proceso de edición de estos parásitos (Abu-Elneel *et al.*, 2001; Blum *et al.*, 1990; Shlomai, 2004).

En el cinetoplasto hay aproximadamente 20,000 minicírculos que poseen una longitud de 0.45 μm (aproximadamente 1,440 pb) y cerca de 30 maxicírculos con un diámetro de 10 μm con un tamaño comparable al ADN

mitocondrial de otras células eucariotas, estos últimos son los componentes activos del genoma mitocondrial del parásito (de Souza, 2002) **(Figura 7)**.

En este genoma se ha observado un intrigante proceso de edición del mensajero (ARNm), el cual consiste en la adición o remoción de uridinas post-transcripcionalmente. Esta adición puede ser desde 4 nucleótidos hasta el 60% del total del transcrito y crea codones de iniciación y terminación de la traducción; así como, de sitios de poliadenilación que no estaban codificados en el genoma mitocondrial (Schnauffer *et al.*, 2001; Benne *et al.*, 1986; Feagin *et al.*, 1988).

Al parecer, la edición se lleva a cabo del extremo 3' hacia el 5' y siempre teniendo en el extremo 3' una purina (Benne, 1988). Se ha propuesto un modelo para este proceso de edición del ARNm. Existe evidencia de una especie de ARN que coordina la adición o remoción de las uridinas. Estos ARNg son complementarios en su extremo 3' con el transcrito no editado y en su extremo 5' con el transcrito editado. En su mayoría, están codificados en los minicírculos del ADN mitocondrial (ADNm) y su tamaño se estima que es aproximadamente de 80 nucleótidos (Blum *et al.*, 1990) **(Figura 7)**.

2.9 Glicosomas.

Son organelos relacionados con los peroxisomas y glioxisomas debido a que poseen características morfológicas y algunas vías metabólicas en común. La característica más importante de los glicosomas, es la presencia de las siete primeras enzimas de la vía glicolítica en la matriz glicosomal. Esta compartimentalización les otorga a las enzimas características bioquímicas y de regulación (de Souza, 1999; Docampo *et al.*, 2005) **(Figura 7)**.

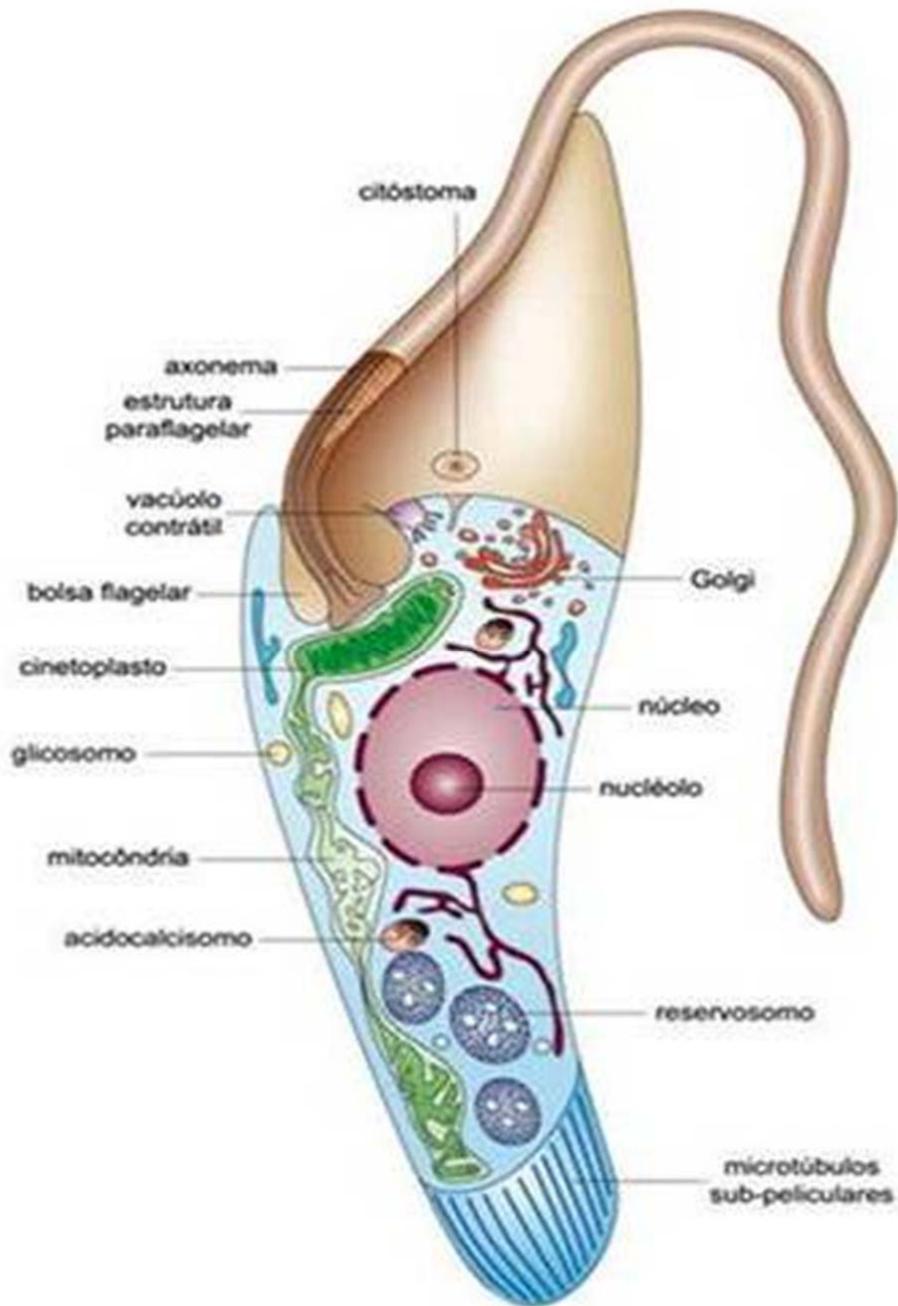


Figura 7. Esquema de los Organelos en el Estado de Epimastigote de *T. cruzi*.

3. Transcripción en *T. cruzi*.

Se ha observado que *T. cruzi* es un organismo diploide con, por lo menos, 20 pares de cromosomas y que, a diferencia de *T. brucei*, carece de minicromosomas. Como se describió anteriormente, los genes codificadores de proteínas de algunos tripanosomatidos están organizados en unidades de transcripción policistrónicas, genes repetidos en tándem y separados por regiones intergénicas que son transcritos y procesados simultáneamente; como se ha estudiado ampliamente en *T. brucei*.

El ribosoma es un complejo de proteínas y ARN, es el organelo encargado de catalizar la síntesis de proteínas. Un ribosoma típico está compuesto por dos subunidades, que juntas contienen cuatro moléculas de ARN ribosomal (ARNr) y 80 proteínas. A pesar de la gran similitud estructural observada entre ribosomas eucarióticos y procarióticos, existen diferencias entre los mismos. Es posible que el mayor número de proteínas en el ribosoma eucariótico pueda deberse a que existe una mayor interacción de los ribosomas con otros organelos, y a la necesidad de transporte de los ribosomas desde el núcleo hacia el citoplasma (Gibson y Mails, 1986; Graham y Barry, 1995; Ejchel *et al.*, 2003).

3.1 Procesamiento Postranscripcional.

3.1.1 *Splicing*.

Todos los genes descritos hasta ahora en *T. cruzi* carecen de intrones, por lo que el procesamiento del ARNm es distinto al del resto de los eucariontes. El corte de los intrones en el ARNm poligénico (*splicing*) es un cambio a nivel post-transcripcional que se lleva a cabo con frecuencia en eucariontes, ya que contienen en su genoma secuencias que no son traducibles, denominadas intrones, y secuencias que contienen información genética expresada mediante la transcripción y la traducción, denominados exones.

Por lo tanto, la maduración del ARNm (*splicing*) consiste en la eliminación de las secuencias de los intrones del transcrito primario, de modo que las secuencias de los exones quedan unidas unas con otras. Las secuencias que codifican para proteínas de los tripanosomatidos están organizadas en transcritos policistrónicos que contienen genes únicos o a una familia de genes (Benne, 1988; Stuart *et al.*, 1989), por lo que solo llevan a cabo el procesamiento por *trans-splicing* que se describe a continuación.

3.1.2 *Trans-splicing*.

Los transcritos policistrónicos primarios son transformados en ARNm monocistrónicos mediante un procesamiento denominado *trans-splicing* (en contraposición al *cis-splicing* del resto de los eucariotas), que consiste en la adición en el extremo 5' de un miniexón común a todos los transcritos (Stuart *et al.*; 1989; Cevallos *et al.*, 2003). Este miniexón, denominado "*spliced leader*" (SL) es una secuencia de 39 nucleótidos derivada de una secuencia precursora de 110 bases (SL-RNA), cuyos genes se encuentran organizados en cúmulos de 0.6 Kb (McCarthy-Burke *et al.*, 1989). La adición de este miniexón da como resultado, además de la adición de un "CAP" de 5' metil-guanosina que confiere estabilidad al transcrito, una molécula en forma de "Y" derivada de las porciones escindidas de los transcritos, con una unión 2'-3'-ADP en el sitio de la bifurcación. Se cree que este proceso pueda constituir un nivel de regulación de la expresión de los genes codificados en unidades de transcripción policistrónicas (Muhich y Boothroyd, 1989).

La poliadenilación está, al parecer, relacionada con el proceso de *trans-splicing*, aunque no se ha identificado una secuencia consenso en la región no traducida en el extremo 3' del mensajero para este proceso. Se ha identificado una región rica en pirimidinas dentro del espaciador intergénico que, se sugiere, pudiera controlar la poliadenilación (Elias *et al.*, 2001) (**Figura 8**).

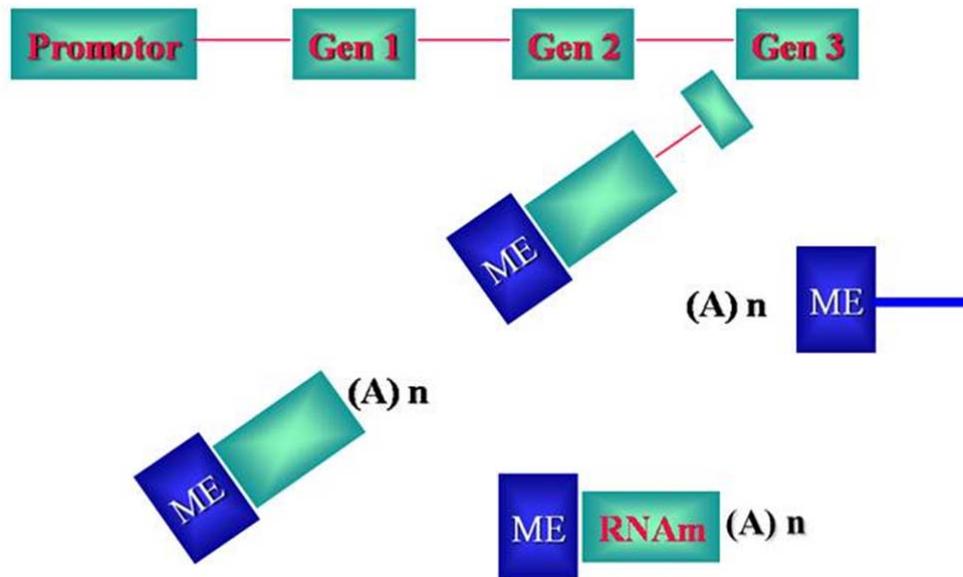


Figura 8. Proceso de *Trans-splicing*.

4. Sistemas de Transfección.

Los métodos de transfección en eucariontes son equivalentes a los de transformación en procariontes, y han sido utilizados para introducir secuencias de ADN exógeno en el genoma de células eucariontes *in vitro*. El mecanismo de transcripción, procesamiento de ARNm y estabilidad de ARNm han sido objeto de muchas investigaciones, utilizando métodos basados en transfección. Estos métodos, han sido usados para el estudio de proteínas, además del aislamiento de genes por complementación funcional. Los sistemas de transfección pueden ser divididos en dos grandes categorías: sistemas temporales y estables.

Los sistemas temporales son aquellos en los que un plásmido vector es introducido dentro del parásito y la expresión de un gen reportero, codificado en el plásmido, es medida poco tiempo después; este sistema ha sido utilizado para el estudio de la transcripción, procesamiento de ARN y proteínas blanco.

El sistema de transfección estable provoca una alteración estable en el genoma del parásito. Esto puede ocurrir como resultado del mantenimiento de un plásmido episomal libremente replicándose, o por inserción de un plásmido o fragmento de ADN dentro de un cromosoma por recombinación homóloga.

Los sistemas de transfección temporales están basados en la expresión de un gen reportero; el origen de los genes reporteros es de procariotes y codifican productos para los que no hay un equivalente en la célula eucariota, por lo que hay una nula o muy poca actividad endógena que limite los resultados.

Los métodos de transfección más frecuentes para la introducción de ADN dentro de tripanosomátidos son por electroporación. Con la transfección estable se puede manipular el genoma del parásito, la única limitante significativa es que los cambios pueden ser letales al parásito. Por lo que se han desarrollado diferentes métodos para estabilizar las transfecciones estables. Estos métodos incluyen el mantenimiento del plásmido como un elemento cromosomal, la integración de un plásmido circular dentro de un cromosoma (por un evento único de recombinación) y la integración de un fragmento lineal de ADN por doble recombinación (Kapler *et al.*, 1990; Cooper *et al.*, 1993; Cruz, 1990; Coburn *et al.*, 1991).

5. Genes Reporteros.

La expresión de genes es un proceso complejo regulado a muchos niveles, cuya etapa limitante es, generalmente, la transcripción. Una técnica muy común en el estudio de la actividad transcripcional, es el uso de los llamados genes reporteros que codifican para proteínas fácilmente detectadas. Los genes reporteros son secuencias de ácido nucleico que se utilizan para sustituir o integrarse a otras regiones que codifican para otras proteínas (proteínas de fusión). Entre ellas, está la enzima bioluminiscente luciferasa cuya actividad genera emisión de fotones que se pueden medir con precisión.

Para investigar la actividad transcripcional de un gen, la secuencia del promotor que regula su expresión se liga a la secuencia que codifica para la enzima. Estas construcciones de ADN son introducidas en las células por medio de plásmidos. Una vez que las células han sido transfectadas, la activación del promotor exógeno inducirá la síntesis de las dos proteínas. Las células se transfectan con un plásmido que contiene la secuencia estructural del gen reportero bajo el control del promotor a estudiar. La transfección puede llevarse a cabo por diversos métodos como son: la electroporación, fosfato de calcio, lipofectamina, microinyección, etc.

Se han utilizado varios genes reporteros, como los genes de: Cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), β -glucuronidasa (GUS), luciferasa de la luciérnaga (LUX), β -galactosidasa, GFP y EGFP. La expresión de un gen reportero se puede medir por simples técnicas bioquímicas, la síntesis del producto del gen reportero es una medida indirecta de los procesos que llevan a la expresión de la transcripción, *trans-splicing* y poliadenilación.

5.1 Proteína Verde Fluorescente (*Green Fluorescent Protein-GFP*).

La proteína verde fluorescente (*GFP-Green Fluorescent Protein*), descubierta por Shimomura en 1964, es una proteína que se encuentra en forma natural en la medusa del Pacífico *Aequoria victoria*. Los componentes requeridos para su bioluminiscencia son una fotoproteína activada con Ca^{++} llamada aquarina, la cual emite una luz azul-verde. La proteína verde fluorescente es extremadamente estable, está compuesta de un monómero de 27 kDa de 238 aminoácidos. Su fluorescencia natural es ocasionada por un único cromóforo pegado covalentemente, que se origina de una secuencia interna Ser-Tyr-Gly (residuos 65, 66 y 67 respectivamente) la cual es modificada después de la traducción por ciclización y oxidación de un p-hidroxibenciliden-imidazolin.

El espectro de excitación de la GFP nativa de *A. victoria* (azul) tiene dos picos a 375 nm y uno más pequeño a 470 nm. Mientras que el espectro de emisión de la fluorescencia (verde) tiene un pico de 509 nm.

Esta proteína presenta una estructura de un dominio único compacto en donde el cromóforo se encuentra localizado en el centro de la molécula, lo cual le proporciona algunas ventajas, como la resistencia a la desnaturalización con tratamientos de guanidina-HCl 6 M, urea 8 M, SDS al 1% y dos días de tratamiento con varias proteasas tales como: Tripsina, quimiotripsina o papaína a concentraciones de hasta 1 mg/ml. Deleciones en la secuencia de aminoácidos, en particular del residuo más allá de la metionina del extremo N-terminal o más de siete aminoácidos del extremo C-terminal, resultan en la pérdida total de la fluorescencia aún cuando las características del espectro de absorción del cromóforo se encuentren intactas.

La GFP puede ser fusionada a otras proteínas tanto a su extremo N-terminal o C-terminal. Este hecho es debido a que ambos extremos de la proteína GFP parecen ser flexibles con respecto a la estructura beta-can, denominada así, por la forma estructural de la proteína la cual presenta 11 pliegues antiparalelos beta en la parte externa formando así un cilindro muy compacto parecido a una lata, por lo que la estructura de la GFP no se distorsiona significativamente por la fusión con otras proteínas. Una de las aplicaciones más exitosas, es fusionarla con otras proteínas y así monitorear la localización y características de las proteínas de interés utilizando a la GFP como marcador o bandera. La fusión es realizada utilizando la secuencia del gen que codifica para la GFP junto con la secuencia del gen que codifica para la proteína de interés, y la quimera resultante se introduce a la célula blanco de forma que se exprese manteniendo las funciones normales. Por el tamaño y la forma de la GFP, los diferentes pH's, así como el potencial redox de los diferentes organelos celulares, no parecen ser una barrera importante en la expresión de esta proteína, logrando obtener resultados exitosos al expresar y localizar quimeras con la GFP en núcleo, mitocondrias, vesículas secretoras, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, peroxisomas, vacuolas, fagosomas,

citoesqueleto y la membrana plasmática, permitiendo así su análisis “*in vivo*” (Yang *et al.*, 1996).

Por otra parte, la enorme flexibilidad que tiene como marcador no invasivo en células vivas, sirve para otras numerosas aplicaciones, tales como control en experimentos de transfección, monitorear la proteína en células vivas, marcar células para protocolos de separación de células activadas por fluorescencia (*FACS-Fluorescence Activated Cell Sorting*), la expresión de genes reporteros y como una medida en el estudio de interacciones proteína-proteína.

Los factores que afectan la expresión, o de los cuales depende la detectabilidad de la GFP son los siguientes: Cantidad total de la GFP (número de copias del gen y duración de la expresión) y eficiencia de la formación del cromóforo después de la traducción (disponibilidad de las chaperonas, tiempo, temperatura, propiedades moleculares de la GFP madura o dimerización, competencia con otras señales de fondo o con autofluorescencia de células o medio de cultivo, calidad de excitación y filtros de emisión). Además, la proteína requiere de la presencia de oxígeno para su expresión en las etapas tempranas, particularmente para el deshidrogenado de los enlaces α y β del residuo 66 que se localiza en el cromóforo. Una vez que la proteína ha madurado el oxígeno no tiene efecto (Tsien *et al.*, 1998). La GFP original ha sido modificada de varias maneras, tanto para la optimización de la fluorescencia así como para una mayor expresión y estabilidad en diferentes sistemas eucariotas. Existen diferentes variantes de la GFP, dentro de las cuales está la llamada *EGFP-Enhanced Green Fluorescent Protein*; ésta proteína ha sido modificada para optimizar la obtención de una mayor fluorescencia y expresión en células de mamífero (excitación máxima = 488 nm, emisión máxima = 507 nm). El cromóforo de la EGFP tiene una fluorescencia 35 veces más alta que la GFP, sin embargo, la proteína requiere de promotores fuertes para su expresión, tales como el del citomegalovirus (CMV), CV40 y el del VIH para que la detección sea apreciable, y más aún en células de mamífero (Tsien *et al.*, 1998).

Existen varios métodos por medio de los cuales se puede conseguir la transferencia de genes con una alta eficiencia en células, particularmente de mamífero. Cada una de las técnicas está asociada a problemas de equipo como la electroporación y la microinyección, en comparación con técnicas como la transfección por medio de DEAE-Dextrán y la co-precipitación con fosfato de calcio, siendo estas últimas técnicas sencillas de realizar sin requerir de equipo especial y por medio de las cuales, se pueden transfectar células eucariotas con ADN genómico de otro origen (Pollad et al., 1990) (**Figura 9**).

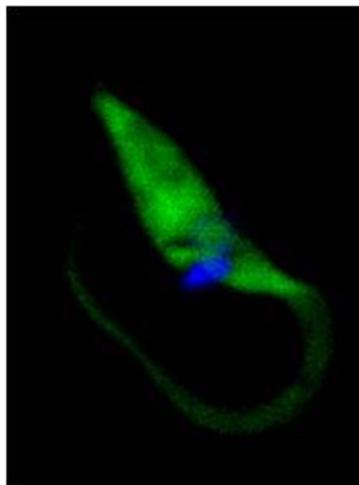


Figura 9. Epimastigote de *T. cruzi* Expresando EGFP (Transfectado por electroporación en nuestro laboratorio).

6. Proceso de Infección de *T. cruzi*.

Los mecanismos moleculares por los que se lleva a cabo el proceso de infección de *T. cruzi* a la célula huésped se encuentran aún en debate. Algunos estudios han demostrado que este proceso presenta varias etapas: adhesión, invasión, diferenciación, multiplicación y salida, y que permiten al parásito su diseminación tanto en células fagocíticas como no fagocíticas (Espinoza y Manning-Cela 2007).

6.1 Adhesión.

Este paso consiste en la unión del parásito a la superficie de la célula mediante una serie de moléculas de superficie específicas, tanto de la célula, como del parásito. Se ha observado el aumento en la expresión de moléculas de adhesión en células neuronales (NCAM-*Neuronal cell adhesion molecular*) en la miocarditis ocasionada por la tripanosomiasis americana, lo que sugiere que NCAM puede ser un receptor en el proceso de unión y de invasión a la célula por el parásito. La variedad de moléculas que participan en el reconocimiento y unión del parásito sugieren que este proceso no está en función de un único ligando-receptor específico, si no que depende de la participación de un conjunto de moléculas tanto de la célula huésped como del parásito (Burleigh y Andrews, 1995; Burleigh y Andrews, 1998; Carvalho *et al.*, 1999; Espinoza y Manning-Cela 2007).

Entre las moléculas que se han relacionado de manera importante con la adhesión de los tripomastigotes metacíclicos se encuentran gp82, gp35/50, penetrina, y trans-sialidasa. La penetrina es capaz de unirse a heparina, heparán sulfato y colágena (Ortega y Pereira, 1991; Santori *et al.*, 1996). Las trans-sialidasas transfieren residuos de ácido siálico de la membrana del hospedero a los residuos β -galactosilados de la superficie del parásito, aunque el papel de estas enzimas en el proceso de invasión no está del todo definido (Meirelles *et al.*, 1992; Schenkman y Eichinger, 1993; Yoshida, 1997; Espinoza y Manning-Cela, 2007).

El proceso de adhesión activa distintas cascadas de señalización dependientes de IP3, PLC y PI3K, que llevan a la movilización intracelular de calcio en la célula hospedera como un evento indispensable para que se lleve a cabo la internalización del parásito. Dos proteínas que se han relacionado con la activación de éstas cascadas son oligopeptidasa B y cruzipaína. Estas proteínas pudieran estar actuando en procesos independientes o coordinados.

La oligopeptidasa B actúa en el citoplasma del parásito generando un intermediario agonista de éstas cascadas, mientras que la cruzipaina es secretada y origina quininas del tipo de la bradiquinina, mediante el procesamiento de un quinínogeno secretado del hospedero (Burleigh y Andrews, 1995; Caler *et al.*, 1998; Paiva *et al.*, 1998; Scharfstein *et al.*, 2000; Burleigh y Woolsey, 2002; Marino *et al.*, 2003). Durante la activación de éstas cascadas en el hospedero, se activan cascadas similares de manera simultánea en el parásito, las cuales son iniciadas por glucoproteínas como gp82, así como tirosina-cinasas y PLC. Esta movilización de calcio es igualmente necesaria para el proceso de internación (Moreno *et al.*, 1994; Burleigh y Woolsey 2002).

Recientemente, se ha reportado la familia de proteínas SAP ricas en serina, alanina y prolina, de las cuales se han descrito una forma anclada a la membrana y otra forma secretada. Estas proteínas también han sido involucradas en la activación de vías de señalización para la movilización intracelular de calcio en la célula blanco (Baida *et al.*, 2006).

Se conoce muy poco también acerca de los mecanismos y moléculas implicadas en el proceso de infección por amastigotes. La glucoproteína SA85-1 se ha relacionado con los procesos de adhesión e internación de los amastigotes, por medio de su interacción con un receptor de manosa de la célula hospedera (Kahn *et al.*, 1996). Al igual que en tripomastigotes, posterior al proceso de adhesión, ocurre una activación de vías dependientes de calcio tanto en el parásito como en la célula huésped, lo cual ha sido asociado con la activación de tirosina cinasas o cinasas relacionadas con la señalización por IP3 y PI3K. (Fernández *et al.*, 2006).

Los procesos posteriores a la internación, al igual que en tripomastigotes no son conocidos, aunque se sugiere que podrían ser parecidos (Espinoza y Manning-Cela, 2007) (**Figura 10**).

6.2 Invasión.

Se ha propuesto que los mecanismos por los que el parásito puede penetrar en la célula huésped están dados por varios procesos: uno tipo fagocítico, el cual involucra la formación de proyecciones tipo filopodio en la célula y que es dependiente del ensamblaje de filamentos de actina. Un segundo proceso tipo endocítico, el cual no depende de la formación de estructuras tipo filopodio, pero que es dependiente de actina. Y un proceso tipo endocítico, que no depende de actina. Existe también un mecanismo propuesto a partir de la unión del parásito a la superficie celular del huésped activando una serie de vías de señalización, las cuales actúan liberando calcio intracelular, lo que estimula el reclutamiento de los lisosomas hacia el sitio de unión del parásito con la membrana plasmática, para posteriormente fusionarse en una vacuola parasitófora que envuelve al parásito y lo ayuda en su penetración hacia el citoplasma (Herrera, 1994; Burleigh y Andrews, 1995; Burleigh *et al.*, 1997; Burleigh y Andrews, 1998; Carvalho *et al.*, 1999; Tardieux *et al.*, 1992; Rodríguez *et al.*, 1996).

También se ha descrito un mecanismo independiente de lisosomas, en el cual, el parásito es internado a través de una vacuola derivada directamente de la membrana plasmática de la célula huésped de un modo similar a la endocitosis. En éste último caso, esta vacuola adquiere posteriormente marcadores lisosomales, dado el proceso normal de su maduración y su fusión con lisosomas (Rodríguez *et al.*, 1996; Rodríguez *et al.*, 1997; Burleigh y Woolsey 2002). La participación que tiene el citoesqueleto de actina en estos procesos no ésta del todo clara. Algunos trabajos sugieren que es necesaria para la fusión de lisosomas a la membrana.

Otras evidencias señalan que la actina es necesaria para la fusión de las vacuolas derivadas de la membrana con los lisosomas, lo cual aparentemente también es un paso importante para que el parásito se mantenga dentro de la célula y pueda completar su ciclo (Andrews *et al.*, 1990; Carvalho *et al.*, 1999; Fonseca *et al.*, 2002; Woolsey *et al.*, 2003; Woolsey *et al.*, 2004; Andrade 2004; Ferreira *et al.*, 2006; Yoshida, 1997; Espinoza y Manning-Cela, 2007).

Estos procesos de internación se han evaluado en parásitos con distinta infectividad y linaje; los resultados sugieren que es posible que no exista un mecanismo generalizado para la internación, sino más bien una mezcla de éstos que dependa tanto de la cepa del parásito como del tipo de célula que infecte (Fernández y Mortara 2004; Andrade y Andrews 2005; Yoshida, 1997) **(Figura 10)**.

6.3 Multiplicación.

Dentro de este evento se ha propuesto que se requiere de un ambiente ácido, proporcionado por la vacuola parasitófora, para que se pueda iniciar la diferenciación del parásito del estadio de tripomastigote al de amastigote antes de iniciar su multiplicación (Ley *et al.*, 1990; Tomlinson *et al.*, 1995; Espinoza y Manning-Cela 2007).

En el proceso de escape de la vacuola parasitófora se ha relacionado a Tc-TOX y a las enzimas *trans*-sialidasas. La proteína Tc-TOX expresada en todos los estadios de desarrollo, fue inicialmente identificada como un factor hemolítico que depende de condiciones ácidas para su actividad. Tiene características que la relacionan con porinas e implicaciones importantes, como se ha mencionado, en el escape de la vacuola parasitófora. Sin embargo, no se cuenta con una caracterización genética de su función debido a que la proteína es muy inestable y no ha sido posible su clonación para caracterizarla (Andrews *et al.*, 1990; Ley 1990). Otras proteínas relacionadas con el escape de la vacuola parasitófora incluyen *trans*-sialidasas, las cuales parecen conferir mayor eficiencia a éste proceso (Shenkman *et al.*, 1991; Frevert *et al.*, 1992; Rubin de Celis *et al.*, 2006).

Recientemente LYT1, fue aislada y caracterizada genéticamente por nuestro grupo de trabajo. Se demostró, por análisis de parásitos *knock-out*, que LYT1 participa en el proceso de infección y escape de la vacuola parasitófora (Manning-Cela *et al.*, 2001, 2002, 2003; Espinoza y Manning-Cela, 2007).

Posterior a la salida del parásito de la vacuola parasitófora, se inicia el proceso de replicación de los amastigotes por fisión binaria. Hasta ahora no se conocen los mecanismos que participan en el proceso de diferenciación a amastigotes, replicación, diferenciación a tripomastigotes, así como de la salida de estos últimos de la célula huésped (Espinoza y Manning-Cela 2007) (**Figura 10**).

6.4 Liberación.

La última etapa del proceso de infección es la salida del tripomastigote sanguíneo de la célula huésped, para la posterior diseminación de la infección. Los mecanismos utilizados por el parásito en esta parte del ciclo de vida, hasta ahora, se desconocen (Rodríguez *et al.*, 1996) (**Figura 10**).

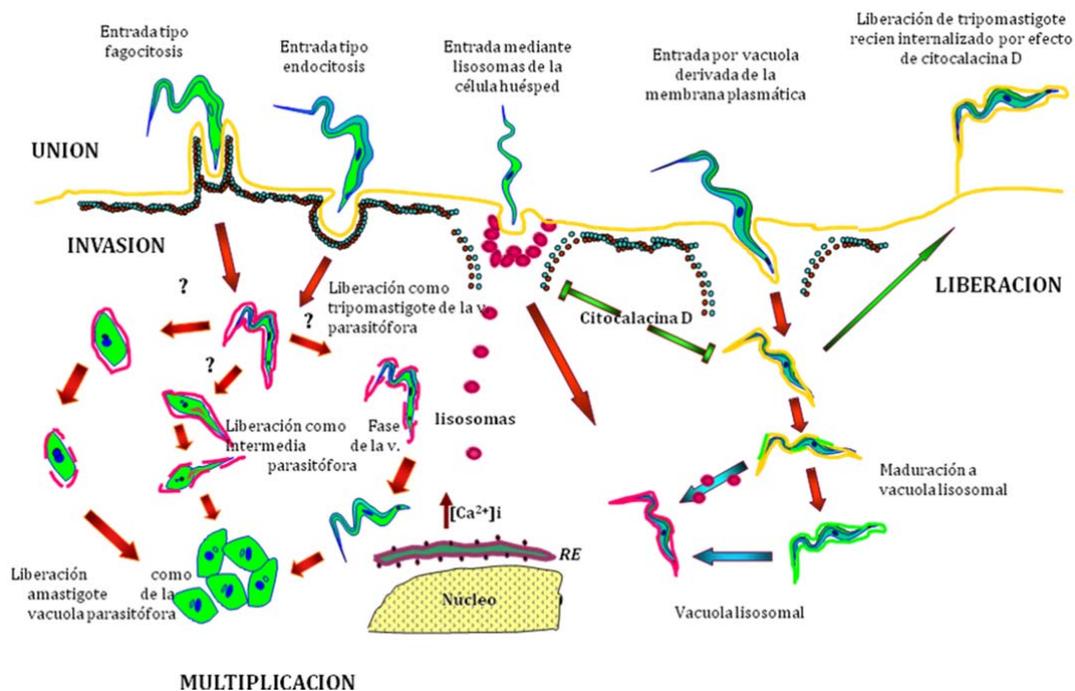


Figura 10. Esquema del Mecanismo de Infección de *T. cruzi* en Células no Fagocíticas. (Espinoza y Manning-Cela 2007).

7. Antecedentes Directos.

LYT1 es la segunda proteína que, con base a evidencias genéticas, se mostró que es requerida no solo para una infección eficiente, sino también, que está involucrada en el proceso de transición de estadio del parásito. El gen *LYT1* se clonó a partir de una biblioteca de expresión de *T. cruzi* de la cepa Y, aprovechando la reacción cruzada que presentó el anticuerpo contra el componente C9 del complemento. *LYT1* es un gen de copia única, con un marco de lectura abierto de 1, 659 pb presente en dos alelos y que codifica para una proteína de 552 aa. Al analizar su secuencia no se encontró homología con proteínas ya registradas y de función conocida (Manning *et al.*, 2001).

La secuencia de aminoácidos de LYT1 contiene una región que corresponde a una secuencia señal de secreción (SS), una secuencia de corte y una secuencia con localización nuclear (SLN), la cual presentó homología con la secuencia clásica de localización nuclear reportada para el antígeno T grande del virus SV40 del simio (Manning, 2002) (**Figura 11**).

1	MRK KAAALVA	PTAD TRPTCR	GAAIANNFMG	ragpr EGVGR	STEMPAAGPT
51	GSQRSQTQRE	VKASKDADAA	AISSYFQSEL	VTSQSHEGVS	PLAKTRANER
101	RNGEQEREKE	LPAVGGAVPT	GKGTDPKKRV	<u>LQDLPAMHAE</u>	GQNQHGREGD
151	KGVSVRMDSF	GRVQVLEQML	LHLAALNRQL	ELELIETRRE	LTMYKQLLPD
201	VQRQTEAHAS	SQEHHKANS	APPLMSDERR	RQMLFTGQKQ	QQQQAEDLHG
251	GISGWETAAR	RMRYGYEEGE	RDTLSDGEGR	PRCAGRMGSP	KRFLSTQPPR
301	SSRNRYRNPH	ANGTNGNSYV	PHSSRQKSHP	KRAAAVTSVP	LAASATNRRG
351	RSMRQHTRPR	GPSHLFEHLD	AEDAIDMLET	LKRSLMYRCN	HSHHRSTEGD
401	VVRLAAKPRK	GTRSVPPPPP	PPMSSSSQR	KLAAAVAGAP	VCSVSARHGR
451	NHGVSavgdp	SRGNRVSETA	RIAHAPSF	GGKNCAPGPTQL	HFSSPSRGAT
501	PMKKDTPLSR	GQAAGVAAVA	EGGDGQLEAL	QRRYWEQSRA	ILEQLENMLA
					552 AD

Figura 11. Esquema de la Secuencia de Aminoácidos de LYT1. Se indica la secuencia señal de secreción (SS) (**negritas**), la secuencia del sitio de corte (**negritas y minúsculas**) y la secuencia con localización nuclear (SLN) (subrayado).

Nuestro grupo obtuvo y caracterizó parásitos *knock-out* para demostrar la función de LYT1, reportando que no es esencial en epimastigotes; sin embargo, los parásitos deficientes de *LYT1* mostraron tres fenotipos sobresalientes: Una capacidad infectiva disminuida, un desarrollo acelerado *in vitro* y una actividad hemolítica disminuida (Manning-Cela *et al.*, 2001). La diferente funcionalidad de esta molécula fue explicada mediante experimentos de extensión 5' y RT-PCR por la presencia de tres transcritos obtenidos por *trans-splicing* alternativo, dos de los cuales codifican para la proteína completa conteniendo una SS (relacionada con la infectividad) y otro que codifica para la proteína truncada (-28 aa) sin la SS y con una SLN (relacionada con diferenciación) (Manning-Cela *et al.*, 2002).

