



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**RNA POLIMERASA I DE *Trypanosoma cruzi*: CARACTERIZACIÓN DE LA SEÑAL
DE LOCALIZACIÓN NUCLEAR DE LA SUBUNIDAD RPA31**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ISRAEL FELIPE CANELA PÉREZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

Dr. ROBERTO JOSÉ RAFAEL HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR:

Dra. ROSA LAURA CAMARENA MEJÍA (INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM)

Dra. BERTHA GONZÁLEZ PEDRAJO (INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM)

MÉXICO, D.F. Noviembre, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**RNA POLIMERASA I DE *Trypanosoma cruzi*: CARACTERIZACIÓN DE LA SEÑAL
DE LOCALIZACIÓN NUCLEAR DE LA SUBUNIDAD RPA31**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ISRAEL FELIPE CANELA PÉREZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

Dr. ROBERTO JOSÉ RAFAEL HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR:

Dra. ROSA LAURA CAMARENA MEJÍA (INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM)

Dra. BERTHA GONZÁLEZ PEDRAJO (INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM)

MÉXICO, D.F. Noviembre, 2015

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

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 3 de agosto del 2015, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **ISRAEL FELIPE CANELA PÉREZ** con número de cuenta **303316107** con la tesis titulada **"RNA POLIMERASA I DE *Trypanosoma cruzi*: CARACTERIZACIÓN DE LA SEÑAL DE LOCALIZACIÓN NUCLEAR DE LA SUBUNIDAD RPA31"**, realizada bajo la dirección del **DR. ROBERTO JOSÉ RAFAEL HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ**:

Presidente: Dr. Roberto Coria Ortega
Vocal: Dra. María Soledad Funes Argüello
Secretaria: Dra. Rosa Laura Camarena Mejía
Suplente: Dr. Gabriel López Velázquez
Suplente: Dra. Herminia de Jesús Loza Tavera

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 7 de octubre del 2015.

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



Agradecimientos

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por apoyarme en mi formación académica y científica.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haber apoyado y financiado mis estudios de maestría (beca 363087).

Agradezco al Programa de Apoyo a Proyecto de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), DGAPA, UNAM, por el apoyo financiero del proyecto “RNA POLIMERASA I DE *Trypanosoma cruzi*: CARACTERIZACIÓN DE LA SEÑAL DE LOCALIZACIÓN NUCLEAR DE LA SUBUNIDAD RPA31” (No. IN201014).

Agradezco a los miembros de mi comité tutorial:

Dr. Roberto José Rafael Hernández Fernández

Dra. Rosa Laura Camarena Mejía

Dra. Bertha González Pedrajo

Gracias por su apoyo y sus consejos.

Agradecimientos

De manera muy especial le quiero agradecer a mi tutor, al Dr. Roberto José Rafael Hernández Fernández, del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Por darme sus atinados consejos y compartir conmigo sus conocimientos y experiencia. Le agradezco por guiarme en mi formación científica. Gracias por enseñarme a conservar la calma en los momentos de angustia durante mi trabajo experimental y lograr resolver los problemas con paciencia.

A la Dra. Ana María Cevallos Gaos, del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Le agradezco de manera especial, su apoyo en el manejo de imágenes, sus consejos y enseñanzas.

A la Dra. Imelda López Villaseñor, del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Gracias por sus comentarios y consejos durante los seminarios, fueron muy valiosos para mí.

A mis sinodales, a la Dra. Rosa Laura Camarena Mejía, al Dr. Gabriel López Velázquez, al Dr. Roberto Coria Ortega, a la Dra. Herminia de Jesús Loza Tavera, a la Dra. María Soledad Funes Argüello, por sus valiosos comentarios al revisar mi tesis.

A la M. en C. Juliana Herrera López, le agradezco sus consejos y el apoyo técnico recibido en este trabajo.

Al Dr. Miguel Tapia Rodríguez, le agradezco su apoyo con las imágenes de microscopía.

Al Q.F.B Ernesto Guerrero Sánchez, por la construcción del plásmido pTE.

A la Biol. Bárbara Beatriz Moguel Rodríguez por su ayuda.

A mis compañeros de laboratorio: Ernesto, Felipe Osorio, Andrea, Juliana, Erick, Karla y Olivia. Gracias a todos por su ayuda y consejos.

Dedicatoria

A mis padres Gloria Pérez Rodríguez y Felipe Canela Torres por apoyarme en todo momento.

A mi Hermana Carolina y a mis sobrinos Kaleb y Said.

A mi amiga y compañera de vida Gabriela Rosello por apoyarme incondicionalmente.

A todos mis amigos por brindarme su apoyo.

Dedicado a Charles Darwin, Alfred Russel Wallace, Theodosius Dobzhanski, Jean Baptiste Lamarck, Gregor Mendel, Carolus Linnaeus, Robert Hooke, Anton van Leeuwenhoek, Theodor Schwann, Matthias Schleiden, Rudolf Virchow, Francesco Redi, Louis Pasteur, Stanley Miller, Aleksandr Oparin, John Haldane, Harold Urey, Linus Pauling, Lynn Margulis, Oswald Avery, Martha Chase, Erwin Chargaff, Rosalind Franklin, James Watson, Francis Crick, Matthew Meselson, Franklin Stahl...

ÍNDICE

ABREVIATURAS USADAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABLAS

RESÚMEN 1

ABSTRACT 2

1. INTRODUCCIÓN 3

1.1 *Trypanosoma cruzi*. 3

1.1.1 Ciclo de Vida de *T. cruzi*. 5

1.1.2 Enfermedad de Chagas. 8

1.2 Núcleo celular. 10

1.3 Nucléolo. 12

1.4 Ribosomas y su biogénesis. 15

1.5 RNA Polimerasa I. 17

1.5.1 RPA31. 20

1.6 Señal de localización nuclear. 21

1.7 Importación de proteínas al núcleo celular. 24

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 27

3. HIPÓTESIS 28

4. OBJETIVO 29

4.1 Objetivos Particulares. 29

5. METODOLOGÍA 30

5.1 Cultivos del parásito. 30

5.2 Amplificación. 31

5.3 Preparación de células competentes de *Escherichia coli*. 32

5.4 Clonación de productos amplificados en el Vector pGEM-T-easy y transformación de células competentes. 33

5.5 Extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina. 34

5.6 Construcción del vector pTEX-EGFP-RPA31, pRPA31-NLS-EGFP y pRPA31-DNLS-EGFP.	34
5.7 Transfección de <i>T. cruzi</i> .	35
5.8 Microscopía de fluorescencia.	36
5.9 Inmunorreplicación tipo Western Blot.	36
6. RESULTADOS	38
6.1 Expresión y localización de la proteína de fusión RPA31-EGFP en epimastigotes de <i>T. cruzi</i> .	38
6.2 Expresión de RPA31-EGFP en fase de crecimiento exponencial y fase estacionaria.	41
6.3 Análisis <i>in silico</i> para la predicción de señales de localización nuclear (NLS) de las subunidades de la RNA Pol I de <i>T. cruzi</i> .	44
6.4 Alineamiento de las secuencias proteicas ortólogas de RPA31 en distintos miembros de la familia Trypanosomatidae y sus señales de localización nuclear.	46
6.5 Alineamiento de NLSs monopartitas de RPA31 en distintos miembros de la familia Trypanosomatidae.	48
6.6 Evaluación de la NLS de RPA31.	49
7. Discusión	53
8. Conclusiones	58
9. Perspectivas	59
10. Referencias	60
11. Apéndice	72

ABREVIATURAS USADAS

aa	Aminoácidos
°C	Grados Celsius
µg	microgramo(s)
µL	microlitro(s)
µm	micrómetro(s)
µM	micromolar
cNLSs	Señales de localización nuclear clásicas
kDNA	DNA del cinetoplasto
rDNA	DNA ribosomal
h	hora(s)
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
kb	kilobases
kDa	kilodaltones
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
LIT	Medio de cultivo de infusión de hígado y triptona
min	minutos
M	Molar
mL	mililitro(s)
mM	milimolar
NLS	Señal de localización nuclear
ng	nanogramo(s)
nm	nanómetro(s)
pb	pares de bases
pre-RNA	ARN precursor
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

RNA Pol	ARN Polimerasa
RNasa	Ribonucleasa
rRNA	RNA ribosomal
RRM	Motivo de reconocimiento a RNA

Lista de aminoácidos y sus abreviaturas

NOMBRE	SÍMBOLO
Alanina	A
Arginina	R
Asparagina	N
Aspartato	D
Cisteína	C
Glutamina	Q
Ácido glutámico	E
Glicina	G
Histidina	H
Isoleucina	I
Leucina	L
Lisina	K
Metionina	M
Fenilalanina	F
Prolina	P
Serina	S
Treonina	T
Triptófano	W
Tirosina	Y
Valina	V

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación de un epimastigote de <i>T. cruzi</i> .	4
Figura 2. Representación de los diferentes estadios presentes en <i>T. cruzi</i> .	7
Figura 3. Signo de Romaña ocasionado por la infección con <i>T. cruzi</i> .	9
Figura 4. Arquitectura nuclear típica de una célula de mamífero.	11
Figura 5. Ultraestructura del material nuclear de <i>T. cruzi</i> .	13
Figura 6. Fotografías de microscopía electrónica del nucléolo de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> durante fase de crecimiento exponencial y estacionaria.	14
Figura 7. Esquema que representa el cistrón ribosomal de tripanosomátidos y <i>S. cerevisiae</i> .	16
Figura 8. Modelaje de la RNA Pol I de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> al interactuar con el rDNA y con los factores de transcripción específicos.	18
Figura 9. Predicción estructural de la proteína RPA31 de <i>T. cruzi</i> usando el programa SWISS MODEL.	20
Figura 10. Importación nuclear canónica en eucariontes de proteínas con NLS.	26
Figura 11. Inmunorréplica tipo Western blot de lisado de epimastigotes transfectados con EGFP y con RPA31-EGFP.	39
Figura 12. Microscopía de fluorescencia de epimastigotes transfectados con EGFP y RPA31-EGFP.	40
Figura 13. Inmunorréplica tipo Western blot de lisado de epimastigotes transfectados con RPA31-EGFP en fase de crecimiento exponencial y estacionaria.	42
Figura 14. Microscopía de fluorescencia de epimastigotes transfectados con RPA31-EGFP.	43
Figura 15. Alineamiento de las secuencias proteicas ortólogas de RPA31 en distintos miembros de la familia Trypanosomatidae.	47
Figura 16. Alineamiento entre las secuencias de las señales de localización nuclear monopartitas de las proteínas ortólogas de RPA31 predichas con PSORT II.	48

- Figura 17. Secuencia codificante del gen RPA31 de *T. cruzi*. **50**
- Figura 18. Representación esquemática de las construcciones para evaluar la NLS de RPA31. **51**
- Figura 19. Microscopía de fluorescencia de epimastigotes transfectados con EGFP, RPA31-EGFP, pRPA31-NLS-EGFP (NLS) y pRPA31-DNLS-EGFP (Δ NLS). **52**

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Subunidades de la RNA Pol I en <i>T. cruzi</i> , <i>T. brucei</i> y <i>S. cerevisiae</i> .	19
Tabla II. Ejemplos de diferentes tipos de señales de localización nuclear.	23
Tabla III. Oligonucleótidos requeridos para la construcción de las proteínas recombinantes.	31
Tabla IV. Análisis <i>in silico</i> de la predicción de las señales de localización nuclear (NLS) de las subunidades que conforman a la RNA Pol I de <i>T. cruzi</i> .	45
Tabla V. Señales de localización nuclear reportadas en <i>T. cruzi</i> .	55
Tabla VI. Señales de localización nuclear encontradas en este trabajo.	56