El análisis de una clona *knock-out* de *LYT1*, denominada L-13, la cual mostró retener ambos alelos de *LYT1* más un alelo adicional truncado de *LYT1*, presentó los tres fenotipos obtenidos en los parásitos mutantes nulos (capacidad infectiva y hemolítica disminuida, y capacidad de transición de estadio incrementada). Este fenotipo es consistente con el comportamiento de una mutante dominante negativa, en la que la copia adicional truncada de LYT1 parece estar inhibiendo la función de la proteína normal, lo que sugiere que posiblemente LYT1 es parte de un complejo protéico (Manning-Cela, 2003).

Esta posibilidad fue evaluada con ensayos de co-inmunoprecipitación y GST- *pull down*, demostrándose que LYT1 interacciona con diversas proteínas en un rango de 8 a 255 kDa; proteínas cuyas funciones están relacionadas con el fenotipo de infección (*Trans*-sialidasa, fosfatasa tipo DSPc, gp63, MASP, LYT1) y de transición de estadio (histonas H2A y H2B, C2H2 putativa, glutatión sintetasa putativa), procesos en los que, como se dijo anteriormente, se ha demostrado la participación de LYT1 (Lugo-Caballero, 2008; Manning-Cela *et al.*, 2001 y 2002).

En conjunto, estos resultados sugieren que la presencia de las diferentes secuencias de localización en LYT1, así como su posible interacción con distintas proteínas, pudiera ser resultado de una localización diferencial que expondría a la proteína a un microambiente diferente, lo que impactaría en su

multi-funcionalidad. Por lo tanto, es necesario continuar con su caracterización, evaluando la localización de los distintos productos de LYT1 en los diferentes estadios de desarrollo de *T. cruzi*, así como del impacto que pudiera tener esto en su función.

II. JUSTIFICACIÓN.

“Un científico debe tomarse la libertad de plantear cualquier cuestión, de dudar de cualquier afirmación, de corregir errores”.

Julius Robert Oppenheimer

II. Justificación

Como se describió anteriormente, reportamos la caracterización genética de *LYT1* demostrando que participa en el proceso de infección y transición de estadio del parásito. Así mismo, encontramos que, como resultado de un *trans-splicing* alternativo que es regulado diferencialmente en los distintos estadios del parásito, se obtienen tres transcritos diferentes que codifican para dos posibles proteínas distintas en su amino-terminal. Siendo tan importante el papel de *LYT1* en procesos esenciales para la sobrevivencia del parásito y para el establecimiento de la patogenicidad de la enfermedad, es importante continuar con la caracterización de los diferentes productos de *LYT1*.

III. HIPÓTESIS.

“La hipótesis es una interpretación anticipada y racional de los fenómenos de la naturaleza”.

Claude Bernard

III. Hipótesis

Se sintetizan dos diferentes productos del gen *LYT1* de *Trypanosoma cruzi* con diferente localización y diferente función.

IV. OBJETIVO GENERAL.

“El experimentador que no sabe lo que está buscando no comprenderá lo que encuentra”.

Claude Bernard

IV. Objetivo General

Determinar si los transcritos alternativos de *LYT1* de *Trypanosoma cruzi* dan lugar a productos con diferente localización y función.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

“Aprendemos, o por inducción o por demostración. La demostración parte de lo universal; la inducción de lo particular.”

Aristóteles

V. Objetivos Particulares

1. Obtener Parásitos *Knock-in* de LYT1.

- Clonar LYT1(s+n, s y n) en el vector pEGFP-N1.
- Subclonar LYT1(s+n, s y n)-EGFP en el vector de expresión pTREXn.
- Transfectar epimastigotes con pTREXn-LYT1(s+n, s y n)-EGFP.
- Secuenciar el ADN de pTREXn-LYT1(s+n, s y n)-EGFP.
- Analizar por *Western blot* de la expresión de las proteínas quiméricas y controles en los parásitos *knock-in*.

2. Determinar la Localización de los Productos LYT1(s+n, s y n) en los Parásitos *Knock-in*.

- Localizar las proteínas control y quiméricas LYT1(s+n, s y n)-EGFP por epifluorescencia.
- Localizar las proteínas control y quiméricas LYT1(s+n, s y n)-EGFP por microscopía confocal.
- Determinar del porcentaje de colocalización en núcleo y cinetoplasto de epimastigotes control y *knock-in*.

3. Caracterizar a los Parásitos *Knock-in* que expresan LYT1(s+n, s y n)-EGFP.

- Determinar la curva de crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* de los parásitos control y *knock-in* con agitación y sin agitación.
- Determinar la motilidad de epimastigotes control (WT y *knock-out* de LYT1) y *knock-in* LYT1.
- Analizar la trayectoria y distancia recorrida de epimastigotes control (WT y *knock-out* de LYT1) y *knock-in* LYT1 por videomicroscopía.
- Analizar de manera cuantitativa el movimiento en parásitos control (WT y *knock-out* de LYT1) y *knock-in* LYT1.
- Cuantificar el promedio del largo del flagelo de parásitos control (WT y *knock-out* de LYT1) y *knock-in* LYT1.
- Realizar el análisis vectorial del movimiento de los parásitos control (WT y *knock-out* de LYT1) y *knock-in* LYT1.
- Análisis de varianza (ANOVA) de los datos anteriores.

4. Evaluar la Localización de LYT1 en Vesículas Involucradas en el Tráfico Vesicular del Parásito.

- Realizar el marcaje de vesículas involucradas en el tráfico vesicular del parásito con FM4-64, en epimastigotes transfectados que expresan LYT1s+n-EGFP.
- Evaluar la localización de LYT1s+n-EGFP y FM4-64 por microscopía confocal y determinación de su posible colocalización.

5. Analizar las Características Morfológicas de los Parásitos Control (WT y *Knock-out* de LYT1) y *Knock-in* de LYT1 por Microscopía Electrónica de Barrido y de Transmisión.

6. Determinar los Índices de Infectividad *in vivo* con Parásitos *Knock-in* de LYT1.

- Parasitemia de ratones Balb/c infectados con parásitos control y *knock-out* de LYT1.
- Parasitemia de ratones Balb/c infectados con parásitos control y *knock-in* de LYT1.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS.

“La ciencia se compone de errores, que a su vez, son los pasos hacia la verdad”.

Julio Verne

VI. Material y Métodos

1. Parásitos.

Se utilizaron parásitos de *Trypanosoma cruzi* cepa CL-Brener, tipo silvestre (WT-*Wild Type*), transfectados de manera estable con ADN de los plásmidos: pTREXn-EGFP, pTREXn-LYT_s+n-EGFP, pTREXn-LYT_s-EGFP y pTREXn-LYT_n-EGFP (obtenidos en este trabajo de investigación), y *knock-out* de *LYT1* L-14 (sencillo) y L-16 (nulo) obtenidos en un trabajo previo (Manning-Cela *et al.*, 2001) (**Tabla 1**).

Tabla 1. Cepas de Parásitos

CEPA	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
CL- BRENER	WT Cepa de referencia para el proyecto genoma de <i>T. cruzi</i>	Zingales <i>et al</i> ; 1997 (a,b y c)
EGFP	WT transfectados con pTREXn-EGFP	Vázquez y Levin, 1999
L-14	<i>Knock-out</i> sencillo de <i>LYT1</i>	Manning-Cela <i>et al.</i> , 2001
L-16	<i>Knock-out</i> nulo de <i>LYT1</i>	Manning-Cela <i>et al.</i> , 2001
LYT_{1s}+n-EGFP	WT transfectados con pTREXn-LYT _{1s} +n-EGFP	Este estudio
LYT_{1s}-EGFP	WT transfectados con pTREXn-LYT _{1s} -EGFP	Este estudio
LYT_{1n}-EGFP	WT transfectados con pTREXn-LYT _{1n} -EGFP	Este estudio

2. Bacterias.

La cepa DH5 α de *Escherichia coli* se utiliza para la clonación y propagación de plásmidos con una alta eficiencia (**Tabla 2**).

- *lacZ* Δ M15.- Delección parcial del amino terminal de β -D-galactosidasa que permite la complementación con ciertos plásmidos que codifican

esta región (PUC, M13), confiriendo el fenotipo azul/blanco para la selección de las colonias recombinantes.

- *endA1*.- Contiene una mutación en la endonucleasa I, lo que permite generar ADN-ss de M13, incrementando la calidad del plásmido.
- *gyrA96*.- ADN girasa mutante que produce resistencia al ácido nalidíxico.
- *thi-1*.- Requiere tiamina para su crecimiento en medio mínimo.
- *hsd R17*.- Permite una eficiente transformación con ADN sin cortar proveniente de la amplificación por PCR.
- *supE44*.- Supresor de ARNt-glutamina.
- *relA1*.- El ARN es sintetizado en ausencia de la síntesis de proteína.

Tabla 2. Cepas Bacterianas

CEPA	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F- ϕ 80 Δ , <i>lacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZ</i> YA- <i>argF</i>), U169, <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsd R17</i> (rk-, mk+), <i>supE44</i> , <i>relA1</i>	GIBCO® BRL®

3. Técnicas de ADN Recombinante.

La extracción de ADN, la reacción en cadena de la polimerasa, la transformación bacteriana, la electroforesis en geles de agarosa y la manipulación genética se realizaron de acuerdo a las especificaciones y protocolos del manual de laboratorio para clonación molecular (Ausubel *et al.*, 1996; Sambrook y Russell, 2001) y de acuerdo a las recomendaciones de los *kits* comerciales utilizados. Los oligonucleótidos empleados fueron sintetizados por *Invitrogen*TM. Todas las enzimas utilizadas para digerir el ADN y para realizar las ligaciones fueron de *New england Biolabs*TM. Para la purificación de los productos de digestión enzimática del ADN plasmídico y de los productos de PCR se utilizó un *KIT* de gel nebulizador para la extracción de ADN a partir de agarosa (Ultrafree®-DA-Millipore).

4. Extracción de ADN.

El aislamiento del ADN se realizó por lisis alcalina. Se inoculó una colonia de bacterias conteniendo el ADN de cada cepa a trabajar en 10 ml de medio LB (Luria-Bertoni) adicionando 100 µg/ml de ampicilina, se dejó incubando toda la noche a 37 °C y en agitación a 2,500 rpm en un aparato *Environ Shaker*.

El cultivo fue centrifugado a 10,500 g durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla formada para después resuspenderla en 200 µl de la solución de lisis I (Glucosa 50 mM, Tris-Cl 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM pH 8.0). Se adicionaron 400 µl de la solución de lisis II (0.2 N NaOH, 1% SDS), la cual se preparó al momento para ser utilizada fresca, se agregaron 300 µl de la solución III (Acetato glacial 5 M, acetato potásico 5 M) y se mezclaron suavemente. Después de 5 min se centrifugó a 11,200 g durante 5 min. Se recuperó el sobrenadante y se le adicionaron 10 µg/ml de ARNasa, se incubó a 37 °C durante 2 h. Se agregó un volumen igual de fenol: cloroformo: alcohol isoamilico (25:24:1), se mezcló fuertemente hasta obtener una emulsión y se centrifugó a 11,200 g durante 5 min a 4 °C. Se recuperó la fase acuosa y se adicionó un volumen igual de isopropanol para precipitar el ADN dejando 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 11,200 g por 5 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla formada en 1 ml de etanol al 70%, se volvió a centrifugar a 11,200 g por 5 min a 4 °C, se retiró el sobrenadante, se dejó secar a temperatura ambiente y finalmente se resuspendió el ADN en 50 µl de TE (10 mM Tris-Cl pH8.0, 1 mM EDTA pH8.0).

5. Análisis de ADN por Electroforesis.

Se prepararon geles de agarosa al 1% con TBE 0.5X (0.045 M Tris-Borato, 1mM EDTA pH 8.0) calentando a ebullición para disolver la agarosa, se dejó enfriar y después se vaciaron aproximadamente 20 ml en una cámara de electroforesis, colocando un peine especial para la formación de los pozos, se dejó enfriar para que la agarosa solidificara y se cubrió el gel con TBE 0.5X

(0.045 M Tris-Borato, 1mM EDTA pH 8.0). A las muestras de ADN se les adicionó buffer de corrida (azul de bromofenol 0.25%, glicerol 30% y xilencianol 0.25%), para después ser colocadas en los pozos correspondientes, la cámara se sometió a una corriente de 100 V y el ADN se dejó correr por 40 min. Posteriormente el gel fue teñido con bromuro de etidio y la imagen se registró con una cámara digital *Kodak EDAS 290*, utilizando un transluminador de luz UV.

6. Construcciones de los Vectores pEGFP-N1-LYT1.

Con el propósito de determinar la localización tanto de la secuencia señal como de la secuencia nuclear de *LYT1*, su secuencia codificante se fusionó a la secuencia de la proteína verde fluorescente. Para lo cual se amplificó la secuencia de *LYT1* por PCR en tres diferentes variantes: **1) LYT1s+ n**: a partir del primer ATG en la posición +1, que contiene tanto la posible secuencia señal (SS), como la posible secuencia con localización nuclear (SLN), **2) LYT1s**: a partir del primer ATG y con una mutación en el segundo ATG para asegurarnos que no se produzcan dos proteínas como resultado del *trans-splicing* alternativo de sus transcritos y se obtenga únicamente la proteína conteniendo la SS en su amino terminal y **3) LYT1n**: a partir del segundo ATG de la posición +85 y por lo tanto conteniendo únicamente la posible SLN. Se empleó el plásmido comercial pEGFP-N1 (4.7 Kb) de Clontech® para fusionar la secuencia de *LYT1* en sus diferentes variantes con la secuencia que codifica para la proteína verde fluorescente *EGFP*, como se describe a continuación (**Figura 12**) (**Tabla 3**).

Tabla 3. Plásmidos pEGFP-N1-LYT1(s+n, s y n)

NOMBRE	TAMAÑO	PROTEINA	REFERENCIA
pEGFP-N1	4,700 pb	EGFP	CLONTECH®
pEGFP-N1-LYT1s+n	6,359 pb	LYT1s+n-EGFP	Este estudio
pEGFP-N1-LYT1s	6,359 pb	LYT1s-EGFP	Este estudio
pEGFP-N1-LYT1n	6,275 pb	LYT1n-EGFP	Este estudio

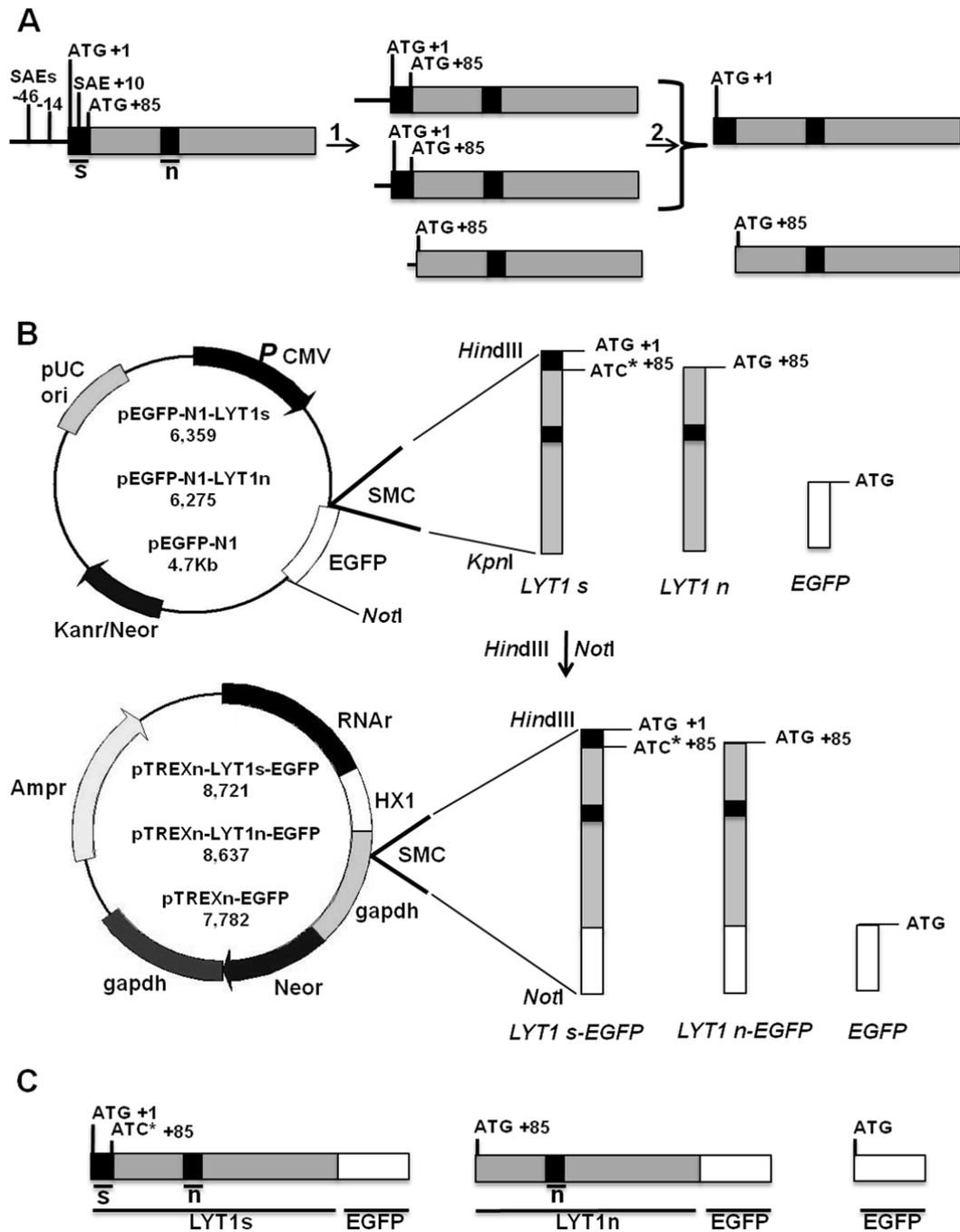


Figura 12. Diagramas de las Construcciones pTREXn-LYT1s+n-EGFP, pTREXn-LYT1s-EGFP, pTREXn-LYT1n-EGFP y pTREXn-EGFP, así como de los Productos Obtenidos de *LYT1* Fusionados a *EGFP*.

6.1 LYT1s+n.

La secuencia completa de *LYT1* fue amplificada por PCR a partir del primer codón de inicio de la traducción (ATG) con los oligonucleótidos: **LYT-11 S** (sentido) conteniendo un sitio de corte *EcoRI* en el extremo 5', y **LYT-17 AS** (antisentido) conteniendo un sitio de corte *KpnI* en el extremo 3'. Tanto el producto de PCR como el ADN del vector pEGFP-N1 fueron digeridos con las enzimas de restricción *EcoRI* y *KpnI*, para posteriormente purificarlos y ligarlos dando origen a la construcción pEGFP-N1-LYT1s+n (**Tabla 4**) (**Figura 13**).

6.2 LYT1s.

En este caso se realizaron dos reacciones de PCR. La primera amplificación por PCR se realizó a partir del segundo codón de inicio de la traducción (ATG), en donde el oligonucleótido sentido **LYT-13 S** contiene una mutación en la que se sustituye G por C del ATG. Como oligonucleótido antisentido se utilizó **LYT-17 AS** conteniendo los últimos nucleótidos de la secuencia codificante de *LYT1*, eliminando el codón de paro para permitir la correcta fusión con la secuencia de EGFP (**Tabla 4**) (**Figura 14**).

Una vez obtenido el primer producto de PCR, éste fue empleado como templado para realizar una segunda reacción de PCR para amplificar *LYT1* a partir del primer codón de inicio de la traducción (ATG) conteniendo la posible SS. Se emplearon los oligonucleótidos **LYT-14 S** (sentido) con un sitio de corte *HindIII* en el extremo 5', y **LYT-17 AS** (antisentido) con un sitio de corte *KpnI* en el extremo 3'.

Tanto el producto de PCR como el ADN del vector pEGFP-N1 fueron digeridos con las enzimas de restricción *HindIII* y *KpnI*, para posteriormente purificarlos y ligarlos, dando origen a la construcción pEGFP-N1-LYT1s (**Tabla 4**) (**Figura 15**).

Tabla 4. Oligonucleótidos

NOMBRE	SECUENCIA	CARACTERÍSTICAS
LYT-11 A	GCG GAA TTC ATG CGG AAG AAA GCC GCA GC	Oligonucleótido sentido de 29 pb. Del nucleótido 4 al 9 contiene un sitio de corte para <i>Hind</i> III. Del nucleótido 10 al 29 contiene del sitio +1 al +20 de la secuencia codificante de <i>LYT1</i> alelo b (<i>Genebank AF320626</i>).
LYT-12 S	GGG CAA AGC TTT CTA GAA TGG GAC GTG CCG GCC CCC G	Oligonucleótido sentido de 37 pb. Del nucleótido 6 al 11 contiene un sitio de corte para <i>Hind</i> III. Del nucleótido 18 al 37 contiene del sitio +1 al +20 de la secuencia codificante de <i>LYT1</i> alelo b (<i>Genebank AF320626</i>).
LYT-13 S	GTA GCA CCC ACA GCA GAC ACA CGG CCG ACG TGC CGC GGG GCT GCC ATT GCG AAT AAC TTT ATC GGA CGA CGT G	Oligonucleótido sentido de 73 pb. En el nucleótido 63 contiene una mutación puntual en la que se sustituye G por C del 2º ATG, nucleótido +85 de la secuencia codificantes de <i>LYT1</i> (<i>Genebank AF320626</i>).
LYT-14 S	GGG CAA AGC TTT CTA GAA TGC GGA AGA AAG CCG CAG CAT TAG TAG CAC CCA CAG CAG ACA C	Oligonucleótido sentido de 61 pb. Del nucleótido 6 al 11 contiene un sitio de corte <i>Hind</i> III. Del nucleótido 18 al 61 contiene el sitio +1 al +44 de la secuencia codificante de <i>LYT1</i> alelo b (<i>Genebank AF320626</i>).
LYT-17 AS	GGG GTA CCC CAT CAG CTG CCA GCA TGT TTT C	Oligonucleótido antisentido de 31 pb. Del nucleótido 3 al 6 contiene un sitio de corte <i>Kpn</i> I en el extremo 3'.

Se utilizó como templado ADN de PBS 4.3 Kb-LYT1 alelo b

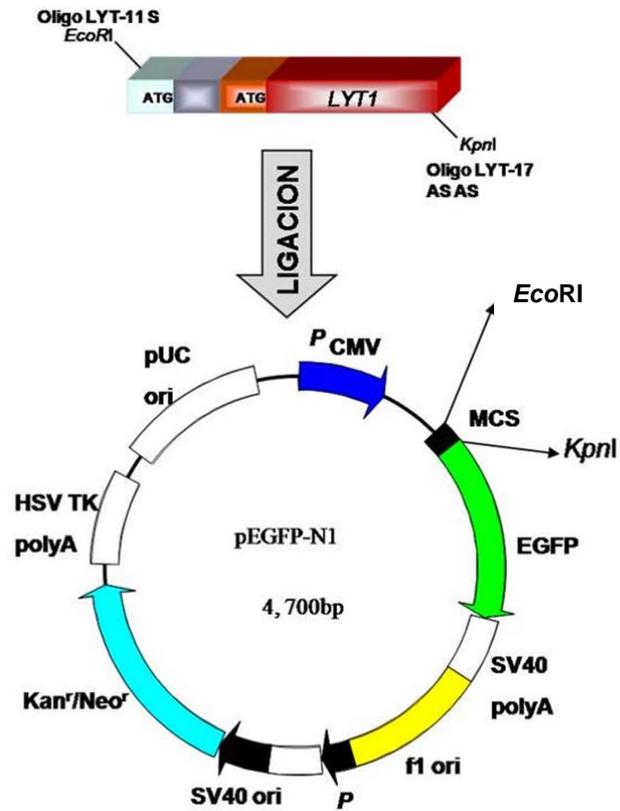


Figura 13. Esquema del Vector pEGFP-N1-LYT1s+n.

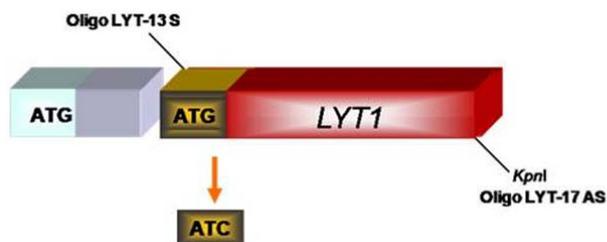


Figura 14. Esquema del Producto de la Primera Reacción de PCR de LYT1s.

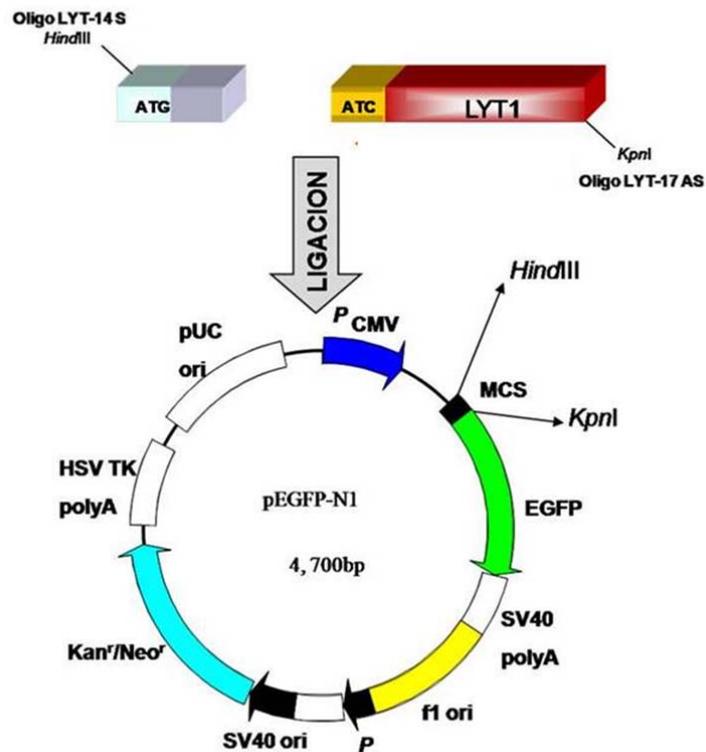


Figura 15. Esquema del Producto de la Segunda Reacción de PCR de *LYT1*s y del Vector pEGFP-N1-LYT1s.

6.3 LYT1n.

La secuencia de *LYT1* fue amplificada por PCR a partir del segundo codón de inicio de la traducción (ATG) conteniendo la posible SLN. Se emplearon los oligonucleótidos **LYT-12 S** (sentido) con un sitio de corte *HindIII* en el extremo 5' y **LYT-17 AS** (antisentido) con un sitio de corte *KpnI* en el extremo 3'. Tanto el producto de PCR como el ADN del vector pEGFP-N1 fueron digeridos con las enzimas de restricción *HindIII* y *KpnI*, y posteriormente purificados y ligados para dar origen a la construcción pEGFP-N1-LYT1n (Tabla 4) (Figura 16).

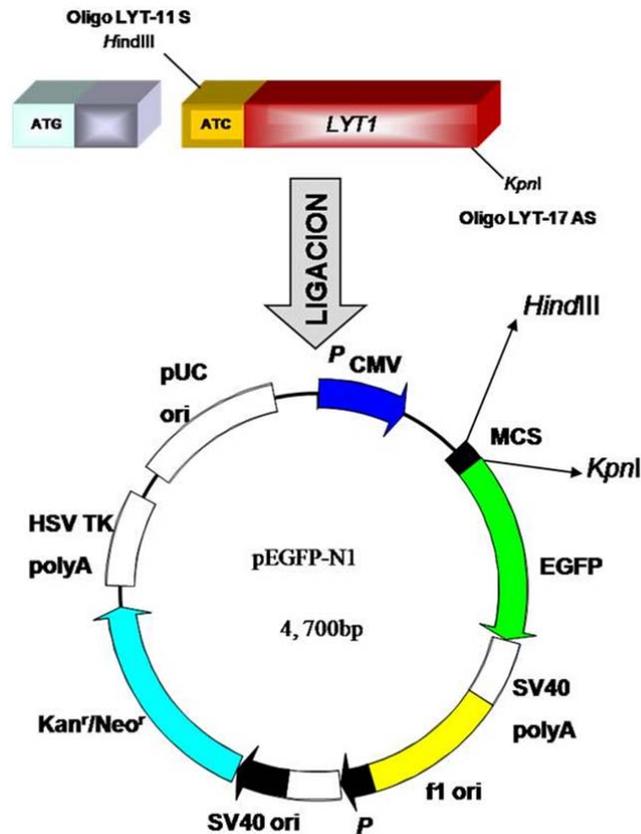


Figura 16. Esquema del Vector pEGFP-N1-LYT1n.

7. PCR.

La secuencia completa de *LYT1* puede consultarse en el *GenBank* (www.pubmed.com) con los códigos AF263616 y AF320626 para los alelos *LYT1a* y *LYT1b* respectivamente, cuyo marco de lectura abierto es de 1,659 pb que codifica para una proteína de 552 aa (Manning-Cela *et al.*, 2001). La secuencia *LYT1b* (Anexo I) fue amplificada de acuerdo a las construcciones correspondientes utilizando 10 ng de ADN de *LYT1*, 1 ng de cada uno de los oligonucleótidos, 1.25 mM de dNTPs, buffer *Taq Herculasa* 1X, enzima *Herculasa* (*Stratagen*) y agua inyectable estéril, para un volumen final de 50 μ l. Se emplearon las siguientes condiciones de reacción (**Figura 17**):

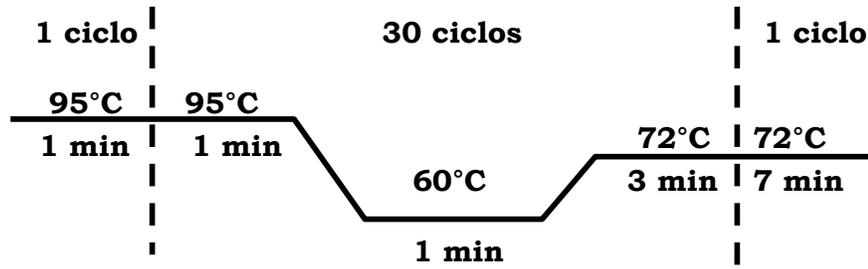


Figura 17. Condiciones para la Amplificación de *LYT1* por PCR para la Construcción de los Vectores Requeridos.

8. Digestión con Enzimas de Restricción.

Para verificar la correcta amplificación del ADN se sometió a análisis por electroforesis en gel de agarosa al 1%, 5 μ l de cada uno de los productos obtenidos. Una vez comprobado que el producto de PCR fuera del peso molecular esperado (inserto) y que el ADN del plasmido (vector) no estuviera degradado se procedió a digerirlos con las enzimas correspondientes, para linearizar al vector y generar extremos cohesivos tanto en el inserto como en el vector realizando la siguiente reacción de restricción y dejando incubar a 37 °C durante toda la noche (Tabla 5).

Tabla 5. Mezcla de Reacción para Digestión con Enzimas de Restricción.

Tipo de ADN	Inserto LYT1s+n	Inserto LYT1s	Inserto LYT1n	Vector pEGFP-N1
ADN	3 μ l	3 μ l	3 μ l	3 μ l
Buffer 2 10X	_____	3 μ l	3 μ l	3 μ l
Buffer <i>EcoR1</i> 10X	3 μ l	_____	_____	_____
BSA 10X	3 μ l	3 μ l	3 μ l	3 μ l
<i>EcoR1</i>	0.5 μ l	_____	_____	_____
<i>HindIII</i>	_____	0.5 μ l	0.5 μ l	0.5 μ l
<i>KpnI</i>	0.5 μ l	0.5 μ l	0.5 μ l	0.5 μ l
H ₂ O MiliQ	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l
Total	30 μ l	30 μ l	30 μ l	30 μ l

9. Purificación del ADN.

Se corrieron 5 μ l de la reacción de digestión en un gel de agarosa al 1% con TBE 0.5X (0.045 M Tris-Borato, 1mM EDTA pH 8.0) y se tiñó con bromuro de etidio para visualizar el ADN y comprobar que se obtuvo su digestión total. El resto de la reacción, 25 μ l, se corrieron en otro gel para después cortar la banda correspondiente, y colocarla en los tubos del *KIT* Ultrafree®-DA (*Millipore*); y se centrifugó por 1 min a 11,200 g para la obtención del ADN purificado.

10. Ligación.

Para llevar a cabo la reacción de ligación, que consiste en que el producto de PCR se inserte entre los sitios de restricción de las enzimas correspondientes (*EcoRI/KpnI* ó *HindIII/KpnI*) del vector pEGFP-N1, se realizó la siguiente reacción de ligación y se dejó incubando a 16° C toda la noche (Tabla 6).

Tabla 6. Reacción de Ligación con una Relación Inserto: Vector de 1:5 para las Contrucciones pEGFP-N1-LYT1

Inserto	10 μ l (1 μ g)
Vector	2 μ l (200ng)
Buffer ligasa 10X	2 μ l
Enzima T4 ligasa	1 μ l
H₂O MiliQ	5 μ l
Total	20 μ l

11. Células Calcio Competentes.

Las bacterias DH5 α fueron tratadas con CaCl₂ (bacterias calcio competentes), para facilitar que el ADN pasara a través de su membrana. En 20 ml de medio TYM (triptona, extracto de levadura y maltosa) contenidos en un matraz de 250 ml, se creció un cultivo de bacterias obtenidas de un cultivo fresco recién sembrado en LB agar sólido, se incubó toda la noche a 37° C en agitación a 250 rpm; de este cultivo se tomaron 2 ml, colocándolos en otro matraz de 250 ml, se dejó crecer en agitación a 37° C hasta obtener una densidad óptica de 0.5-0.8 nm. Se agregó medio TYM (triptona, extracto de levadura y maltosa) hasta alcanzar un volumen final de 500 ml y se dejó crecer hasta obtener una densidad óptica de 0.6 nm. El cultivo se enfrió en hielo por 5 min. Las células se centrifugaron para su empastillado a 4,000 rpm por 15 min a 4° C en un rotor GSA y en una centrífuga Sorvall, se desechó el sobrenadante y se resuspendió suavemente en 33 ml de buffer TFBI (30 mM acetato de potasio, 100 mM RbCl₂, 10 mM CaCl₂, 50 mM Mn Cl₂, 15% de glicerol H₂O a pH5.8), se incubó 5 min en hielo y se centrifugó a 2,500 rpm durante 8 min a 4° C en un rotor GSA, se retiró el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 4 ml de buffer TFBII (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl₂, 15% glicerol a pH6.5). Las células se incubaron por 15 min en hielo y se congelaron rápidamente en hielo seco en alícuotas de 100 μ l para posteriormente almacenarlas en una ultracongeladora a -70° C hasta ser utilizadas.

12. Transformación Bacteriana.

Se realizó la transformación con cada uno de los tres diferentes tipos de ligaciones, colocando un tubo de vidrio con tapa para cada transformación, los cuales se preenfriaron en hielo por 5 min, después se colocaron 25 ng del ADN, se mezcló suavemente con 100 μ l de solución fría TFBII (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl₂, 15% glicerol a pH6.5), se adicionaron 50 μ l de células calcio competentes DH5 α , lo cual se debe realizar en un cuarto frío y

sin que las bacterias toquen las paredes del tubo de vidrio. La mezcla se dejó incubar a 4° C por 20 min, sin mover. Posteriormente se les aplicó un choque térmico de 42° C durante 1:30 min exactos. Las células transformadas se enfriaron en hielo por 2 min para después ser colocadas a temperatura ambiente durante 5 min, se agregó 1 ml de LB (Luria-Bertoni) y se incubó a 30° C en agitación durante 1 h. Del total del cultivo se tomaron 300 µl para plaquar en una caja de petri con LB (Luria-Bertoni) agar, conteniendo ampicilina en una concentración de 100 µg/ml, y se incubó a 30° C hasta observar el crecimiento de colonias, que es alrededor de 16 h. Las colonias que crecieron fueron colonias positivas conteniendo el plásmido de interés y por ello resistencia al antibiótico, lo cual se comprobó con la extracción de ADN por STET y su digestión con enzimas de restricción.