RESUMEN

Trypanosoma cruzi es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas. En nuestro laboratorio existe un interés por estudiar la biogénesis ribosomal en este organismo. En este trabajo se describen aspectos generales de la expresión y localización nucleolar de la proteína TcRPA31, que es específica de tripanosomátidos y que forma parte del complejo de proteínas de la RNA polimerasa I (RNA Pol I), que en eucariontes transcribe al RNA ribosomal (rRNA). Versiones quiméricas de RPA31 fusionadas a la proteína fluorescente EGFP fueron expresadas ectópicamente desde un vector episomal de transfección. Epimastigotes de cultivos transgénicos mostraron una señal fluorescente en el nucléolo de células en crecimiento exponencial. Durante la fase estacionaria de cultivo, donde los nucléolos han demostrado ser pequeños y con muestras de poca actividad biosintética de rRNA, la señal derivada de RPA31-EGFP se observó ocupando todo el nucleoplasma de la célula. Los niveles totales de expresión de la proteína transgénica no mostraron ser diferentes en estas dos condiciones de proliferación (crecimiento exponencial y fase estacionaria). Finalmente, por deleciones génicas, se demostró la participación del motivo deca-peptídico Pro, Ile, Arg, Lys, Thr, Arg, Ala, Lys, Lys, Glu en la retención nuclear de RPA31-EGFP. Aparentemente, este motivo es reconocido como una señal de localización nuclear (NLS), y su presencia en RPA31 permitirá el uso de esta proteína como un modelo molecular apropiado para estudiar el sistema molecular de transporte intranuclear en este grupo importante de protozoarios parásitos.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is the etiologic agent of Chagas disease. In our laboratory the study of ribosomal biogenesis in this organism is of special interest. In this study, we described general aspects about the nuclear expression and location of the TcRPA31 protein. This protein is specific of trypanosomatids and is part of the multiproteic complex of the RNA polymerase I (RNA Pol I), which is known that in eucaryotes transcribes ribosomal RNAs (rRNA). Chimeric versions of RPA31 fused to an enhanced green fluorescent protein (EGFP) were ectopically expressed from a transfected episomal vector. Epimastigotes from transgenic cultures showed a fluorescent signal in the nucleolus of exponential growth cells. In the stationary phase of the culture, when the nucleolus has been demonstrated to be small and the rRNA biosynthetic activity is low, the signal from RPA31-EGFP filled the cell nucleoplasm. The total levels of the transgenic protein expression were not shown to be different in the two proliferation conditions (exponential growth and stationary phase). Finally, by genic deletions we demonstrated that the presence of the deca-peptidic motif Pro, Ile, Arg, Lys, Thr, Arg, Ala, Lys, Lys, Glu was required for the nuclear retention of RPA31-EGFP. Apparently, this motif is recognized as a nuclear location signal (NLS) and its presence in RPA31 allow to use this protein as an appropriate molecular model for the study of the molecular system of intranuclear transport in this important protozoal parasite.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi es un organismo eucarionte unicelular perteneciente al reino protista, formando parte del phylum *Euglenozoa* y clasificado dentro de la familia Trypanosomatidae (Lukeš *et al.*, 2014; Deschamps *et al.*, 2011). *T. cruzi* es de gran importancia médica ya que es el agente causante de la enfermedad de Chagas y también resulta ser un modelo biológico interesante ya que tiene estructuras atípicas en su composición celular (Steverding, 2014; De Souza *et al.*, 2010). En su estructura subcelular se puede observar principalmente la presencia de un núcleo, un cinetoplasto y un flagelo (Figura 1). El cinetoplasto es DNA extranuclear en una región bien definida dentro de la mitocondria, formando una estructura de barra redondeada bajo la base flagelar. El DNA del cinetoplasto (kDNA) puede llegar a formar el 30 % de DNA celular, acomodado en una red de 20,000 a 30,000 minicírculos de kDNA (Wanderley de Souza, 1999; Jensen y Englund, 2012).

La secuencia del genoma de *T. cruzi*, fue publicada en el 2005, reveló que el genoma diploide tiene 60 ~ kb. El 50 % del genoma consiste en secuencias repetidas y contiene 22, 570 genes codificadores de proteínas (El-Sayed *et al.*, 2005).

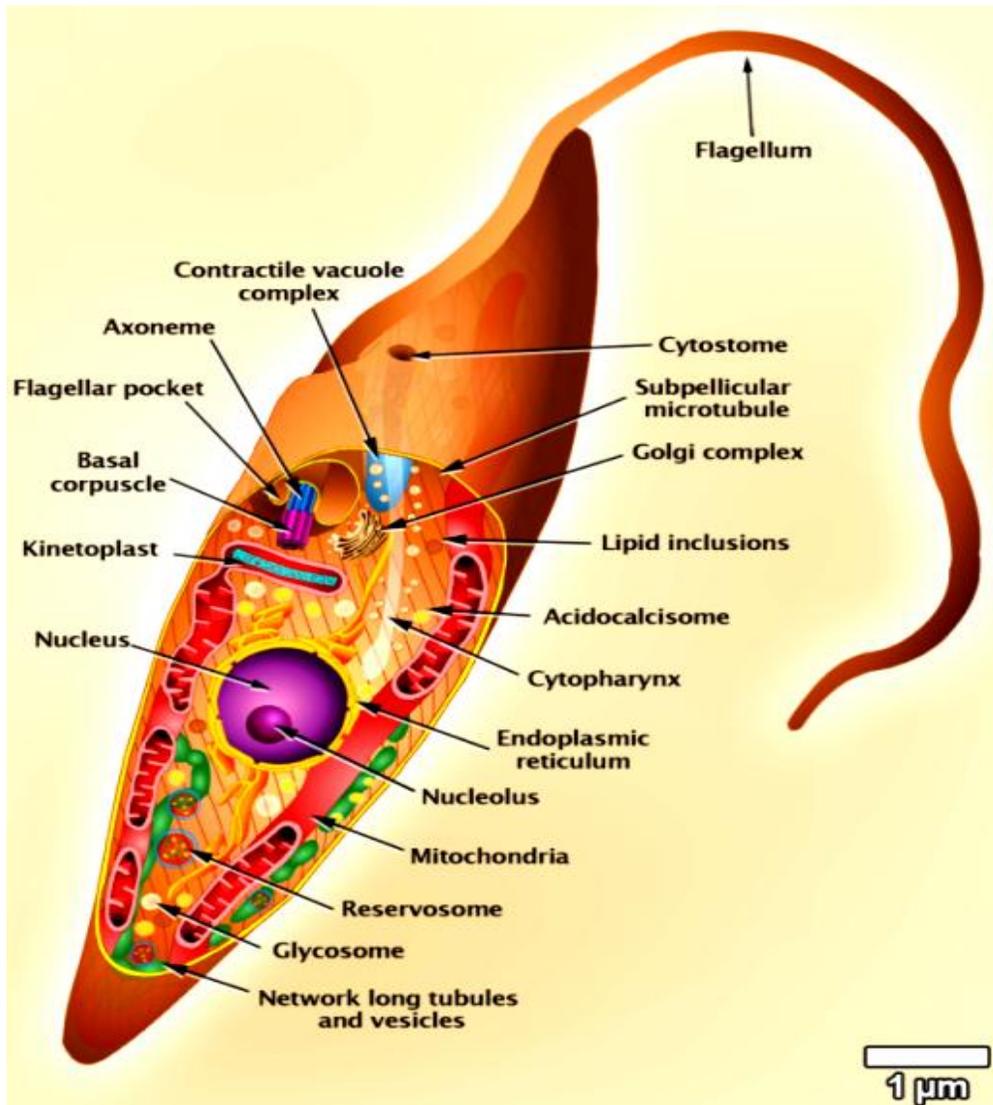


Figura 1. Representación de un epimastigote de *T. cruzi* (Tomado de Teixeira et al., 2012)

1.1.1 Ciclo de vida de *T. cruzi*.

El desarrollo de *T. cruzi* ocurre a través de un ciclo de vida complejo, caracterizado por varias etapas de desarrollo las cuales transcurren en dos hospederos: un mamífero y un insecto (De Souza, 1984, Schofield y Galvao, 2010). Los vectores invertebrados del parásito son insectos hemípteros hematófagos de la subfamilia Triatominae, comúnmente llamados triatominos, entre los que predominan las especies *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *Panstrongilus megistus*, *Triatoma dimidiata* entre otros (Schettino *et al.*, 2005; Zárate y Zárate, 1985). Estos insectos se alimentan al succionar la sangre de un mamífero que puede estar infectado con *T. cruzi*, entonces los tripomastigotes sanguíneos son ingeridos por el insecto. Los tripomastigotes se diferencian a epimastigotes en el estómago del insecto, posteriormente al encontrarse en el intestino se reproducen y se acumulan. En el recto del insecto cierta porción de epimastigotes se diferencian a tripomastigotes metacíclicos que son capaces de infectar a un mamífero al ser liberados en el excremento del insecto (Storino, *et al.*, 1994; Garcia, *et al.*, 1991). *T. cruzi*, además de infectar al humano, infecta a otros mamíferos entre los que se encuentran: perros, gatos, armadillos, tlacuaches, ratas, ardillas, entre otros, que actúan como reservorios naturales del parásito (Cruz-Reyes y Pickering-López, 2006; Velasco-Castrejón y Rivas-Sánchez, 2008).

Existen diferentes estadios en el ciclo de vida de *T. cruzi* (Figura 2) los cuales se describen a continuación:

Epimastigote: forma elongada con dimensiones de 20-40 μm de largo, el flagelo se origina próximo y por delante del núcleo, emerge por un costado del cuerpo del parásito, arrastra la membrana citoplasmática en un corto trayecto dando la imagen de una membrana ondulante corta que se libera por el extremo anterior de parásito, el cinetoplasto está localizado anterior al núcleo; este estadio se desarrolla en el insecto vector y constituye una de las formas proliferativas del *T. cruzi*.

Amastigote: forma esférica u ovalada aproximadamente de 2-4 μm que carece de flagelo y es el estadio replicativo e intracelular del parásito en las células de mamífero.

Esferomastigote: forma esférica con flagelo extracelular que bordea el cuerpo del parásito, éste es un estadio replicativo presente en el estómago del insecto vector.

Tripomastigote: forma elongada de 20-25 μm de largo con un diámetro de 2 μm , el cinetoplasto situado posterior al núcleo con el flagelo naciente en su proximidad y emerge por un costado del cuerpo del parásito, se libera por el extremo anterior creando la imagen de una membrana ondulante de importante extensión. Este estadio se encuentra en la sangre del mamífero, en el intestino posterior, el excremento y orina del insecto vector. Este estadio carece de capacidad replicativa (De Souza, 1984).

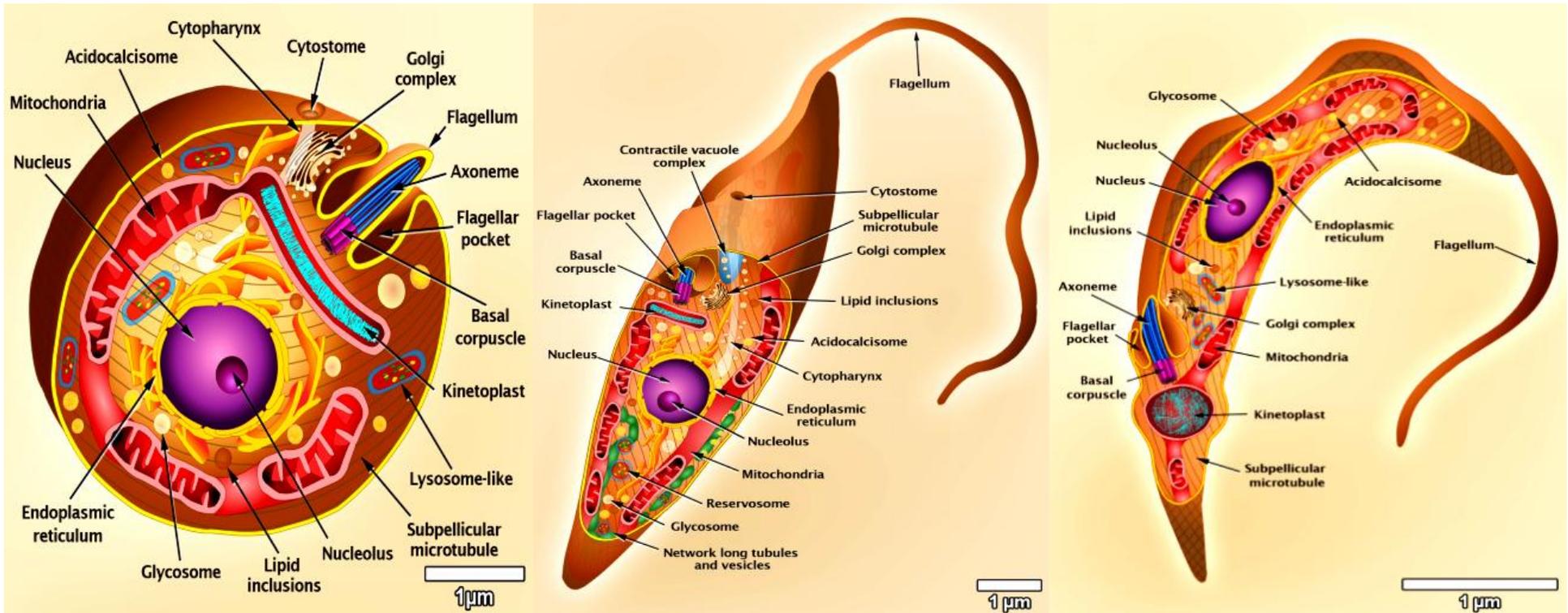


Figura 2. Representación de los diferentes estadios presentes en *T. cruzi*. a) Amastigote; b) Epimastigote; c) Tripomastigote (Imágenes tomadas de Teixeira *et al.*, 2012)

1.1.2 Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas también conocida como tripanosomiasis Americana es una enfermedad infecciosa que afecta principalmente a la población de América Latina (OMS, 2015). Esta enfermedad es causada por el parásito *T. cruzi*, el cual es transmitido al humano cuando es picado por el insecto vector que típicamente defeca después de alimentarse con la sangre. Sus heces contienen al parásito *T. cruzi* y a través de laceraciones en la piel, el parásito penetra en el huésped (Clayton, 2010, Macedo *et al.*, 2004; Lazzari *et al.*, 2013). En México se han reportado vectores como *Triatoma dimidiata* en el estado de Chiapas, *R. prolixus* y *T. dimidiata* en Veracruz y *T. phyllosoma* en Oaxaca (Villalobos *et al.*, 2011).

Otras maneras de infección que han sido reportadas son la transfusión sanguínea, trasplante de órganos, alimentación con leche materna, congénitamente por parasitemia de la madre, por alimentos y bebidas infectadas con las heces del insecto vector (Steverding, 2014, Norman y López-Veles, 2013; Cevallos y Hernández, 2014).

Existen dos fases durante la enfermedad de Chagas que han sido caracterizadas como fase aguda y fase crónica (Weiser, 2011). La fase aguda comienza de 6 a 10 días después de la infección y dura de 4 a 8 semanas (Myles, 2009), en esta etapa se presenta una reacción inflamatoria aguda, alta parasitemia y una corta etapa clínica (Carod-Artal, 2013). En niños se ha reportado fiebre, anorexia, diarrea, fallas cardíacas y linfadenopatía (Pinto *et al.*, 2008). En el caso de entrar por el ojo, se observa una inflamación periorbital conocida como signo de Romaña (Myles, 2009; Delaporte, 1997) (Figura 3).

Aproximadamente 30 % de las personas infectadas con *T. cruzi* desarrollan la etapa crónica de la enfermedad cuyos signos pueden aparecer 30 días después de la infección inicial (Prata, 2001). Los órganos cardíacos y gastrointestinales son comúnmente afectados durante esta etapa, los daños reportados son

disturbios microvasculares, cardiomiopatía e incremento en el diámetro de órganos gastrointestinales (Nunes *et al.*, 2009; Troncon *et al.*, 2000).



Figura 3. Signo de Romaña ocasionado por la infección con *T. cruzi* (Tomado de <http://www.cdc.gov/globalhealth/ntd/diseases/otherNTDs.html>)

1.2 Núcleo celular

El núcleo es un organelo membranoso que contiene el genoma celular y en el que ocurren eventos importantes como: la replicación del DNA, la transcripción y el procesamiento del mRNA. La envoltura nuclear consiste en dos bicapas lipídicas, la membrana externa y la membrana interna que se encuentran separadas por un espacio perinuclear que continúa con el lumen del retículo endoplásmico. El núcleo contiene poros que atraviesan la envoltura nuclear en sitios donde la membrana interna y externa se fusiona, proporcionando un medio de comunicación entre el citoplasma y nucleoplasma (Wagner *et al.*, 1990; Cooper y Hausman, 2010; Floch *et al.*, 2014; Clark, 2010).

El núcleo de mamíferos tiene varios componentes subnucleares entre los que se encuentran el nucléolo, el compartimento perinucleolar, los cuerpos de cajal (CBS) y cuerpos de leucemia promielocítica (PML) (Cremer y Cremer, 2001; Misteli, 2011) (Figura 4).

El núcleo de *T. cruzi* es esférico y tiene una organización estructural parecida a la de otros eucariontes, con una envoltura nuclear provista con complejos de poro nuclear. La membrana nuclear externa continúa con el retículo endoplásmico. En tripomastigotes, el núcleo es elongado y situado en la parte central de la célula. Tiene un evidente nucléolo que se encuentra en la parte central al reproducirse en el insecto vector como un epimastigote y en el citoplasma de células de mamífero como un amastigote (de Souza y Meyer, 1974; de Souza, 2002; Souza, 2009; De Souza, 1984). Se sabe que bajo condiciones de inanición, cuando ocurre la transformación de epimastigotes a tripomastigotes y también amastigotes a tripomastigotes el tamaño de la célula se reduce dramáticamente con un cambio muy notable en la forma y organización nuclear, mostrando un decremento en su actividad transcripcional (Elias *et al.* 2001).

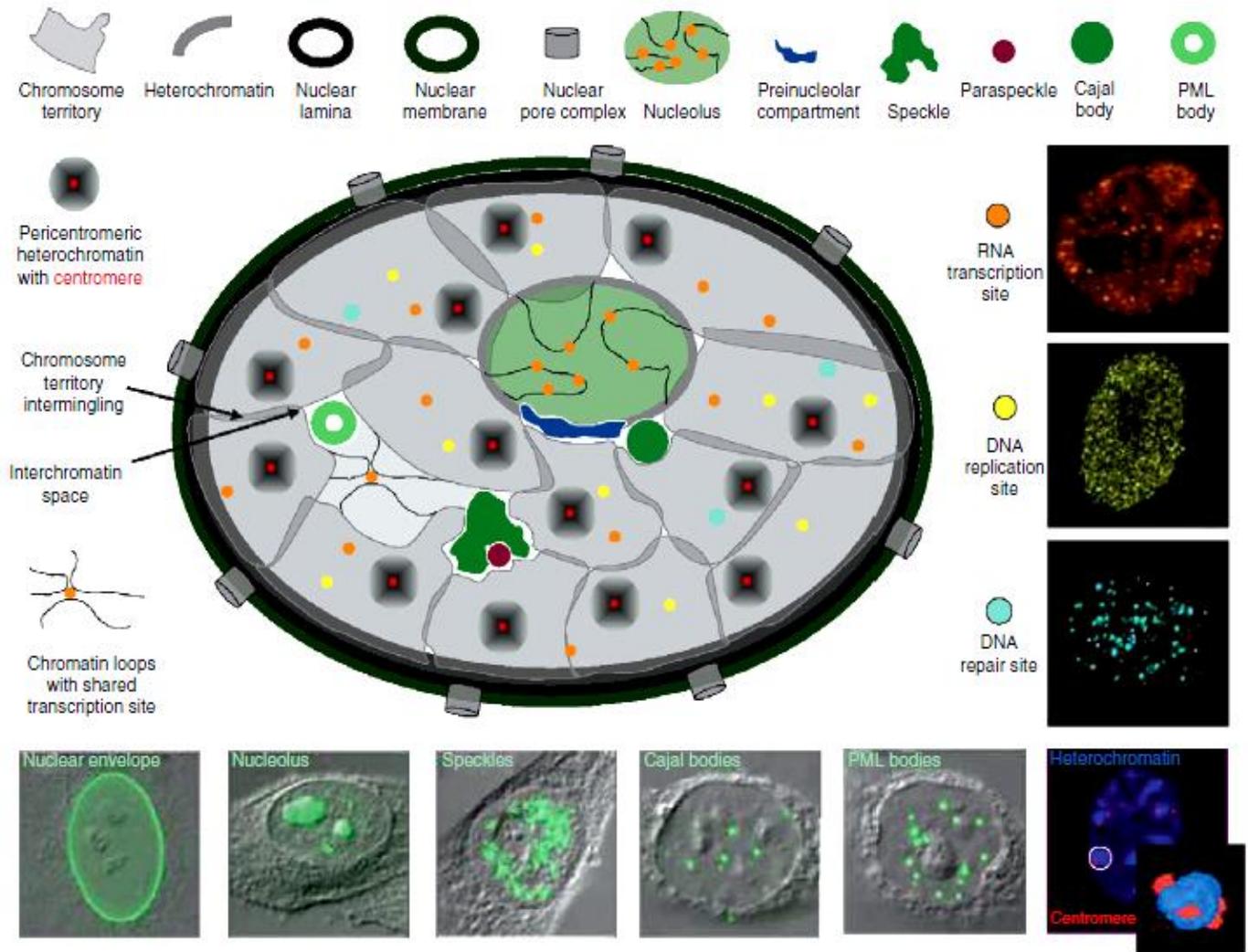


Figura 4. Arquitectura nuclear típica de una célula de mamífero. Contiene cromatina en forma de territorios cromosomales que pueden tener contacto entre ellos en sus fronteras o dejar espacios intercromatinianos (blanco). La heterocromatina constitutiva (gris oscuro en el esquema y azul en la imagen del extremo inferior derecho) es principalmente encontrada como cromatina pericentromérica, en parches a través del nucleoplasma, en la periferia nuclear y alrededor del nucléolo. En la periferia nuclear se observa la membrana nuclear (verde oscuro) y los complejos de poro nuclear (cilindros grises). Bucles de cromatina de los territorios cromosomales asociados a las maquinarias de transcripción, se encuentran en el nucléolo y el nucleoplasma (puntos anaranjados). Se observan los sitios de replicación (amarillo) y sitios de reparación del DNA (azul claro). En el panel inferior se observan distintos cuerpos nucleares mediante inmunofluorescencia en microscopio confocal (Tomado y modificado de Lenser *et al.*, 2010).

1.3 Nucléolo

En el interior del núcleo celular los cromosomas ocupan territorios específicos formando grupos de genes que son reconocidos por la maquinaria transcripcional (Misteli, 2011). Uno de estos territorios es el nucléolo, que es la estructura ribonucleoproteica más prominente al visualizar el núcleo de la mayoría de células eucariontes (Jiménez-García *et al.*, 2008). El nucléolo tiene una estructura organizada para la producción de rRNA y finalmente para la fabricación de los ribosomas (Mélèse y Xue, 1995). En mamíferos la ultraestructura del nucléolo consta de centros fibrilares (FC), el componente fibrilar denso (DFC) y el componente granular (GC) (Mosgoeller, 2004; Olson, 2010). Los FC contienen agrupamientos de factores de transcripción de la RNA Pol I tal como el factor de unión río arriba (UBF) y los genes que codifican para el rRNA. El DFC contiene factores de procesamiento temprano de pre-rRNA y el GC es el sitio de procesamiento tardío del pre-rRNA y ensamblaje de subunidades ribosomales.

El nucléolo de tripanosomátidos no está estructurado en estos tres componentes como en células de mamífero, sino que presenta solo dos, el componente granular y el fibrilar denso (Ogbadoyi *et al.*, 2000; López-Velázquez *et al.*, 2005). En *T. cruzi* se ha logrado observar un cuerpo fibrogranular dentro del nucleoplasma rodeado por partículas nucleares (fibras y gránulos) y cromatina compacta. *T. cruzi* no presenta centros fibrilares, sin embargo los componentes fibrilares y granulares están distribuidos como una red continua a través del nucléolo (López-Velázquez *et al.*, 2005) (Figura 5). De forma importante, se ha demostrado que el nucléolo de *T. cruzi* se reduce de tamaño y la tasa de transcripción se ve disminuída durante la transición de la forma proliferativa (epimastigote) a no proliferativa (tripomastigote) (Elias *et al.*, 2001). En el grupo del Dr. Roberto Hernández, se demostró que epimastigotes de *T. cruzi* presentan un área nucleolar dos veces mayor en fase de crecimiento exponencial comparada con respecto a su tamaño en la fase estacionaria (Nepomuceno *et al.*, 2010) (Figura 6).