13. Extracción de ADN por STET.

De las colonias resistentes al antibiótico de selección, se tomaron algunas para inocularlas en 5 ml de medio LB (Luria-Bertoni) conteniendo 100 µg/ml de ampicilina y se incubaron en agitación a 30 °C durante toda la noche. Se tomó 1.5 ml del cultivo y se centrifugó a 11,200 g por 1 min para obtener una pastilla de bacterias, la cual fue resuspendida en 350 µl de solución STET (10 mM Tris-Cl a pH8, 0.1 M NaCl, 1mM EDTA a PH8, 5% (v/v) Tritón X-100), se mezcló en *vortex* y se agregaron 25 µl de lisozima (10 mg/ml) recién preparada. Los tubos se colocaron en agua hirviendo durante 40 seg exactos.

Posteriormente se incubó a temperatura ambiente. Se mezcló y se microcentrifugó a 11,200 g por 10 min a temperatura ambiente y se recupero el sobrenadante en otro tubo, adicionando 40 µl de acetato de sodio 2.5 mM más 420 µl de isopropanol, incubando por 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 11,200 g por 5 min a 4° C, se descartó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla formada, después se agregó 1 ml de etanol al 70%, se microcentrifugó nuevamente a 11,200 g durante 5 min a 4° C, y se retiró el sobrenadante.

Posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente y finalmente se resuspendió en 25 µl de TE (10 mM Tris-Cl pH8.0, 1 mM EDTA pH8.0). El ADN obtenido se corrió en un gel de agarosa al 1% con TBE 0.5X (4.5 mM Tris-Borato, 0.1mM EDTA pH 8.0) y se tiñó con bromuro de etidio para visualizar el ADN en un transluminador de luz UV.

14. Comprobación de las Clonas Positivas por Mapas de Restricción.

Para comprobar que las clonas fueran realmente positivas, el ADN obtenido en la extracción por STET (10 mM Tris-Cl a pH8, 0.1 M NaCl, 1mM EDTA a pH 8.0 5% (v/v) Tritón X-100), se digirió con las enzimas de restricción correspondientes (*EcoRI* ó *HindIII/KpnI*) para liberar el inserto de cada una de las contrucciones (LYT1s+n, LYT1s y LYT1n). Posteriormente el ADN digerido se corrió y visualizó en un gel de agarosa al 1% con TBE 0.5X (0.045 M Tris-Borato, 1mM EDTA pH 8.0), teñido con bromuro de etidio, a través de un transluminador de luz UV.

15. Subclonación de LYT1(s+n, s y n)-EGFP en el Vector pTREXn.

Para poder observar en el parásito la localización de LYT1 fusionada a la proteína verde fluorescente LYT1(s+n, s y n)-EGFP, fue necesario subclonar los diferentes insertos quiméricos en el vector de expresión específico para *T. cruzi* pTREXn (Vázquez y Levin, 1999), el cual dirige la expresión del gen exógeno bajo un promotor homólogo ribosomal y permite la selección estable de los parásitos transfectados con Geneticina (G418) (**Tabla. 7**).

Tabla 7. Plásmidos pTREXn-LYT1(s+n, s y n)-EGFP

NOMBRE	TAMAÑO	PROTEINA	REFERENCIA
pTREXn	7, 062 pb	-----	Vázquez y Levin, 1999
pTREXn-LYT1s+n-EGFP	8,721 pb	LYT1s+n-EGFP	Este estudio
pTREXn-LYT1s-EGFP	8,721 pb	LYT1s-EGFP	Este estudio
pTREXn-LYT1n-EGFP	8,637 pb	LYT1n-EGFP	Este estudio

16. Análisis por Mapas de Restricción de pTREXn-LYT1(s+n, s y n)-EGFP.

Una vez que las secuencia de *LYT1*(s+n, s y n) fueron fusionadas a la secuencia que codifica para la proteína verde fluorescente (EGFP) en las construcciones pEGFP-N1-LYT1(s+n, s y n), se realizó la digestión de estos ADNs con las enzimas de restricción correspondientes (*EcoRI/NotI* y *HindIII/NotI*) para liberar el inserto *LYT1*(s+n, s y n)-EGFP, el cual, se purificó y se ligó al vector pTREXn-EGFP (7,062 pb), digerido previamente con las mismas enzimas de restricción para liberar a la proteína EGFP (720 pb) y dejar los extremos cohesivos para permitir la ligación de los insertos, de la misma forma descrita anteriormente (**Tabla 8**) (**Figura 18**).

Tabla 8. Mezcla de Reacción para Digestión con Enzimas de Restricción

Tipo de vector	pTREXn-LYT1s+n-EGFP	pTREXn-LYT1s-EGFP	pTREXn-LYT1n-EGFP	pTREXn-EGFP
ADN	3 µl	3 µl	3 µl	3 µl
Buffer 2 10X	_____	3 µl	3 µl	3 µl
Buffer <i>EcoR1</i> 10X	3 µl	_____	_____	_____
BSA 10X	3 µl	3 µl	3 µl	3 µl
<i>EcoR1</i>	0.5 µl	_____	_____	_____
<i>HindIII</i>	_____	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl
<i>NotI</i>	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl
H₂O MiliQ	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
Total	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl

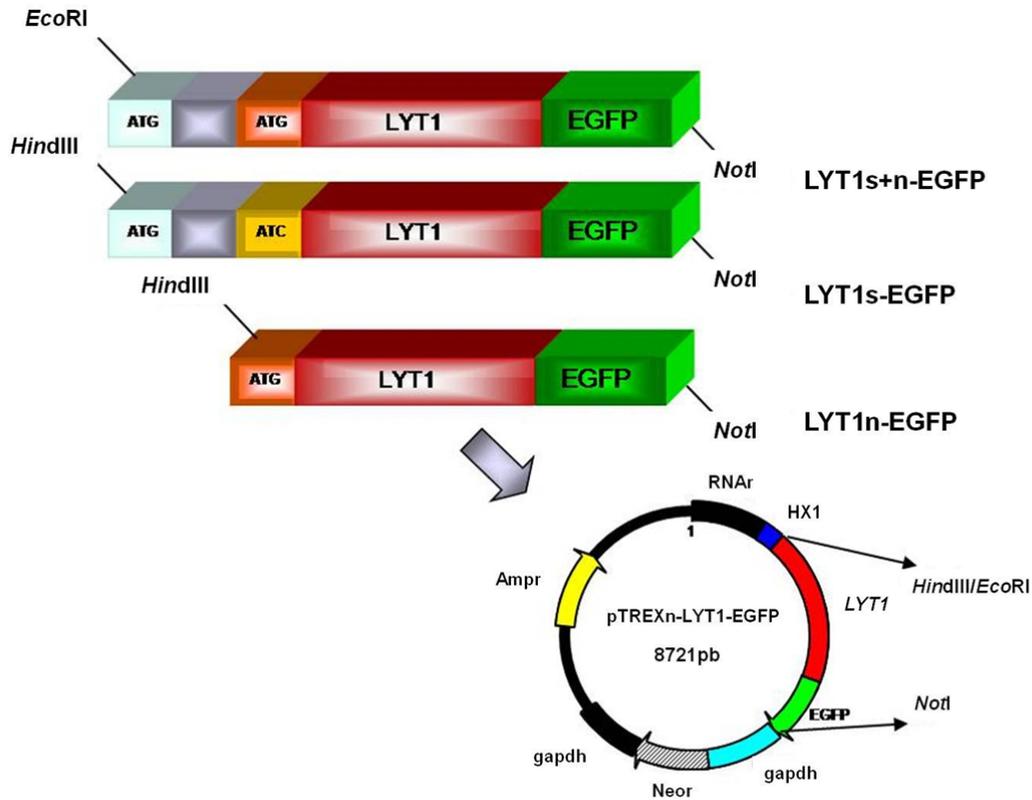


Figura 18. Esquema de las Tres Diferentes Construcciones pTREXn-LYT1(s+n, s y n)-EGFP.

Una vez obtenidos los insertos *LYT-EGFP* en sus tres diferentes variantes, y digerido el plásmido pTREXn con las enzimas correspondientes, se realizaron los procesos de purificación, ligación del ADN, transformación de las bacterias y la comprobación de clonas positivas por extracción de ADN por STET y digestión con enzimas de restricción, del mismo modo en que se describe para las construcciones pEGFP-N1-LYT1.

17. Extracción de ADN por Cloruro de Cesio (CICs).

Una vez obtenida la subclonación de *LYT1-EGFP* en pTREXn, se procedió a extraer ADN de las tres diferentes construcciones por medio de CICs y bromuro de etidio, procedimiento que se utiliza para extraer gran cantidad de ADN con un alto grado de pureza, además de permitir la separación del ADN circular del ADN cortado de una sola cadena. Primero se inocula una colonia positiva en 20 ml de LB (Luria-Bertoni) conteniendo ampicilina (100 µg/ml), se deja incubar a 30° C durante 8 h en agitación. Después, se tomaron 5 ml de este cultivo y se colocaron en un matraz de 1 litro con 500 µl de medio LB (Luria-Bertoni) conteniendo ampicilina (100 µg/ml) y se dejó incubar toda la noche a 30° C en agitación. Posteriormente, se centrifugó el cultivo a 10,500 g durante 10 min a 4° C, desechando el sobrenadante y resuspendiendo la pastilla obtenida en 4 ml de solución TS (Tris-Cl 50 mM, sucrosa al 25%, ajustada a 500 ml), luego se agregaron 4 ml de solución ELT (EDTA 100 mM, lisozima 2 mg/ml, Tritón X-100 0.1% ajustada a 200 ml) y se incubó a 70 °C por 10 min exactos. Se ultracentrifugó a 40,000 rpm en un rotor *SW 40Ti* durante 20 min a 4° C y se recuperó el sobrenadante en un tubo *Corex* de 30 ml.

Se agregó un volumen igual de solución PEG-NaCl, se mezcló por inmersión y se dejó incubando 30 min a temperatura ambiente. Se ultracentrifugó a 70,000 rpm por 10 min a 4° C en un rotor *SS*, se desecho el sobrenadante y se resuspendio la pastilla en 3 ml de TE (10 mM Tris-Cl pH8.0, 1 mM EDTA pH8.0), se adicionaron 25 µl de ARNsa (5 µg/ml) y se incubó a 37° C por 4 h. Posteriormente se adicionaron 4 g de CICs más 500 µl de bromuro de etidio (5 mg/ml). Se ultra centrifugó a 90,000 rpm por 4 h a 20° C en un rotor *NVT90*. Con ayuda de luz UV se observó la banda formada por el ADN circular, el cual se recuperó con una aguja y jeringa para posteriormente pasarlo a tubos *Falcon* donde se adicionó un volumen igual de isopropanol y, centrifugando a 10,500 g durante 1 min para quitar el bromuro de etidio, paso que se repitió 3 veces; luego se agregaron 3 volúmenes de etanol al 70% y se dejó a -20° C toda la noche. Se centrifugó la muestra a 10,500 g durante 30 min a 4° C.

Se resuspendió en 200 μ l de TE (10 mM Tris-Cl pH8.0, 1 mM EDTA pH8.0) en condiciones estériles y se extrajo el ADN con un volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamilico (25:24:1). Se mezcló en el vortex y después se centrifugó a 11,200 g durante 1 min, recuperando la fase acuosa. Se agregó 1/10 volúmenes de acetato de sodio 2.5 M más 2.5 volúmenes de etanol absoluto y se dejó a -70° C por 20 min. Finalmente, se lavó con etanol al 70%, centrifugando a 11,200 g por 10 min, a 4° C, se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 50 μ l de TE (10 mM Tris-Cl pH8.0, 1 mM EDTA pH8.0).

18. Cuantificación del ADN.

Para cuantificar la cantidad de ADN se utilizó espectrofotometría, determinando la densidad óptica (DO) de cada muestra a una longitud de onda de 260 nm y a 280 nm. Una DO corresponde a 50 μ g/ml de ADN de doble cadena, 40 μ g/ml de ADN de cadena sencilla y 20 μ g/ml para oligonucleótidos de cadena sencilla. La relación de las lecturas de 260 nm/280 nm = 1.8 indica que el ADN es puro. Las muestras de ADN se diluyeron 1:1000 μ l con agua y se realizó la lectura en una cubeta de cuarzo. La densidad óptica se leyó en un espectrofotómetro UV/VIS Beckman a las longitudes de onda de 260 nm y 280 nm.

19. Secuenciación de pTREXn-LYT1(s+n, s y n)-EGFP.

Se llevó a cabo la secuenciación automática de cada una de las construcciones obtenidas para verificar que la secuencia de los insertos fuera la correcta *LYT*(s+n, s y n), empleando el oligo antisentido POR-2. Además, se secuenciaron las construcciones para verificar que cada una de las secuencias de *LYT1*(s+n, s y n) fueran correctas y que se encontraran en fase con la secuencia del gene que codifica para la proteína EGFP, de acuerdo al siguiente protocolo para la extracción de ADN utilizando el oligo antisentido EGFP-AS.

Cada clona fue crecida en 5 ml de medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml), a 2000 rpm, de 20 a 24 h. El cultivo se centrifugó a 9,700 g por 5 min, se decantó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en 200 µl de buffer P1 (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM EDTA pH 8) y transferida a un tubo *ependorf*. Posteriormente se agregaron 300 µl de buffer P2 (0.2 M NaOH, 1% SDS) recién preparado y 300 µl de buffer P3 (29.4 g de acetato de potasio, 11.5 ml de ácido acético glacial y aforado a 100 ml de H₂O). La muestra fue microcentrifugada por 15 min a 12,000 rpm a temperatura ambiente, se recuperó el sobrenadante y se trató con 3 µl de ARNasa (10 mg/ml) durante 3 h a 37° C.

Para eliminar las proteínas presentes en la muestra, se trató el sobrenadante con un volumen igual de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico, a una proporción 25:24:1, con pH 8.0, se microcentrifugó por 10 min a 12,000 rpm a temperatura ambiente, se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo y se precipitó el ADN con volumen igual de isopropanol frío. La muestra se microcentrifugó por 5 min a 12,000 rpm a temperatura ambiente, se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 300 µl de etanol frío al 70%. Nuevamente la muestra se microcentrifugó durante 5 min a 12,000 rpm a temperatura ambiente y la pastilla se resuspendió en 40 µl de agua. Se agregaron 6.4 µl de NaCl 5 M, 40 µl de PEG y 120 µl de etanol frío al 95%, y se incubaron las muestras por 20 min en hielo.

Se recuperó el ADN microcentrifugando por 20 min a 12,000 rpm a temperatura ambiente y se retiró el sobrenadante lavando la pastilla con 300 µl de etanol frío al 70%, y después de microcentrifugar 5 min a 12,000 rpm a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante y la pastilla seca fue resuspendida en 40 µl de agua.

20. Transfección de Epimastigotes por Electroporación.

3×10^8 de epimastigotes de *T. cruzi* fueron lavados en 10 ml de medio LIT no complementado, preenfriado, centrifugando a 800 g durante 10 min. Posteriormente, fueron resuspendidos en 350 μ l de medio LIT sin complementar, y se colocaron en cubetas de electroporación (BTX 2 mm) preenfriadas. Se le adicionaron 40 μ l con una concentración de 100 μ g del ADN del plásmido purificado por el procedimiento de Cloruro de Cesio.

Los parásitos fueron transfectados con el electroporador BTX ECM 830 aplicando una descarga eléctrica de 300 V, de 12 ms, y se dejaron reposar 5 min a temperatura ambiente. Los epimastigotes fueron resuspendidos en 10 ml de medio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) (Camargo, 1964) complementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco® No. Cat. 12318-028), 0.5% de penicilina/ estreptomycin (Gibco® No. Cat. 15140-122), y 1% de hemina (5 mg/ml), e incubados a 28° C durante 24 h. Posteriormente se puso un cultivo a una dilución 1:5 en medio LIT conteniendo 500 μ g/ml de G418. Después de 48 h, se colocó otro cultivo a una dilución 1:5 en el mismo medio. Después de 7-10 días de incubación, los parásitos transfectados no resistentes dejan de dividirse por completo. Los parásitos que sobreviven a la selección, fueron incubados en la presencia de presión selectiva por otros 7 días.

21. Obtención de Clonas de Parásitos Resistentes a G418.

Los parásitos transfectados resistentes al antibiótico de selección (500 μ g/ml de G418) en fase de crecimiento logarítmica y expresando la proteína de fusión LYT(s+n, s y n)-EGFP, fueron clonados en el FACS (de las siglas en inglés: *Fluorescence Activated Cell Sorting*) en cajas de 96 pozos, con 100 μ l en cada pozo de medio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) (Camargo, 1964) complementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco® No. Cat. 12318-028), 0.5% de penicilina/ estreptomycin (Gibco® No. Cat. 15140-122), y 1% de hemina (5 mg/ml).

Se verificó la presencia de los parásitos fluorescentes con la ayuda del microscopio invertido de fluorescencia. Las placas de cultivo se mantuvieron en una cámara húmeda a 28° C durante 14 días, monitoreando el crecimiento de los parásitos. Transcurrido este tiempo, se seleccionaron aquellos pozos en donde se observó una colonia de parásitos fluorescentes y se cultivaron extendiéndolas a un volumen de 200 µl, 500 µl, 1 ml, 2 ml y hasta 5 ml de medio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) (Camargo, 1964) complementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco® No. Cat. 12318-028), 0.5% de penicilina/estreptomicina (Gibco® No. Cat. 15140-122) y 1% de hemina (5 mg/ml), incubando a 28° C en tubos falcón de 15 ml para mantenerlas en fase de crecimiento logarítmica, para lo cual se contarán los parásitos y se resembrarán constantemente hasta obtener poblaciones más grandes en cuanto al número de parásitos de cada clona obtenida.

22. Obtención de Extractos Protéicos Totales (EPT) de *T. cruzi*.

Se cosecharon 1×10^8 epimastigotes de la cepa CL-Brener tipo silvestre (*WT-wilde type*), así como de parásitos transfectados establemente con pTREXn-EFGP, pTREXn-LYT1s+n-EFGP, pTREXn-LYT1s-EFGP y pTREXn-LYT1n-EFGP. Se lavaron tres veces con 1 ml de PBS 1X, a pH 7.2, a 4° C, se centrifugaron a 3,200 g, a 4° C, por 5 min, La pastilla obtenida fue resuspendida en 500 µl de buffer de lisis A (Tris-HCl 50 mM pH7.8, Nonidet 40 1% (Np40), EDTA 5 mM, SDS 1%), 100 µl de la mezcla de inhibidores de proteasas Complete® (ROCHE) y 15 µl de ZnCl₂ 100 mM.

Se incubó a 4° C durante 20 min y se sonicaron 3 veces por 1 min, con intervalos de 10 seg, a una amplitud de 40 % (8 watts) en un sonicador *Sonics and Materials* INC. Se microcentrifugaron a 14,000 g por 10 minutos recuperándose al final el sobrenadante. Finalmente se cuantificó por el método de Lowry y se verificó mediante geles de SDS-PAGE al 12 % teñidos con azul de Coomasie.

23. Análisis de la Expresión de las Proteínas Quiméricas LYT1(s+n, s y n)-EGFP en los Parásitos *Knock-in* por *Western blot*.

Una vez cuantificados los EPT obtenidos para cada línea de parásitos, se mezcló la cantidad equivalente a 10 µg con buffer Laemli 1X (62.5 mM Tris, pH 6.8, 10% glycerol, 3% SDS, 5% β-mercaptoethanol) (Laemmli, 1970), se hirvió cada muestra durante 5 min y se cargaron en geles SDS-PAGE al 4%, hasta lograr una adecuada separación de las bandas de 75 y 100 KDa del marcador de peso molecular (BIO-RAD #cat: 161-0374). A continuación, se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa con 100 V por una hora. Posteriormente se verificó la eficiencia de transferencia tiñendo la membrana con rojo Ponceau (Sigma cat: P-7170) y se destiñeron con PBS 1X (NaCl 0.14 M, KCL 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM). Una vez hecha la comprobación, se bloqueó la membrana con PBS1X-Leche (Svelty) al 6% durante 1 h.

A continuación se descartó la solución de bloqueo y se incubó la membrana con el anticuerpo primario α-GFP IgG_{2a} producido en ratón (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY # cat. GFP B-2 sc-9996), a una dilución 1:1000 preparada en PBS1X-Leche (Svelty) al 6% durante 1 h. Posteriormente se realizaron 3 lavados a la membrana con 5 ml de PBS 1X durante 10 min, 5 ml de PBS 1X–Tween-20 0.05%, 5 ml de PBS 1X por 10 min. Después, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario α-mouse IgG (H+L) conjugado con peroxidasa producido en cabra (ZYMED LABORATORIES # cat. 81-6520), a una dilución 1:5000 preparada en PBS1X-Leche (Svelty) al 6% durante 1 h.

Posteriormente, se realizaron 3 lavados a la membrana con 5 ml de PBS 1X por 10 min, 5 ml de PBS 1X–Tween-20 0.05%, 5 ml de PBS 1X por 10 min. La membrana se reveló mediante quimioluminiscencia utilizando el reactivo ECL (*Amersham* cat: RPN2106) como sustrato de la peroxidasa. El resultado fue visualizado para determinar los pesos moleculares de las proteínas.

24. Determinación de la Localización de las Proteínas Quiméricas por Epifluorescencia.

De los parásitos transfectantes estables resistentes a G418 se tomaron 4×10^6 , se lavaron con PBS centrifugando 800 g durante 6 min y se resuspendieron en 500 μ l de paraformaldehído al 4%. Se tomaron 10 μ l de cada tipo de parásito para aplicarlos en áreas delimitadas con lápiz graso en la superficie de laminillas siliconizadas (Silane-pep™ *slides Sigma Diagnostics*). Las gotas con los parásitos se dejaron secar en condiciones húmedas a temperatura ambiente durante 30 min. Las muestras se lavaron en agitación con PBS 1X pre-enfriado, para posteriormente permeabilizarlas con metanol absoluto durante 10 min. Se lavaron nuevamente en agitación con PBS y después, se adicionaron 15 μ l de DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride*) (Molecular Probes™ Invitrogen detection technologies) para teñir los ácidos nucleicos, a una dilución de 1:1000 durante 5 min. Por último se lavó la laminilla con PBS 1X y se dejó secar a temperatura ambiente. Se adicionó Arvitol para la fijación de las preparaciones con un cubreobjetos.

Los parásitos se observaron al microscopio de epifluorescencia marca *Olympus BX41*, equipado con un objetivo 60X / 1.25 *oil Iris Ph3 UPlan FL N*, las imágenes se capturaron con una cámara *Evolution VF Fast Cooled Color Media Cybernetics* y se analizaron con el programa *Image-Pro Plus V 6.0 Media Cybernetics*. También fueron analizados por fluorescencia confocal, usando un microscopio *Leica microsystems TSC SP5, DM 1600, Mo* por medio de los filtros de excitación: multifotónico 400 nm para DAPI y argón 488 nm para EGFP, y se determinó la localización del núcleo y cinetoplasto (DAPI), así como la expresión del gen *LYT1* mediante la fluorescencia de la proteína verde fluorescente (EGFP) en los parásitos transfectados con pTREXn-LYT1s+n-EGFP, pTREXn-LYT1s-EGFP, pTREXn-LYT1n-EGFP. Las muestras fueron observadas con el objetivo 63X 1.4 con aceite de inmersión. Las imágenes fueron capturadas con el programa *LAS AF (Leica Application Suite Advanced Fluorescence Lite) 1.7.0 build 1240 Leica microsystems*.

25. Cultivo de Parásitos *in vitro*.

Las clonas de los parásitos transfectados con los diferentes plásmidos se cultivaron en 5 ml de medio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) (Camargo, 1964) complementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco® No. Cat. 12318-028), 0.5% de penicilina/ estreptomycin (Gibco® No. Cat. 15140-122) y 1% de hemina (5 mg/ml), en un tubo falcón de 15 ml, a 28° C, utilizando un inóculo con proporción de 1:5 del un cultivo en fase logarítmica. En estas condiciones los parásitos se resembraron periódicamente, manteniendo el *stock* y los cultivos para uso experimental semanalmente.

26. Curva de Crecimiento.

Obtenidas las clonas, y en fase de crecimiento logarítmico, se realizaron curvas de crecimiento celular para los diferentes tipos de parásitos transfectados, tomando como controles la cepa WT y la EGFP. Para ello, se colocaron epimastigotes de *T. cruzi* WT, EGFP, pTREXn-LYT1s+n-EGFP, pTREXn-LYT1s-EGFP y pTREXn-LYT1n-EGFP en tubos *falcón* de 15 ml, a un inóculo inicial de 1×10^6 parásitos/ml en medio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) (Camargo, 1964) complementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco® No. Cat. 12318-028), 0.5% de penicilina/ estreptomycin (Gibco® No. Cat. 15140-122) y 1% de hemina (5 mg/ml). Los parásitos se contaron cada 24 h con la ayuda de una cámara de Neubauer.

27. Análisis de Exclusión por Azul de Tripano.

El azul de tripano es un colorante utilizado para el recuento de células íntegras por exclusión de dicho colorante. Este método está basado en que las células vivas (viables) no captan el azul de tripano, mientras que las células muertas (no viables) si lo hacen, por la pérdida de lípidos de su membrana. Se adiciona azul de tripano al 0.2% en relación 1:1 (5 μ l del cultivo de parásitos y se mezcla con 5 μ l de azul de tripano) y se deja incubar de 2-3 min.

Posteriormente se cuentan los parásitos vivos (sin teñir) y muertos (teñidos) en la cámara de Neubauer.

28. Análisis del Movimiento de los Parásitos Transfectados.

Debido a la detección de un defecto en el movimiento de los parásitos transfectados, se capturaron imágenes y videos de las diferentes líneas de parásitos LYT1(s+n, s y n)-EGFP mediante la técnica de gota suspendida, colocando una gota en un porta objeto sin cubre objeto, utilizando el microscopio de fluorescencia confocal *Leica microsystems TSC SP5, DM 1600, Mo* por medio del filtro de excitación multifotónico de 488 nm para EGFP, empleando el programa *LAS AF*. Las imágenes fueron capturadas (*the times series mode*) a una razón de 10 cuadros por segundo y tomando 10 segundos por muestra. El movimiento de los parásitos fue medido y analizado utilizando el programa *Image-Pro Plus V 6.0*. Se utilizaron parásitos WT, EGFP y *knock-out* L-14 (sencillo) y L-16 (nulo) como controles.

29. Análisis del Movimiento de los Parásitos no Transfectados.

Los parásitos que no expresan EGFP (WT, L-14 y L-16) fueron teñidos con carboxifluoresceína succinimidilo ester (CFSE), el succinimidilo ester reacciona con las aminas intracelulares, formando conjugados fluorescentes que son retenidos en la célula y heredados a las generaciones subsecuentes después de su división, y no se transfiere hacia las células adyacentes.

Primero se recolectaron los epimastigotes, se lavaron 2 veces con PBS, se resuspendieron a una concentración de 1×10^7 células/ml en PBS. Posteriormente se añadió el fluorocromo CFSE (*Molecular Probes™. Invitrogen detection technologies*), hasta una concentración final de 5 μ M, y se incubaron durante 10 min a 37° C en condiciones de oscuridad. Transcurrido este tiempo, se paró la reacción de tinción añadiendo PBS 1X pre-enfriado a 4° C, y finalmente los parásitos fueron lavados 2 veces con PBS 1X.

Los epimastigotes teñidos con el marcador CFSE se analizaron al microscopio de fluorescencia confocal *Leica microsystems TSC SP5, DM 1600, Mo* por medio del filtro de excitación multifotónico de 488 nm para EGFP, empleando el programa *LAS AF*, y el movimiento de los parásitos fue medido y analizado utilizando el programa *Image-Pro Plus V 6.0*, de igual manera que se hizo para los parásitos transfectados.

30. Análisis Morfométrico del Flagelo de los Parásitos Transfectados.

Debido a la detección de un defecto en el movimiento de los parásitos transfectados, y para determinar si éste defecto se relacionaba con el tamaño o el crecimiento del flagelo, se capturaron imágenes en el microscopio confocal con las especificaciones anteriores, en las que el flagelo de los parásitos fue medido y analizado utilizando el programa *Image-Pro Plus V 6.0*.

31. Análisis Vectorial del Movimiento.

Las trayectorias de los distintos tipos de parásitos se analizaron a partir del video obtenido para cada uno de ellos. Usando el programa de análisis de video *Image Pro Plus V 6.0* fue posible obtener las coordenadas a intervalos regulares de 1 s del campo analizado para los diferentes parásitos.

Utilizando las siguientes formulas matematicas se determinaron las coordenadas de un parásito dado al tiempo t_i como x_i e y_i .

El primer paso para analizar la trayectoria de un parásito consistió en calcular la distancia recorrida por éste entre dos tiempos consecutivos, t_i y t_{i+1} . Para ello, usamos la siguiente fórmula del análisis vectorial mediante el programa *MATLAB 7.1*:

$$d_i = \sqrt{(x_{i+1} - x_i)^2 + (y_{i+1} - y_i)^2}.$$

Dado que todos los intervalos entre puntos consecutivos son de 1 s, las distancias d_i son numéricamente iguales a las correspondientes velocidades v_i . Posteriormente graficamos el histograma de velocidades v_i , y calculamos la velocidad promedio \bar{v} , para cada uno de los parásitos estudiados.

A continuación, calculamos el cambio angular de dirección entre dos pasos consecutivos mediante la fórmula:

$$\theta_i = s \cos^{-1} \left(\frac{(x_{i+1} - x_i)(x_i - x_{i-1}) + (y_{i+1} - y_i)(y_i - y_{i-1})}{d_{i-1}d_i} \right),$$

Donde d_{i-1} son las distancias (calculadas con la fórmula anterior recorridas por el parásito en los dos pasos consecutivos, entre los que se calcula el ángulo θ_i , en tanto que s está dado por:

$$s = \frac{(x_i - x_{i-1})(y_{i+1} - y_i) - (y_i - y_{i-1})(x_i - x_{i-1})}{|(x_i - x_{i-1})(y_{i+1} - y_i) - (y_i - y_{i-1})(x_i - x_{i-1})|}.$$

Se puede comprobar, a partir de los teoremas del análisis vectorial, que $s=1$ si el cambio de dirección ocurre en sentido opuesto al de las manecillas del reloj, y que $s = -1$ en caso contrario.

Una vez calculados todos los ángulos θ_i para la trayectoria de un parásito dado, se procedió a graficar el correspondiente histograma, repitiendo el procedimiento para la totalidad de los parásitos estudiados. Puesto que todos los histogramas resultaron ser aproximadamente simétricos, procedimos a calcular el promedio de los valores absolutos de los ángulos θ_i ($\bar{\theta}$) como una medida de qué tan intrincada es la correspondiente trayectoria.

32. Análisis de Varianza (ANOVA).

Para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas en la movilidad de los diferentes tipos de parásitos transfectados LYT1(s+n, s y n)-EGFP) comparados con los parásitos control (WT, EGFP y *knock-out* L-14 y L-16), se realizó el análisis de varianza (ANOVA), tanto para la v_i , como para el θ_i , mediante el programa *MATLAB 7.1*.

33. Análisis por Microscopía Electrónica de Barrido.

Para comprobar si el defecto en la motilidad de los epimastigotes que expresan de manera exógena LYT1(s+n, s y n)-EGFP está relacionado con algún cambio estructural, se realizó el análisis por microscopía electrónica de barrido y por microscopía electrónica de transmisión.

1×10^9 epimastigotes fueron fijados con glutaraldehído al 2.5% durante 1h, y luego fueron puestos en cubreobjetos de vidrio previamente tratados con $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ de poli L-lisina; los parásitos fueron fijados con OsO_4 al 1% durante 1h a 4°C , se deshidrataron las muestras con etanol en concentraciones crecientes, las muestras fueron secadas con CO_2 en un aparato *Samdry-780* y cubiertas con oro en un aparato de vacío *Denton Vacuum Desk II*, posteriormente las muestras fueron observadas en un microscopio electrónico de barrido *JEOL JSM-35 C*.

34. Análisis por Microscopía Electrónica de Transmisión.

1×10^9 epimastigotes fueron lavados con PBS 1X, se fijaron con glutaraldehído al 2.5% durante 30 minutos. Posteriormente se fijaron con OsO_4 al 1% durante 60 min a 4°C , se deshidrataron las muestras con etanol en concentraciones crecientes, para después ser embebidas en resina *Spurr*. Se realizaron cortes ultrafinos con un ultramicrotomo *Reichert Jung*. Los parásitos fueron teñidos con acetato de uranilo y citrato de plomo.

Posteriormente las muestras fueron analizadas en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 2000 EX a 80 keV.

34. Ensayos de Endocitosis con FM4-64.

El estudio funcional de los parásitos expresando de manera exógena LYT1-EGFP, sugiere que esta proteína está implicada en el tráfico intracelular, por lo que se realizó un análisis de endocitosis, utilizando como marcador endocítico fluorescente al FM4-64 (Red fluorescent FM® 4-64, Molecular probes™) (Vida and Emr, 1995). Se emplearon 1×10^6 parásitos/ml, los cuales fueron lavados con PBS 1X, centrifugando a 800 g por 6 min, y resuspendidos en medioLIT (*Liver Infusion Tryptose*) (Camargo, 1964) complementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO® No. Cat. 12318-028), 0.5% de penicilina/ estreptomycin (GIBCO® No. Cat. 15140-122) y 1% de hemina (5 mg/ml), y conteniendo FM4-64 (5 µg/ml). Los parásitos fueron incubados a 28 °C for 20 min, siguiendo el protocolo adaptado por McConville *et al.* (Mullin *et al.*, 2001).

Posteriormente los parásitos se colocaron en hielo durante 5 min y fueron lavados con PBS 1X centrifugando a 800 g, por 6 min, y se resuspendieron en 500 µl de paraformaldehído al 4%. Se tomaron 10 µl para aplicarlos en áreas delimitadas con lápiz graso en la superficie de laminillas siliconizadas (Silane-pep™ *slides Sigma Diagnostics*). Las gotas con los parásitos se dejaron secar en condiciones húmedas a temperatura ambiente durante 30 min.

Las muestras se lavaron en agitación con PBS preenfriado, para posteriormente permeabilizarlas con metanol absoluto durante 10 min. Se lavaron nuevamente en agitación con PBS y después se adicionaron 15 µl de DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride*) (Moleculars Probes™ *Invitrogen detection technologies*) para teñir los ácidos nucleicos, a una dilución de 1:1000 durante 5 min.

Por último, la laminilla se volvió a lavar con PBS y se dejó secar a temperatura ambiente. Se adicionó Arvitol para la fijación de las preparaciones con un cubreobjetos. Las muestras se observaron al microscopio de fluorescencia confocal *Leica microsystems TSC SP5, DM 1600 Mo* por medio de los filtros de excitación: multifotónico 400 nm para DAPI, argón 488 nm para EGFP y 558 nm para FM4-64 rojo. Las muestras fueron observadas con el objetivo 63X 1.4 con aceite de inmersión y las imágenes fueron capturadas con el programa LAS AF (*Leica Application Suite Advanced Fluorescence Lite*) 1.7.0 build 1240 *Leica microsystems*.

36. Cultivo Celular.

Las células se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO® No. Cat. 12318-028) alta glucosa complementado con 10% suero fetal bovino (SFB) (GIBCO® No. Cat. 12318-028), 0.5% de penicilina/estreptomicina (GIBCO® No. Cat. 15140-122), a 37 °C, en una atmósfera de CO₂ al 5%. Para llevar a cabo la resiembra del stock de fibroblastos 3T3 NIH crecidos en frascos de cultivo T25 se les retiró el medio a las cajas con un 80% de confluencia y se adicionaron 3 ml de PBS 1X EDTA 0.53 M, a 37 °C, para lavar la monocapa. Se adicionaron 500 µl de 0.05% Tripsina-EDTA 1X (GIBCO® No. Cat. 25300-062) moviendo la caja de forma que permita la distribución homogénea de la solución. Se dejó incubar a 37°C por 1 a 2 min para levantar y disgregar la monocapa. La suspensión celular se colocó en un tubo con 2 ml de medio DMEM alta glucosa sin complementar, y se centrifugó a 500 g por 5 min, a 4 °C, para retirar la tripsina de las células.