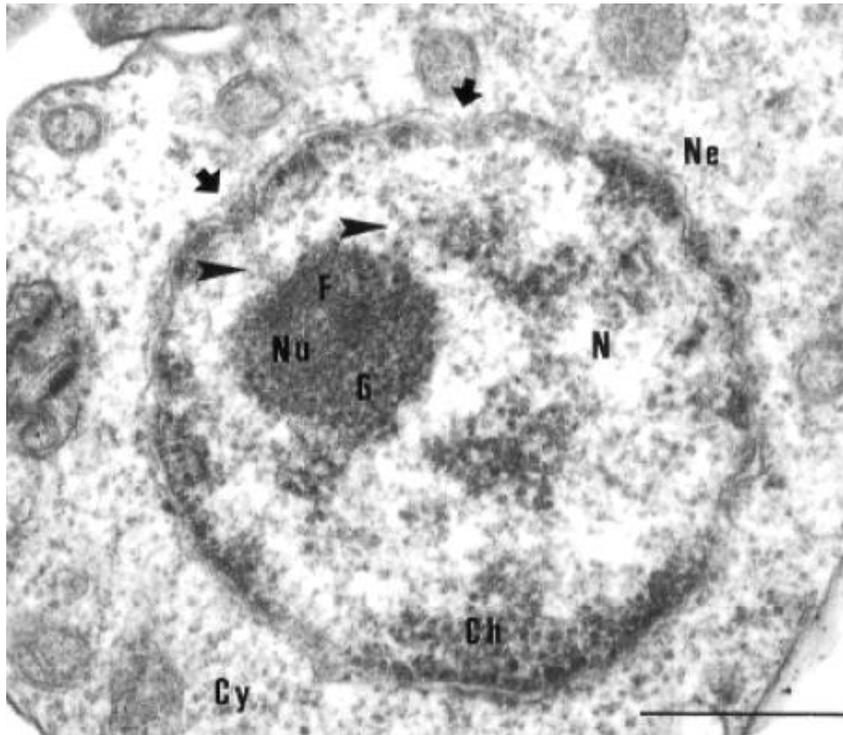
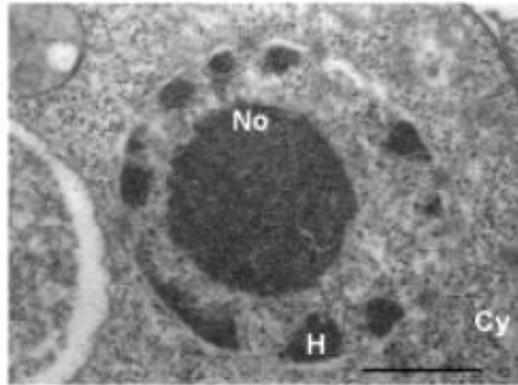
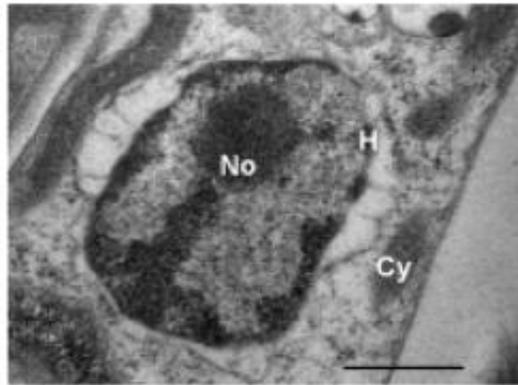


Figura 5. Ultraestructura del material nuclear de *T. cruzi*. Ch: Cromatina; Cy: citoplasma; F: Componente fibrilar; G: Componente granular; Ne: envoltura nuclear; N: núcleo; Nu: nucléolo; Barra 500 nm (Tomado de López-Velazquez *et al.*, 2005). Las flechas completas indican los complejos de poro nuclear y las cabezas de flecha indican las partículas nucleares que se desprenden del nucléolo.

Exponential



Stationary



Bars = 0.5 μ m

Figura 6. Fotografías de microscopía electrónica del nucléolo de epimastigotes de *T. cruzi* durante fase de crecimiento exponencial y estacionario. No, nucléolo; H, heterocromatina; Cy, citoplasma (Tomado de Nepomuceno *et al*, 2010).

1.4 Ribosomas y su biogénesis.

Los ribosomas son la maquinaria encargada de la síntesis de proteínas y están formados por un complejo ribonucleoproteico. Los ribosomas están compuestos por una subunidad pequeña y una subunidad grande que se mantienen juntas formando un complejo de una masa de varios millones de daltons (Ramakrishnan, 2014). Los ribosomas eucariontes contienen alrededor de 49 proteínas en la subunidad 60S (LSU) y los RNA ribosomales 28S, 5.8S y 5S, mientras que la subunidad 40S (SSU) contiene alrededor de 33 proteínas y el RNAr 18S. Sin embargo, el número de proteínas varía dependiendo la especie (Warner, 1999). En mamíferos los genes de RNAr consisten en repeticiones de la secuencia codificante de las subunidades 18S, 5.8S y 28S, separadas por regiones espaciadoras internas y externas que se transcriben (ITS y ETS). También tiene espaciadores intergénicos no transcritos (Raska et al., 2004; Fatica y Tollervey, 2002)

El cistrón ribosomal de *T. cruzi* tiene una organización muy particular en un patrón de moléculas de RNAr más complejo (Figura 7). El gen que en otros eucariontes codifica para el rRNA 28S, en *T. cruzi* presenta una discontinuidad interna que genera la liberación de las moléculas 24S α y 24S β . En el cistrón también se encuentran codificadas 5 moléculas pequeñas de RNAr (small RNAr) que son: S1, S2, S3 (esta última equivalente a la subunidad 5.8S de RNAr de otros eucariontes), S4, S6. La molécula pequeña S5 representa al RNAr 5S, que también forma parte de la subunidad ribosomal mayor. Ésta se encuentra codificada como copias en tándem en una región distinta del genoma (Hernández-Rivas et al., 1988; Calvillo et al., 2010, Hernández et al., 1993).

En *T. brucei* se ha logrado encontrar que la biogénesis del RNAr 5S involucra proteínas que se encuentran exclusivamente en tripanosomas como son P34 y P37 que resultan ser esenciales para el parásito (Ciganda y Williams, 2012).

Un fenómeno interesante que se ha descrito en tripanosomátidos es que la biogénesis ribosomal disminuye cuando los parásitos alcanzan la fase de crecimiento estacionario (Nardelli *et al.*, 2007, Cevallos *et al.*, 2005).

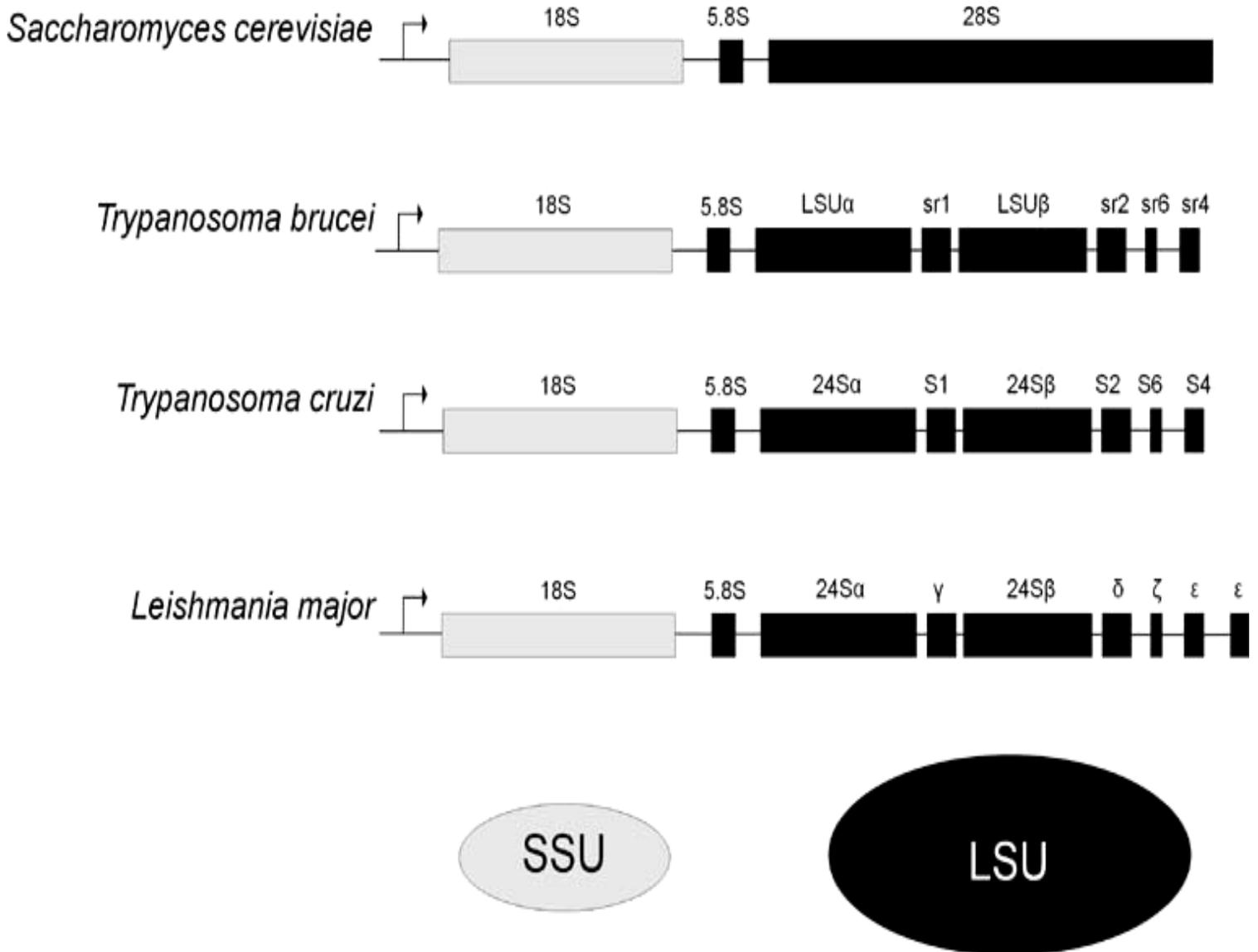


Figura 7. Esquema que representa el cistron ribosomal de tripanosomátidos y *S. cerevisiae* como referencia. La caja gris representa a las subunidad menor (SSU), mientras que las cajas negras representan la subunidad mayor (LSU) (Tomado de Hernández y Cevallos, 2014).

1.5 RNA Polimerasa I

La RNA Pol I en complejo con los factores asociados UBF y SL1 es responsable de la síntesis de rRNA. En el nucleólo, la RNA Pol I es responsable de transcribir la unidad de RNAr 18S, 5.8S y 28S y su actividad representa la mayor transcripción total en la célula (Russel y Zomerdijk, 2006). La actividad transcripcional por la RNA Pol I de los genes de rDNA y la biogénesis ribosomal representan una gran inversión energética, por lo que este proceso se encuentra regulado. También en el nucleólo se lleva a cabo el procesamiento del RNAr, las modificaciones post transcripcionales y el ensamblaje de las subunidades pre-ribosomales (Gourse, *et al.* 1996; Moss, *et al.*, 2002; Thiry, *et al.*, 2005; Uliel *et al.*, 2004). La RNA Pol I de levadura está conformada por ~14 subunidades, las subunidades RPB5, RPB6, RPB8, RPB10 y RPB12 son compartidas con la RNA Pol II y la RNA Pol III. Mientras que AC40 y AC19 se comparten con la RNA Pol III. Sin embargo, también se han encontrado subunidades específicas de la RNA Pol I las cuales son A190, A135, A49, A43, A 34.5, A14 y A12.2 (Vannini y Cramer, 2012) (Figura 8). La RNA Pol I de *T. brucei* está compuesta por ~12 subunidades entre las que se encuentran RPA1, RPA2, RPC40, RPB5z, RPB6z, RPB8, RPC19, RPB12, RPB10z, RPA12 y RPA31 (Nguyen, 2007). Es importante destacar que *T. brucei* es la especie en la que más se han realizado estudios relacionados con las subunidades de la RNA Pol I; en este parásito se ha logrado observar señal de fluorescencia en nucleólo de las subunidades RPB5z y RPB6z fusionadas a GFP (Devaux *et al.*, 2007). Para *T. cruzi* sólo se disponen a la fecha de asignaciones bioinformáticas de genes ortólogos (Tabla I).