Se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1ml de medio DMEM alta glucosa complementado con 10% SFB. Las células se sembraron a una razón de pase 1/5 en una caja con medio DMEM alta glucosa complementado como ya se indicó, y se incubaron a 37 °C con CO₂ al 5% hasta obtener una confluencia del 70%.

37. Infección Primaria de Fibroblastos 3T3 con *T. cruzi*.

Esta primera infección se hace con el propósito de obtener parásitos en sus fases de amastigote y tripomastigote. La infección primaria de fibroblastos 3T3 se realizó en una monocapa de células al 70%, crecidas en frascos T-25 con medio DMEM alta glucosa complementado con 10% SFB y 0.5% ampicilina/estreptomicina.

La infección de estas células se realizó con parásitos en fase de crecimiento logarítmica, a una densidad de 1×10^7 epimastigotes (previamente lavados con medio DMEM alta glucosa sin complementar para eliminar el medio LIT remanente) en medio DMEM alta glucosa complementado con 2% de SFB y 0.5% de ampicilina/estreptomicina. Después de 48 h se lavaron las cajas de cultivo, con 2 ml de medio DMEM alta glucosa sin complementar, hasta eliminar los parásitos remanentes en el sobrenadante y se agregó medio fresco cada tercer día (DMEM alta glucosa complementado con 2% de SFB y 0.5% de ampicilina/estreptomicina), monitoreando diariamente el progreso de la infección bajo el microscopio de fluorescencia.

38. Purificación de Tripomastigotes y Amastigotes.

Una vez que se observen tripomastigotes y amastigotes en el sobrenadante de las células infectadas, se retiró el sobrenadante. El medio de cultivo se colocó en un tubo falcón 15 ml, y se centrifuga a 145 g por 5 min para separar los restos de células 3T3. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 5,200 g, por 3 min, para colectar los parásitos.

Después de centrifugar se desecha el sobrenadante, procurando dejar cerca de 500 μ l en el cual se resuspende la pastilla y se pasa a un tubo *ependorf* de 1.5 ml centrifugando a 5,200 g por 5 min. Al término de esta centrifugación se desecha el sobrenadante y se adiciona un volumen aproximado de 4-5 veces el tamaño de la pastilla de anticuerpo primario anti-2C2 (Andrews *et al.*, 1987) dirigido contra la glicoproteína de superficie Ssp4, la

cual es específica de amastigotes. Posteriormente, se incubó a 37 °C por 1 h y se centrifugó por 5-6 seg a 5,200g. Se retiró el sobrenadante para colocarlo en otro tubo (aquí se encuentran suspendidos los tripomastigotes, con no más del 10% de amastigotes contaminantes), la pastilla obtenida con el anticuerpo se lava con PBS 1X y se resuspende con PBS 1X. Al igual que el sobrenadante conteniendo los tripomastigotes, la suspensión de amastigotes no contiene más del 10% de tripomastigotes contaminantes.

39. Índice de Infectividad *in vivo* de Parásitos *Knock-out* y *Knock-in* de LYT1.

Se utilizó un lote de 20 ratones Balb/c hembras de 4-6 semanas de edad, y de 20 ± 2 g de peso, proporcionados por la unidad del bioterio del CINVESTAV-IPN, el lote fue dividido en 4 grupos de 5 ratones cada uno. Los ratones fueron inoculados, vía intraperitoneal, con 2×10^6 tripomastigotes WT de la cepa CL-Brener, parásitos L-14 (*knock-out* sencillo), L-16 *knock-out* doble) y parásitos *knock-in* de LYT1 (LYT1s+n-EFGP, LYT1s-EFGP y LYT1n-EFGP), los cuales fueron previamente lavados con PBS 1X, centrifugando a 800 g por 6 min, por 3 veces. La parasitemia fue seguida cada dos días hasta que disminuyó de manera notable. Para la determinación de la presencia y cantidad de parásitos en sangre se tomaron muestras de sangre de cada uno de los ratones de los diferentes grupos y se utilizó el método descrito por de Arias y Ferro en 1988.

VII. RESULTADOS.

“Las ciencias tienen las raíces amargas, pero muy dulces los frutos”.

Aristóteles

VII. RESULTADOS.

1. Construcción de los Plásmidos pTREXn-EGFP, pTREXn-LYT1 (s+n, s y n)-EGFP.

A fin de expresar las diferentes variantes de LYT1 (conteniendo y sin contener la secuencia señal amino-terminal) en los parásitos *knock-in*, clonamos las secuencias codificantes de las mismas en un vector de expresión para *T. cruzi*. Ya que en estos parásitos no es posible utilizar promotores heterólogos, utilizamos el vector pTREXn (reportado por Vázquez y colaboradores en 1999), que contiene un promotor ribosomal homólogo y la secuencia *HX1*, que le confiere el sitio aceptor del *trans-splicing* al gen a expresar; obteniéndose de este modo, altos niveles de expresión. También, como necesitamos determinar la localización de los diferentes productos de LYT1, fusionamos estas secuencias a la secuencia codificante de la proteína verde fluorescente (EGFP) para determinar de manera indirecta, la localización de LYT1 por microscopía de fluorescencia y confocal.

Para llevar a cabo las construcciones de estos vectores de expresión, primero se amplificaron por PCR las secuencias codificantes de las diferentes versiones de *LYT1* para su clonación en el vector pEGFP-N1 y poder obtener las quimeras LYT1 (s+n, s y n)-EGFP. Posteriormente las tres diferentes quimeras se subclonaron en el vector pTREXn para la obtención de pTREXn-LYT1s+n-EGFP, pTREXn-LYT1s-EGFP, pTREXn-LYT1n-EGFP que fueron utilizados para transfectar los parásitos. Como control, se utilizó el plásmido pTREXn-EGFP que contiene la secuencia codificante de la EGFP subclonada del plásmido pEGFP-N1, como se describió en materiales y métodos.

1.1 Amplificación del Fragmento *LYT1s+n* por PCR.

La secuencia codificante de *LYT1* fue amplificada por PCR usando como templado el vector pBS+LYT1b (4.3 kb), que contiene clonada la secuencia codificante y flanqueante del alelo *b* de *LYT1*. Por lo tanto, se amplificó la secuencia a partir del primer codón de inicio de la traducción (ATG) de la posición +1 y consecuentemente la señal amino-terminal. El producto de PCR se corrió y analizó en un gel de agarosa, como se describe en materiales y métodos. Como se observa en la **Figura 18, carril 4**, se obtuvo una banda de peso molecular aproximado de 1,659 pb. Posteriormente el producto de PCR, así como el ADN del vector pEGFP-N1 (4.7 Kb), fueron digeridos con las enzimas de restricción *EcoRI* y *KpnI*, para linearizar al vector y favorecer los extremos cohesivos, dando como resultado una banda de aproximadamente 1.6 Kb y otra de 4.7 Kb respectivamente (**Figura 19, carril 3 y 4**). Estos resultados indicaron que efectivamente se obtuvo el producto de PCR del peso molecular esperado y la digestión completa del vector.

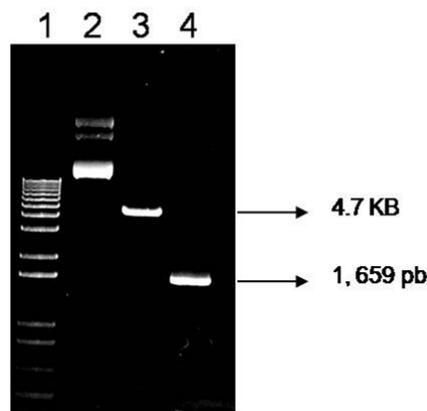


Figura 19. Amplificación del Fragmento *LYT1s+n* por PCR y Digestión de su Producto de PCR y Digestión de pEGFP-N1. Gel de agarosa al 1% donde se corrió en el carril 1.- Marcador de peso molecular 1 Kb, carril 2.- ADN del vector pEGFP-N1 sin digerir, carril 3.- ADN del vector pEGFP-N1 digerido con las enzimas *EcoRI* y *KpnI* (4.7 Kb) y carril 4.- Producto de PCR de *LYT1s+n* digerido con las enzimas *EcoRI* y *KpnI* (1,659 pb).

1.2 Amplificación del Fragmento *LYT1s* por PCR.

A fin de evitar que se obtengan los dos productos de *LYT1* (con y sin contener la secuencia señal amino-terminal) en los parásitos transfectados, amplificamos la secuencia *LYT1s* a la cual se le incorporó una mutación conservativa (C por G) del segundo codón de inicio de la traducción (ATG +85), como se describió en materiales y métodos.

Para ello, realizamos una primera reacción de PCR utilizando un oligo sentido LYT-13 S (**Tabla 4**), el cual contiene la mutación (C por G) en su secuencia, y el oligo LYT-17 AS como oligo antisentido. El producto de PCR se analizó en un gel de agarosa al 1% en donde se observó un producto de peso molecular aproximado de 1,575 pb (**Figura 20, carril 1**). El producto de PCR fue entonces empleado como templado para realizar una segunda reacción de PCR, utilizando ahora como oligo sentido LYT-14 S (**Tabla 4**), el cual contiene la secuencia de *LYT1* a partir del primer ATG de la posición +1, y parte de la secuencia de *LYT1* contenida en el oligo LYT-13 S, utilizada para el acoplamiento del *primer*, y el oligo LYT-17 AS como antisentido. De este modo, se amplificó *LYT1s* a partir del primer codón de inicio de la traducción y con la mutación en el segundo codón de inicio de la traducción (ATC). El producto anterior se analizó en un gel de agarosa al 1%, obteniéndose una banda de 1,659 pb aproximadamente (**Figura 21, carril 2**). El segundo producto de PCR obtenido, y el ADN del vector pEGFP-N1, fueron digeridos con las enzimas de restricción *HindIII* y *KpnI*, para linearizar el vector y favorecer los extremos cohesivos para la clonación posterior (**Figura 21, carril 2 y 3**). Los resultados anteriores mostraron que, efectivamente, se obtuvo el producto de PCR del peso molecular esperado y la digestión completa del vector.

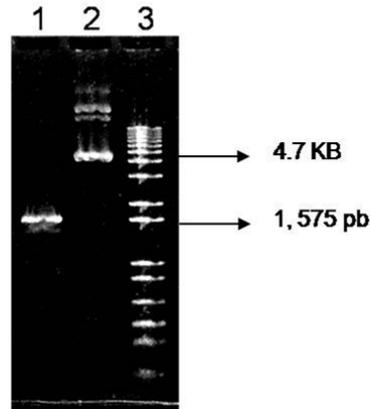


Figura 20. Amplificación del Primer Producto de PCR del Fragmento *LYT1s*. Gel de agarosa al 1% donde se observa en el carril 1.- ADN del producto del primer PCR (1,575 pb) conteniendo la mutación puntual, carril 2.- ADN del vector pEGFP-N1 y carril 3.- Marcador de peso molecular 1 Kb.

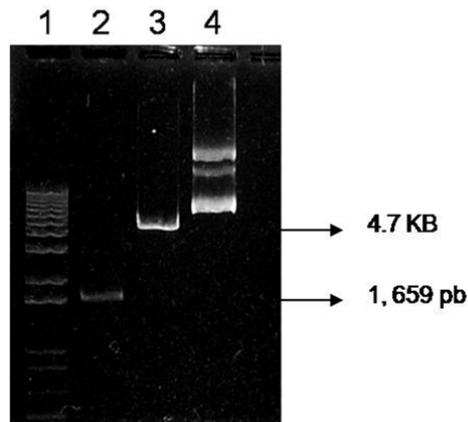


Figura 21. Amplificación del Fragmento *LYT1s* por PCR y Digestión de su Producto de PCR y Digestión de pEGFP-N1. Gel de agarosa al 1% donde se observa en el carril 1.- Marcador de peso molecular 1 Kb, carril 2.- ADN del producto del segundo PCR (1,659 pb) digerido con las enzimas *HindIII* y *KpnI*, carril 3.- ADN del vector pEGFP-N1 digerido con las enzimas *HindIII* y *KpnI* (4.7Kb) y carril 4.- ADN del vector pEGFP-N1 sin digerir.

1.3 Amplificación del Fragmento *LYT1n* por PCR.

La secuencia de *LYT1n* fue amplificada por PCR a partir del segundo codón de inicio de la traducción (ATG +85), por lo que no contiene la secuencia señal amino-terminal, pero si la secuencia con localización nuclear. El producto de PCR se corrió y analizó en un gel de agarosa como se describe en materiales y métodos. Como se observa en la **Figura 22, carril 4**, se obtuvo una banda de peso molecular aproximado de 1,575 pb. Posteriormente el producto de PCR, así como el ADN del vector pEGFP-N1 (4.7 Kb), fueron digeridos con las enzimas de restricción *HindIII* y *KpnI*, para linearizar al vector y favorecer los extremos cohesivos, dando como resultado una banda de aproximadamente 1.6 Kb y otra de 4.7 Kb respectivamente (**Figura 22, carril 3 y 4**). Estos resultados indicaron que, efectivamente, se obtuvo el producto de PCR del peso molecular esperado y la digestión completa del vector.

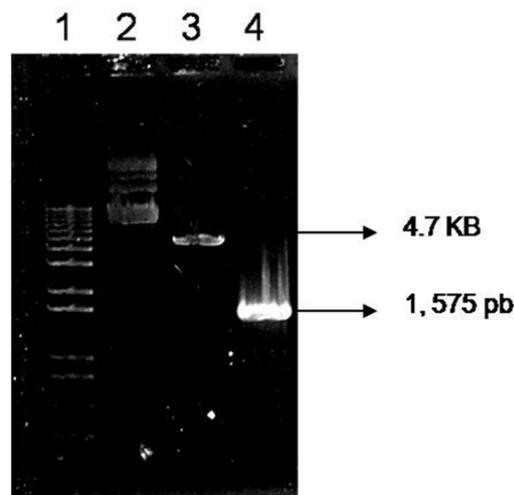


Figura 22. Amplificación de *LYT1n* por PCR y Digestión de su Producto de PCR y Digestión de pEGFP-N1. Gel de agarosa al 1% donde se observa en el carril 1.- Marcador de peso molecular 1 Kb, carril 2.- ADN del vector pEGFP-N1 sin digerir, carril 3.- ADN del vector pEGFP-N1 digerido con las enzimas *HindIII* y *KpnI* (4.7 Kb), y carril 4.- Producto de PCR de *LYT1n* digerido con las enzimas *HindIII* y *KpnI* (1,575 pb).

1.4 Construcción del Vector pEGFP-N1-LYT1(s+n, s y n).

Los productos de PCR *LYT1*s+n, *LYT1*s y *LYT1*n obtenidos, se ligaron al vector comercial pEGFP-N1 como se describe en materiales y métodos. Una vez realizada la ligación y obtenida la construcción del vector pEGFP-N1 -LYT1 (s+n, s y n), se procedió a transformar células calcio competentes *E. coli* DH5 α . De las colonias resistentes a ampicilina, conteniendo el vector que confiere esta resistencia, se seleccionaron algunas colonias de cada una de las construcciones para la extracción de ADN de los plámidos por STET, como se mencionó anteriormente. Para verificar si las colonias resistentes a ampicilina obtenidas efectivamente contenían el inserto de interés, se analizó su patrón de restricción, digiriendo con las enzimas correspondientes (*EcoRI/NotI* o *HindIII/NotI*) para liberar la secuencia de *LYT1*(s+n, s y n)-EGFP, como se observa en la **Figura 23, carriles 4, 10, 14 y 17** y en la **Figura 24, carriles 3, 4 y 5**, donde se aprecian dos bandas: una de 3,980 pb, correspondiente al vector pEGFP-N1 linearizado y la otra de aproximadamente 2,379 pb (*LYT1*s+n-EGFP y *LYT1*s-EGFP) o de 2,295 pb (*LYT1*n-EGFP), que corresponden al inserto. Estos resultados indicaron que efectivamente se obtuvieron las construcciones deseadas.

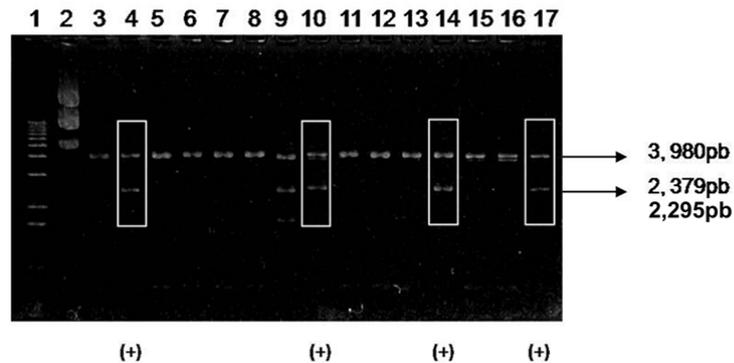


Figura 23. Análisis de Restricción del ADN de pEGFP-N1-LYT1(s+n, s y n).

Gel de agarosa al 1% mostrando los resultados del análisis de restricción, con el ADN de las colonias positivas marcados con recuadros blancos, donde se aprecian dos bandas: una de 3,980 pb, correspondiente al vector pEGFP-N1 y la otra, de aproximadamente 2,379 pb (*LYT1*s+n-EGFP y *LYT1*s-EGFP) o de 2,295 pb (*LYT1*n-EGFP), que corresponden a los insertos.

De las tres construcciones se analizaron varias colonias resistentes a ampicilina, encontrándose una eficiencia de clonación del 23.5%.

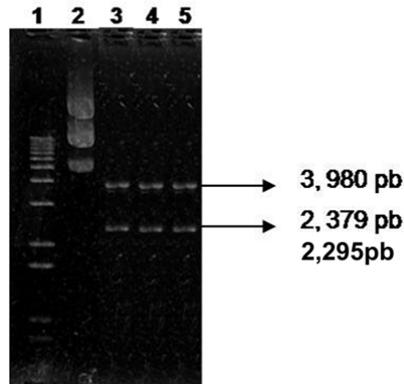


Figura 24. Análisis del Mapa de Restricción del vector pEGFP-N1-LYT1. Gel de agarosa al 1%. Carril 1.- Marcador de peso molecular 1 Kb, carril 2.- ADN del vector pEGFPN1 (6,359 pb), carril 3.- ADN de pEGFP-N1-LYT1s+n digerido con *EcoRI/NotI* (3,980 pb y 2,379), carril 4.- ADN de pEGFP-N1-LYT1s digerido con las enzimas *HindIII/NotI* (3,980 y 2,379 pb), carril 5.- ADN de pEGFP-N1-LYT1n digerido con las enzimas *HindIII/NotI* (3,980 y 2,295 pb).

1.5 Subclonación de los Fragmentos LYT1(s+n, s y n)-EGFP en el Vector pTREXn.

Para poder observar en el parásito la localización de *LYT1* fusionada a la proteína verde fluorescente fue necesario subclonar el inserto LYT1-EGFP en el vector de expresión de *T. cruzi* pTREXn (Vázquez, 1999), el cual dirige la expresión del gen exógeno bajo un promotor homólogo ribosomal y permite la selección estable de los parásitos transfectados con G418. Una vez que la secuencia de *LYT1*, en sus tres diferentes variantes, fue fusionada a la secuencia que codifica para la proteína verde fluorescente (EGFP) en las construcciones pEGFP-N1-LYT1 (s+n, s y n), se realizó la digestión con las enzimas de restricción correspondientes (*EcoRI/NotI* y *HindIII/NotI*) para liberar al inserto (*LYT1*s, s y n -EGFP) como se describe en materiales y métodos.

Se digirió y purificó tanto el ADN del inserto *LYT1 (s+n, s y n) -EGFP* (2,379 pb) como el ADN del vector pTREXn (6,342 pb), como se muestra en la **Figura 25, carril 2, 3, 4, 5 y 6** respectivamente. Posterior a la ligación del inserto en el vector, se transformaron bacterias DH5 α y se realizó la comprobación del ADN de las clonas positivas por STET y su análisis con enzimas de restricción, del mismo modo que se describe anteriormente para las construcciones pEGFP-N1-LYT1 (**Figura 26, carril 4, 7 y 10**). Estos resultados indicaron que efectivamente se obtuvo el inserto *LYT1 (s+n, s, n)-EGFP* del peso molecular esperado, siendo la subclonación en el vector de expresión pTREXn exitosa.

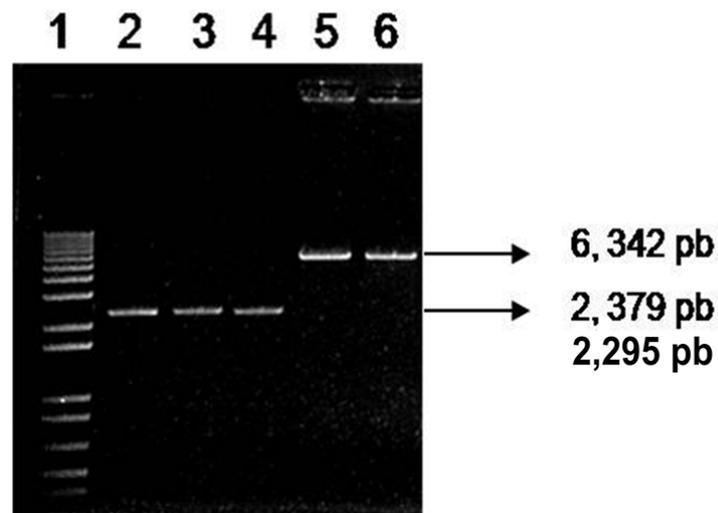


Figura 25. Digestión y Purificación del ADN del Inserto *LYT1(s+n, s y n)-EGFP* y del Vector pTREXn. Gel de agarosa al 1% donde se observa en el carril 1.- Marcador de peso molecular 1Kb, carril 2.- ADN del inserto *LYT1s+n-EGFP* digerido con *EcoRI/NotI* (2,379 pb), carril 3.- ADN del inserto *LYT1s-EGFP* digerido con las enzimas *HindIII/NotI* (2,379 pb), carril 4.- ADN del inserto *LYT1n-EGFP* digerido con las enzimas *HindIII/NotI* (2,295 pb), carril 5.- ADN del vector pTREXn digerido con las enzimas *HindI/NotI* carril 6.- ADN del vector pTREXn digerido con las enzimas *EcoRI/NotI* (6,342 pb).

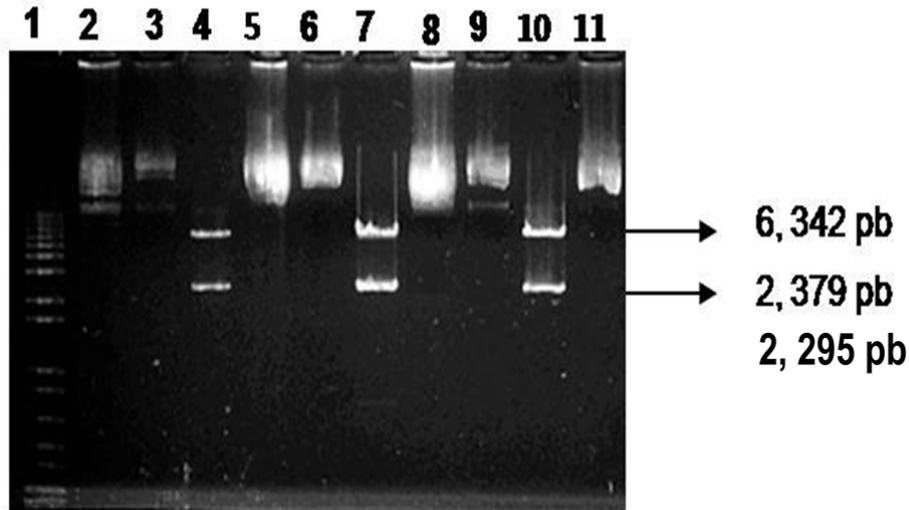


Figura 26. Análisis del Mapa de Restricción de pTREXn-LYT1(s+n, s y n)-EGFP. Gel de agarosa al 1% donde se observa en el carril 1.- Marcador de peso molecular 1 Kb, carril 2.- ADN del plásmido pTREXn-LYT1s+n-EGFP, carril 3.- ADN del plásmido pTREXn-LYT1s+n-EGFP dilución 1:10, carril 4.- ADN del plásmido pTREXn-LYT1s+n-EGFP digerido con *EcoRI/NotI*, observándose dos bandas una del plásmido pTREXn (6,342 pb) y otra de correspondiente al inserto *LYT1s+n-EGFP* (2,379 pb), carril 5.- ADN del plásmido pTREXn-LYT1s-EGFP, carril 6.- ADN del plásmido pTREXn-LYT1s-EGFP dilución 1:10, carril 7.- ADN del plásmido pTREXn-LYT1s-EGFP digerido con las enzimas *HindIII/NotI*, mostrando dos bandas una del plásmido pTREXn (6,342 pb) y otra de correspondiente al inserto *LYT1s-EGFP* (2,379 pb), carril 8.- ADN del plásmido pTREXn-LYT1n-EGFP, carril 9.- ADN del plásmido pTREXn-LYT1n-EGFP dilución 1:10, carril 10.- ADN del plásmido pTREXn-LYT1n-EGFP digerido con las enzimas *HindIII/NotI*, carril 11.- ADN del plásmido pTREXn-EGFP dilución 1:10.

2. Secuenciación del ADN de pTREXn-LYT1(s+n, s y n)-EGFP.

A fin de verificar que la secuencia de los insertos fuera la correcta (*s+n*, *s* y *n*) (**Figura 27**), y que se encontraran en fase con el marco de lectura en la secuencia del gene que codifica para la proteína EGFP (**Figura 28**), se llevó a cabo la secuenciación automática de cada una de las construcciones obtenidas, como se especifica en materiales y métodos. En la **Figura 27** se muestran las tres diferentes secuencias de *LYT1*: **A) *LYT1s+n***: a partir del primer ATG en la posición +1 que contiene tanto la posible secuencia señal, como la posible secuencia con localización nuclear; **B) *LYT1s***: a partir del primer ATG y con una mutación en el segundo ATG cambiando G por C, y **C) *LYT1n***: a partir del segundo ATG de la posición +85 y por lo tanto conteniendo únicamente la posible secuencia con localización nuclear.

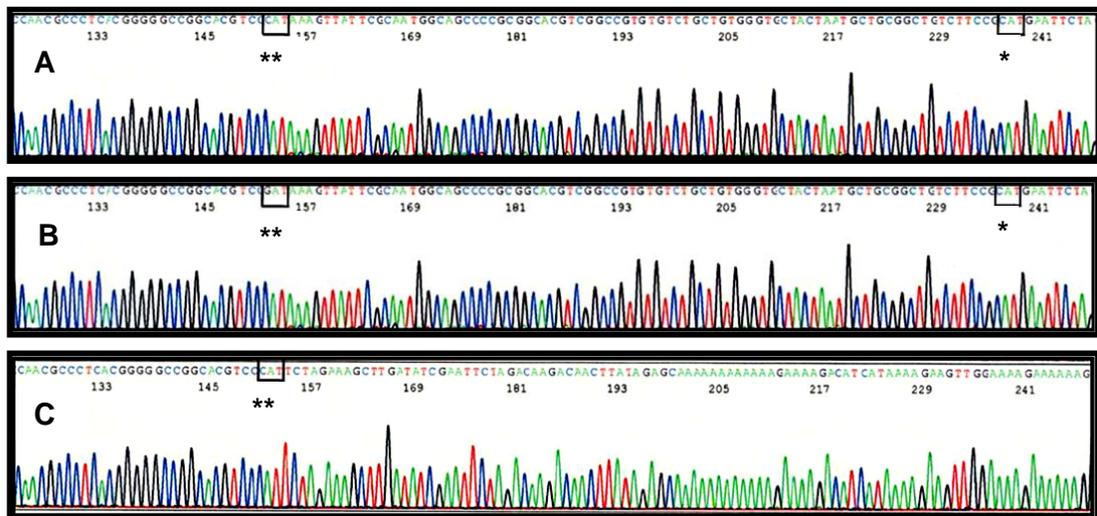


Figura 27. Secuenciación de las Construcciones pTREXn-LYT1(s+n, s y n)-EGFP Mostrando el Sitio de Inicio de la Traducción. Se muestra en los recuadros **A) *LYT1s+n*** * el primer ATG y el ** segundo ATG. **B) *LYT1s*** * el primer ATG con una mutación en ** el segundo ATG cambiando G por C. **C) *LYT1n*** ** el segundo ATG (ATG = CAT secuencia complementaria inversa por el uso de oligonucleótidos antisentido para la amplificación).

Los resultados obtenidos en la secuenciación muestran que las secuencias de *LYT1* (s+n, s y n) empleadas en las construcciones pTREXn-LYT1-EGFP son las correctas.

Con el propósito de verificar que la fusión de *LYT1-EGFP* se encuentra en el marco de lectura correcto, se realizó la secuenciación del ADN de la construcción pTREXn-LYT1-EGFP obtenido por cloruro de cesio (CICs), como se describió anteriormente en materiales y métodos. El resultado de la **Figura 28** muestra que, efectivamente, las fusiones de *LYT1*s+n, *LYT1*s y *LYT1*n se encuentran en fase con respecto a la secuencia *EGFP*, indicando que las construcciones obtenidas son correctas y pueden ser utilizadas para la transfección de parásitos.

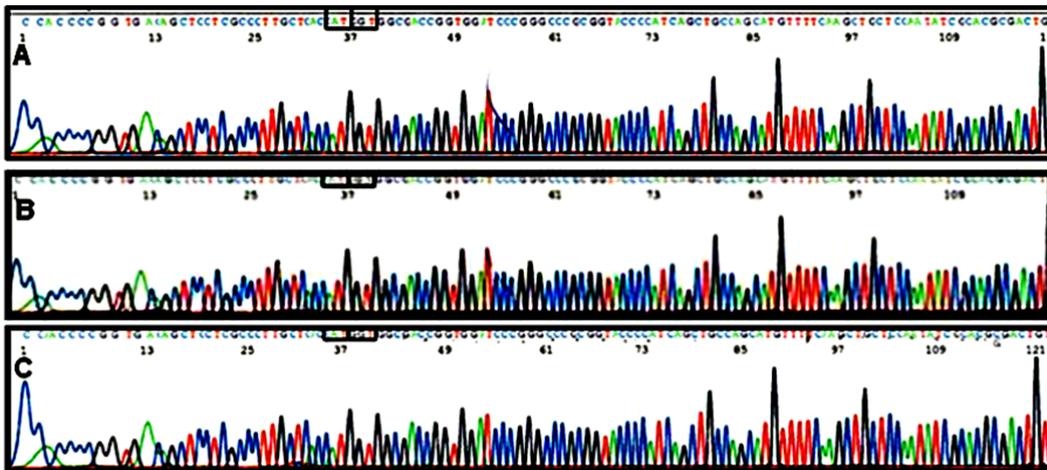


Figura 28. Secuenciación de las Construcciones pTREXn-LYT1(s+n, s y n)-EGFP Mostrando el Sitio de Fusión de LYT1 con EGFP. Se muestra la secuencia de las tres diferentes construcciones, donde se marca en los recuadros la fusión del último codón codificante de *LYT1*, seguido del codón de inicio de *EGFP* (ATG = CAT secuencia complementaria inversa por el uso de oligonucleótidos antisentido para la amplificación).

3. Análisis de la Expresión de las Proteínas Quiméricas LYT1(s+n, s y n)-EGFP en los Parásitos *Knock-in* por *Western blot*.

Para determinar la expresión exógena de cada una de las proteínas de fusión se obtuvieron, separaron y transfirieron extractos totales de cada línea de parásitos estables expresando LYT1-EGFP (s+n, s y n), con los cuales se realizaron ensayos de *western blot* con el anticuerpo α -GFP, como se describe en material y métodos. Se emplearon las líneas de parásitos EGFP y WT como control.

La **Figura 29** muestra el reconocimiento del anticuerpo en bandas con los pesos moleculares esperados de 26 kDa para los parásitos EGFP (**carril 1**) y aproximadamente 82 kDa y 86 kDa para LYT1s+n-EGFP (**carril 2**), LYT1s-EGFP (**carril 3**) y para LYT1n-EGFP (**carril 4**). Aún cuando se esperaba obtener dos bandas, una de 82 kDa para el producto de LYT1n y otra de 86 kDa para el producto de LYT1s, no fue posible separar ambas bandas, debido a la falta de resolución en el sistema. Como era de esperarse no hubo reconocimiento del anticuerpo en parásitos WT (dato no mostrado).

Estos resultados indicaron que se obtuvo un reconocimiento en bandas correspondientes a los pesos moleculares esperados tanto del control EGFP como de las diferentes proteínas quiméricas LYT1s+n-EGFP, LYT1s-EGFP y LYT1n-EGFP, lo que demostró su expresión exógena en los parásitos transfectados.

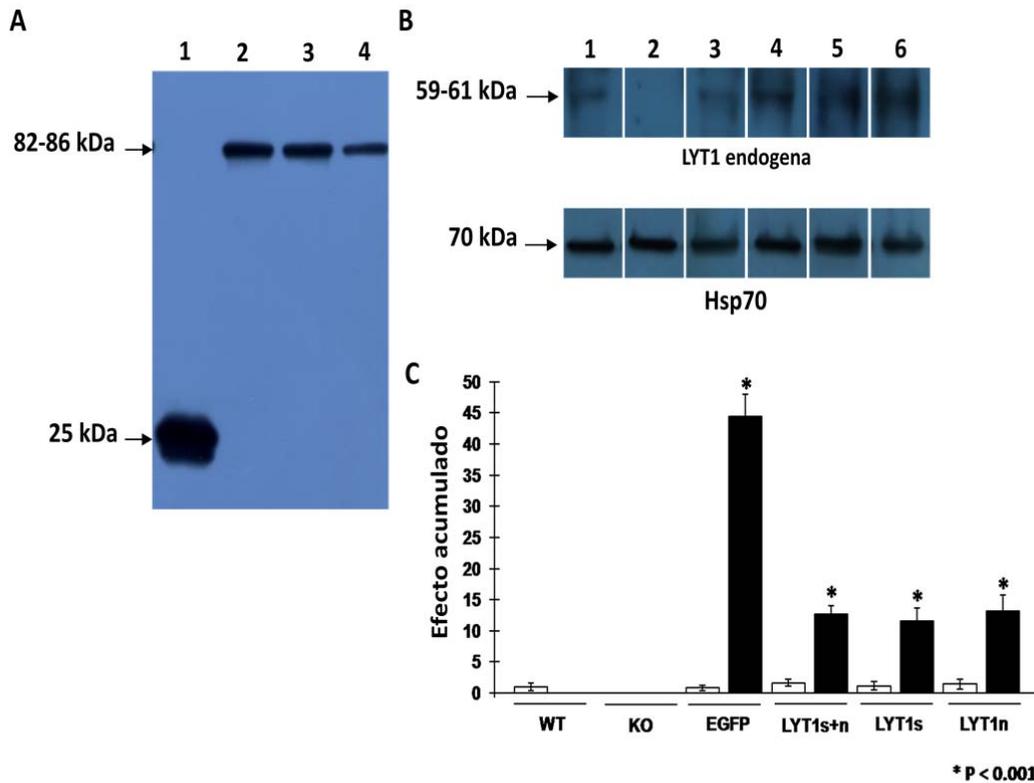


Figura 29. Análisis por Western blot de la Expresión de las Proteínas Quiméricas LYT1(s+n, s y n)-EGFP en los Parásitos *Knock-in*.