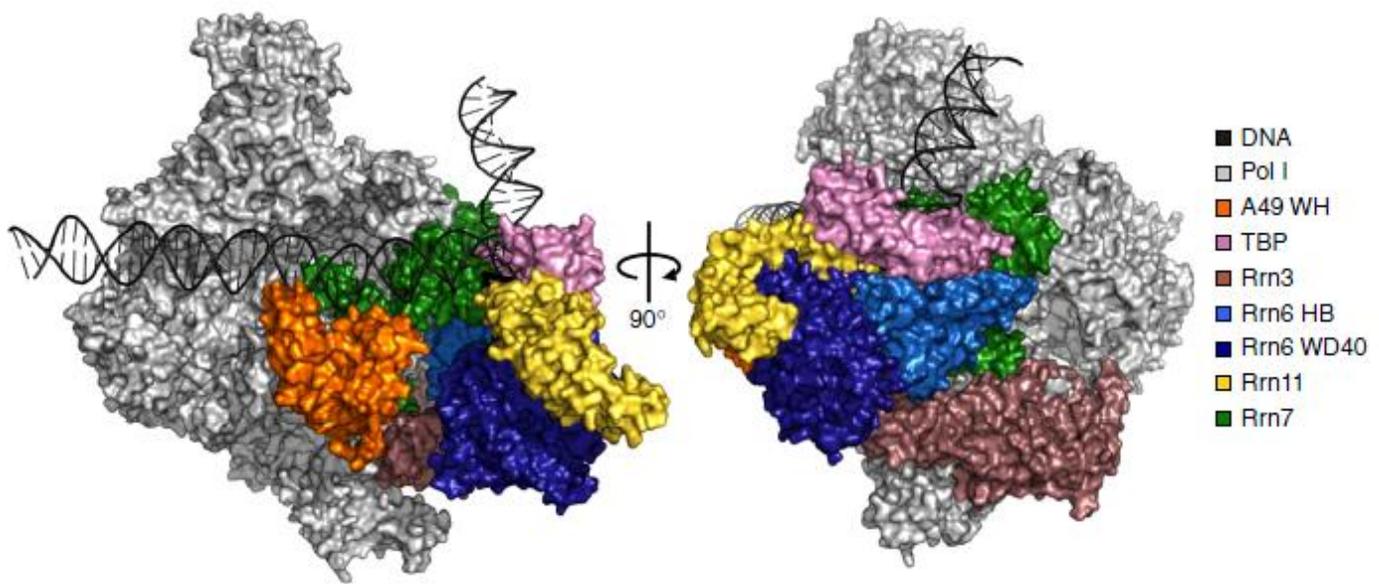


Figura 8. Modelaje de la RNA Pol I de *Saccharomyces cerevisiae* al interactuar con el rDNA y con los factores de transcripción específicos (Tomado de Kanutson *et al.*, 2014)

Tabla I. Subunidades de la RNA Pol I en *T. cruzi*, *T. brucei* y *S. cerevisiae*.

RNAPs	Subunidades de la RNA Pol	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
Pol I, Pol II y Pol III (Canónicamente en eucariontes excepto las subunidades RPB5, RPB6 y RPB10 de tripanosomátidos que solo están en Pol II y Pol III)	RPB8	✓	✓	✓
	RPB12	✓	✓	✓
	RPB5	✓	✓ Pol II y Pol III	✓ Pol II y Pol III
	RPB6	✓	✓ Pol II y Pol III	✓ Pol II y Pol III
	RPB10	✓	✓ Pol II y Pol III	✓ Pol II y Pol III
Pol I y Pol III	RPC40	✓	✓	✓
	RPC19	✓	✓	✓
Específicas de Pol I	RPA1	✓	✓	✓
	RPA2	✓	✓	✓
	RPA12	✓	✓	✓
	RPA14	✓	✗	✗
	RPA43	✓	✗	✗
	RPA31	✗	✓	✓
	RPB5z	✗	✓	✓
	RPB6z	✗	✓	✓
	RPB10z	✗	✓	✓

Presencia	✓
Ausencia	✗

Vannini *et al.* 2012, *Molecular Cell*, Vol. 45; Park *et al.* 2011, *Molecular and Biochemical Parasitology*, Vol. 180; Nguyen, *et al.* 2007, *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 27, no. 17; Nguyen *et al.* 2006, *Mol Biochem Parasitol* Vol. 149; Schimaski, *et al.* 2005, *Mol Cell Biol*, Vol. 25; Bindereif *et al.* 2012, *Nucleic Acids and Molecular Biology*, Vol. 28.

1.5.1 RPA31

Es una subunidad de la RNA Pol I específica de la familia Trypanosomatidae. Por estudios de silenciamiento se ha logrado demostrar que es esencial pues su ausencia resulta letal para *T. brucei*. El número de acceso en la base de datos TriTrypDB.org con descripción del gen RPA31 de la RNA Pol I de *T. brucei* (Nguyen, *et al.*, 2007; Nguyen, *et al.*, 2006; Schimanski, *et al.*, 2005, El-Sayed *et al.*, 2005) es: *T. brucei* TREU927 Tb927.10.3540, mientras que el gen ortólogo para *T. cruzi* se encuentra con el número de acceso TcCLB.510311.110. RPA31 de *T. cruzi* corresponde a una proteína de 184 aa con un peso aproximado de 21.7 KDa (Figura 9).

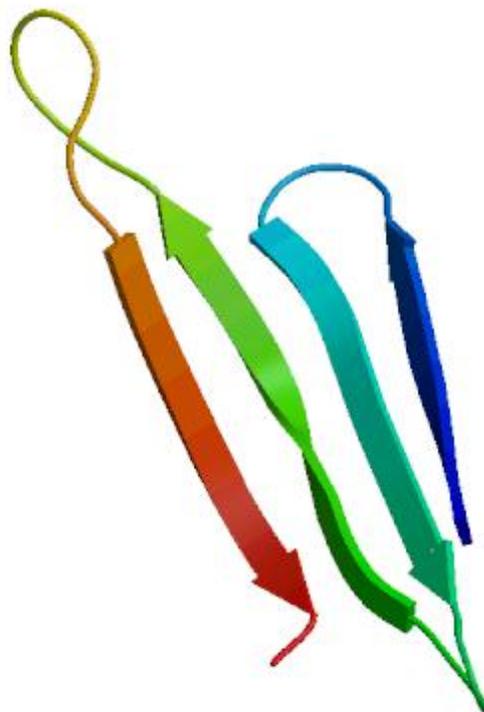


Figura 9. Predicción estructural de la proteína RPA31 de *T. cruzi* usando el programa SWISS MODEL.

1.6 Señal de localización nuclear

El transporte de proteínas al interior del núcleo celular es un proceso selectivo, algunas de estas proteínas son exclusivamente nucleares, otras se encuentran en núcleo y citoplasma (Dingwall *et al.*, 1982). Las proteínas destinadas para ser transportadas al interior del núcleo contienen una secuencia corta de aminoácidos básicos llamada señal de localización nuclear (NLS). Las señales de localización nuclear se caracterizan por ser secuencias cortas, usualmente de 8 a 10 aminoácidos, contienen una alta proporción de aminoácidos básicos (cargados positivamente). Estas secuencias pueden residir en alguna región expuesta de la proteína nuclear y no son eliminadas después de la importación proteínica. Se ha reportado que puede haber más de una señal de localización nuclear en una proteína determinada (Wagner *et al.*, 1990). Las señales de localización nuclear pueden ser monopartitas o bipartitas, también conocidas como NLSs clásicas (cNLSs) (Goldfarb *et al.*, 2004). Un ejemplo de cNLS monopartita es la del antígeno T de SV40 (126PKKKRKV132), mientras que un ejemplo de cNLS bipartita se encuentra en la proteína nucleoplasmina de *Xenopus laevis* (155KRPAATKKAGQAKKKK170). La cNLS monopartita requiere la secuencia consenso K(K/R)X(K/R), mientras que las cNLS bipartitas requieren dos dominios ricos en aminoácidos básicos separados en un grupo de 10 aminoácidos (Kalderon *et al.*, 1984; Dingwall *et al.*, 1988; Robbins *et al.*, 1991; Marfori *et al.*, 2011) (Tabla II). Sin embargo han sido identificadas varias NLSs no clásicas (Chook y Süel, 2011). En tripanosomátidos existen muy pocos reportes de NLS y los pocos que hay tienen secuencias poco conservadas como es el caso de Topo-II de *T. cruzi* que tiene una NLS monopartita, mientras que los ortólogos de TopoIIα de *T. brucei* y *Leishmania donovani* tienen una NLS bipartita en la cual sólo el segundo elemento de la secuencia señal es conservado (Obado *et al.*, 2011; Das *et al.*, 2001). Existen otras NLS reportadas experimentalmente, como es el caso del factor de transcripción La (₃₂₉RHKRSE₃₃₄) en *T. brucei* (Marchetti *et al.* 2000), el factor de splicing p14 (₉₀RRKRR₉₄) (Westergaard *et al.* 2010), el factor

de la vía lítica LTY1 (₁₁₅PKKRVLQ₁₂₁) en *T. cruzi* (Lugo-Caballero *et al.* 2013) y RPA2 con una NLS bipartita (₅₇RLKLVRCIARLR₆₉---₉₇RKRVLK₁₀₂) (Daniels *et al.*, 2012). Existen otros reportes de predicción de NLSs *in silico* usando programas como PSORTII y PredictNLS. Sin embargo, es escasa la información que se encuentra reportada hasta ahora acerca de las NLS en tripanosomátidos.

Tabla II. Ejemplos de diferentes tipos de señales de localización nuclear (Imagen modificada de Freitas y Cunha, 2009).

Tipo de NLS	Proteína	Secuencia de aminoácidos de la NLS
Convencionales	Ag-T grande SV40	PKKKRKV ¹³²
	Ag-T grande de Polyoma	VSRKRPRP ¹⁹⁶
	Ag del virus de Hepatitis D	EGAPPAKRAR ⁷⁵
	p53 murino	PPQPKKKPLDGE ³²²
	NF-κB p50	QRKRQK ³⁷²
	NF-κB p65	EEKRRK ²⁸⁶
	c-myc de Humano	PAAKRVKLD ³²⁸ ; RQRRNELKRSF ³⁷⁴
Bipartitas	Nucleoplasmina <i>X. laevis</i>	KRPAATKKAGQAKKKKLD ¹⁷¹
	Receptor glucocorticoide de Rata	YRKCLQAGMNLEARKTKKKIKGIQQATA ⁵²⁴
	RCC1	MSPKRIAKRRSPPADAIPKSKKVKVSHR ²⁸
Ricas en arginina	Proteína Rex HTLV-1	MPKTRRRPRRSQRKRPT ¹⁸
	Proteína Rev VIH-1	RQARRNRRRRWR ⁴⁶
Atípicas	Matα2	MNKIPIKDLLNPQ ¹³ /VRILESWFAKNI ¹⁵⁹
	Ag core del virus de Hepatitis B	SKCLGWLWG ²⁹
	rpL23a de Humano	VHSHKKKKIRTSPFTTPKTLRLRRQPKYPR-KSAPRRNKLDHY ⁷⁴
	hnRNP A1 de Humano	NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPGGGGQ-YFAKPRNQGGY ³⁰⁵
	SREBP2	RSSINDKIIEKDLVMGTDKMHKSGVLRK-AIDYIKYLQQVNHKLRQENMVLKLANQKNKL ⁴⁰³

1.7 Importación de proteínas al núcleo celular

El material genético de las células eucariontes se encuentra en el núcleo. La replicación y la transcripción de DNA son eventos separados espacialmente de la síntesis de proteínas, que ocurre en el citoplasma, por la presencia de una envoltura nuclear. La envoltura nuclear está formada por una doble bicapa lipídica la cual está cruzada por estructuras especializadas que median el tráfico bidireccional de moléculas entre el núcleo y el citoplasma, denominados complejos de poro nuclear (NPC). El NPC es un complejo multiprotéico de forma cilíndrica de 90 nm de largo y 50 nm de ancho, conformado por aproximadamente 30 proteínas diferentes, llamadas nucleoporinas (Nups), tiene un anillo nuclear, uno citoplásmico y un canal central de 40 nm (Floch *et al.*, 2014; Freitas y Cuhna, 2009; Suntharalingam y Wentz, 2003; Fahrenkrog y Aebi, 2003; Hoelz *et al.*, 2011; Chumakov y Prassolov, 2010; Hoelz *et al.*, 2011; Floch *et al.*, 2014). Gracias al NPC se distribuyen iones y moléculas pequeñas, incluyendo proteínas con una masa de hasta 40 kDa cuando se unen a los receptores de transporte apropiados (Weis, 2007; Pante y Kann, 2002). La importación y exportación de moléculas que superan los 40 kDa involucran un mecanismo de transporte dependiente de energía, el cual es mediado por una familia de proteínas llamadas carioferinas también llamadas importinas y exportinas (Mosammamaparast y Pemberton, 2004; Chook y Süel, 2011; Terry *et al.*, 2007). Las carioferinas también están involucradas en el transporte de RNA no codificante (Kohler y Hurt, 2007). Las carioferinas α portan un dominio rico en arginina de tres hélices α repetidas que se conoce como dominio armadillo (ARM) que interaccionan con motivos específicos de aminoácidos en las proteínas carga (a ser transportadas), en particular NLS monopartitas y bipartitas (Goldfarb *et al.*, 2004; Conti *et al.*, 1998). Las carioferinas α pueden interactuar con las carioferinas β mediante un motivo autoinhibitorio en la región N terminal llamado IBB, así se forma un complejo de importación funcional entre la importina α , la proteína carga y la importina β (Lott y Cingolani, 2011; Gorlich *et al.*, 1996; Weiss *et al.*, 1996; Conti *et al.*, 1998;

Goldfarb *et al.*, 2004) (Figura 10). Aunque también la proteína carga puede interactuar directamente con la importina β sin la importina α y ser transportada mediante una vía no canónica (Lange *et al.*, 2007). También se han reportado NLS no canónicas, como es el caso de los motivos de reconocimiento a RNA (RRM) que tienen una longitud aproximada de 90 aa que adoptan una topología $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$, sin embargo, se desconocen las interacciones involucradas entre las proteínas con RRM y la participación de este motivo como NLS (Cassola *et al.*, 2010). La translocación a través del NPC requiere de energía, la cual es proporcionada por la proteína Ran GTPasa, que puede estar en forma de Ran-GTP, en el interior del núcleo celular o Ran-GDP en el citoplasma. El gradiente de estas dos moléculas a través de la envoltura nuclear es controlado por proteínas regulatorias de Ran resultando ser un mecanismo clave en el transporte nucleocitoplasmático (Kalab y Heald, 2008). El complejo de importación atraviesa el NPC por un mecanismo que involucra la interacción de la importina β con motivos ricos en fenilalanina y glicina de las nucleoporinas llamados motivos FG (Weis, 2003). Una vez que ha entrado, el complejo de importación es disociado por la interacción de Ran-GTP con la importina β , ocasionando la liberación de la proteína carga en el nucleoplasma y las importinas son exportadas al citoplasma para utilizarse nuevamente (Steward, 2007; Lee *et al.*, 2005).

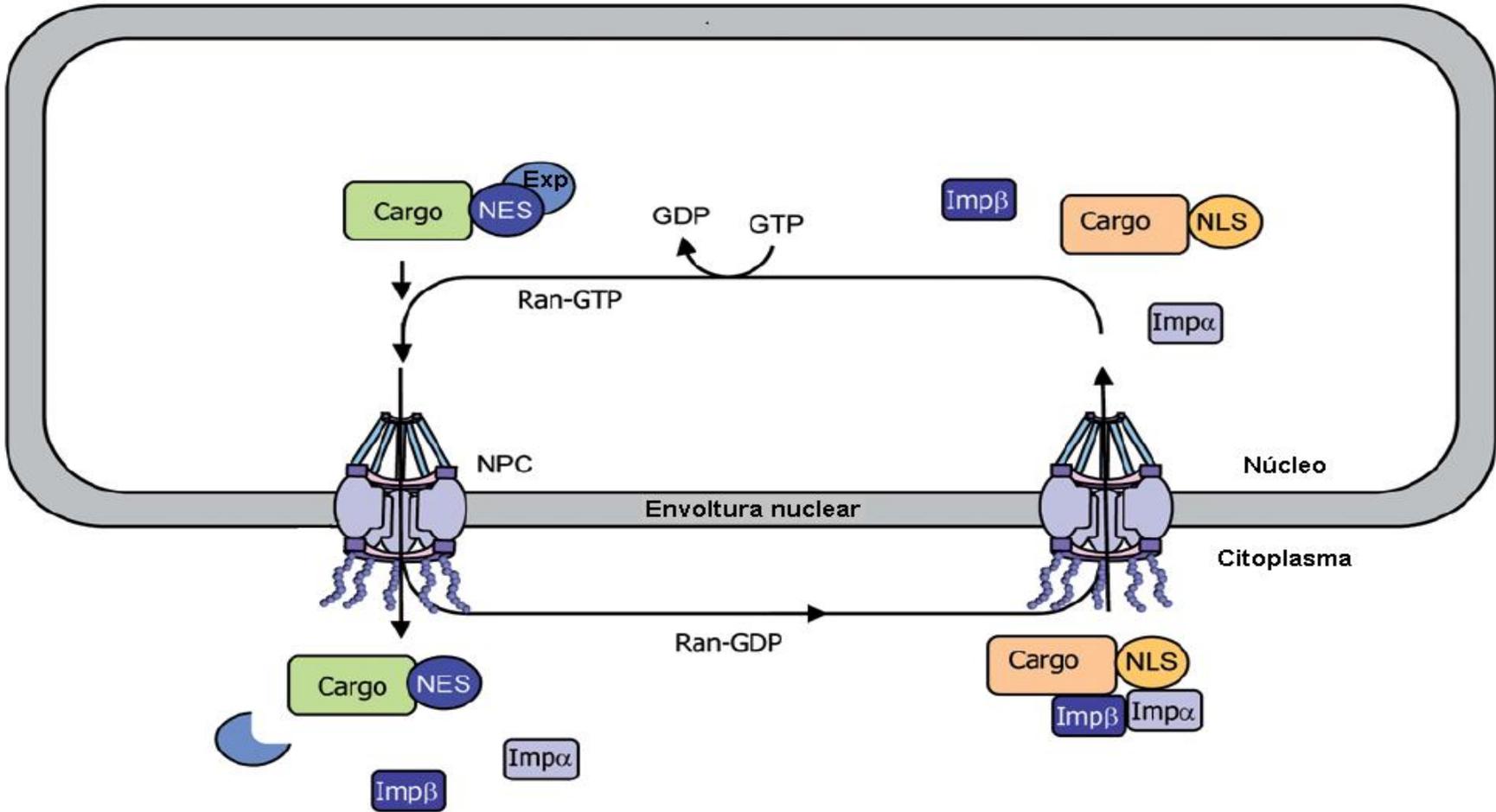


Figura 10. Importación nuclear canónica en eucariontes de proteínas con NLS. En el citoplasma la proteína con NLS es reconocida por la importina α y posteriormente se une la importina β , este complejo atraviesa el complejo de poro nuclear y la proteína de carga es liberada en el nucleoplasma debido a la unión de Ran-GTP. Las importinas son transportadas al citoplasma y son recicladas nuevamente (Modificado de Deslandes y Rivas, 2011).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El grupo de trabajo del Dr. Roberto Hernández está interesado en los procesos fisiológicos de la biogénesis de ribosomas en el parásito *T. cruzi* y su relación con la proliferación celular en este organismo. RPA31 es una proteína específica de tripanosomátidos, además ha sido demostrado que esta proteína es esencial en *T. brucei*. La proteína RPA31 no ha sido estudiada en *T. cruzi*, esta proteína al ser específica y esencial, resulta interesante estudiarla y tomarla en cuenta como un potencial blanco terapéutico contra la enfermedad de Chagas.

3. HIPÓTESIS

RPA31 se ubica en el nucléolo ya que es una subunidad de la RNA Pol I, además, su localización nuclear es dependiente de la señal de localización nuclear que permite su importación al núcleo. En relación a una posible regulación, la abundancia de RPA31 y/o su ubicación intracelular cambia en epimastigotes de *T. cruzi* en correlación con estadios fisiológicos de proliferación celular (fase de crecimiento exponencial y fase estacionaria).

4. OBJETIVO

Caracterizar la expresión y localización intracelular de RPA31 en epimastigotes de cultivo de *T. cruzi*.

4.1 Objetivos particulares

- a) Construcción quimérica de RPA31 fusionada a EGFP para evaluar su localización subcelular.
- b) Evaluar la expresión y localización subcelular de RPA31 en fase de crecimiento exponencial y fase estacionaria.
- c) Predecir mediante herramientas informáticas la señal de localización nuclear de RPA31.
- d) Evaluar la señal de localización nuclear predicha, mediante la construcción de versiones quiméricas de RPA31 fusionadas a EGFP.

5. METODOLOGÍA

5.1 Cultivos del parásito

Los epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa de referencia CL Brener (TINF/BR/1963/CL- Brener) se mantuvieron en medio de cultivo LIT (Liver Infusion Tryptone Medium) (Camargo, 1964), complementado con suero fetal bovino al 10% e inactivado, penicilina [100 U/mL], estreptomina [100 µg/mL] y hemina a una temperatura de 28°C. El conteo celular se realizó en cámara de Neubauer. En el sistema experimental usado y para fines de reproducibilidad cosechamos a los parásitos tanto en fase exponencial de crecimiento (densidad poblacional entre 20 a 30 x 10⁶ células/mL) como fase estacionaria, considerada operacionalmente cuando la densidad de células no aumenta en 72 h, típicamente entre 80-100 x 10⁶ células/mL.

5.2 Amplificación

Tabla III. Oligonucleótidos requeridos para la construcción de las proteínas recombinantes.

NOMBRE DEL OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA	FUNCIÓN
1RPA31Fwd	5'- GAATTCGATGAAGCTGGT GAAGTTTGTGAATTG-3'	Amplificación del gen RPA31 de <i>T. cruzi</i> proporcionando un sitio de restricción para la enzima <i>Eco</i> RI en el extremo 5', como templado se uso el plásmido pTcA31s.
1RPA31Rev	5'- ATCGATTTGTGCTTCTTTG ACCCACCGTTG-3'	Amplificación del gen RPA31 proporcionando un sitio de restricción para la enzima <i>Cla</i> I en el extremo 3', como templado se uso el plásmido pTcA31s.
2RPA31Fwd	5'- GAATTCATGAATCTGGTG AAGTTTGTG-3'	Amplificación del gen RPA31 con NLS y Δ NLS proporcionándoles un sitio de restricción para la enzima <i>Eco</i> RI en el extremo 5', como templado se uso el plásmido pTEX-RPA31-EGFP.
RPA31NLSdelRev	5'- ATCGATCCTTCCTTCTTTG CACGTGTC -3'	Amplificación del gen RPA31 con NLS proporcionando un sitio de restricción para la enzima <i>Cla</i> I en el extremo 3', como templado se uso el plásmido pTEX-RPA31-EGFP.
RPA31NLSdelRev	5'- ATCGATCCTTCCTCACCG TTTTCAATCG -3'	Amplificación del gen RPA31 con Δ NLS proporcionando un sitio de restricción para la enzima <i>Cla</i> I en el extremo 3', como templado se uso el plásmido pTEX-RPA31-EGFP.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: a cada reacción se le agregó 1 μL (100 μM) del oligonucleótido en sentido más 1 μL (100 μM) del oligonucleótido reverso y 1 μL (220 ng) de templado. Además a cada reacción se le agregaron 5 μL de amortiguador HIFI PCR 10X (Invitrogen), 1.5 μL MgSO_4 (50 mM), 1 μL Taq Polimerasa (Invitrogen), 1 μL de dNTPs (10 mM) y 38.5 μL de agua bidestilada para alcanzar un volumen final de 50 μL .

El programa seguido por el termociclador (Mastercycler Personal-Eppendorf) para la reacción de PCR consiste en 7 pasos; una desnaturalización inicial de 5 min a 94 °C (Paso 1), seguida por otra desnaturalización corta de 30 segundos a 94 °C (Paso 2), renaturalización por 30 segundos a 67 °C (Paso 3), una extensión a 68 °C por 1 min (Paso 4), se repitieron los pasos 2 al 4 por 29 veces (Paso 5), una extensión final de 68 °C por 10 min (Paso 6), y un enfriamiento a 4 °C (Paso 7).

5.3 Preparación de células competentes de *Escherichia coli*.

Se siguió el protocolo recomendado en Sambrook y Russell, 2001 que es explicado a continuación: Se cultivaron células de *E. coli* (JM109) en una caja de Petri con Agar LB (triptona 0.1 %, extracto de levadura 0.5 %, NaCl 0.1 %) (Bertani y Weigle, 1953) y se sembraron cada 24 horas durante 3 días. Se tomó una de las colonias y fue inoculada en 3 mL de medio LB (MgCl_2 3 mM y MgSO_4 3 mM), las células se incubaron toda una noche a 37 °C. Posteriormente se tomaron 100 μL del inóculo y se colocaron en un matraz con 30 mL de LB y 300 μL de sales. El cultivo se incubó a temperatura ambiente y en agitación, cuando el cultivo llegó a una $\text{D.O.}_{600\text{ nm}} = 0.6$, el matraz se colocó en hielo durante 10 min, posteriormente se centrifugó a 1620 x g (Centrífuga Beckman de mesa, rotor de columpio S4180, 3000 rpm) por 10 min a 4 °C, el botón celular se resuspendió en 2.4 mL de amortiguador TB (PIPES 0.3 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.22 g, KCl 1.86 g, MnCl_2 1.09 g, pH 6.7) con Dimetilsulfoxido (DMSO) a una concentración final de 7 % e incubando en hielo por 10 min. Finalmente la suspensión se vertió en tubos Eppendorf fríos de

200 μ L y se congelaron inmediatamente sumergiéndolos en hielo seco con etanol. Para almacenar las células, se guardaron a -70 °C.