(A) Reconocimiento de las proteínas de fusión, con el anticuerpo α EGFP en condiciones desnaturalizantes. Carril 1.- Parásitos EGFP (26 kDa), Carril 2.- Parásitos LYT1s+n-EGFP (82 y 86 kDa), Carril 3.- Parásitos LYT1s-EGFP (86 kDa), Carril 4.- Parásitos LYT1n-EGFP (82 kDa). **(B)** Anticuerpo α -LYT1, reconoce la proteína endógena LYT1 de *T. cruzi* (59-61 KDa). Carril 1.- Parásitos WT, Carril 2.- Parásitos *Knock-out*, Carril 3.- Parásitos EGFP, Carril 4.- Parásitos LYT1s+n-EGFP, Carril 5.- Parásitos LYT1s-EGFP, Carril 6.- Parásitos LYT1n-EGFP. Se utilizó el anticuerpo α -Hsp70 (70 KDa) como control de carga. **(C)** Datos cuantitativos a partir de tres experimentos independientes del análisis de *Western blot*. Los niveles de las proteínas LYT1 endógena (barras vacías) y LYT1 exógena (barras rellenas) se cuantificaron en relación con los niveles de Hsp70, y se normalizaron con respecto a los parásitos WT, en los que se considera el nivel de LYT1 endógena como 1.

4. Localización de las Proteínas Quiméricas LYT1(s+n, s y n)-EGFP por Epifluorescencia.

Para determinar la localización de LYT1 (s+n, s y n)-EGFP en los parásitos, epimastigotes WT de la cepa CL-Brener fueron transfectados por electroporación con las diferentes construcciones de pTREXn-LYT1-EGFP (s+n, s y n). Como control se trasfectaron epimastigotes con pTREXn-EGFP utilizando las mismas condiciones. Los parásitos fluorescentes fueron crecidos en medio LIT, seleccionados con G418 (500 µg/ml) hasta obtener los transfectantes estables, posteriormente fueron procesados para su tinción con DAPI y observados al microscopio de fluorescencia como se describe anteriormente. La **Figura 30** muestra que los epimastigotes transfectados que expresan LYT1s+n-EGFP (**panel B**), tuvieron localizada la fluorescencia en vacuolas, núcleo, cinetoplasto, flagelo, reservosoma y ocasionalmente en membrana.

Los parásitos que expresan LYT1s-EGFP (**panel C**), presentaron la fluorescencia localizada en núcleo, cinetoplasto, flagelo, reservosoma, vacuolas y frecuentemente en membrana. Finalmente los que expresan LYT1n-EGFP (**panel D**), mostraron la fluorescencia localizada en núcleo, cinetoplasto, reservosoma y en algunas ocasiones en vesículas con un patrón diferente al observado en LYT1s+n. Como control se utilizaron epimastigotes transfectados con pTREXn-EGFP, los cuales muestran la localización de la fluorescencia a todo lo largo del cuerpo y flagelo del parásito (**panel A**). Estos resultados mostraron que los diferentes productos de LYT1 presentan una localización diferencial.

La **Figura 31** muestra la fluorescencia en verde de la proteína LYT1 endógena en epimastigotes WT, teñidos con un anticuerpo policlonal de ratón contra LYT1 y un anticuerpo secundario anti-ratón marcado con Alexa Fluor 488 (verde). La muestra también fue teñida con DAPI (azul) para visualizar el ADN nuclear y cinetoplasto.

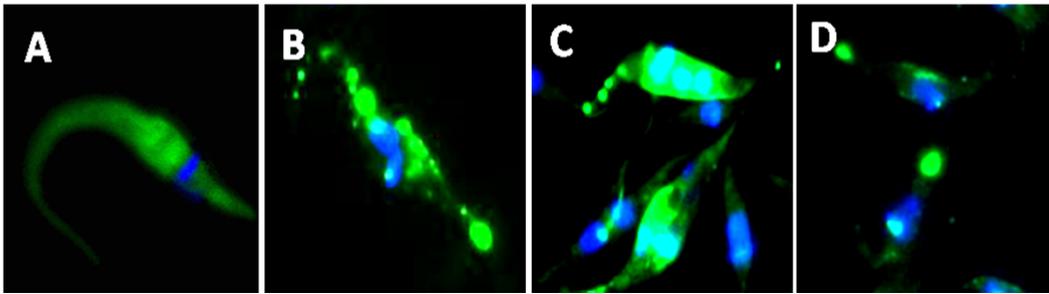


Figura 30. Análisis por Microscopía de Epifluorescencia de Epimastigotes Transfectados con pTREXn-LYT1-EGFP. A) Expresando EGFP, B) Expresando LYT+n-EGFP, C) Expresando LYTn-EGFP, D) Expresando LYTn-EGFP. Todas las muestras fueron contrastadas con DAPI (azul) para visualizar el ADN nuclear y cinetoplasto.

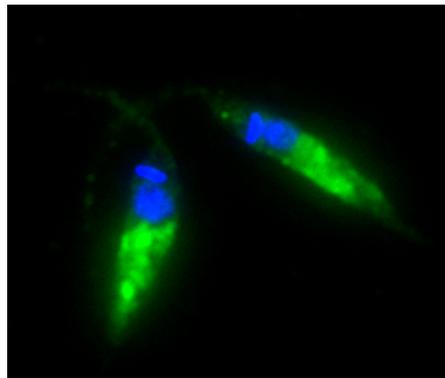


Figura 31. Análisis por Microscopía de Epifluorescencia para la Observación Indirecta de Proteínas Endógenas LYT1 por Medio de Anticuerpos Policlonales Contra LYT1.

5. Localización de las Proteínas Quiméricas LYT1(s+n, s y n)-EGFP por Microscopía Confocal.

El microscopio confocal, además de determinar la localización de la fluorescencia con una mayor resolución, proporciona datos importantes sobre la cercanía de la fluorescencia correspondiente a LYT1-EGFP con relación al núcleo y al cinetoplasto (DAPI), excitando ambos elementos mediante dos canales diferentes, separando la longitud de onda para cada uno y tomando imágenes por separado para después empalmarlas determinando así la colocalización de ambos elementos. Ya que en el análisis de fluorescencia anterior, es difícil asegurar que LYT1n se encuentra tanto en núcleo como en cinetoplasto, se utilizó el análisis por microscopía confocal para determinar la colocalización con dichos organelos.

La **Figura 32** muestra la fluorescencia en verde de LYT1 (s+n, s y n)-EGFP, la tinción con DAPI, el empalme de ambas; el empalme de la fluorescencia con DAPI y el campo claro; así como la colocalización de la fluorescencia con DAPI determinada por el aparato. En el caso de epimastigotes se observó la misma localización vista por microscopía de epifluorescencia (**Figura 30**), y se pudo determinar sin duda alguna que efectivamente LYT1 colocaliza en una región del núcleo y cinetoplasto. En tripomastigotes y amastigotes también se vió localizada LYT1 en una región de núcleo y cinetoplasto, así como en vesículas, sin observarse diferencias significativas entre las tres variantes de LYT1-EGFP (s+n, s y n).

6. Determinación del Porcentaje de Colocalización

Utilizando el programa LAS AF (*Leica Application Suite Advanced Fluorescence Lite*) 1.7.0 build 1240 *Leica microsystems*, para la captura de las imágenes, es posible realizar el análisis de colocalización de LYT1 en los diferentes estadios de desarrollo de *T. cruzi* expresando LYT1-EGFP (s+n, s y n) (**Figura 32**).

Con los resultados obtenidos de porcentaje de colocalización de LYT1 en núcleo y cinetoplasto de 20 parásitos, analizados al azar, se calculó y se graficó como se muestra en la **Tabla 9** y **Gáfica 1**. Los resultados muestran un mayor porcentaje de colocalización en los epimastigotes expresando LYTs+n-EGFP (24.7%) comparado con los parásitos expresando LYTn-EGFP (12.7%) y LYTs-EGFP (6.2%) (**Tabla 9**) (**Gráfica 1**).

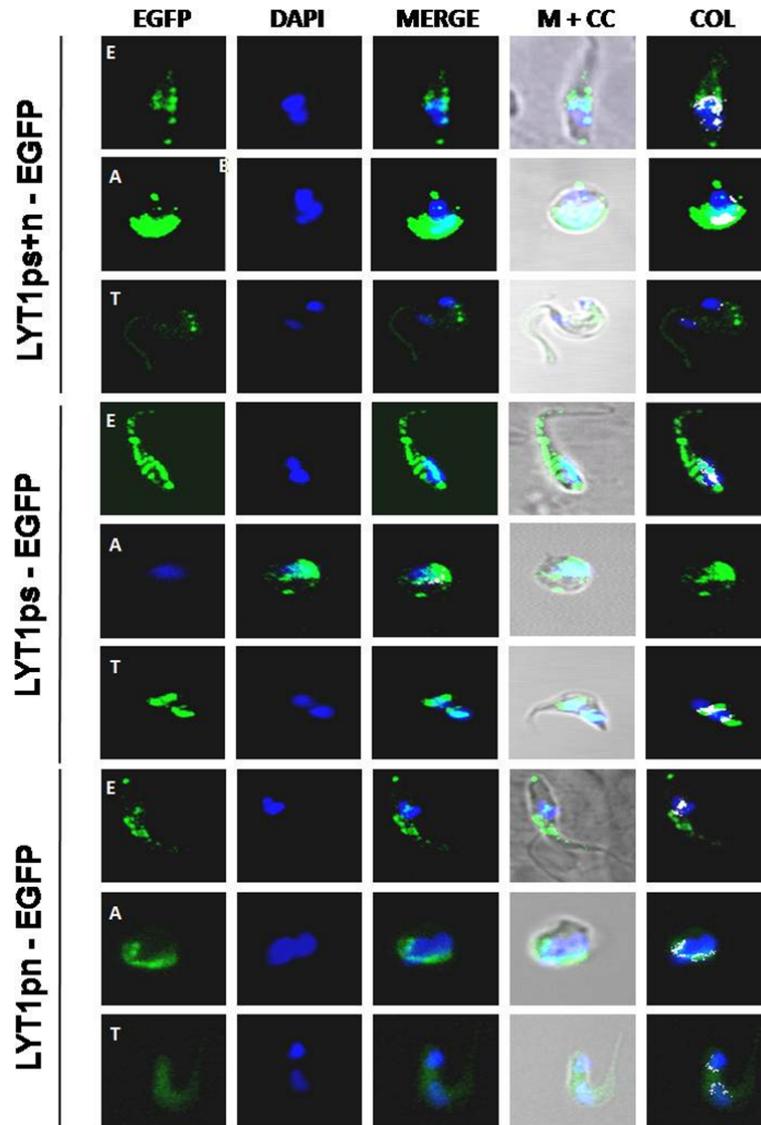


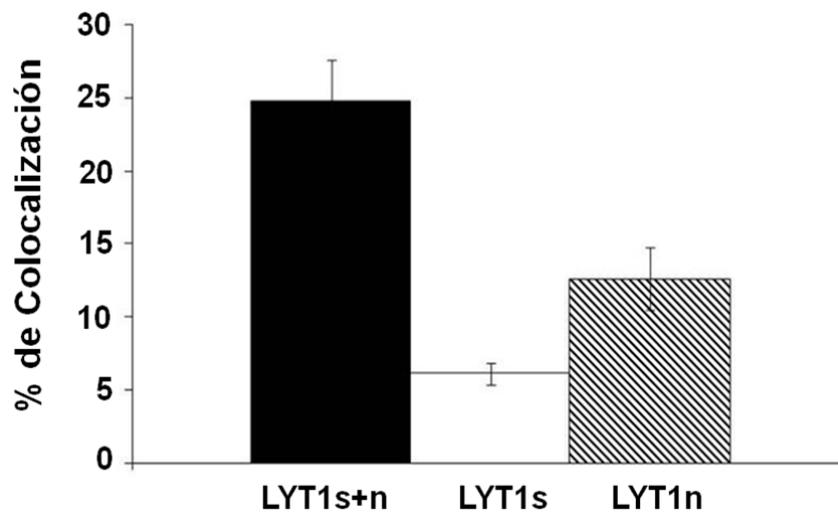
Figura 32. Análisis de la Colocalización por Microscopía Confocal. Parásitos expresando LYTs+n-EGFP, LYTs-EGFP y LYTn-EGFP en los estadios de epimastigote (E), amastigote (A) y tripomastigote (T).

Tabla 9. Promedio de los Porcentajes de Colocalización de LYT1 (s+n, s y n)-EGFP en Núcleo y Cinetoplasto en los Epimastigotes *Knock-in*

Parásito	% promedio
LYTs+n-EGFP	24.7
LYTs-EGFP	6.2
LYTn-EGFP	12.7

Gráfica 1.

Promedio de los Porcentajes de Colocalización de LYT1(s+n, s y n)-EGFP en Núcleo y Cinetoplasto de Epimastigotes *Knock-in*.



Los resultados nos revelan que existe una proporción de localización diferencial en núcleo y cinetoplasto de los diferentes productos de LYT1 en epimastigotes. También sugieren que en los parásitos expresando LYT1s+n-EGFP se encuentra aparentemente la combinatoria de los porcentajes de colocalización de los parásitos expresando LYT1s-EGFP y LYT1n-EGFP.

7. Curva de Crecimiento de los Parásitos *Knock-in*.

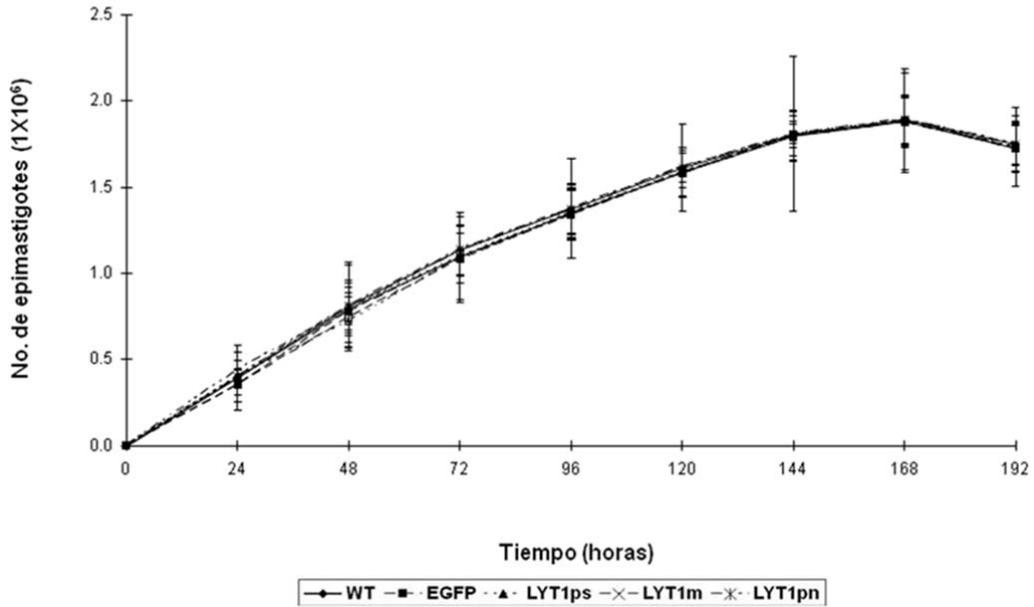
Para iniciar con la caracterización de los parásitos *knock-in* determinamos su curva de crecimiento en relación a los parásitos controles (EGFP y WT) en medio LIT, como se describe en material y métodos. Este análisis surgió del hecho de que las diferentes variantes presentaron un comportamiento diferente al de los parásitos controles a lo largo de su cultivo. Mientras que los epimastigotes control (EGFP y WT) presentaban un crecimiento homogéneo durante la fase logarítmica de crecimiento y formaban la pastilla de parásitos característica en el fondo del tubo en su fase estacionaria, las diferentes variedades de parásitos LYT1-EGFP (s+n, s y n) formaron la pastilla en el fondo del tubo desde los inicios (3-4 días) del cultivo en su fase logarítmica. Cuando se revisó la viabilidad de los mismos con la prueba de exclusión de azul de tripano pudimos determinar que estos eran viables y por lo tanto que su sedimentación no era resultado de la muerte de los parásitos. Por lo tanto se realizaron las curvas de crecimiento, tanto antes como después de agitar el cultivo y se realizó el conteo celular utilizando la prueba de exclusión de azul de tripano, como se describe en material y métodos.

Como se observa en la **Gráfica 2**, los parásitos expresando las tres diferentes variantes de LYT1-EGFP (s+n, s y n) tienen un crecimiento muy similar a los parásitos controles, cuando el conteo se realiza agitando el contenido del tubo. Sin embargo cuando el conteo se realizó antes de agitar el cultivo se observó que a partir del día 5 había una caída en la cantidad de parásitos en el sobrenadante de las variantes LYT1-EGFP (s+n, s y n) con respecto a los controles (**Gráfica 3**).

Estos resultados sugieren un posible defecto en la capacidad de movimiento de los parásitos transfectados con LYT1-EGFP (s+n, s y n), probablemente debido a la sobreexpresión de LYT1, por lo que decidimos analizar este fenotipo a continuación.

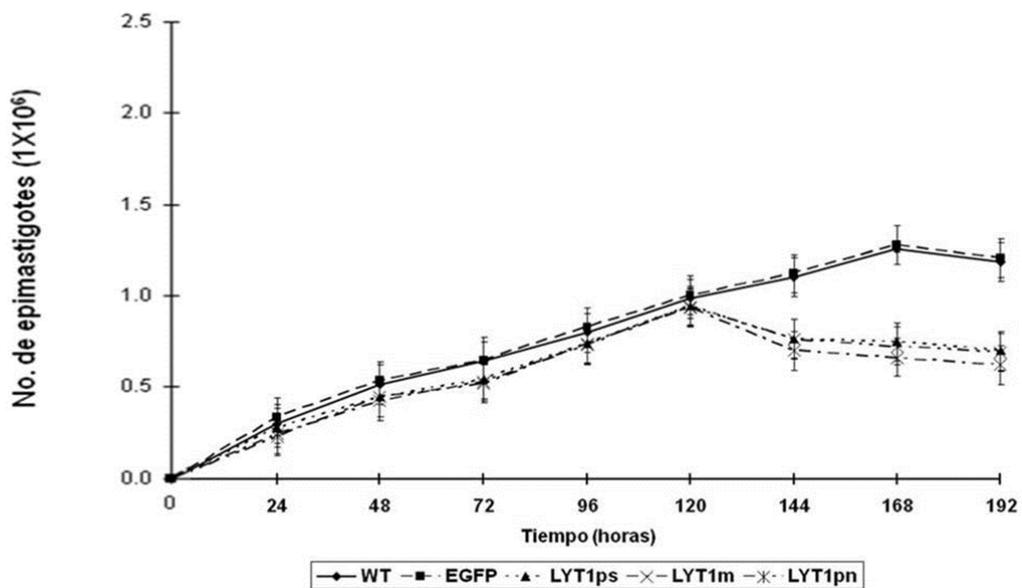
Gráfica 2.

Curva de Crecimiento de Epimastigotes de *T. cruzi* WT y Transfectados (Con Agitación)



Gráfica 3.

Curva de Crecimiento de Epimastigotes de *T. cruzi* WT y Transfectados (Sin agitar)



8. Determinación de la Motilidad de Epimastigotes WT y Transfectados.

Debido a que los resultados anteriores sugirieron que los parásitos expresando LYT1s+n-EGFP, LYT1s-EGFP y LYT1n-EGFP presentaban un posible defecto en su motilidad, se analizaron al microscopio de fluorescencia, utilizando la técnica de gota suspendida, comparándolos con los epimastigotes control (WT y EGFP), y los parásitos *knock-out* (L-14 y L-16). Cabe mencionar que el análisis de motilidad se realizó con el programa *Image Pro plus*, utilizando la fluorescencia de los parásitos *knock-in* (EGFP, LYT1s+n-EGFP, LYT1s-EGFP y LYT1n-EGFP) como marca para poder hacer el seguimiento del movimiento. Los parásitos no transfectados (WT y *knock-out*) fueron marcados con el fluoróforo CFSE, como se describe en material y métodos, para poder analizar su movimiento. Los resultados mostraron que los parásitos LYT1s+n y LYT1s revelaron una disminución en su capacidad de movimiento, al compararlos con los parásitos control (WT y EGFP). En el caso de los parásitos LYT1n no se observó un cambio tan notorio como en los parásitos LYT1s+n y LYT1s. Para determinar este resultado a nivel cuantitativo se realizó la captura y análisis del movimiento de los epimastigotes por videomicroscopía en el microscopio confocal, como se describe en material y métodos.

La **Figura 33** muestra que la motilidad de los parásitos expresando la proteína LYT1(s+n y s)-EGFP esta notablemente disminuída con respecto a los parásitos control (WT, EGFP) y los parásitos *knock-out* de LYT1(L-14, sencillos y L-16, nullos). Se observó una disminución en el promedio de la distancia recorrida del 84% en parásitos LYT1s+n-EGFP **(B)** y 78% en parásitos LYT1s-EGFP **(C)** con respecto a los parásitos que expresan únicamente la proteína EGFP **(A)** (**Tabla 10**) (**Gráfica 4**). Aún cuando observamos una tendencia de disminución del movimiento en los parásitos LYT1n-EGFP **(D)** comparado con los parásitos control, el análisis estadístico usando la prueba *t* student con una $p \leq 0.001$ indicó que no hay una diferencia significativa.

Los resultados obtenidos sugieren que la expresión exógena de la proteína de fusión LYT1(s+n y s)-EGFP tiene un efecto deletéreo en la motilidad de los parásitos.

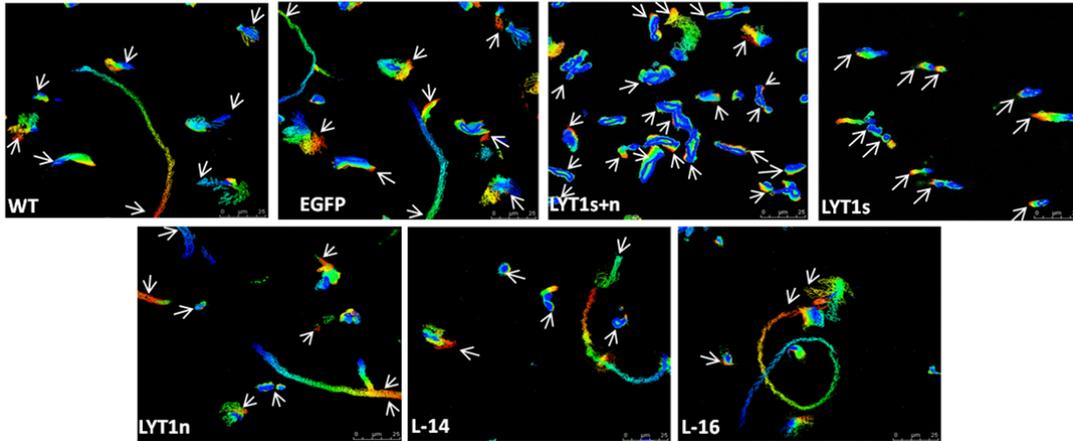


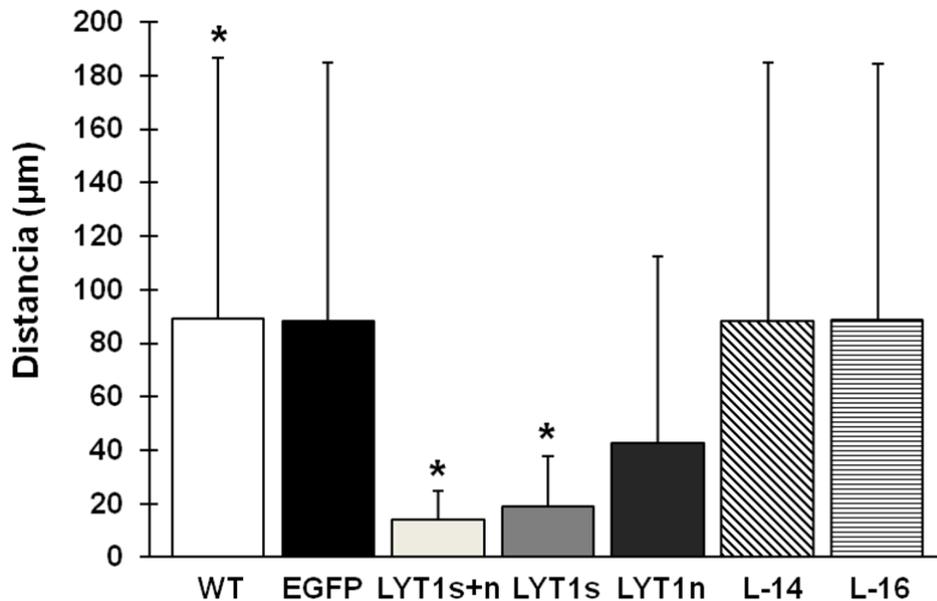
Figura 33. Análisis de la Trayectoria y Distancia Recorrida por Epimastigotes *Knock-in* Mediante Videomicroscopía. Parásitos control: WT y EGFP. Parásitos *knock-in*: expresando LYT1s+n-EGFP, LYT1s-EGFP, LYT1n-EGFP. Parásitos *knock-out*: L-14 (sencillo) y L-16 (nulo).

Tabla 10. Promedio de la Distancia Recorrida y Porcentaje de Reducción de la Motilidad de Parásitos *Knock-in*.

Parásitos	Distancia (μm)	Disminución
WT	89	-----
EGFP	88	-----
LYT1s+n	14	84%
LYT1s	19	78%
LYT1n	43	49%
L-14	87	-----
L-16	88	-----

Gráfica 4.

Promedio de la Distancia Recorrida por los Parásitos WT, EGFP, LYT1(s+n, s y n)-EGFP y Parásitos *Knock-out* (L-14 y L-16)



9. Análisis Cuantitativo del Movimiento en Parásitos Transfectados.

Una vez analizada la trayectoria del movimiento así como la distancia recorrida de los parásitos expresando WT, EGFP, LYT1(s+n, s y n)-EGFP y *knock-out* (L-14 y L-16), se cuantificó la cantidad de parásitos (de un total de 100) que recorren determinados rangos de distancia (0-20, 21-40, 41-60, 61-80, 81-100, 101-400 μm) durante 10 segundos, como se describió en material y métodos.

La **Tabla 11** y la **Gráfica 5** muestran que los parásitos control (WT y EGFP) recorren desde distancias cortas, por debajo de 20 μm, hasta distancias largas, de hasta 400 μm, mostrando además que el mayor porcentaje de parásitos recorre las distancias más largas. Por el contrario, los parásitos que expresan la proteína de fusión LYT1s+n-EGFP y LYT1s-EGFP muestran una notoria reducción en la distancia recorrida y un comportamiento distinto entre ellos.

En el caso de los parásitos LYT1s+n, éstos no fueron capaces de recorrer distancias mayores a los 40 μm , mientras que los parásitos LYT1s lo hicieron hasta los 100 μm .

Finalmente, los parásitos LYT1n recorrieron distancias de hasta 400 μm , pero el número de parásitos para este rango fue menor (9%) al observado en los parásitos control WT (30%) y EGFP (32%). Además, el mayor porcentaje de parásitos expresando LYT1(s+n, s y n)-EGFP se concentró por debajo de los 20 μm (de 55 a 75 parásitos) en comparación con los parásitos WT y EGFP (aproximadamente 20 parásitos). Los parásitos *knock-out* (L-14 y L-16) se comportaron de manera similar a los parásitos control.

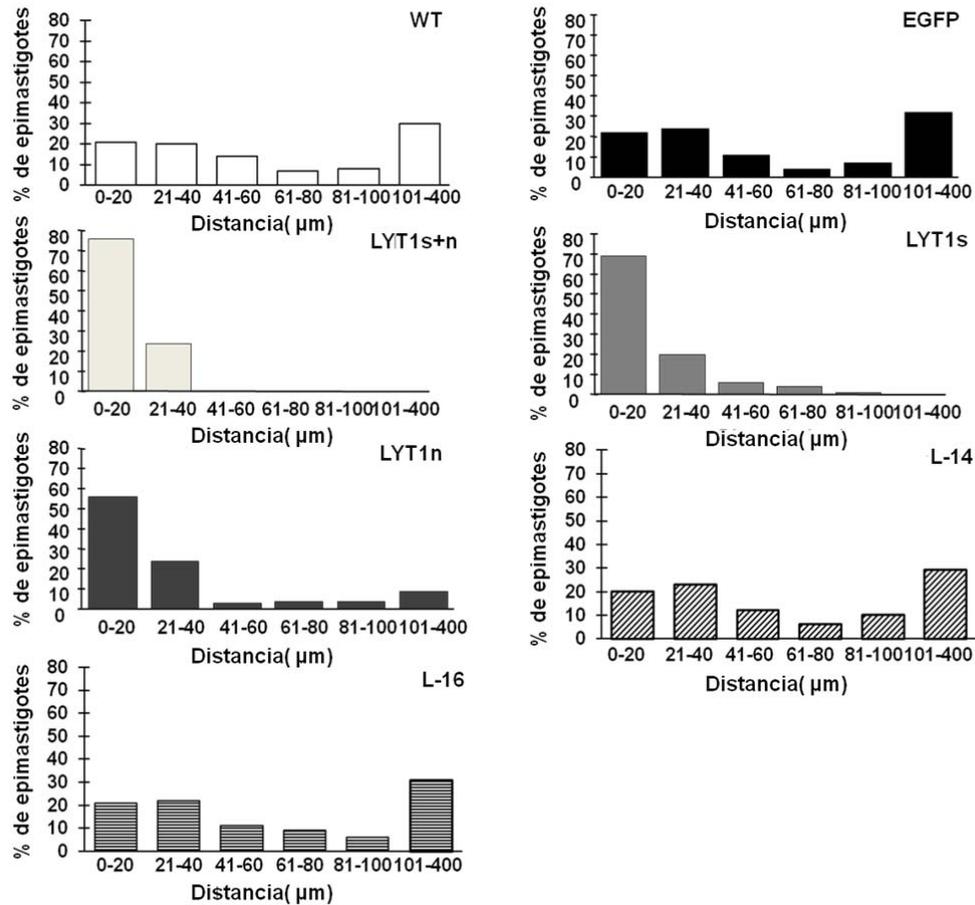
Estos resultados sugieren que la expresión exógena de la proteína completa de LYT1 esta afectando, de una manera aparentemente indirecta, la capacidad mótil de los parásitos.

Tabla 11. Porcentaje de Parásitos por Rangos de Distancia Recorrida en Parásitos WT, Parásitos Expresando EGFP, LYT1(s+n, s y n)-EGFP y Parásitos *Knock-out* de LYT1.

	0-20 μ	21-40 μ	41-60 μ	61-80 μ	81-100 μ	101-400 μ	Total
WT	21	20	14	7	8	30	100
EGFP	22	24	11	4	7	32	100
LYT1s+n	76	24	0	0	0	0	100
LYT1s	69	20	6	4	1	0	100
LYT1n	56	24	3	4	4	9	100
L-14	20	22	11	7	10	30	100
L-16	21	22	11	9	6	31	100

Gráfica 5.

Porcentaje de Parásitos por Rangos de Distancia Recorrida en Epimastigotes WT, Parásitos Expresando EGFP, LYT1(s+n, s y n)-EGFP y Parásitos *Knock-out* de LYT1



Una vez analizada la disminución en la capacidad motora de los parásitos, se procedió a medir el largo del flagelo de los parásitos control y muestra con el propósito de determinar si la disminución del movimiento de los parásitos se relaciona con algún defecto en el crecimiento del flagelo. La **Tabla 12** y la **Gráfica 6** muestran que los parásitos que expresan la proteína de fusión en sus tres variantes (s+n, s y n) no presentan diferencias en la longitud del flagelo, ni entre ellos, ni comparados con los parásitos control (WT y EGFP) y tampoco con respecto a los parásitos *knock-out* (L-14 y L-16).

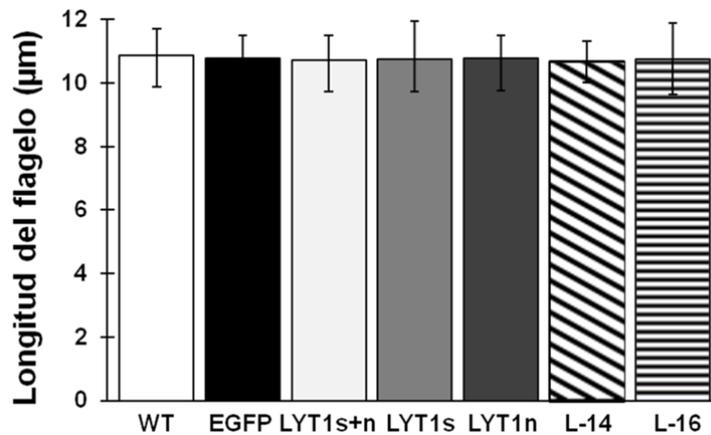
Estos resultados muestran que el tamaño o el desarrollo del flagelo, en las diferentes líneas de parásitos, no están relacionados con la disminución de la capacidad mótil que ocasiona la sobre-expresión de la proteína de fusión LYT1- (s+n, s y n)-EGFP.

Tabla 12. Promedio del Largo del Flagelo de Parásitos WT, Parásitos Expresando EGFP, LYT1(s+n, s y n)-EGFP y Parásitos *Knock-out* de LYT1.

PARÁSITOS	PROMEDIO DE LA LONGITUD DEL FLAGELO
WT	10.87 ± 0.85
EGFP	10.78 ± 0.72
LYT1s+n	10.72 ± 0.77
LYT1s	10.74 ± 1.2
LYT1n	10.77 ± 0.72
L-14	10.7 ± 0.62
L-16	10.75 ± 1.14

Gráfica 6.

Promedio de la Longitud del Flagelo de Parásitos WT, EGFP, LYT1(s+n, s y n)-EGFP y Parásitos *Knock-out* de LYT1



10. Determinación de la Motilidad de Tripomastigotes WT y Transfectados.

Ya que se observó un defecto en la motilidad de los epimastigotes, fué necesario realizar el mismo estudio en tripomastigotes, debido a que éste también es un estadio mótil. Para ello, analizamos tanto los parásitos control (WT y EGFP) como *knock-in* de LYT1 por videomicroscopía, como se describe en material y métodos. Los resultados no mostraron diferencias significativas en el movimiento, trayectoria y distancia de los parásitos LYT1s+n, LYT1s y LYT1n con respecto a los controles (datos no mostrados). Estos resultados indican que el efecto deletéreo en la motilidad de los parásitos como resultado de la expresión exógena de LYT1 es estadio específico.

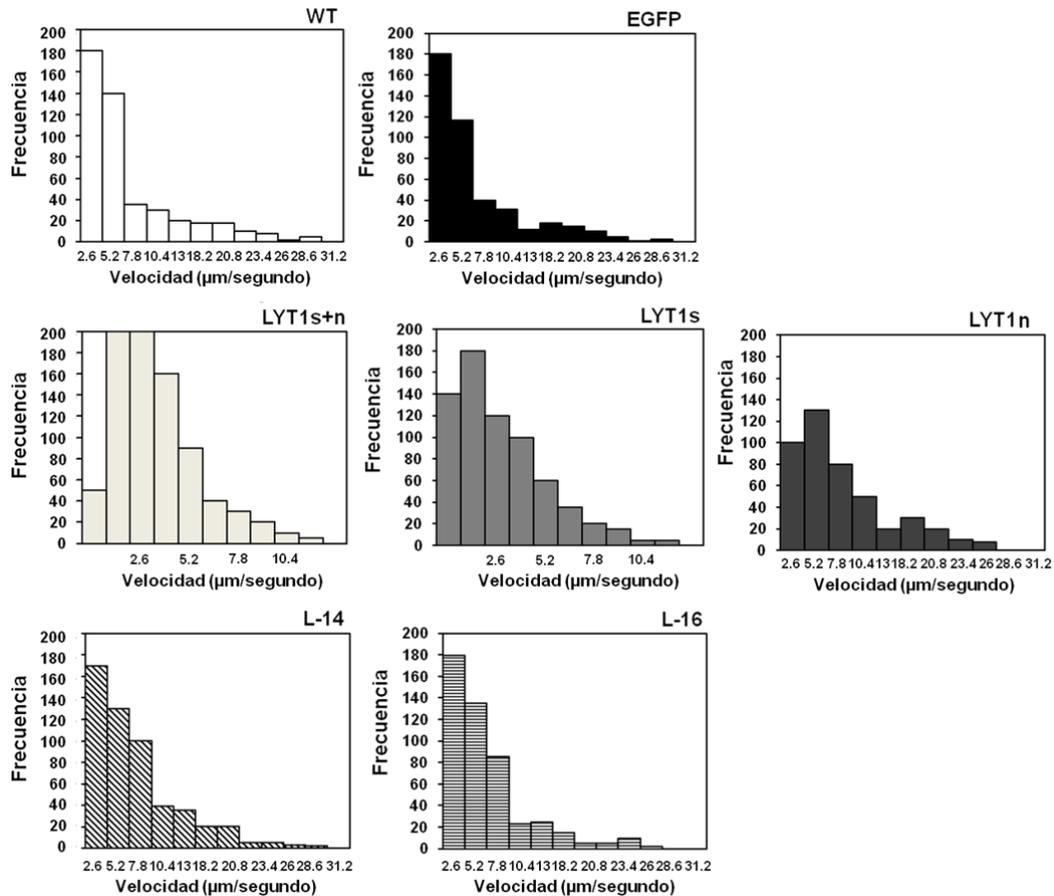
11. Análisis Vectorial del Movimiento.