5.4 Clonación de productos amplificados en el vector pGEM-T-easy y transformación de células competentes.

Los productos de PCR se clonaron en el vector pGEM-T-easy (Promega), los insertos clonados fueron evaluados con enzimas de restricción que realizan cortes en la región de multiclonación de pGEM. Las condiciones de clonación son las siguientes: a cada reacción se le agregaron 5 μ L de amortiguador 2X rapid ligation (Promega), 1 μ L del vector pGEM-T-easy (50 ng), 1 μ L de los productos de PCR, 1 μ L de T4 DNA ligasa (Promega) y 2 μ L de agua bidestilada. Posteriormente las reacciones se incubaron toda una noche a 4 °C.

Para transformar las células competentes con los productos clonados, se agregaron 50 ng de las ligaciones junto con 200 μ L de células competentes en tubos Eppendorf estériles y se dejaron en hielo durante 30 min, posteriormente se les dio un choque térmico a 42 °C durante 45 s y rápidamente se transfirieron a hielo durante 1 min. A cada tubo con células se le adicionaron 800 μ L SOB (bacto-triptona 2 %, extracto de levadura 0.5 %, NaCl 0.05 %) mas glucosa a una concentración final de 20 mM y se incubaron durante 50 min a 37 °C. Las células se sembraron en cajas de Petri con medio LB-Agar y ampicilina (100 μ g/mL), con la finalidad de seleccionar bacterias transformadas, además se agregó IPTG (0.5 mM) y X-Gal (80 μ g/mL) utilizado para facilitar la selección de colonias transformadas con el vector que contiene el inserto de interes. Finalmente se incubaron toda una noche a 37 °C.

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

5.5 Extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina.

Se escogieron colonias blancas al azar y fueron inoculadas en 3 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL) dejándolas crecer una noche a 37 °C. Al día siguiente, los cultivos se centrifugaron a 18400 x g (Centrifuga 5424, eppendorf, 14000rpm) durante 30 segundos, se desechó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 100 µL de solución de suspensión fría (glucosa 500 mM, Tris-HCL a pH 8.0 25 mM y EDTA pH 8 10 mM) por 5 min, después se agregaron 200 µL de solución de lisis recién preparada (NaOH 0.2 N, SDS 1%) mezclando 10 segundos por inversión y manteniendo en hielo, inmediatamente se adicionaron 150 µL de solución neutralizante fría (acetato de potasio 5 M, ácido acético glacial al 10 %), mezclando por inversión durante 10 segundos y manteniendo en hielo por 5 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se realizaron dos extracciones, la primera con un volumen de la mezcla fenol:cloroformo (1:1) y la segunda con un volumen de cloroformo, con dos centrifugaciones entre cada extracción de 5 min a 18400 x g. El DNA plasmídico se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto a una temperatura de -70 °C por 20 min, posteriormente se centrifugó a 18400 x g por 10 min y se retiró el sobrenadante, el botón celular se lavó con etanol al 70 % y se dejó secar por 2 min a temperatura ambiente, finalmente el DNA se resuspendió en 100 µL de TE con RNasa (Tris 10 mM pH 7.4, EDTA 0.2 mM pH 7.2, RNasa 20 µg/mL), las muestras se incubaron a 37°C por 1 h y fueron almacenadas a -20 °C.

5.6 Construcción del vector pTEX-EGFP-RPA31, pRPA31-NLS-EGFP y pRPA31-DNLS-EGFP.

Se realizó la construcción de los vectores pTEX-RPA31-EGFP (Fusión carboxilo) como herramienta de monitoreo de la subunidad RPA31 de la RNA Pol I, mientras que los plásmidos pRPA31-NLS-EGFP (RPA31 con NLS) y pRPA31-DNLS-EGFP (RPA31-ΔNLS) se construyeron para comprobar experimentalmente si la señal de localización nuclear (NLS) de RPA31 predicha con los programas PSORT II y

PredictProtein era correcta. Para la construcción de los plásmidos pTEX-RPA31-EGFP, pRPA31-NLS-EGFP y pRPA31-DNLS-EGFP fue necesario amplificar el gen RPA31 (completo), RPA31 con NLS del nucleótido 1-516 y RPA31- Δ NLS del nucleótido 1 al 486. Los productos de PCR se clonaron en el plásmido pTE con las enzimas de restricción *Eco* RI en 5' y *Cla* I en 3'. Las ligaciones se hicieron en un tubo Eppendorf de la siguiente manera: se agregó 1 μ L de buffer T4 Ligasa 10X, 1 μ L de T4 DNA ligasa (Promega), 1 μ L (300 ng) de pTE digerido, 2 μ L (132 ng) producto de PCR purificado y digerido previamente y 5 μ L de agua mili Q, finalmente fue incubado 18 h a 14 °C.

5.7 Transfección de *T. cruzi*.

Se dejó crecer un cultivo de epimastigotes hasta que alcanzara la fase de crecimiento exponencial, fueron necesarios 3×10^8 epimastigotes (30 mL de cultivo LIT, a una densidad inicial de 1×10^6 cel/mL e incubados por 4 días). Los epimastigotes fueron cosechados a 800 x g (centrífuga Beckman de mesa, rotor de columpio S4180, 2100 rpm) por 10 min y se lavaron con 30 mL de medio LIT no complementado (sin suero y sin hemina) preenfriado a 4°C. Después de lavadas las células fueron centrifugadas a 800 x g por 10 min. Posteriormente se resuspendieron en 350 μ L de medio LIT sin complementar y se adicionaron con 50 μ g de DNA de plásmido purificado con Qiagen (todo en hielo). Se transfirió a celdas para electroporación utilizando la pipeta Pasteur que viene con las celdillas y se incubaron en hielo por 5 min. Posteriormente se prendió el equipo durante los 5 min de incubación (BTX ECM 830) y se fijaron las condiciones de electroporación a 360 V 1500 μ F 13 Ohms 12 milisegundos. La transfección se realizó verificando que los valores de capacitancia cayeran entre 8 y 9. Después de la transfección se dejaron reposar a temperatura ambiente 5 min y se recuperaron las células de la celda con pipeta pasteur y fueron transferidas a un frasco para su incubación. Se recuperó el mayor número de células con varios lavados de la celda con medio LIT complementado y resuspendiéndolas. Las células se sembraron en 10 mL de medio LIT complementado y se incubaron por

24 h a 28°C. Se realizó la cuenta de parásitos con un rango cercano de $1-2 \times 10^8$ células/mL y se realizó una dilución 1:5 (1 mL de células más 4 mL de medio) en medio fresco con G418 a [300 µg/mL] para las transfecciones con el vector pTEX. Después de incubar por ~20 días los parásitos no resistentes dejaron de dividirse por completo y se observaron como células redondas sin flagelo.

5.8 Microscopía de fluorescencia

Epimastigotes en fase de crecimiento exponencial transfectados con RPA31-EGFP fueron centrifugados a $3000 \times g$ (Centrífuga Beckman de mesa, rotor de columpio S4180) por 5 min, se lavaron con un volumen de amortiguador fosfato salino (PBS) 1X, nuevamente fueron centrifugados y el sobrenadante se desechó. El botón celular fue resuspendido suavemente en paraformaldehído al 3.7 % en PBS 1X, llevando a una densidad de 40×10^6 cel/mL. Se incubaron por 10 min a 4°C para fijar las células. En un portaobjetos silanizado se dibujaron círculos con plumón hidrofóbico y se colocaron 100 µL de la suspensión de células fijadas. Se incubaron 10 min a temperatura ambiente. Las células no unidas fueron lavadas sumergiendo los portaobjetos en PBS 1X y en agitación gentil durante 10 min. Las células fueron montadas con el medio de montaje Vecta-Shield que tiene DAPI (Vector Laboratories, USA). DAPI se une a los surcos menores del DNA principalmente a las regiones ricas en adenina y timina, sin embargo, en tripanosomátidos también se une al DNA mitocondrial, por lo que se observa la fluorescencia del núcleo y cinetoplasto. Las muestras se observaron por medio de microscopía de fluorescencia usando un filtro que permite la excitación de la muestra a 450-488 nm y emite a 510 nm (verde).

5.9 Inmunorréplica tipo Western Blot

Se obtuvieron lisados totales de epimastigotes de la siguiente manera: se centrifugaron parásitos en fase exponencial y fase estacionaria a $1620 \times g$ (Centrífuga Beckman de mesa, rotor de columpio S4180) a 4 °C, se realizaron dos lavados con 10 mL de PBS 1X y se centrifugaron a $1620 \times g$ por 10 min. Las

células fueron centrifugadas y se decantó el sobrenadante para realizar un conteo de parásitos, posteriormente se les agregaron 10 μ L de amortiguador de lisis por cada 5×10^6 células, el lisado fue transferido a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y fue calentado a 95 °C por 5 min. Finalmente las muestras se guardaron a -20 °C.

Las proteínas presentes en el lisado total de parásitos fueron separadas por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de 0.45 μ m PVDF Immobilon-P (Merk Millipore, Darmstadt, Germany) de acuerdo con los protocolos estándar. La membrana fue bloqueada con 0.05 % de Triton X- 100 en PBS (PBS-T) con 5 % de leche descremada toda la noche a 4°C en agitación gentil. La membrana fue incubada por 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo primario comercial anti-EGFP (Clontech) y anti-tubulina (Amersham Life Science) para el control de carga (la tubulina es un gen housekeeping), diluidos por separado en PBS con 2 % de leche descremada (1:16,000 v/v). Posteriormente la membrana fue lavada tres veces con PBS-T (30 min por lavado) y entonces fue incubada por 1 h con el anticuerpo secundario de cabra contra IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (Pierce) (1: 30,000 v/v), diluido en PBS-T con 2 % de leche descremada. La membrana fue lavada tres veces con PBS-T (3 min por lavado), incubada en SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate (Pierce) y se expuso al revelado.

6. RESULTADOS

6.1 Expresión y localización de la proteína de fusión RPA31-EGFP en epimastigotes de *T. cruzi*

Para poder evaluar la expresión y la localización subcelular de la proteína RPA31, se generó la construcción génica de la proteína de fusión RPA31-EGFP (fusión carboxilo). Para evaluar la expresión de RPA31, se hicieron inmunorréplicas tipo Western blot. Fueron evaluadas las células transfectadas con la proteína de fusión RPA31-EGFP y se logró detectar una banda específica que corresponde al peso molecular esperado de 49 kDa. En el carril correspondiente a la proteína total de los parásitos transfectados con EGFP se observa una banda que corresponde al peso molecular esperado de 28 kDa, ésta no se observa ni en los parásitos sin transfectar ni en las células transfectadas con la proteína de fusión RPA31-EGFP (Figura 11).

La localización de RPA31 en los epimastigotes de *T. cruzi* transfectantes con esta construcción se encuentra en la zona intranuclear. Al hacer el análisis de sobreposición con las imágenes para detectar los núcleos con DAPI, la proteína de fusión se observa subcompartmentalizada en el núcleo celular, aparentemente en el nucléolo (Figura 12). Esto contrasta con los epimastigotes transfectados solo con EGFP, cuya localización abarca todo el cuerpo celular. La localización nucleolar de RPA31 concuerda con lo esperado, ya se ha demostrado en *T. brucei* que esta proteína es una subunidad de la RNA Pol I y es ampliamente conocido que esta maquinaria transcripcional se encuentra en el nucléolo (Russell y Somerdijk, 2005).