11.1 Velocidad.

Los resultados de la **Grafica 7** muestran un histograma de un parásito representativo del promedio de 20 parásitos analizados.

Los parásitos LYT1s+n (LYT1s+n-EGFP) y LYT1s (LYT1s-EGFP) presentan una velocidad promedio menor a la observada en los parásitos control (WT y EGFP). Mientras que los parásitos EGFP alcanzan velocidades aproximadas de hasta 31.2 $\mu\text{m}/\text{segundo}$. Los parásitos LYT1s+n y LYT1s únicamente alcanzan velocidades entre 7.8 y 10.4 $\mu\text{m}/\text{segundo}$. Por otro lado en el caso de los parásitos LYT1n no se observaron diferencias significativas con respecto a los parásitos control, observándose velocidades promedio de 26 $\mu\text{m}/\text{segundo}$ y de 31.2 $\mu\text{m}/\text{segundo}$ para los parásitos que expresan EGFP. Los parásitos *knock-out* (L-14 y L-16) alcanzan velocidades aproximadas similares a los parásitos control (WT y EGFP) de hasta 31.2 $\mu\text{m}/\text{segundo}$.

Gráfica 7.
Histogramas de Velocidad

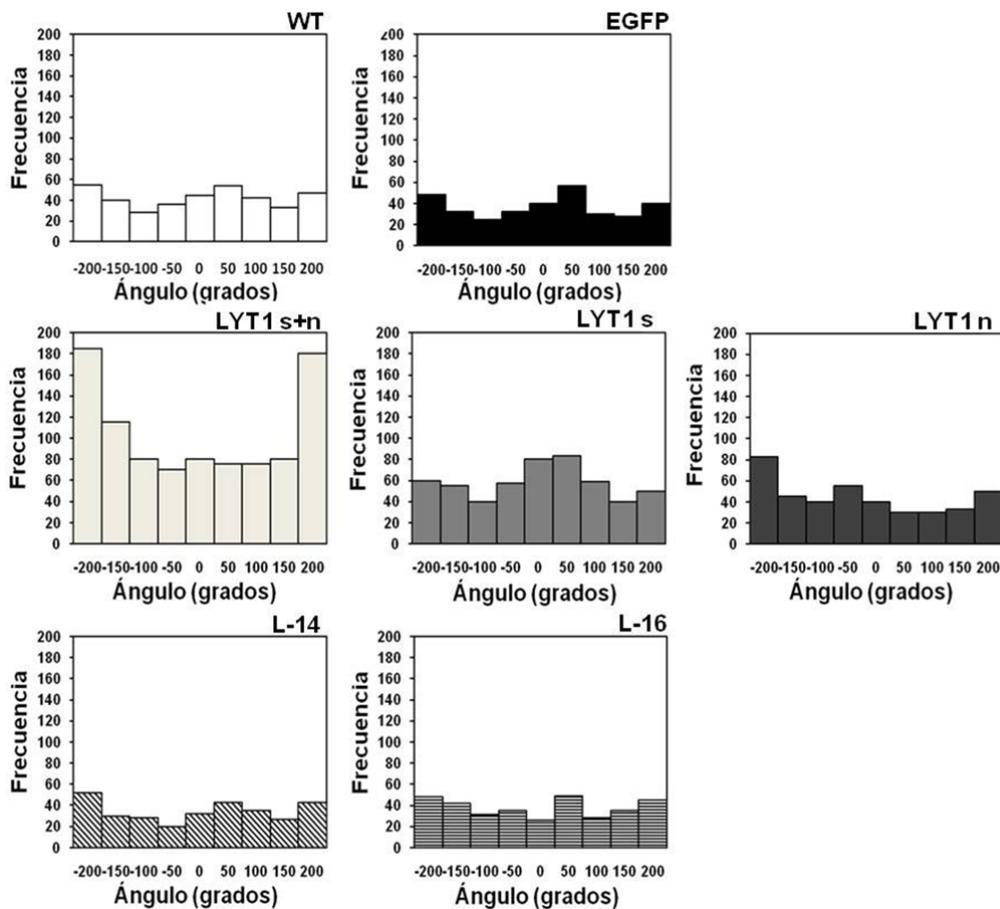


11.2 Cambio Angular de Dirección.

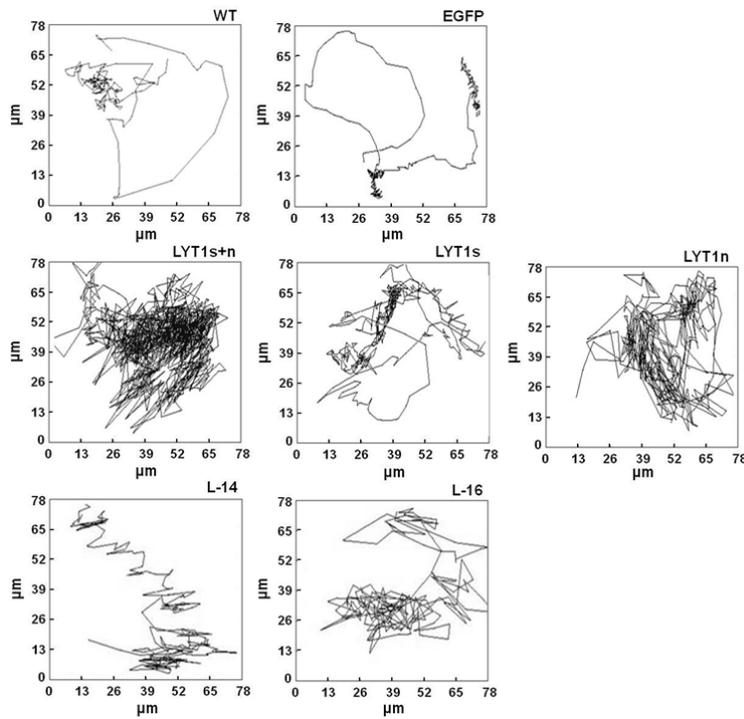
En la **Grafica 8**, que muestra un histograma de un parásito representativo del promedio de 20 parásitos, se analizó el cambio angular de dirección del movimiento. Los resultados indican que el cambio angular es mas o menos simétricos en toda la gama, desde -180 hasta 180 grados en los parásitos *knock-in* (EGFP y LYT1s+n, LYT1s y LYT1n)-EGFP). En el caso de los parásitos WT y EGFP se observa un pico prominente en el centro, indicativo de trayectorias casi rectilíneas, con muy pocos cambios abruptos de dirección.

Por el contrario, en el caso de los parásitos LYT1s+n-EGFP se observan picos de altura similar en los extremos del histograma, los cuales revelan trayectorias intrincadas, en las que se favorecen cambios abruptos de dirección. Los parásitos LYT1s-EGFP y LYT1n-EGFP mostraron una combinación de ambos fenómenos, indicando una alternancia de trayectorias más o menos rectilíneas y de trayectorias muy intrincadas. Finalmente, los parásitos *knock-out* se comportaron de manera similar a los parásitos control (WT y EGFP), mostrando un comportamiento de trayectorias casi rectilíneas, con muy pocos cambios abruptos de dirección. (Grafica 8 y 9).

Gráfica 8.
Histogramas del Cambio Angular de Dirección



Gráfica 9.
Trazos de Velocidad y Cambio Angular de Dirección



12. Análisis de Varianza (ANOVA).

Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) del movimiento del promedio de 20 parásitos analizados para cada grupo de epimastigotes WT, EGFP, LYT1(s+n, s y n)-EGFP y parásitos *knock-out* (L-14 y L-16). Como se muestra en la **Tabla 13**, mientras que los parásitos que expresan a la proteína completa exógena LYT1s-EGFP muestran una disminución en la velocidad (1.41 ± 0.49), aquellos que expresan la proteína truncada LYT1n-EGFP no mostraron diferencias (2.24 ± 1.11) con respecto a los parásitos WT y EGFP utilizados como control (2.45 ± 0.7 y 2.49 ± 0.9 , respectivamente). Por otro lado, ambos parásitos no presentan diferencias significativas en el cambio angular de dirección (87 ± 15 para LYT1s y 79 ± 0.64 para LYT1n) con respecto a los parásitos control WT y EGFP (85 ± 15 y 84 ± 25 , respectivamente).

Por el contrario, los parásitos que expresan de manera exógena ambas formas de la proteína LYT1s+n-EGFP presentan una marcada disminución de la velocidad (1.75 ± 0.89) y un aumento en el cambio angular de dirección (106 ± 20) con respecto a las células control WT (v_i de 2.45 ± 0.7 y θ_i de 85 ± 15) y EGFP (v_i de 2.49 ± 0.9 y θ_i de 84 ± 25), lo que resulta aparentemente en una alteración del movimiento del parásito. Se realizó también el análisis de varianza (ANOVA) del movimiento del promedio de los parásitos *knock-out* (L-14 y L-16), observándose resultados sin diferencia estadística significativa con respecto a los controles.

Tabla 13. ANOVA del Promedio de la Velocidad (v_i) y del Cambio Angular de Dirección (θ_i) de Parásitos Control (WT y EGFP), *Knock-in* (EGFP, LYT1s+n, LYT1s y LYT1n) y Parásitos *Knock-out* (L-14 y L-16). Las diferencias estadísticamente significativas se marcan con un asterisco (*) y sombreadas en gris.

	WT	EGFP	LYT1s+n-EGFP	LYT1s-EGFP	LYT1n-EGFP	L-14	L-16
V_i	2.45 ± 0.7	2.49 ± 0.9	$1.75 \pm 0.89^*$	$1.41 \pm 0.49^*$	2.24 ± 1.11	2.35 ± 0.78	2.41 ± 0.59
θ_i	85 ± 15	84 ± 25	$106 \pm 20^*$	87 ± 15	79 ± 0.64	78 ± 20	86 ± 15

13. Ensayos de Endocitosis con FM4-64.

Con la finalidad de determinar la posible participación de LYT1 en el proceso del tráfico vesicular utilizamos el marcador endocítico para células eucariotas FM4-64, como se describe en material y métodos. Después de 20 min de incubación con el marcador, se pudieron observar vesículas intracelulares relacionadas con la endocitosis. Los resultados obtenidos muestran que LYT1 comparte sitios de ubicación con algunas vesículas involucradas en el tráfico vesicular de *T. cruzi*, lo cual sugiere la participación de esta molécula en éste proceso (**Figura 34**).

Los resultados muestran en la colocalización de la expresión de LYT1s+n-EGFP y FM4-64 que, aunque existen algunas vesículas que comparten localización, no todas las vesículas en las que se localiza LYT1 fueron marcadas con FM-64. Estos resultados sugieren que algunas de estas vesículas podrían corresponder a proteínas que viajan del Golgi, a núcleo o a membrana, lo que es consistente con el posible transporte de LYT1n-EGFP a núcleo y de LYT1s-EGFP a membrana a través del tráfico vesicular.

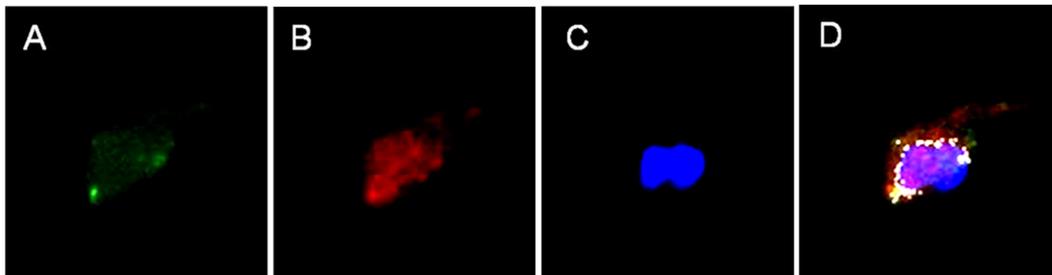


Figura 34. Análisis de Endocitosis Mediante FM4-64 en Parásitos Expresando LYT1s+n-EGFP de Forma Exógena. (A) EGFP; (B) FM4-64; (C) DAPI; (D) Colocalización.

14. Análisis por Microscopía Electrónica.

Con la finalidad de determinar si el defecto observado en la motilidad de los epimastigotes *knock-in* esta relacionado con la estructura del flagelo, se realizó un análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB) de los parásitos LYT1s+n-EGFP, LYT1s-EGFP y LYT1n-EGFP, utilizando como control parásitos WT y EGFP y como control negativo parásitos *knock-out* nulos de LYT1 (L-16). Los resultados en las micrografías obtenidas por el microscopio electrónico de barrido, muestran que los parásitos que expresan de manera exógena las proteínas de fusión LYT1(s+n, s y n)-EGFP presentan estructuras correspondientes a vesículas en la base del flagelo, cerca de la bolsa paraflagelar, o a lo largo del flagelo, con un marcado defecto estructural con respecto a lo observado en los parásitos control (WT y EGFP), en los que se observan vesículas de menor tamaño en las mismas zonas. Cabe

mencionar que los parásitos *knock-out* nulos de *LYT1* (L-16) presentan características morfológicas similares a los parásitos control (**Figura 35**).

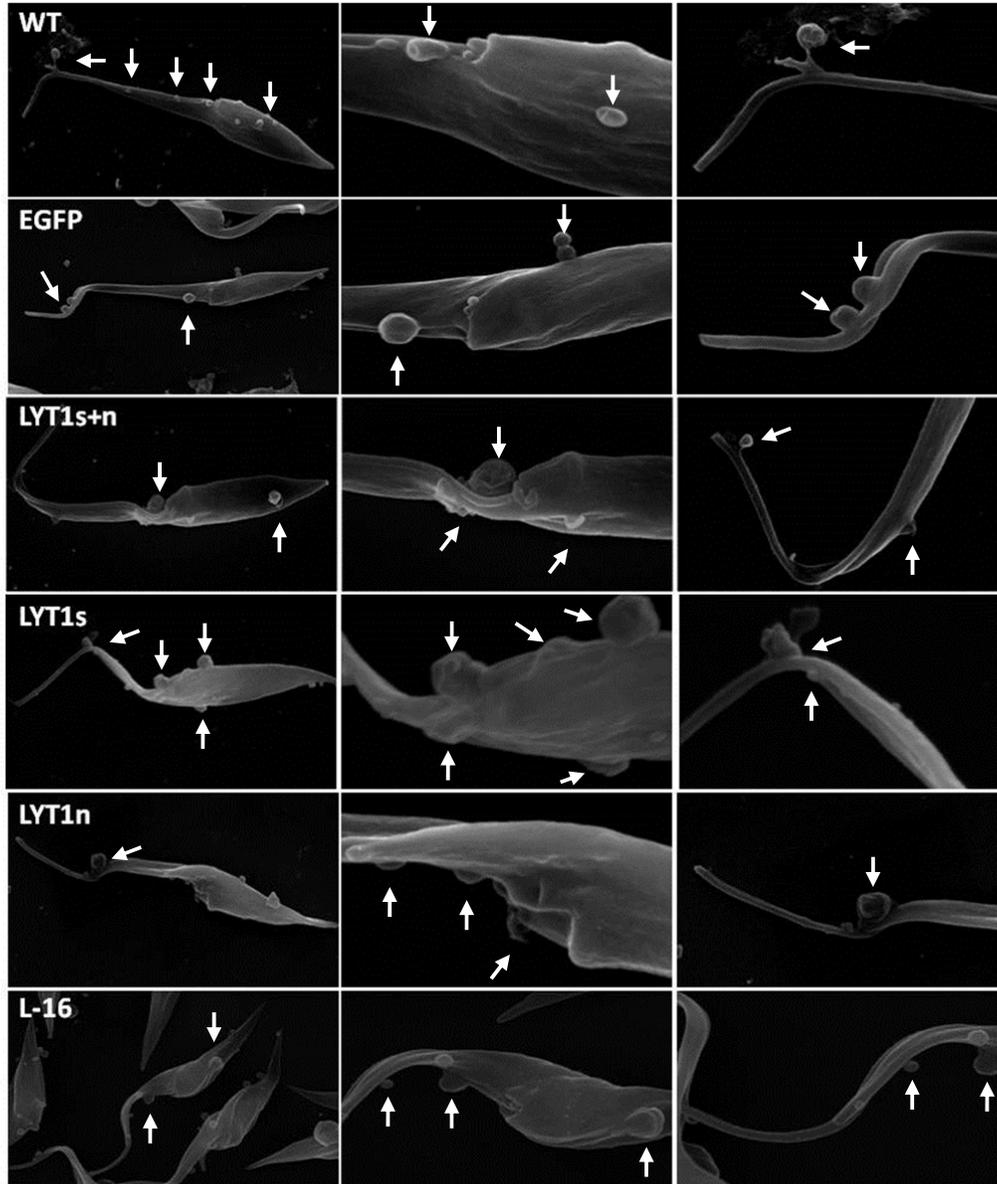


Figura 35. Análisis por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) en Parásitos Control (WT y EGFP), Parásitos Expresando LYT1(s+n, s y n)-EGFP y Parásitos *Knock-out* nulos de LYT1(L-16). Se marcan con flechas blancas las vesículas normales observadas en los epimastigotes control (WT y EGFP) y las vesículas con defecto estructural de los parásitos expresando LYT1(s+n, s y n)-EGFP y de los parásitos L-16.

Los resultados en las micrografías obtenidas por el microscopio electrónico de transmisión muestran que los parásitos que expresan de manera exógena las proteínas de fusión LYT1(s+n y s)-EGFP presentan estructuras correspondientes a vesículas de mayor tamaño o acumuladas en la base del flagelo, cerca de la bolsa paraflagelar, o a lo largo del flagelo, con respecto a lo observado en los cortes de los epimastigotes control (WT y EGFP) y los que expresan LYT1n-EGFP. Además, en los parásitos L-16 se observan las vesículas en forma y tamaño similares a los parásitos control (**Figura 36**).

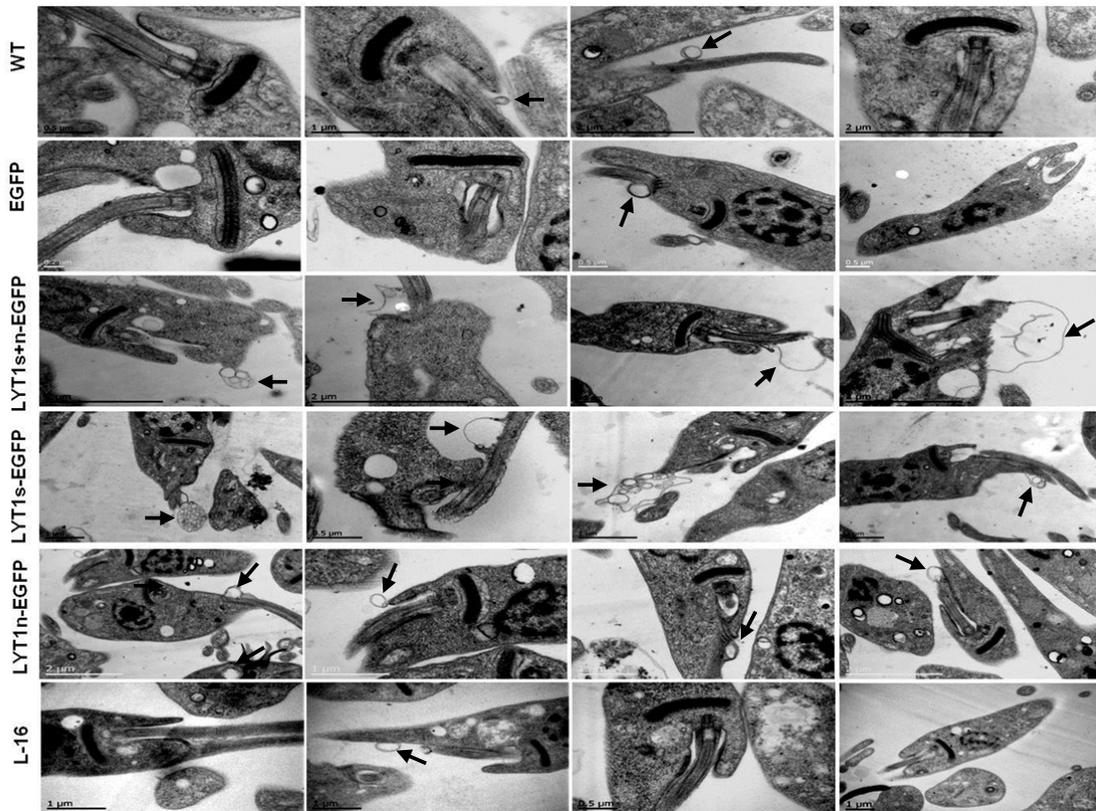


Figura 36. Análisis por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) en Cortes de Parásitos Control (WT y EGFP), Parásitos Expresando LYT1(s+n, s y n)-EGFP y Parásitos *Knock out* (L-16). Se marcan con flechas negras las vesículas normales observadas en los cortes de los epimastigotes control (WT y EGFP) y las vesículas con defecto estructural, tanto de los parásitos expresando LYT1-EGFP (s+n, s y n), como de los parásitos *knock-out* nulos (L-16).

Estos resultados sugieren que algunas de estas vesículas podrían corresponder a proteínas involucradas con el posible transporte de LYT1 a través del tráfico vesicular, y que al sobreexpresarse de manera exógena la proteína de fusión LYT1-EGFP estas proteínas se ven afectadas en su función normal.

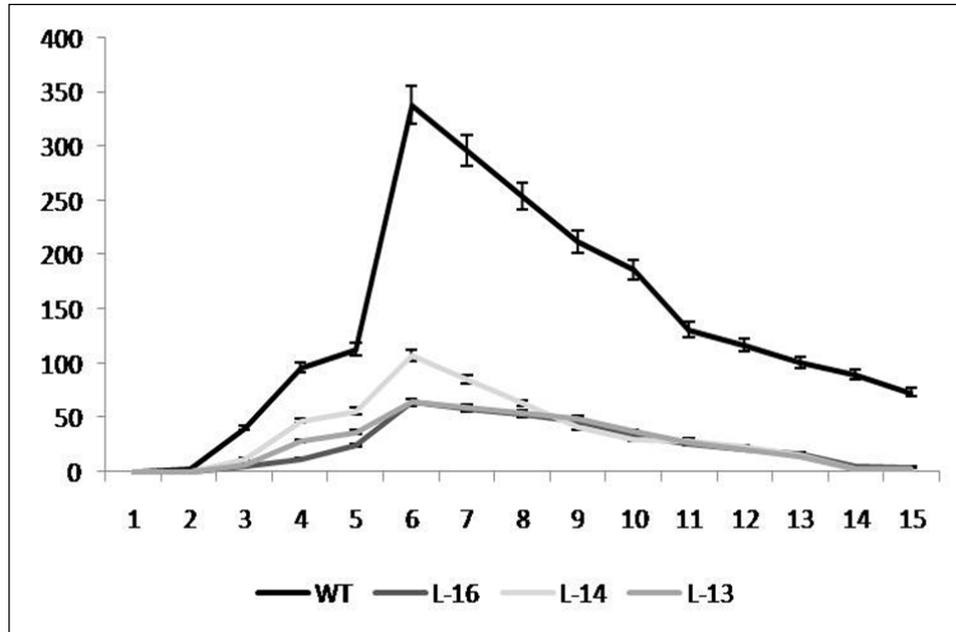
15. Índices de infectividad *in vivo* de Parásitos *Knock-out* y *Knock-in* de LYT1.

Ya que los parásitos *knock-in* mostraron un defecto evidente en su motilidad, era necesario evaluar si esto tendría o no un impacto en la capacidad infectiva de los mismos; se evaluó su infectividad en un modelo murino, como se describe en material y métodos. Como control se utilizaron parásitos WT y EGFP. Para interpretar mejor los datos, también se incluyeron en el estudio los parásitos *knock-out* de LYT1 cuya infectividad *in vivo* no había sido evaluada previamente.

Para evaluar la infectividad *in vivo* de los parásitos *knock-out* y *knock-in* de LYT1 se infectaron ratones Balb/c con parásitos L-16, L-14 y L-13 (Manning-Cela *et al* 2001, 2003) o parásitos expresando LYT1(s+n, s y n)-EGFP obtenidos en este trabajo comparando con parásitos WT y EGFP como control.

Los resultados obtenidos en las infecciones mostraron que la parasitemia de los ratones inoculados con los parásitos *knock-out* fueron, aproximadamente, 7 veces menor que la de los parásitos WT. Estos resultados demuestran que LYT1 tiene un papel importante durante la infección de *T. cruzi* *in vivo* (**Gráfica 10**).

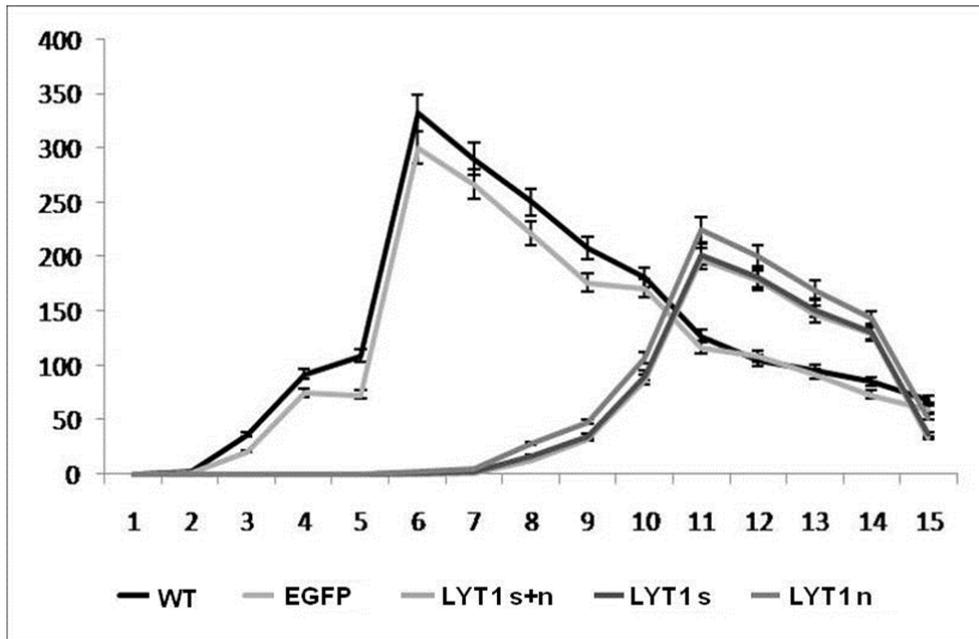
Gráfica 10.
Parasitemia de Ratones Balb/c Infectados con Parásitos *Knock-out* de *LYT1*



En el caso de los parásitos *knock-in*, como se observa en la **Gráfica 11**, se muestra que la parasitemia de los ratones empieza a detectarse entre el cuarto y quinto día pos-infección, mientras que en los ratones infectados con los parásitos control (WT y EGFP) la parasitemia se empieza a detectar a partir del día 2. Por otro lado, el pico de la parasitemia se alcanza alrededor del día 10 en los ratones infectados con los parásitos *knock-in*, mientras que en los animales infectados con los controles se alcanza en el día 5.

Además de que la parasitemia se encuentra desfasada en tiempo, también se encuentra disminuída aproximadamente 1.5 veces en los parásitos que expresan LYT1 exógenamente con respecto a los controles. Estos resultados demuestran que la expresión exógena de LYT1 afecta la infección *in vivo* de *T. cruzi* y que, el hecho de que lo haga con un comportamiento diferente a lo observado en los parásitos *knock-out* de LYT1, sugiere que posiblemente lo hace por un mecanismo diferente.

Gráfica 11.

Parasitemia de Ratones Balb/c Infeccionados con Parásitos *Knock-in* de *LYT1*

VIII. DISCUSIÓN.

“Ciencia es todo aquello sobre lo cual siempre cabe discusión”.

José Ortega y Gasset

VIII. DISCUSIÓN.

Muchas proteínas son importantes en el proceso de infección de *T. cruzi*; sin embargo, muy pocas han sido demostradas experimentalmente. Como se dijo anteriormente, *LYT1* es una molécula requerida para una infección eficiente y también está involucrada en el proceso de transición de estadio del parásito. Los parásitos deficientes en *LYT1* muestran tres fenotipos sobresalientes: una infección deficiente, un desarrollo acelerado *in vitro* y una actividad hemolítica disminuida (Manning-Cela *et al.*, 2001; Manning-Cela *et al.*, 2002; Manning-Cela, 2003; Espinoza y Manning-cela, 2007). Esta diferente función de *LYT1* es resultado de la producción de tres transcritos distintos obtenidos por *trans-splicing* alternativo, dos de los cuales codifican para una proteína completa conteniendo tanto una secuencia señal amino-terminal como una secuencia nuclear, y otro que codifica para una proteína truncada conteniendo únicamente la secuencia nuclear (Manning-Cela, 2002).

Este comportamiento es factible ya que en los tripanosomátidos, la transcripción es policistrónica y los ARNm producidos son directamente dependientes de la presencia del miniexón en su extremo 5' durante su procesamiento (Walder, 1986). Al igual que *LYT1*, se han reportado otros genes de tripanosomátidos con procesamiento de *trans-splicing* alternativo y que presentan diferente localización de las proteínas producidas, como en el caso de una prolina de *T. cruzi*, que es secretada en su transcrito largo y dirigida al citoplasma en su transcrito corto (Chamond, 2003). Además, *LYT1* está altamente regulada durante los estadios de desarrollo de *T. cruzi*, en donde los ARNm largos son expresados mayoritariamente en los estadios de tripomastigote y amastigote, y los ARNm cortos son expresados más abundantemente en el estadio de epimastigote (Manning-Cela *et al.*; 2002), lo que sugiere que posiblemente su expresión diferencial pudiera tener implicaciones en la biología de cada uno de los estadios de desarrollo del parásito, aunque futuros experimentos serán necesarios para demostrar esto.

Ya que se había determinado que el gen de LYT1 podía dar resultado a diferentes transcritos, era necesario determinar si éstos eran activos y daban lugar a distintos productos que pudieran tener diferente localización y función. Por ello, en este trabajo se evaluó la localización de los diferentes productos de *LYT1*, obteniendo y analizando parásitos *knock-in* que expresan una copia exógena de *LYT1* fusionada a *EGFP*, expresando las dos proteínas (LYT1s+n-EGFP), solo la proteína completa (LYT1s-EGFP) o únicamente la proteína incompleta (LYT1n-EGFP) (**Figura 29**).

Los resultados mostraron que, efectivamente, los diferentes productos de LYT1(s y n)-EGFP presentan distinta localización. Al igual que lo reportado recientemente por Benabdellah y colaboradores en el 2007, quienes determinaron la localización de LYT1 usando anticuerpos dirigidos contra esta proteína, observamos que la proteína completa se localiza en membrana y la proteína troncada en cinetoplasto. Sin embargo, nosotros también determinamos que ambas proteínas, se localizan en núcleo, reservosoma y vesículas. Una posible explicación a estas diferencias, es que en nuestro sistema además de expresar LYT1 endógena los parásitos transfectados expresan LYT1-EGFP exógena bajo un promotor fuerte, por lo que los parásitos posiblemente expresan a LYT1-EGFP exógena a niveles altos. De este modo, esperaríamos que se evidenciara aún mas su localización, la cual posiblemente no es fácil de ver cuando únicamente se expresa la copia endógena, que sabemos lo hace en bajos niveles. Otra posible explicación es que la fusión de LYT1 con EGFP pueda de alguna manera modificar su localización. Esta posibilidad la consideramos poco probable por las siguientes razones: Se ha reportado que este gen reportero por lo regular no modifica la localización de las proteínas a las cuales se fusiona (Yang *et al.*, 1996; Tsien *et al.*, 1998). Además, la localización que obtuvimos en parte corresponde a la reportada por Benabdellah y colaboradores en el 2007 para la proteína endógena por lo que sería poco probable que se obtuviera una localización aberrante adicional a la localización de LYT1 endógena.

En las tres variantes de LYT1(s+n, s y n)-EGFP observamos una localización compartida en núcleo y cinetoplasto, una disposición esperada considerando que, tanto la proteína completa como la truncada contienen la secuencia de localización nuclear. A este respecto, se ha sugerido que cuando una proteína contiene más de una secuencia de localización, y aún cuando una de éstas predomina sobre la otra, siempre se observarán ambas localizaciones. Esto resulta relevante en el caso de LYT1-EGFP, ya que tanto la proteína completa como la incompleta se localizan en núcleo y cinetoplasto, lo que daría lugar a la posibilidad de que presenten funciones diferentes en estos organelos. A este respecto es interesante observar el resultado obtenido por Benabdellah y colaboradores en el 2007, cuando reconstituyeron diferencialmente el fenotipo de infectividad y diferenciación de estadio en parásitos *knock-out* de LYT1. Ellos observaron que al expresar a la proteína incompleta únicamente reconstituían el fenotipo de diferenciación de estadio, mientras que al expresar la proteína completa reconstituían el fenotipo de infectividad. Esto sugiere que la proteína completa, localizada en núcleo y cinetoplasto, pudiera tener una función diferente a la regulación de diferenciación de estadio del parásito, siendo necesario realizar experimentos futuros para determinar esto.

También, es interesante el hecho de que LYT1-EGFP tanto completa como truncada se localice en el reservosoma. El reservosoma es un conjunto de organelos endocíticos propios del estadio de epimastigote de *T. cruzi*, que almacenan proteínas y lípidos que utiliza el parásito para su proceso de diferenciación. Se ha reportado que este organelo desaparece gradualmente cuando los epimastigotes son incubados en medio de cultivo en condiciones que inducen el proceso de transformación de epimastigote a tripomastigote (Soares y de Souza, 1988; Soares *et al.*, 1989, Soares *et al.*, 1999). Por lo tanto no es extraño encontrar a LYT1-EGFP en este organelo, ya que se ha demostrado genéticamente su participación directa en éste proceso (Manning-Cela *et al.*, 2001; Benabdellah *et al.*, 2007).

Por otro lado, cada epimastigote puede presentar diversas formas de reservosomas, las cuales pueden variar, dependiendo de las condiciones de crecimiento y de la cepa del parásito, siendo común observar además de las vesículas anteriores, una vesícula característica grande y predominante que se localiza en la región posterior del parásito (región pos-nuclear) (Soares y de Souza, 1987). Esta misma organización fue observada en este trabajo, en donde tanto la proteína completa, así como la incompleta, se localizó en diversas vesículas incluyendo la característica, localizada en la parte posterior de los epimastigotes.

Si consideramos que toda macromolécula ingerida por el parásito, a través de un proceso endocítico que tiene lugar en el citostoma y en el *pocket* flagelar, se acumula en el reservosoma y que se ha reportado que éste organelo está implicado en el transporte de proteínas de membrana (Goncalves *et al.*, 1991), no sería extraño tampoco el poder relacionar a LYT1-EGFP completa, localizada en membrana e involucrada en infectividad, con éste organelo. Sabemos que la localización de LYT1-EGFP en vesículas corresponde, al menos una parte de éstas, al reservosoma, ya que al usar el marcador FM4-64 usado para determinar este organelo en *T. cruzi* (Torres *et al.*, 2004) colocaliza con la fluorescencia de LYT1-EGFP (**Figura 31**).

En apoyo a lo anterior, el reservosoma desaparece en tripomastigotes y amastigotes al igual que la colocalización de LYT1-EGFP en éste, como era de esperarse (**Figura 32**). Además, se ha reportado que en los reservosomas se acumula una gran cantidad de cruzipaina, la principal cisteínproteasa de *T. cruzi* (Campetella, 1990; Murta *et al.*, 1990; Souto-Padrón *et al.*, 1990), que se sabe también es esencial para el crecimiento, diferenciación e infectividad del parásito (Meirelles *et al.*, 1992; Harth *et al.*, 1993; Franke de Cazzulo *et al.*, 1994; Engel *et al.*, 1998). Por lo tanto, estos hallazgos en conjunto apoyan la presencia de ambas formas de la proteína en el reservosoma y su relación con el proceso de diferenciación de estadio e infectividad.

Ya que no todas las vesículas en que esta localizada LYT1-EGFP fueron marcadas con FM4-64, se sugiere que algunas de éstas podrían corresponder a vesículas de transporte de proteínas que viajan del golgi a núcleo o membrana, lo que es consistente con el posible transporte de LYT1n-EGFP a núcleo y LYT1s-EGFP a membrana.

Por otro lado, la presencia de los diferentes productos de LYT1-EGFP en distintos organelos con características de pH diferentes, expone a esta molécula a adquirir conformaciones distintas que pudieran impactar en su función. Además, se ha considerado su posible interacción con distintas proteínas que, en conjunto, pudieran tener una participación en los fenotipos con que se le ha relacionado. A este respecto, en el laboratorio se ha explorado ésta posibilidad, y se encontró que LYT1 interactúa con diversas proteínas implicadas en el fenotipo de infección (*Trans*-sialidasa, fosfatasa tipo DSPc, gp63, MASP, LYT1) y de transición de estadio (histonas H2A y H2B, C2H2 putativa, glutatión sintetasa putativa) faltando aún por determinar de que manera lo hace y que implicaciones biológicas pudiera tener dicha interacción (Andrews, 1990; Lugo-Caballero, 2008).

Un fenotipo interesante e inesperado fué que la expresión exógena de LYT1(s+n y s)-EGFP afectó el movimiento de los parásitos. La motilidad del epimastigote depende esencialmente del flagelo, el cual está conformado principalmente de microtúbulos (Kohl y Gull, 1998; Gull, 1999; Kohl y Bastin 2005; Hutchings, 2002). A pesar de que se conocen algunas moléculas involucradas en el movimiento del flagelo en células eucariotas, es muy poco lo que se sabe sobre el mecanismo que regula o coordina este movimiento flagelar (Cosson, 1995). Los microtúbulos tienen un papel importante en el mantenimiento de la estructura de *T. cruzi*, participa en la separación de los cuerpos basales, en el crecimiento del nuevo flagelo, en la mitosis, en la citocinesis y, por supuesto, en la motilidad del parásito (Robinson *et al.*, 1995; Kohl y Gull, 1998; Gull, 1999). También éstos conforman el saco flagelar, que es por donde el parásito endocita y exocita sus proteínas, siendo un organelo importante en la regulación del tráfico vesicular que lleva las moléculas

necesarias para el crecimiento y funcionamiento del flagelo (Kozminski *et al.*, 1993; Souto-Padrón *et al.*, 1990; Brooks *et al.*, 2000).

Ya que los parásitos *knock-out* de LYT1 (Manning-Cela *et al.*, 2001) y la mutante dominante negativa de LYT1 (Manning-Cela *et al.*, 2003) no presentaron defectos en la motilidad del parásito, indicando que ésta molécula no tiene una implicación directa en este fenómeno, es difícil explicar el porque los parásitos *knock-in* y *knock out* de LYT1 muestran defectos a este nivel.

Una posible explicación es que LYT1-EGFP este participando de manera indirecta en este proceso. Esta propuesta se basa en el hecho de que, cuando se analizaron las moléculas que interactúan con LYT1, se encontró que entre estas se unen la tubulina, cineína y dineína, que son moléculas involucradas en el tráfico vesicular del parásito (Lugo-Caballero, 2008). Ya que este mecanismo es esencial para el transporte de las moléculas encargadas del crecimiento y buen funcionamiento flagelar, podría ser alterada la motilidad celular. Por lo tanto, si la expresión exógena de LYT1-EGFP y su interacción con tubulina, dineína y kinesina, están afectando la eficiencia del transporte intraflagelar y, por lo tanto, el funcionamiento correcto de cualquiera de las moléculas necesarias para el movimiento del flagelo, sería posible obtener un fenotipo deletéreo como el observado en los parásitos transfectados (Rosenbaum y Witman, 2002).

El sistema de transporte intraflagelar (IFT por sus siglas en ingles), que está formado de diversas partículas compuestas de 15 diferentes polipeptidos, identificados y conservados en muchas especies de flagelados, ha mostrado también que la inactivación de uno solo de sus genes es suficiente para inhibir el ensamble del flagelo, indicando que la integridad de las partículas es necesaria para un funcionamiento eficiente del IFT (Brazelton *et al.*, 2001; Deane *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2003; Gull, 1999), lo cual coincide con lo encontrado en el presente trabajo, ya que al análisis por microscopía electrónica de barrido y microscopía electrónica de transmisión se observa un defecto en la estructura de vesículas que salen del saco flagelar y que recorren el flagelo, lo que sugiere que algunas de estas vesículas podrían corresponder

a proteínas involucradas con el posible transporte flagelar de LYT1 a través del tráfico vesicular y que ésta proteína, al ser sobreexpresada, afecta la asociación de las proteínas con las que interactúa, alterando de este modo su función normal (Figuras 34 y 35).

Se han reportado además, que algunas otras proteínas, como FLA1, que es una proteína que fue localizada a lo largo de la región del flagelo de *T. brucei*, y GP72, que es una glicoproteína asociada a la membrana de *T. cruzi*, actúan directamente en los procesos de movimiento y desplazamiento del parásito (Nozaki, 1994; Cooper, 1993; Haynes, 1996). Finalmente, usando mutantes nulos se determinó que PFR-2 en *Leishmania mexicana* y sus proteínas homólogas PFR-2 de *T. brucei* y PAR-2 de *T. cruzi*, que son proteínas propias del *PFR (paraflagellar rod)*, son necesarias para la motilidad del parásito (Beard, 1992; Foust, 1998; Santrich, 1997; Kohl, 1998; Hunger Glaser, 1997).

Otra posibilidad, es que LYT1-EGFP interactúe directa o indirectamente con moléculas relacionadas con la motilidad del parásito e interfiera, de manera indirecta y negativa en su función, en los parásitos *knock-in* de LYT1. Ejemplo de éstas moléculas son PF16 y PF20, que están asociadas con los pares centrales de microtubulos del axonema y que, usando ARNi para silenciar sus genes, se obtuvo la modificación, reducción o completa inhibición del movimiento del parásito (Ngo *et al.*, 1998; Landfear, 2001; Gull, 1999; Hill, 2003; Kohl y Bastin, 2005). Hasta el momento no hemos encontrado interacción de LYT1 con estas proteínas, sin embargo, aún no contamos con el interactoma completo de LYT1 y tampoco tenemos la información de varias proteínas hipotéticas a las que se les une LYT1, y que pudieran tener funciones parecidas a las de PF16 y PF20.

Es interesante resaltar que el defecto en la motilidad observada fue un fenotipo específico de estadio ya que los tripomastigotes, que también son un estadio mótil del parásito, no presentaron disminución en su movimiento, trayectoria y distancia recorrida (datos no mostrados) (Ballesteros-Rodea *et al.*, 2012).

Estos resultados sugieren que ambos estadios de desarrollo utilizan probablemente mecanismos de motilidad diferentes. De manera distinta a los epimastigotes, los tripomastigotes cuentan con una membrana ondulante, además del flagelo, la cual agitan en movimientos que se continúan hasta el flagelo para llevar a cabo el desplazamiento del parásito con movimientos ondulatorios de todo el cuerpo.

Ya que en los epimastigotes LYT1s+n y LYT1s se observó un defecto en la motilidad (**Figura 32, gráfica 4 y 5**), sugiere la posibilidad de que este fenotipo deletéreo pudiera ser resultado de un efecto indirecto y negativo sobre el tráfico vesicular del parásito y consecuentemente de la función del flagelo. En apoyo a esta propuesta son los trabajos de Soares *et al.*, en 1992 y Mauricio de Mendonca *et al.*, en el 2000, en donde reportan que los índices de endocitosis son muy bajos en tripomastigotes y que en éste estadio desaparece el reservosoma y no es capaz de renovarse nuevamente como consecuencia de la baja endocitosis. Por lo tanto nuestros resultados sugieren que posiblemente LYT1 participa de alguna manera con moléculas involucradas en el tráfico vesicular.

Los resultados del análisis de distancia recorrida, velocidad, y cambio angular de dirección de los parásitos (**Graficas 4, 5, 7, 8 y 9**), mostraron que los epimastigotes que expresan LYT1(s+n y s)-EGFP presentan cambios estadísticamente significativos en la motilidad celular. Ya que no se observó un defecto significativo en la motilidad de los parásitos que expresan a LYT1n-EGFP comparado con los parásitos control, se sugiere que la expresión LYT1s-EGFP aparentemente es la principal responsable del fenotipo observado.

Sin embargo, ya que los epimastigotes que expresan de manera exógena ambas formas de la proteína muestran un efecto mas severo que los parásitos que solo expresan la forma completa LYT1s-EGFP, se sugiere que posiblemente LYT1n-EGFP por sí sola no tenga un efecto sobre la motilidad del parásito, pero que cuando esta junto con LYT1s-EGFP es capaz de potencializar el efecto de ésta última. Como se observa en el análisis de velocidad y cambio angular de dirección (**Grafica 7, 8 y 9 y Tabla 13**) los

parásitos LYT1n+s-EGFP presentan alteración de ambos parámetros, mientras que en los parásitos LYT1s-EGFP solo se altera la velocidad. En este sentido el hecho de que aún cuando LYT1n-EGFP no mostró diferencias significativas con respecto al control (**Tabla 13**), si evidenció algunos cambios. Por ejemplo, una tendencia a disminuir la distancia recorrida (**Grafica 4**).

También, el número de parásitos que recorrieron los diferentes rangos de distancia analizados, mostraron un comportamiento parecido a LYT1s+n-EGFP y LYT1s-EGFP, en donde se observó una mayor concentración de parásitos (55%-75%) que recorrieron distancias de 0 a 20 μm , a diferencia de los parásitos control (20%) (**Grafica 5**). Además, presentaron una alternancia de trayectorias más o menos rectilíneas y de trayectorias muy intrincadas, como las observadas en LYT1s-EGFP y de trayectorias intrincadas como las observadas en LYT1s+n-EGFP y LYT1s-EGFP, que no son comunes en los parásitos control (**Grafica 8 y 9**). Estos resultados entonces, nos sugieren que las tendencias observadas en los epimastigotes LYT1n-EGFP, si bien su efecto no es estadísticamente significativo, si pudiera de alguna manera aumentar el efecto de LYT1s-EGFP en los parásitos LYT1s+n-EGFP.

El análisis de los histogramas de velocidad muestra que todos los parásitos estudiados tienen aproximadamente la forma de distribución de Maxwell-Boltzmann, típica de las partículas brownianas, lo que indica que los epimastigotes presentan un movimiento browniano. Además, el movimiento de los parásitos mostró que tienen un alto grado de estocasticidad (que se mueven tanto hacia a un lado como al otro sin tener una preferencia hacia alguno de los lados). La gran variabilidad de velocidades promedio observada entre distintos parásitos, indica que la motilidad de los parásitos, además de presentar un movimiento browniano, también es debida al movimiento de su flagelo. Esto se basa a que si sólo hubiera movimiento browniano, la variabilidad de velocidades promedio se debería únicamente a la variabilidad en el tamaño de los parásitos y por lo tanto no sería tan grande como se observó (**Gráfica 7**).

Dos hechos que se observan a simple vista en todos los parásitos son: 1) que existen cambios angulares de dirección en toda la gama desde -180 hasta 180 grados y 2) que todos ellos son aproximadamente simétricos. Ambas observaciones concuerdan con la afirmación de que el movimiento de los parásitos tiene un elevado componente estocástico, probablemente de origen similar al movimiento browniano.

En particular, puesto que ángulos positivos y negativos indican cambios de dirección en sentido opuesto al de las manecillas del reloj, el que los histogramas sean simétricos revela la no existencia de una preferencia de dirección hacia la que los parásitos roten (**Grafica 8**).

Por otra parte, si el movimiento de los parásitos fuera completamente aleatorio, los histogramas de los cambios angulares de dirección serían planos. Pero tal cosa no se observa, en concordancia con la existencia de una motilidad inherente a los parásitos. En algunos casos se observa un pico prominente en el centro, indicativo de trayectorias casi rectilíneas, con muy pocos cambios abruptos de dirección (EGFP). En otros casos se observan picos de altura similar en los extremos del histograma, los cuales revelan trayectorias intrincadas, en las que se favorecen los cambios abruptos de dirección (LYT1s+n-EGFP). Finalmente, en otros histogramas se aprecia una combinación de ambos fenómenos, lo que coincide con una alternancia de trayectorias más o menos rectilíneas y de trayectorias muy intrincadas (LYT1s-EGFP y LYT1n-EGFP) (**Grafica 8 y 9**).

Finalmente, los experimentos de infección *in vivo* mostraron, como era de esperarse, que los parásitos *knock-out* de LYT1 redujeran notablemente (85%) su capacidad infectiva (**Gráfica 7**) ya que se había mostrado con anterioridad que disminuían en aproximadamente un 95% su infectividad *in vitro* (Manning-Cela *et al.*, 2001; Zago *et al.*, 2007). Por otro lado los parásitos *knock-in* presentaron también una reducción de su infectividad *in vivo* (30%); sin embargo, lo hicieron en niveles menores y con una cinética diferente a los parásitos *knock-out* sugiriendo que lo hacen por mecanismos diferentes. En el caso de los parásitos *knock-out* se demostró por el análisis genético que LYT1

participa directamente en el proceso de infección de *T. cruzi*. Por lo que en los parásitos *knock-in* proponemos que la reducción de la infectividad, así como el defasamiento en la cinética de la parasitemia, es resultado posiblemente del defecto en la motilidad de los parásitos.

LYT1 no solo muestra un procesamiento alternativo que conlleva a la producción de dos proteínas distintas, sino que también éstas se encuentran en diferentes localizaciones en la célula, que las expone a diferentes condiciones ambientales que pudiera impactar en su función. Aunado a esto, su expresión diferencial en los distintos estadios de desarrollo del parásito y su diferente localización, también las expone a poder interactuar con distintas proteínas e impactar de manera directa o indirecta en diferentes procesos en la biología del parásito. Este comportamiento observado en *LYT1*, ha sido reportado en genes que presentan *switch* alternativo de expresión y función.

Diversos genes de este tipo han sido descritos en *Arabidopsis spp.* y otras plantas, los cuales presentan *switch* de función ante el cambio conformacional de la proteína cuando es expuesta a diferentes condiciones al encontrarse en distintas localizaciones dentro de la célula (Obara *et al.*, 2002; Hamada *et al.*, 2002; Strobel *et al.*, 2002; Silva-Filho 2003). También, en el caso del gen *TcPRAC* de *T. cruzi* que expresa dos proteínas de tipo prolina-racemasas resultado de un *trans-splicing* alternativo, presentan diferente localización y distintas propiedades bioquímicas (San Martín *et al.*, 2000).

Estos resultados muestran que diversas proteínas pueden presentar un comportamiento multifuncional optimizando los sistemas biológicos, sobre todo aquellos cuyo genoma no permite la síntesis de una gran variedad de proteínas con funciones específicas como en el caso de *T. cruzi*. Por ello es importante continuar con su estudio para dilucidar a futuro los mecanismos que regulan el ciclo biológico e infectivo del parásito y poder diseñar estrategias genéticas, inmunológicas o terapéuticas para su control.

IX. CONCLUSIONES.

“La ciencia, a pesar de sus progresos increíbles, no puede ni podrá nunca explicarlo todo. Cada vez ganará nuevas zonas a lo que hoy parece inexplicable. Pero las rayas fronterizas del saber, por muy lejos que se eleven, tendrán siempre delante un infinito mundo de misterio”.

Gregorio Marañón

IX. CONCLUSIONES.

- Los diferentes transcritos de *LYT1* producen dos proteínas diferentes con localización diferencial.
- La expresión exógena de *LYT1* produce un defecto en la motilidad del parásito, aparentemente por un efecto indirecto sobre las moléculas que participan el movimiento del flagelo.
- La expresión de una copia exógena de *LYT1* tiene un impacto negativo en la infectividad *in vivo* de *T. cruzi*, posiblemente como resultado del defecto en la motilidad de los parásitos y no como un efecto directo de *LYT1*, como se observó en los parásitos *knock-out* de *LYT1*.
- El análisis del movimiento del flagelo de los epimastigotes de *T. cruzi* mostró que el parásito presenta un bateo flagelar (simétrico de punta a base) y un bateo ciliar (asimétrico de base a punta) que resulta en dos tipos de desplazamiento (rectilíneo e intrincado) permitiendo así el movimiento direccional del parásito y su cambio de trayectoria.
- El epimastigote presenta una variabilidad en movimiento y trayectoria, lo que resulta en diferentes rangos de distancia recorrida.
- El análisis vectorial del movimiento indicó que éste no es un evento al azar, sino dependiente del comportamiento del parásito.

X. PERSPECTIVAS.

“Cada día sabemos más y entendemos menos”.

Albert Einstein

X. PERSPECTIVAS.

- Determinar la función de los dos distintos productos de LYT1 en cada uno de los organelos en los que se localizan.
- Caracterizar el interactoma de LYT1 y determinar con que proteínas interactúa cada uno de los productos en los distintos organelos, y de que manera impacta esto en su función.
- Determinar si efectivamente, el defecto observado en la motilidad del parásito es resultado de la interferencia indirecta de LYT1 con alguna molécula involucrada en motilidad o en el tráfico vesicular de *T. cruzi*.
- Determinar la motilidad en los diferentes estadios de *Trypanosoma cruzi*.

XI. BIBLIOGRAFÍA.

“La inteligencia consiste no sólo en el conocimiento, sino también en la destreza de aplicar los conocimientos en la práctica.”

Aristóteles

XI. BIBLIOGRAFÍA

Abu-Elneel K, Robinson DR, Drew ME, Englund PT and Shlomai J. Intramitochondrial localization of universal minicircle sequence-binding protein, a trypanosomatid protein that binds kinetoplast minicircle replication origins. *J Cell Biol.* 2001. 14: 725–734.

Andrade LO, Andrews NW. Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. *J of Experim Med.* 2004; 200:1135-1143.

Andrews NW, Abrams CK, Slatin SL, Griffiths G. A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. *Cell.* 1990. 61(7):1277-87.

Andrews NW, Hong K, Robbins ES, Nussenzweig V. Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol.* 1987. 64: 474-484.

Andrews NW. The acid-active hemolysin of *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol.* 1990. 71(2):241-244.

Ausubel MF, Brent R, Kingsto, ER, Moore DD, Seidman GJ, Smith AJ, Struhl K. Current Protocols in Molecular Biology. Massachusetts General Hospital. Harvard Medical School. John Wiley & Sons, Inc. E.U.A. 1994-1996.

Baida RC, Santos MR, Carmo MS, Yoshida N, Ferreira D, Ferreira AT, El Sayed NM, Andersson B, and da Silveira JF. Molecular characterization of serine-, alanine-, and proline-rich proteins of *Trypanosoma cruzi* and their possible role in host cell infection. *Inf and Imm.* 2006; 74: 1537-1546.

Balber AE. The pellicle and the membrane of the flagellum, flagellar adhesión zone, and flagellar pocket: functionally discrete surface domains of the bloodstream form of African trypanosomes. *Crit Rev Immunol.* 1990. 10: 177-201.

Ballesteros-Rodea G, Santillán M, Martínez-Calvillo S, Manning-Cela R. Flagellar motility of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *J Biomed Biotechnol.* 2012; 2012:520380. Epub 2012 Jan 11. Erratum in: *J Biomed Biotechnol.* 2012; 2012:793487.

Barreto ML and Andrade ME. Impact of Chagas infection on some demographic characteristics: results of an ecological study. *Cad Saúde Pública.* 1994, vol.10 suppl.2, p.273-280. ISSN 0102-311X.

Barros HC, Verbisck NV, Silva S, Araguth MF, Mortara RA. Distribution of epitopes of *Trypanosoma cruzi* amastigotes during the intracellular life cycle within mammalian cells. *J Euk Microbiol.* 1997. 46: 332- 344.

Beard CA, Saborio JL, Tewari D, Krieglstein KG, Henschen AH, Manning JE. Evidence for 2 distinct major protein components, PAR-1 and PAR-2, in the flagellar rod of *Trypanosoma cruzi* complete nucleotide sequence of PAR-2. *J Biol Chem.* 1992. 267: 21656-21662.

Benabdellah K, González-Rey E and González A. Alternative trans-splicing of the *Trypanosoma cruzi* *LYT1* gene transcript results in compartmental and functional switch for the encoded protein. *Mol Microbiol.* 2007. 65(6): 1559-1567.

Benne R, Van den Burg J, Brakenhoff JP, Sloof P, Van Boom JH, Tromp MC. Major transcript of the frameshifted *coxII* gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell.* 1986. Sep 12. 46(6):819-26.

Benne R. Related Articles, Aminoacyl-tRNA synthetases are involved in RNA splicing in fungal mitochondria. *Trends Genet.* 1988. 4(7):181-2.

Bittencourt AL, Sadigursky M, Da Silva AA, Menezco CA, Marianetti MM, Guerra SC and Sherlock I. Evaluation of Chagas disease transmission through breastfeeding. *Memories of Institute Oswaldo Cruz.* 1988. 83:37-39.

Blum B, Bakalara N, Simpson L. A model for RNA editing in kinetoplastid mitochondria: "guide" RNA molecules transcribed from maxicircle DNA provide the edited information. *Cell.* 1990. 26. 60(2):189-98.

Brazelton WJ, Amundsen CD, Silflow CD and Lefebvre PA. The bld1 mutation identifies the *Chlamydomonas* osm-6 homolog as a gene required for flagellar assembly. *Curr Biol.* 2001. 11: 1591-1594.

Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Ann Rev Microbiol.* 1973. 27:347-392.

Brooks D.R., Tetley L., Coombs G.H., Mottram J.C. Processing and trafficking of cysteine proteases in *Leishmania Mexicana*. *J of Cell Science* 2000. 113: 4035-4041.

Burleigh BA, Andrews NW. A 120-kDa alkaline peptidase from *Trypanosoma cruzi* is involved in the generation of a novel Ca (2+)-signaling factor for mammalian cells. *J Biol Chem.* 1995. 270 (10):5172-80.

Burleigh BA, Andrews NW. Signaling and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Curr Opin Microbiol.* 1998. 1(4): 461-465.

Burleigh BA, Caler EV, Webster P, Andrews NW. A cytosolic serine endopeptidase from *Trypanosoma cruzi* is required for the generation of Ca²⁺ signaling in mammalian cells. *J Cell Biol.* 1997. 136(3): 609-20.

Burleigh BA, Woolsey AM. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cell Microbiol.* 2002. 4(11): 701-711.

Buscaglia C, Campo V, Frasch A and Di Noia J. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependant coat diversity. *Nature Reviews on Microbiology.* 2006. 4:229-236.

Cabello RC. Microbiología y parasitología humana. Ed. Médica Panamericana. 1^{ra} ed. Buenos Aires Argentina. 1998. pp.543-549.

Caler EV, Vaena de Avalos S, Haynes PA, Andrews NW and Burleigh, BA. Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *The European Molecular Biology Organization Journal.* 1998. 17: 4975-86.

Camargo EP. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1964.12: 93-100.

Campetella O, Martínez J, Cazzulo JJ. A major cysteine proteinase is developmentally regulated in **Trypanosoma cruzi**. *FEMS Microbiol Lett.* 1990. 55 (1-2): 145-9.

Carvalho TMU, de Sousa W, Coimbra ES. Internalization of components of the host cell Plasma Membrana During Infection by *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999. Vol.94, Suppl. I: 143-147.

Castillo C. Tripanosomiasis americana (Enfermedad de Chagas). Boletín epidemiológico. OPS / OMS. 2003. 24 (3): 15-16.

CDC. Division of Parasitic Diseases at the National Center for Infectious Diseases, Centers for Diseases Control and Prevention. DPDx, Identification and Diagnosis of Parasites of Public Health Concern, With emphasis on Footborne and Intestinal Parasites. 2000. Atlanta, Georgia. USA.

Cevallos AM y Hernández R. *Trypanosoma cruzi* y la enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). Libro Microbios. Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM DGSCA. México D.F. 2002. Cap 15.

Cevallos AM, López-Villaseñor I, Espinosa N, Herrera J, Hernández R. *Trypanosoma cruzi*: allelic comparisons of the actin genes and analysis of their transcripts. *Exp Parasitol.* 2003. 103(1-2):27-34.

Chamond N, Grégoire C, Coatnoan N, Rougeot C, Freitas-Junior LH, da Silveira JF, Degrave WM, Minoprio P. Biochemical characterization of proline racemases from the human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* and definition of putative protein signatures. *J Biol Chem.* 2003. 278: 15484–15494.

Clark CG, Pung OJ. Host specificity of ribosomal DNA variation in sylvatic *Trypanosoma cruzi* from North America. *Mol Biochem Parasitol.* 1994. 66 (1): 175-9.

Coburn CM, Otterman KM, MacNeely T, Turco SJ, Beverley SM. Stable DNA transfection of a wide range of trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol.* 1991. 46: 169.

Cooper R, de Jesus AR, Cross GA. Deletion of an immunodominant *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein disrupts flagellum-cell adhesion. *J Cell Biol.* 1993. 122:149.

Coura JR. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007. 102 Suppl 1:113-22.

Cruz A, Beverley SM. Gene replacement in parasitic protozoa. *Nature.* 1990. 348: 171.

Cruz-Reyes A and Pickering-López J. Chagas disease in Mexico: an analysis of geographical distribution during the past 76 years-A review. *Memories of Institute Oswaldo Cruz.* 2006. 101(4): 345-354.

Cubillos-Garzon LA, Casas JP, Morillo CA, Bautista LE. Congestive heart failure in Latin America: the next epidemic. *Am Heart J.* 2004. 147(3): 412-7.

Deane JA, Cole DG, Seeley ES, Diener DR and Rosenbaum JL. Localization of intraflagellar transport protein IFT52 identifies basal body transitional fibers as the docking site for IFT particles. *Curr Biol.* 2001. 11: 1586-1590.

de Arias AR and Ferro EA. Quantification of *Trypanosoma cruzi* parasitaemia by direct micromethod. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1988. 82 (2): 248.

de Sousa MA. Morphobiological Characterization of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 and its Distinction from other Trypanosomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999. Vol.94, Suppl. I: 205-210.

de Sousa W, Souto-Padrón T. The Paraxial structure of the flagellum of Trypanosomatidae. *J Parasitol.* 1980. 66: 229-235.

de Souza W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Int Rev on Citol.* 1984: 86:197-283.

de Souza W. A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: From 1909 to 1999. *Memories of Institute Oswaldo Cruz.* 1999. 94 (Suppl.1): 17-36.

de Souza W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current Pharmaceutical Design.* 2002. 8: 269-285.

de Souza W. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. *Kinetoplastid biology and disease*. 2002. Disponible en URL: www.kinetoplastids.com/content/1/1/3.

Docampo R, De Souza W, Miranda K, Rohloff P and Moreno S. Acidocalcisomes- conserved from bacteria to man. *Nat Rev on Microbiol*. 2005. 3: 251-261.

DosReis GA, Freire-de- Lima CG, Nunes MP, Lopes MF. The importance of aberrant T- cell responses in Chagas disease. *Trends Parasitol*. 2005. 21(5): 237-243.

Dumonteil E. Update on Chagas' disease in Mexico. *Salud Pública de México*. 1999. 41: 322-327.

Dutra WO, Rocha MO, Teixeira MM. The clinical immunology of human Chagas Disease. *Trends Parasitol*. 2005. 21(12): 581-587.

Ejchel TF, Ramirez MI, Vargas N, Azevedo EB, Elias MC, Zingales B, Schenkman S. The largest subunit of the RNA polymerase II of *Trypanosoma cruzi* lacks the repeats in the carboxy-terminal domain and is encoded by several genes. *Parasitol Int*. 2003. 52 (3): 243-9.

Elias MC, Marques Porto R, Freymüller E and Schenkman S. Transcription modulation rate through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organization. *Mol and Biochem Parasitol*. 2001. 112 (1): 79-90.

Engel JC, Doyle PS, Hsieh I and McKerrow JH. Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Exp Med*. 1998. 188(4):725-34

Espinoza B and Manning-Cela RG. An overview of mammalian cell infection by *Trypanosoma cruzi*: cellular and molecular basis. Capítulo de libro. *Advances in the Immunobiology of parasitic disease*. 2007, 219-311.

Feagin JE, Abraham JM, Stuart K. Related Articles, Extensive editing of the cytochrome c oxidase III transcript in *Trypanosoma brucei*. *Cell*. 1988. 53(3):413-22.

Ferguson MA, Brimacombe JS, Brown JR, Crossman A, Dix A, Field RA, Güther ML, Milne KG, Sharma DK and Smith TK. The GPI biosynthetic pathway as a therapeutic target for African sleeping sickness. *Biochim Biophys Acta*. 1999. 1455 (2-3): 327-40.

Fernandes A.B. and Mortara R.A. Invasion of MDCK epithelial cells with altered expression of Rho GTPases by *Trypanosoma cruzi* amastigotes and metacyclic trypomastigotes of strains from the two major phylogenetic lineages. *Microbes and Infection*. 2004. 6: 460-467.

Fernandes A. B., I. Neira, A. T. Ferreira, and Mortara R. Cell invasion by *Trypanosoma cruzi* amastigotes of distinct infectivities: studies on signaling pathways. *Parasitology Research*. 2006. 100: 59-68.

Ferreira D., M. Cortez, V. D. Atayde, and N. Yoshida. Actin cytoskeleton-dependent and -independent host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is mediated by distinct parasite surface molecules. *Infection and Immunity*. 2006. 74: 5522-5528.

Fonseca C., Furniel J., De Souza W. and Ulisses T. Participation of host cell actin filaments during interaction of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* with host cells. *Cell Structure and Function*. 2002. 27: 91-98.

Fouts DL, Stryker GA, Gorski KS, Miller MJ, Nguyen TV, Wrightsman RA, Manning JE. Evidence for four distinct major protein components in the paraflagellar rod of *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem*. 1998. 273: 21846-21855.

Franke de Cazzulo BM, Martínez J, North MJ, Coombs GH and Cazzulo JJ. Effects of proteinase inhibitors on the growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol Lett*. 1994. 124 (1): 81-6.

Fresno M, Kopf M and Rivas L. Cytokines and infectious diseases. *Immunology Today*. 1997.18: 56-58.

Frevert U, Schenkman S and Nussenzweig V. Stage-specific expression and intracellular shedding of the cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity*. 1992. 60: 2349-2360.

García ES and Azambuja P. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol Today*.1991. 7: 240-244.

Gibson WC, Miles MA. The karyotype and ploidy of *Trypanosoma cruzi*. *EMBO J*. 1986. 5 (6): 1299-305.

Goncalves M, Umezawa E, Katzin A, De Souza W, Alves MJ, Zingales B, Colli W. *Trypanosoma cruzi*: Shedding of surface antigens as membrane vesicles. *Exp Parasitol*. 1991. 72 (1): 43-53.

Graham SV, Barry JD. Transcriptional regulation of metacyclic variant surface glycoprotein gene expression during the life cycle of *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol*. 1995. 15 (11): 5945-56.

Guhl F, Jaramillo C, Carranza JC y Vallejo G. Molecular Characterization and Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli*. *Archives of Medical Research*. 2002. 33: 362–370.

Gull K. The cytoskeleton of Trypanosomatid Parasites. *Annu Rev Microbiol.* 1999. 53: 629-655.

Guzmán C, García L, Verdugo J, Guerrero S, Torres M, Ramírez C. Riesgo de transmisión de *Trypanosoma cruzi* por transfusión de sangre en México. *Rev Panam Salud Pública.* 1998, vol.4, no.2, p.94-99. ISSN 1020-4989.

Guzmán-Bracho C. Epidemiology of Chagas disease in Mexico: an update. *Trends in parasitology.* 2001. 17: 372-376.

Hamada S., Ito H., Hiraga S., Inagaki K., Nosaki K., Isono N., Yoshimoto Y.,m Takeda Y., Tatsui H. Differential characteristics and subcellular localization of two strat-branching enzyme isoforms encoded by a single gene in *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Biology and Chemistry* 2002; 277: 16538-16546.

Han YG, Kwok BH and Kernan MJ. Intraflagellar transport is required in *Drosophila* to differentiate sensory cilia but not sperm. *Curr Biol.* 2003. 13: 1679-1686.

Harth G, Andrews N, Mills AA, Engel JC, Smith R, McKerrow JH. Peptide-fluoromethyl ketones arrest intracellular replication and intercellular transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 1993. 58(1):17-24.

Hasne M, Barrett MP. Drug uptake via nutrient transporters in *Trypanosoma brucei*. *J Appl Microbiol.* 2000. 89 (4): 697-701.

Haynes PA, Russel DG, Cross GAM. Subcellular localization of *Trypanosoma cruzi* glycoprotein Gp72. 1996. *J Cell Sci.* 109: 2979-2988.

Herrera EM, Ming M, Ortega-Barria E, Pereira ME. Mediation of *Trypanosoma cruzi* invasion by heparan sulfate receptors on host cells and penetrin counter-receptors on the trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol.* 1994. 65 (1): 73-83.

Hill KL. Biology and mechanism of trypanosome cell motility. *Eukaryot Cell*. 2003. 2(2):200-8.

Hudson L, Snary D, Morgan SJ. *Trypanosoma cruzi*: continuous cultivation with murine cell lines. *Parasitology*. 1984. 88: 283-294.

Hunger Glaser I, Seebeck T. Deletion of the genes for the paraflagellar rod protein PFR-A in *Trypanosoma brucei* is probably lethal. *Mol Biochem Parasitol*. 1997. 90: 347-351

Hutchings NR, Donelson JE and Hill KL. Tripanin is a cytoskeletal linker protein and is required for cell motility in African trypanosomes. *J Cell Biol*. 2002. 156: 867-877.

Kapler GM, Coburn CM, Beverley SM. Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobases region sufficient for extrachromosomal replication and expression. *Mol Cell Biol*. 1990. 10: 1084.

Kahn SJ, Wleklinski M, Ezekowitz RA, Coder D, Aruffo A and Farr A. The major surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi* amastigotes are ligands of the human serum mannose-binding protein. *Infection and Immunity*. 1996. 64: 2649-2656.

Kohl L and Bastin P. The Flagellum of Trypanosomes. *Int Rev of Cytol*. 2005. 244: 227-285.

Kohl L and Gull K. Molecular architecture of the trypanosome cytoskeleton. *Mol Biochem Parasitol*. 1998. 93: 1-9.

Kolien AH and Schaub GA. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatomine. *Parasitol Today*. 2000. 16: 381-387.

Kozminski KG, Johnson KA, Forscher P and Rosenbaum JL. A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating. *Proc Natl Acad Sci*. 1993. 90: 5519-5523.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970. 227:680-685.

Landfear M. Molecular genetics of nucleoside transporters in *Leishmania* and African trypanosomes. *Biochem Pharmacol*. 2001. 62 (2): 149-55.

Ley V, Andrews WN, Robbins SE and Nussenzweig V. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* an infective cycle in mammalian cells. *Journal of Experimental Medicine*. 1988; 168: 649-659.

Lugo Caballero Cesar Israel. Identificación de complejos protéicos de *Trypanosoma cruzi* asociados a LYT1p. Tesis de Maestría. 2008. Departamento de Biomedicina. Centro de Investigacion y de Estudios Avanzados del IPN.

Manning-Cela R, Cortés A, González-Reyes E, Van Voorhis WC, Swindle J, González A. LYT1 protein is required for efficient in vitro infection by *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*. 2001. 69 (6): 3916-3923.

Manning-Cela R, González A, Swindle J. Alternative Splicing of *LYT1* Transcript in *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*. 2002. 70 (8): 4726-4728.

Manning-Cela, R. Obtención y análisis de una mutante dominante negativa de *LYT1* de *Trypanosoma cruzi*. 2003. *SIIC Salud*, Sección de expertos invitados.

María TA, Tarufi WL, Brener Z. The Fine Structure of Different Bloodstream Forms of *Trypanosoma cruzi*. *Ann Trop Med Parasitol*. 1972. 66: 423-431.

Marino AP, Silva AA, Pinho RT, Lannes-Vieira J. *Trypanosoma cruzi* infection: a continuous invader-host cell cross talk with participation of extracellular matrix and adhesion and chemoattractant molecules. *Braz J Med Biol Res*. 2003. 36 (8): 1121-33.

Martinez-Ibarra JA, Bárcenas-Ortega NM, Noguera-Torres B, Alejandro-Aguilar R, Lino Rodríguez M, Magallón-Gastélum E, López-Martínez V and Romero-Nápoles J. Role of two *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae, *Triatominae*) species in the transmission of *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) to man in the west coast in México. *Memories of Institute Oswaldo Cruz*. 2001. 96 (2): 141-144.

Mauricio de Mendonca SM, Nepomuceno da Silva JL, Cunha e-Silva N, de Souza W and Gazos Lopes U. Characterization of a Rab11 homologue in *Trypanosoma cruzi*. *Gene*. 2000. 243: 179–185.

McCarthy-Burke C, Taylor ZA, Buck GA. Characterization of the spliced leader genes and transcripts in *Trypanosoma cruzi*. *Gene*. 1989. 82 (1): 177-89.

McConville M, Mullin K, Ilgoutz S and Teasdale R. Secretory pathway of tripanosomatid parasites. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2002. 66 (1): 122-154.

Meirelles MN, Juliano L, Carmona E, Silva SG, Costa EM, Murta AC, Scharfstein J. Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* *in vitro*. *Mol Biochem Parasitol*. 1992. 52 (2): 175-84.

Miles MA, Feliciangeli MD, Rojas de Arias A. American tripanosomiasis (Chagas disease) and the role of molecular epidemiology in puding control strategies. *Biochemistry Journal*. 2003. 326: 1444-1448.

Miranda G, Alves B, Arruda R, Attías M, De Souza W and Carvalho T. The flagellar attachment zone of *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms. *Journal of structural biology*. 2006. 154: 89-99.

Montfort WR, Weichsel A and Andersen JF. Nitrophorins and related antihemostatic lipocalins from *Rhodnius prolixus* and other blood-sucking arthropods. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2000. 1482 (1-2): 110-118.

Montiel G y Diaz G. Respuesta inmune de las células del hospedero a la infección por *Trypanosoma cruzi*. *Rev méd Hosp Nac. Niños*. 2002. vol.37, no.1-2, p.57-63. ISSN 1017-8546.

Moreno SNJ, Silva J, Vercesi AE and Docampo R. Cytosolic free calcium elevation in *Trypanosoma cruzi* is required for cell invasion. *Journal of Experimental Medicine*. 1994; 180: 1535-1540.

Mortara RA. *Trypanosoma cruzi*: amastigotes and tripomastigotes interact with different structures on the surface of HeLa cells. *Exp Parasitol*. 1991. 73: 1-14.

Muhich ML, Boothroyd JC. Synthesis of trypanosome hsp70 mRNA is resistant to disruption of trans-splicing by heat shock. *J Biol Chem*. 1989. 264(13):7107-10.

Mullin KA, Foth BJ, Ilgoutz SC, Callaghan JM, Zawadzki JL, McFadden GI, and McConville MJ. Regulated degradation of an endoplasmic reticulum membrane protein in a tubular lysosome in *Leishmania mexicana*. 2001. *Mol Biol Cell*. 12: 2364–2377.

Murta AC, Persechini PM, Padron Tde S, de Souza W, Guimarães JA, Scharfstein J. Structural and functional identification of GP57/51 antigen of *Trypanosoma cruzi* as a cysteine proteinase. *Mol Biochem Parasitol*. 1990. 43(1):27-38.

Ngo H, Tschudi C, Gull K, Ullu E. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 1998. 95: 14687-14692.

Nozaki T, Cross GAM. Functional complementation of glycoprotein 72 in a *Trypanosoma cruzi* glycoprotein 72 null mutant. *Mol Biochem Parasitol.* 1994. 67: 91-102.

Obara K., Sumi K., Fukuda H. The use of multiple transcription sites causes the dual targeting of Arabidopsis putative monodehydroascorbate reductase to both mitochondria and chloroplasts. *Plant Cell Physiology.* 2002; 43: 695-705.

Ochsenreiter T, Cipriano M, Hajduk SL. KISS: The kinetoplastid RNA editing sequence search tool. *RNA.* 2007. 13:1–4.

Onn I, Kapeller I, Abu-Elneel K and Shlomai J. Binding of the universal minicircle sequence binding protein at the kinetoplast DNA replication origin. *J Biol Chem.* 2006. 281: 37468–37476.

Ortega-Barria E., and M. E. Pereira. A novel *Trypanosoma cruzi* heparin-binding protein promotes fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomes into mammalian cells. *Cell.* 1991. 67: 411-421.

Packchanian A. Chemotherapy of African sleeping sickness. III. Chemotherapy of experimental *Trypanosoma gambiense* and *Trypanosoma rhodesiense* infections in mice with captostibone. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1957. 51(3): 257-64.

Paiva C, Souto Padron T, Costa D and Gatass C. High expression of a functional cruzipain by a non-infective and non-pathogenic *Trypanosoma cruzi* clone. *Parasitology.* 1998. 117:483-490.

Pan SC. *Trypanosoma cruzi* intracellular stages grown in a cell free medium at 37° C. *Experimental Parasitology.* 1978. 115: 215-224.

Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet Infect Dis.* 2001. 1: 92-100.

Pollard JW and Walker John M. Animal Cell Culture. Methods in Molecular Biology. Vol 5. Ed. Humana Press. USA. 1990. 713pp.

Porto Carreiro I, Attias M, Miranda K, De Souza W and Cunha e Silva N. *Trypanosoma cruzi* epimastigote endocytic pathway: cargo enters the cytostome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes. *European Journal of Cell Biology*. 2000. 79: 858-869.

Pung OJ, Banks CW, Jones DN, Krissinger MW. *Trypanosoma cruzi* in wild raccoons, opossums, and triatomine bugs in southeast Georgia, U.S.A. *J Parasitol*. 1995. 81(2):324-6.

Pung OJ, Spratt J, Clark CG, Norton TM, Carter J. *Trypanosoma cruzi* infection of free-ranging lion-tailed macaques (*Macaca silenus*) and ring-tailed lemurs (*Lemur catta*) on St. Catherine's Island, Georgia, USA. *J Zoo Wildl Med*. 1998. 29(1):25-30.

Rassi A Jr, Rassi A and Little W. Chagas' heart disease. *Clinical cardiology*. 2000. 23: 883-889.

Reed S. In vivo administration of recombinant IFN-g induces macrophage activation, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *J Immunol*. 1988. 140: 4342-4347.

Reed SG, Bronwell CE, Russo DM, Silva JS, Grabstein KH and Morrissey PJ. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*. 1994. 153: 3135-3140.

Robinson DR, Scherwin T, Ploubidou A, Byard EH, Gull K. Microtubules polarity and dynamics in the control of organelle positioning, segregation, and cytokinesis in the trypanosome cell cycle. *J Cell Biol*. 1995. 128: 1163-1172.

Rodríguez A, Samoff E, Rioult MG, Chung A, Andrews NW. Host Cell Invasion by *Trypanosomes* Requires Lysosomes and Microtubule/Kinesin-mediated Transport. *The Journal of Cell Biology*. 1996. 134: 349-362.

Rodríguez A., Webster P., Ortego J. and Andrews N. Lysosome behave as Ca²⁺ regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cell. *Journal of Cell Biology*. 1997. 137: 93-104.

Rosenbaum JL and Witman GB. Intraflagellar transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002. 3: 813-825.

Rubin-de-Celis S.S., H. Uemura, N. Yoshida, and S. Schenkman. Expression of trypomastigote trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* increases parasite escape from its parasitophorous vacuole. *Cell Microbiology*. 2006. 8: 1888-1898.

Salazar PM, Bucio M, de Haro I, Tay J and Alonzo T. Reservorios y transmisores de *Trypanosoma cruzi* en el estado de Oaxaca. *Salud Pública de México*. 1987. 29:26-32.

Salazar-Schettino PM, de Haro-Ortega M, Díaz N, Aguilera X, Apt W, Solari A. Chagas Diseases in México. *Parasitol Today*. 1988. 4: 348-352.

Sambrook J, Rusell D. Molecular cloning: A laboratory manual. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New-York USA. 2001.

Reina-San-Martín B, Degrave W, Rougeout C, Cosson A, Chamond N, Corderiro-Da-Silva A, Arala-Chaves M, Coutinho A and Minoprio P. A B-cell mitogen from a pathogenic trypanosome is a eukaryotic proline racemase. *Nature medicine*. 2000. 6 (8): 890-897.

Santori FR, Dorta ML, Juliano L, Juliano MA, da Silveira JF, Ruiz RC, Yoshida N. Identification of a domain of *Trypanosoma cruzi* metacyclic tripomastigote surface molecule gp82 required for attachment and invasion of mammalian cells. *Mol Biochem Parasitol.* 1996. 78 (1-2): 209-216.

Santrich C, Moore L, Sherwin T, Bastin P, Brokaw C, Gull K and LeBowitz JH. A motility function for the paraflagellar rod of *Leishmania* parasites revealed by PFR-2 gene knockouts. 1997. *Mol Biochem Parasitol.* 1997. 90: 95-109.

Scharfstein J, Schmitz V, Morandi V, Capella M, Lima A, Morrot A, Juliano L and Muller W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of Bradikinin β_2 receptors. *Journal of Experimental Medicine.* 2000; 192: 1289-1299.

Schmidt GD, Roberts LS. Foundations of Parasitology. International Edition IE. Times Mirror/Mosby College Publishing. Fourth Edition. USA. 1989.

Schmuñis GA. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. *Transfusion.* 1991. 31: 547-557.

Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007. 102 Suppl 1: 75-85.

Schnauffer A, Panigrahi A, Panicucci B, Igo R, Salavati R, Stuart K, Wirtz L. An RNA ligase essential for RNA editing and survival of the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *Science.* 2001. 291: 2159-2162.

Shapiro TA and Englund PT. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annual Reviews on Microbiology.* 1995. 49: 117-143.

Shenckman S, Robbins SE and Nussenzweig V. Attachment of *Trypanosoma cruzi* to mammalian cells requires parasite energy and invasion can be independent of target cell cytoskeleton. *Infection and Immunity*. 1991. 59: 645-654.

Shenckman S, Jiang SM, Hart WG and Nussenzweig V. A novel cell surface Trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. *Cell*. 1991. 65: 1117-1125.

Shevach EM. Regulatory T cells in autoimmunity. *Annual Reviews in Immunology*. 2000. 18: 423-449.

Shlomai J. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Current Molecular Medicine*. 2004. 4: 623-647.

Silva-Filho MC. One ticket for multiple destinations: dual targeting of proteins to distinct subcellular localizations. *Current Opinion in Plant Biology*. 2003. 6: 589-595.

Soares MJ, Souto-Padron T, Bonaldo MC, Gondenberg S and de Souza W. A stereological study of the differentiation process in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res*. 1989. 75: 522-527.

Soares MJ, De Souza MF, de Souza W. Ultrastructural visualization of lipids in trypanosomatids. *J Protozool*. 1987. 34 (2): 199-203.

Soares MJ, De Souza W. Cytoplasmic organelles of trypanosomatids: a cytochemical and stereological study. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 1988. 20 (2): 349-61.

Soares MJ, Souto-Padrón T, De Souza W. Identification of a large pre-lysosomal compartment in the pathogenic protozoon *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Sci*. 1992. 102 (1): 157-67.

- Soares M.** The reservosome of *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes: an organelle of the endocytic pathway with a role on metacyclogenesis. *Memories of Institute Oswaldo Cruz*. 1999. 94 (Supl.1): 139-141.
- Souto-Padrón T, Competella O, Cazzulo J, De Souza W.** Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization and involvement in parasite host-cell interaction. *Journal of Cell Science* 1990. 96: 485-490.
- Stoppani MA.** Bioquímica de *Trypanosoma cruzi*. *Interciencia*. 1983. 8: 397-404.
- Strobel G., Zollner A., Angemayr M., Bandlow W.** Competition of spontaneous protein folding and mitochondrial import causes dual subcellular location of major adenylate kinase. *Molecular Biology of the Cell*. 2002. 13: 1439-1448.
- Stuart K, Feagin JE, Abraham JM.** Related Articles, RNA editing: the creation of nucleotide sequences in mRNA--a minireview. *Gene*. 1989. 82 (1): 155-60.
- Tafuri WL.** Immunopathology of Chagas Disease – a historical overview. *Mem inst Oswaldo Cruz*. 1999. 94 (suppl 1): 247-248.
- Tanowitz HB, Kirchhokk LV, Simon D, Morris SA, Weis LM, Wittner M.** Chagas diseases. *Clinical Microbiol Rev*. 1992. 5: 400-419.
- Tardieux I, Webster P, Ravesloot J, Boron W, Lunn JA, Heuser J and Andrews N W.** Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. *Cell*. 1992. 71: 1117-1130.
- Tarleton R.** Autoimmune rejection of neonatal heart transplants in experimental Chagas' disease is a parasite-specific response to infected host tissue. *Procedures of National Academy of Science*. 1997. 94: 3932-3937.

Tarleton R. Parasite persistence in the etiology of Chagas disease. *Int J Parasitol.* 2001. 31:550-554.

Tarleton R. Chagas'disease: a role for autoimmunity. *Trends in parasitology.* 2003. 19 (10): 447-451.

Tay J, Schenone H, Sánchez JT, Robert L. Estado actual de los conocimientos sobre la enfermedad de Chagas en la República Mexicana. *Biol Chil.* 1992. 47: 43-53.

Tomlinson S., F. Vandekerckhove, U. Frevert, and V. Nussenzweig. The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH. *Parasitology.* 1995. 110: 547-554.

Torres C, Pérez-Victoria FJ, Parodi-Talice A, Castanys S and Gamarro F. Characterization of an ABCA-like transporter involved in vesicular trafficking in the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Mol Microbiol.* 2004. 54 (3): 632–646.

Torrice F, Heremans H, Rivera MT, Van Marck E, Billiau A, Carlier Y. Endogenous IFN-g is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Immunol.* 1991. 146: 3626-32.

Torrice F, Alonso-Vega C, Suarez E, Rodriguez P, Torrice MC, Dramaix M, Truyens C, Carlier Y. Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. *Am J Trop Med Hyg.* 2004. 70 (2): 201-9.

Tyler KM and Engman DM. Flagellar elongation induced by glucose limitation is preadaptative for *Trypanosoma cruzi* differentiation. *Cell Motility and the Cytoskeleton.* 2000. 46: 269-278.

Tyler KM and Engman DM. The lyfe cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal of Parasitology.* 2001. 31:472-481.

Tsien RY. The Green Fluorescent Protein. *Annu Rev Biochem.* 1998. 67: 509-544.

Umekita LF, Mota I. How are antibodies involved in the protective mechanism of susceptible mice infected with *T. cruzi*? *Braz J Med Biol Res.* 2000. 33 (3): 253-258.

Vanhamme L, Berberof M, Le Ray D, Pays E. Stimuli of differentiation regulate RNA elongation in the transcription units for the major stage-specific antigens of *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res.* 1995. 23 (11): 1862-9.

Vazquez MP and Levin M. Functional analysis of the intergenic regions of TcP2 β gene loci allowed the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector. *Gene.* 1999. 239: 217-225.

Velasco O. La enfermedad de Chagas. Publicación técnica del INDRE, Secretaría de Salud. México D.F. 1991. 8:56.

Vickerman K. Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes. *British Medical Bulletin.* 1985. 41:105-114.

Vida TA and Emr SD. A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J Cell Biol.* 1995. 128: 779–792.

Walder JA, Eder PS, Engman DM, Brentano ST, Walder RY, Knutzon DS, Dorfman DM and Donelson JE. The 35-nucleotide spliced leader sequence is common to all trypanosome messenger RNA's. *Science.* 1986. 233: 569–571.

Webster P and Rusell DG. The flagellar pocket of trypanosomatids. *Parasitology Today.* 1993; 9:201-206.

Wendel, ZS, Rassi. Brener, ME, Camargo A. Chagas Disease American Trypanosomiasis: its impact on transfusion and clinical medicine. Edt. ISBT Brazil, Sao Paulo, Brazil. 1992.

Woolsey AM, Sunwoo L, Petersen CA, Brachmann SM, Cantley LC and Burleigh BA. Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. *Journal of Cell Science*. 2003; 116: 3611-3622.

Woolsey AM and Burleigh BA. Host cell actin polymerization is required for cellular retention of *Trypanosoma cruzi* and early association with endosomal/lysosomal compartments. *Cell Microbiology*. 2004. 6: 829-838.

World Health Organization. Tropical Disease Research, Twelfth Program Report. WHO, Geneva. 1995. 129-133.

Yang F, Moss LG, Phillips GN Jr. Molecular Structure of Green Fluorescent Protein. *Nature Biotechnology*. 1996. 14: 1246-1251.

Yoshida N, Dorta ML, Ferreira AT, Oshiro ME, Mortara RA, Acosta-Serrano A, Favoreto Junior S. Removal of sialic acid from mucin-like surface molecules of *Trypanosoma cruzi* metacyclic tripomastigotes enhances parasite-host cell interaction. *Mol Biochem Parasitol*. 1997. 84 (1): 57-67.

Zago MP, Barrio AB, Cardozo RM, Duffy T, Schijman AG Basombrío MA. Impairment of infectivity and immunoprotective effect of a null mutant of *T. cruzi* at the *LYT1* gene. *Infect Immun*. 2007. 1-30.

Zavala Velázquez J, Barrera Pérez M, Rodríguez Félix ME, Guzmán Marín E and Ruíz Piña H. Infection by *Trypanosoma cruzi* in mammals in Yucatán, México: A serological and parasitological study. *Revista do Instituto de Medicina Tropical do Sao Paulo*. 1996. 38 (4): 289-292.

Zhang L and Tarleton R. Characterization of cytokine production in murine *T. cruzi* infection by in situ immunocytochemistry. Lack of association between susceptibility and Type II cytokine production. *Europ J Immunol.* 1996. 26: 102-109.

Zingales B, Pereira MES, Almeida KA, Umezawa ES, Nehme NS, Oliveira RP, Macedo A, Souto RP. Biological parameters and molecular markers of clone CL Brener - The reference organism of the *Trypanosoma cruzi* genome project. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1997a. 92: 811-814.

Zingales B, Pereira MES, Oliveira RP, Almeida KA, Umezawa ES, Souto RP, Vargas N, Cano MI, Silveira JF, Nehme NS, Morel CM, Brener Z, Macedo A. *Trypanosoma cruzi* genome project: biological characteristics and molecular typing of clone CL Brener. *Acta Trop (Basel).* 1997b. 68: 159-

Zingales B, Rondinelli E, Degrave W, Da Silveira JF, Levin M, Le Paslier D, Modabber F, Dobrokhotov B, Swindle J, Kelly JM, Åslund L, Hoheisel JD, Ruiz AM, Cazzulo JJ, Pettersson U, Frasch AC. The *Trypanosoma cruzi* genome initiative. *Parasitol Today.* 1997c. 13: 16-22.

www.dpd.cdc.gov/dpdx

www.health.gov.mt/impaedcard

www.kinetoplastids.com/content/1/1/3

www.members.tripod.com

www.ovpr.uqu.edu

www.pubmed.com

www.uta.edu/chagas/html/biolTcru.html

www.who.int/ctd/chagas/index.html

ANEXO I.

“La ciencia más útil es aquella cuyo fruto es el más comunicable”.

Leonardo Da Vinci

ANEXO I.
ARTÍCULO I.

Ballesteros-Rodea G, Santillán M, Martínez-Calvillo S, Manning-Cela R. Flagellar motility of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *J Biomed Biotechnol.* 2012; 2012:520380. Epub 2012 Jan 11. Erratum in: *J Biomed Biotechnol.* 2012; 2012:793487.

Hindawi Publishing Corporation
Journal of Biomedicine and Biotechnology
Volume 2012, Article ID 520380, 9 pages
doi:10.1155/2012/520380

Research Article

Flagellar Motility of *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes

G. Ballesteros-Rodea,^{1,2,3} M. Santillán,⁴ S. Martínez-Calvillo,⁵ and R. Manning-Cela¹

¹Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, 07000 México, DF, Mexico

²Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 04510 México, DF, Mexico

³Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca, 68120 Oaxaca, Mexico

⁴Unidad Monterrey, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, 66600 Monterrey, Mexico

⁵FES Iztacala, UBIMED, UNAM, Estado de México, 54090 México, DF, Mexico

Correspondence should be addressed to R. Manning-Cela, rmanning@cinvestav.mx

Received 15 July 2011; Revised 28 September 2011; Accepted 29 September 2011

Academic Editor: Abhay R. Satoskar

Copyright © 2012 G. Ballesteros-Rodea et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The hemoflagellate *Trypanosoma cruzi* is the causative agent of American trypanosomiasis. Despite the importance of motility in the parasite life cycle, little is known about *T. cruzi* motility, and there is no quantitative description of its flagellar beating. Using video microscopy and quantitative vectorial analysis of epimastigote trajectories, we find a forward parasite motility defined by tip-to-base symmetrical flagellar beats. This motion is occasionally interrupted by base-to-tip highly asymmetric beats, which represent the ciliary beat of trypanosomatid flagella. The switch between flagellar and ciliary beating facilitates the parasite's reorientation, which produces a large variability of movement and trajectories that results in different distance ranges traveled by the cells. An analysis of the distance, speed, and rotational angle indicates that epimastigote movement is not completely random, and the phenomenon is highly dependent on the parasite behavior and is characterized by directed and tumbling parasite motion as well as their combination, resulting in the alternation of rectilinear and intricate motility paths.

J Biomed Biotechnol. 2012; 2012:520380. Epub 2012 Jan 11.

Erratum in: *J Biomed Biotechnol.* 2012; 2012:793487.

<http://www.hindawi.com/journals/jbb/2012/520380/>

ARTÍCULO II.

Gilberto Ballesteros-Rodea, Moisés Santillán, Marisa Cruz-Aguilar, Claudia Márquez-Dueñas, Cesar I. Lugo-Caballero, Santiago Martínez-Calvillo, John Swindle, And Rebeca Manning-Cela. Los Productos Alternativos De LYT1 de *Trypanosoma cruzi* Tienen un Patrón de Localización Diferencial. *Revista Veterinaria México*. Vol. 43, Número 1 (Enero-Marzo, 2012). 29-43.



Los productos alternativos de LYT1 de *Trypanosoma cruzi* tienen un patrón de localización diferencial

The alternative products of *Trypanosoma cruzi* LYT1 have different localization patterns

Gilberto Ballesteros-Rodea*** Moisés Santillán*** Marisa Cruz-Aguilar*
 Claudia Márquez-Dueñas* César Israel Lugo-Caballero* Santiago Martínez-Calvillo†
 John Swindle‡ Rebeca Georgina Manning-Cela*

Abstract

LYT1 is a molecule with lytic activity under acidic conditions that, as genetically demonstrated, participates in the infection and stage transition of *T. cruzi*. The differing functions of this protein result from alternative trans-splicing, resulting in proteins that contain either a secretion and nuclear sequence (LYT1s) or the nuclear sequence alone (LYT1n). To determine the localization of different LYT1 products, transgenic parasites expressing LYT1s or LYT1n fused to the enhanced green fluorescence sequence were analyzed. LYT1s-EGFP localized to the flagellum, vacuoles, membrane and regions of the nucleus and kinetoplast; LYT1n-EGFP localized to the nucleus and kinetoplast, and occasionally in vacuoles. These results show that even though different LYT1 products localize to the same sites, they are also found in different intracellular organelles and microenvironments, which could influence their multifunctional behavior.

Key words: FLAGELLUM, TRANSFECTION, PARASITES, INFECTIVITY, ALTERNATIVE TRANS-SPLICING.

Resumen

LYT1 es una molécula con actividad lítica en condiciones ácidas, que según se demostró genéticamente, participa en el proceso de infección y transición de estadio de *T. cruzi*. Su diferente funcionalidad es resultado de la producción de dos proteínas, obtenidas por trans-empalme alternativo, que contienen una secuencia de secreción y una nuclear (LYT1s) o únicamente la secuencia nuclear (LYT1n). Para evaluar la localización de los diferentes productos de LYT1, se analizaron parásitos transgénicos que expresan la secuencia de LYT1s o LYT1n fusionada con la secuencia de la verde fluorescente. LYT1s-EGFP se localiza en flagelo, vacuolas, membrana y región del núcleo y cinetoplasto; mientras que, LYT1n-EGFP se localiza en la región del núcleo y cinetoplasto, y ocasionalmente en vesículas. Estos resultados muestran que aún cuando los distintos productos de LYT1 comparten algunos sitios de localización, también se encuentran en distintos organelos y microambientes intracelulares que podrían influir en su comportamiento multifuncional.

Palabras clave: FLAGELO, TRANSFECCIÓN, PARÁSITOS, INFECTIVIDAD, TRANS-EMPALME ALTERNATIVO.

Recibido el 15 de octubre de 2010 y aceptado el 13 de mayo de 2011.

* Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y Estudios avanzados del IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, col. San Pedro Zacatenco, Delegación Gustavo A. Madero, 07360, México, D.F. Correos electrónicos: gibar90@hotmail.com, mari_cruz77@yahoo.com, caya_tobi@yahoo.com.mx, cesari@mexico.com, rmanning@cinvestav.mx

** Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, 04510, México, D.F. Correo electrónico: gibar90@hotmail.com

*** Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Monterrey, Vía del Conocimiento 201, Parque de Investigación e Innovación Tecnológica, km 9.5 de la autopista nueva al aeropuerto, Apodaca, Nuevo León, 66600, México. Correo electrónico: msantillan@cinvestav.mx

† UBIMED, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. de los Barrios 1, col. Los Reyes Iztacala, Tlalnequapantla, Estado de México, 54090, México. correo electrónico: scalv@campus.iztacala.unam.mx

‡ Comple Gen, Inc, Seattle, WA 98104, USA. Correo electrónico: jtswindle@complegen.com

Responsable de correspondencia: Rebeca G. Manning Cela, Tel.: 57473922, Fax: 57473938, correo electrónico: rmanning@cinvestav.mx

ANEXO II.

“Escribimos para inventarnos un mundo mejor del que conocemos.”

Anais Nin

ANEXO II.**RELACIÓN DE ARTÍCULOS PUBLICADOS**

Ballesteros-Rodea G, Santillán M, Martínez-Calvillo S, Manning-Cela R. Flagellar motility of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *J Biomed Biotechnol.* 2012; 2012:520380. Epub 2012 Jan 11. Erratum in: *J Biomed Biotechnol.* 2012; 2012:793487.

Gilberto Ballesteros-Rodea, Moisés Santillán, Marisa Cruz-Aguilar, Claudia Márquez-Dueñas, Cesar I. Lugo-Caballero, Santiago Martínez-Calvillo, John Swindle, And Rebeca Manning-Cela. Los Productos Alternativos De LYT1 de *Trypanosoma cruzi* Tienen un Patrón de Localización Diferencial. *Revista Veterinaria México.* Vol. 43, Número 1 (Enero-Marzo, 2012). 29-43.

Florencio-Martínez L, Márquez-Dueñas C, **Ballesteros-Rodea G**, Martínez-Calvillo S, Manning-Cela R. Cellular analysis of host cell infection by different developmental stages of *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol.* 2010 Nov; 126(3):332-6. Epub 2010 Apr 28.

Hernández-Osorio LA, Márquez-Dueñas C, Florencio-Martínez LE, **Ballesteros-Rodea G**, Martínez-Calvillo S, Manning-Cela RG. Improved method for in vitro secondary amastigogenesis of *Trypanosoma cruzi*: morphometrical and molecular analysis of intermediate developmental forms. *J Biomed Biotechnol.* 2010; 2010:283842. Epub 2009 Dec 13

APÉNDICE I.

APÉNDICE I.

Secuencia completa del alelo **b** de **LYT1** con un marco de lectura abierto de 1, 659pb, y que codifica para una proteína de 552 aminoácidos.

- [AF320626](#). [Reports](#) *Trypanosoma cruzi*...[gi:12958499]

Features
Sequence

LOCUS AF320626 2289 bp DNA linear INV 22-MAY-2001

DEFINITION *Trypanosoma cruzi* LYT1p (**LYT1**) gene, **LYT1-b** allele, complete cds.

ACCESSION **AF320626**

VERSION AF320626.1 GI:12958499

KEYWORDS .

SOURCE *Trypanosoma cruzi*

ORGANISM *Trypanosoma cruzi*
Eukaryota; Euglenozoa; Kinetoplastida; Trypanosomatidae;
Trypanosoma; *Schizotrypanum*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 2289)

AUTHORS **Manning-Cela,R.**, Cortes,A., Gonzalez-Rey,E., Van Voorhis,W.C., Swindle,J. and Gonzalez,A.

TITLE LYT1 protein is required for efficient in vitro infection by *Trypanosoma cruzi*

JOURNAL *Infect. Immun.* 69 (6), 3916-3923 (2001)

PUBMED 11349059

REFERENCE 2 (bases 1 to 2289)

AUTHORS **Manning-Cela,R.G.**, Cortes,A., Gonzalez-Rey,E., Van Voorhis,W.C., Swindle,J. and Gonzalez,A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (10-NOV-2000) Infection Disease Research Institute, 1124 Columbia Street, Suite 600, Seattle, WA 98104, USA

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..2289
/organism="*Trypanosoma cruzi*"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="CL Brenner"
/db_xref="taxon:5693"

gene <202..>1860
/gene="**LYT1**"
/allele="**LYT1-b**"

mRNA <202..>1860
/gene="**LYT1**"
/allele="**LYT1-b**"
/product="**LYT1p**"

CDS 202..1860
/gene="**LYT1**"
/allele="**LYT1-b**"
/inference="non-experimental evidence, no additional details recorded"
/codon_start=1
/product="**LYT1p**"
/protein_id="**AAK09325.1**"
/db_xref="GI:12958500"

```

/translation="MRKKAALVAPTADTRPTCRGAAIANNFMGRAGPREGVGRSTEM
PAAGPTGSQRSQTQREVKASQDADAAAISYFQSELVTSQSHEGVSP LAKTRANERRN
GEQEREKELPAVGGAVPTGKGTDPKQRLQDL PAMHAEGQNQHGREGDKGVSVKM DSP
GRVQVLEQMLLHLAALNRQLELELELIETRRELTMYKQLLPDVQRQTEAHALSQEHHKAN
SAAPPLMSDERRRQMLFTGQQQQQQVEDLHGGISGWETAARRMRYGYEEGERDALSD
GEGRPRCAGRMGSPKRFLSTQPPRSSRNHRNPHAANGTNGNSHVP HSSRQKSHPTRGA
AVTSVPLAASATNRRGRSMRQHTRPRGPSHLFERLDAEDAIDMLETLKLSLMYRCNHS
HHRSTEGDVV RPAAKPRKGT RSVAPPPPPSMLSSSRKLA AVAGAPACSV SARHGR
NHGVS AVGDP SRGNRVSETARIAHAPSF GKKCAPGLTQLHFSSPSRRATPMKKDTPL
SRGQAAGVA AVAVGGDQLEALQRRYWEQSRAILEQLENMLAAD"
misc_feature      286
                  /gene="LYT1"
                  /allele="LYT1-b"
                  /note="alternate site of translation initiation"

```

ORIGIN

```

1 agtcctttgc tttttat ttt taacctgtaa gtttcatgta aaatgaaaaa tgcggaaacc
61 aaaaggatg gaattacggc gtatgtatgt catccacttc ccatcccctt tacgtgtttc
121 gcaacttgcc cttttgctct ctgccttggt gaagtttccc ctggtttttt ttttttttgt
181 tttgtggccg tgctcgcct catgcggaag aaagccgcag cattagtagc acccacagca
241 gacacacggc cgacgtgccg cggggctgcc attgccaata actttatggg acgtgccggc
301 ccccgtagg gcggtggaag atcaacggag atgccggctg ctggaccgac ggggtctcaa
361 agaagtcaaa cgcaacggga gytgaaagcg tcacaagacg ccgacgcggc ggccattagt
421 agttatttcc agtccgaatt ggtgacatct cagtgcgacg aggggtgtgc tcctctggca
481 aagactaggg ccaacgaacg gcggaacggg gagcaggagc gggagaagga actgccggcg
541 gttggtggcg ccggtccaac tgggaagggg acggacccca aacagcgagt gctgcaggat
601 tcccgagcga tgcacgcgga gggacaaaa cagcacggta gagaggggtga caagggtgtt
661 tccgtgaaga tggactcccc tggtcgcgta caggtgctgg agcaaatggt gctacacctg
721 gctgcattga acagacagct agaattagaa cttatagaaa cgcgacggga actgacgatg
781 tacaagcagc ttttacctga tgtgcagcgc cagaccgagg cccatgcttt gtctcaggag
841 catcacaagg cgaatagtgc tgctccgcca ctgatgtcag atgagaggcg acgacagatg
901 ctcttcacag ggcaacaaca acaacagcaa caagtggaag atctgcatgg cggtattagc
961 ggggtgggaaa cggcagcgag gagaatgcgc tatggttacg aggaggggga gagggacgcc
1021 ctttcagatg gtgagggccg tccacgttgc gcaggtcgta tgggctcccc gaagagattc
1081 ctttcaacac aaccgcctcg aagcagcagg aaccatcgga accctcacgc tgctaacggg
1141 acaaatggca atagtcatgt tccccattcg tccagacaaa aaagtcaccg gacaagagga
1201 gctgctgtaa cttccgtacc gttggcggcg tccgcaacca atcgccgagg tcgttccatg
1261 cgacaacata cccgaccccg cggaccttct catcttttcg aacgcctcga cgctgaggat
1321 gcaattgata tgctggagac cttgaagctc tctctcatgt atcgctgcaa ccaactcgcat
1381 catcgatcaa cagaaggaga tgttgtgcgg cccgcgcgca agccccgga aggcacgcgg
1441 tctgttgcac caccaccgcc accaccgtcc atgttatcat cgtcacaagg aaagcttggc
1501 gccgcagttg ctggagcgcc ggcattgcag gtctcagcac gacacggaag gaaccatggc
1561 gtttctgcgg tgggagatcc gtcaaggggc aatcgagttt cagaaaacagc tcgcatagct
1621 catgctcctt cttttggggg gaagaaatgc gcgcccggcc taaccact ccatttctct
1681 tccccttcca gaagggtac gccgatgaaa aaagacacgc cattgtcacg tggcaagcg
1741 gctggagtag cagcagtagc ggtggcggt gacgggcagc tagaggcact gcagaggcgt
1801 tactgggaac agtcccgtgc gatattggag cagcttgaaa acatgctggc agctgattga
1861 agtctttggc attagggatg acaatcatag tcgttttgca gcttcggtga ggttggtaca
1921 ttctgagaat tgtatctgca cagggtgcag tgatacacac acacacacac acatacaaat
1981 acatgtacac ttatgtgtt tgctatctac caggaggggt gaggagttag tggaaatgag
2041 caagcgggtg aaagttttct tcctcacagt cttccggcga gcggaagagc aggagaatgg
2101 gaagtcaatg ccgagaagaa gaagaagaag aaggaaaaaa aaaaaaata ggaagtaaaa
2161 tgacgttcga ccgtggttaag cataccctt gagtctgga cagattaaac aagccccagg
2221 gtcagaaaaa tgaaaccggg attgaaaaaa aaaaaaaaaa atttcccca gaggagaagt
2281 ttgaaaaaa

```

//