Anti α EGFP

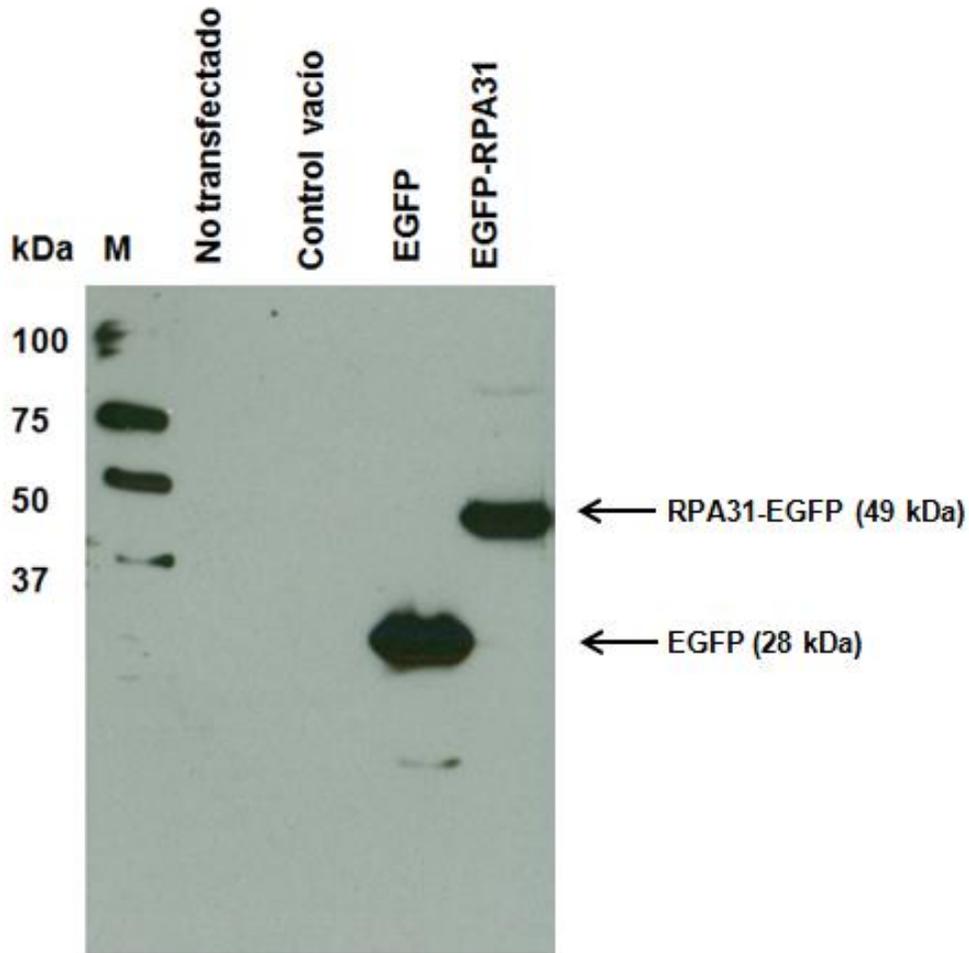


Figura 11. Inmunorréplica tipo Western blot de lisado de epimastigotes transfectados con EGFP (28 KDa) y con RPA31-EGFP (49 KDa), se detectan bandas específicas a los tamaños esperados, mientras que en los controles (no transfectado y el control vacío) no se observa señal.

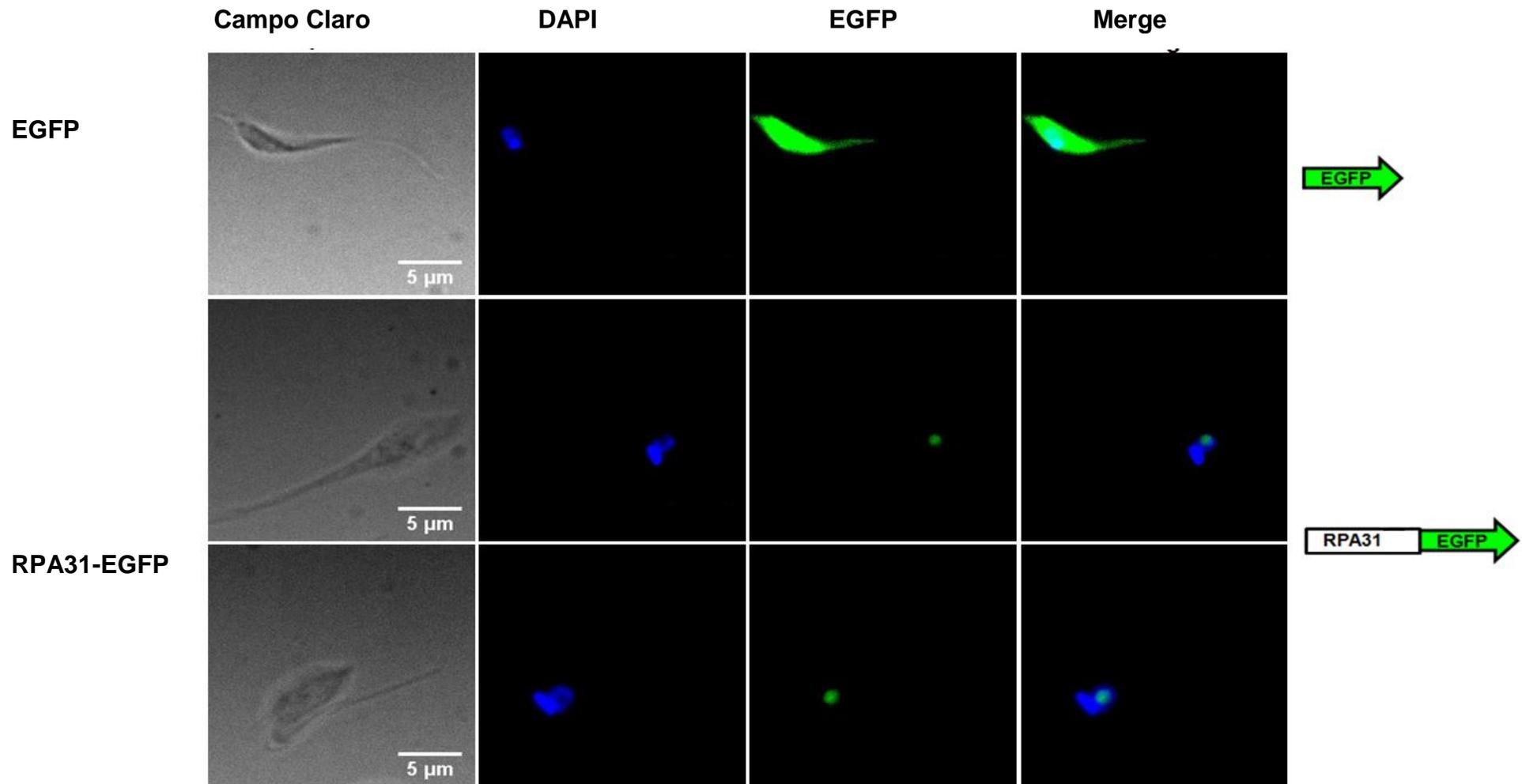


Figura 12. Microscopía de fluorescencia de epimastigotes transfectados con EGFP y RPA31-EGFP. La localización de RPA31 en los parásitos con RPA31-EGFP se ubica en el nucléolo al sobreponerse con DAPI (azul), el nucléolo se observa como un hueco en el núcleo. La localización de EGFP se observa en todo el cuerpo celular de los parásitos. A la derecha del panel se muestran los mapas de las construcciones transfectadas. Se observa el núcleo (N) y el cinetoplasto (K). El cinetoplasto contiene gran cantidad de DNA mitocondrial que se tiñe con DAPI.

6.2 Expresión de RPA31-EGFP en fase de crecimiento exponencial y fase estacionaria

El nucléolo de epimastigotes de *T. cruzi* creciendo en fase exponencial es de mayor tamaño y con más granularidad que el observado en células estacionarias (Nepomuceno *et al.*, 2010). Esto en concordancia con una mayor actividad de biogénesis ribosomal. Para comparar la expresión y ubicación de la proteína RPA31-EGFP en fase de crecimiento exponencial y estacionaria en epimastigotes, fue evaluada por microscopía de fluorescencia e inmunorréplica tipo Western blot. Las proteínas detectadas en los lisados de las células transfectantes, no mostraron niveles de expresión diferentes de RPA31-EGFP entre fase de crecimiento exponencial y estacionaria (western blot). Las bandas correspondientes a la proteína de fusión RPA31-EGFP migran en el tamaño esperado para esta fusión de 49 kDa, el control de carga con tubulina tampoco muestra una diferencia entre la fase exponencial y la estacionaria (Figura 13).

Al analizar la ubicación de RPA31 en los epimastigotes transfectados con RPA31-EGFP provenientes de la fase exponencial, la proteína se localiza compartamentalizada aparentemente en el nucléolo. En los parásitos de fase estacionaria aparentemente se localiza en todo el nucleoplasma y el nucléolo (Figura 14).

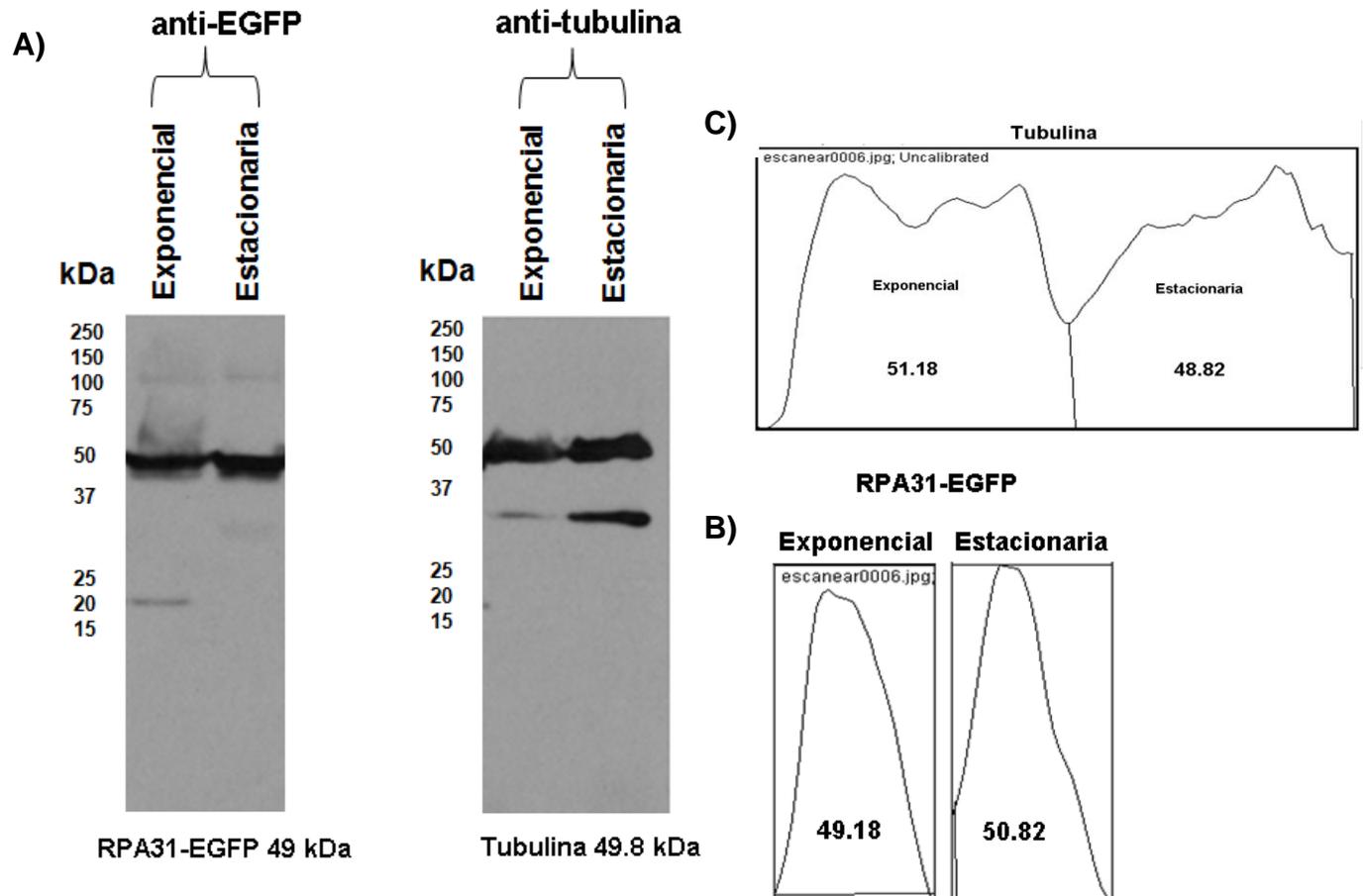


Figura 13. A) Inmunorréplica tipo Western blot de lisado de epimastigotes transfectados (5×10^6 células por carril) con RPA31-EGFP (49 kDa) en fase de crecimiento exponencial y estacionaria. Las bandas detectadas para RPA31-EGFP son específicas a los sitios de migración esperados, como control de carga se usó tubulina (50 kDa). B). El análisis densitométrico no muestra una variación significativa en la expresión de la proteína de fusión RPA31-EGFP en fase exponencial y fase estacionaria, C) esto es similar con el control de carga con tubulina.

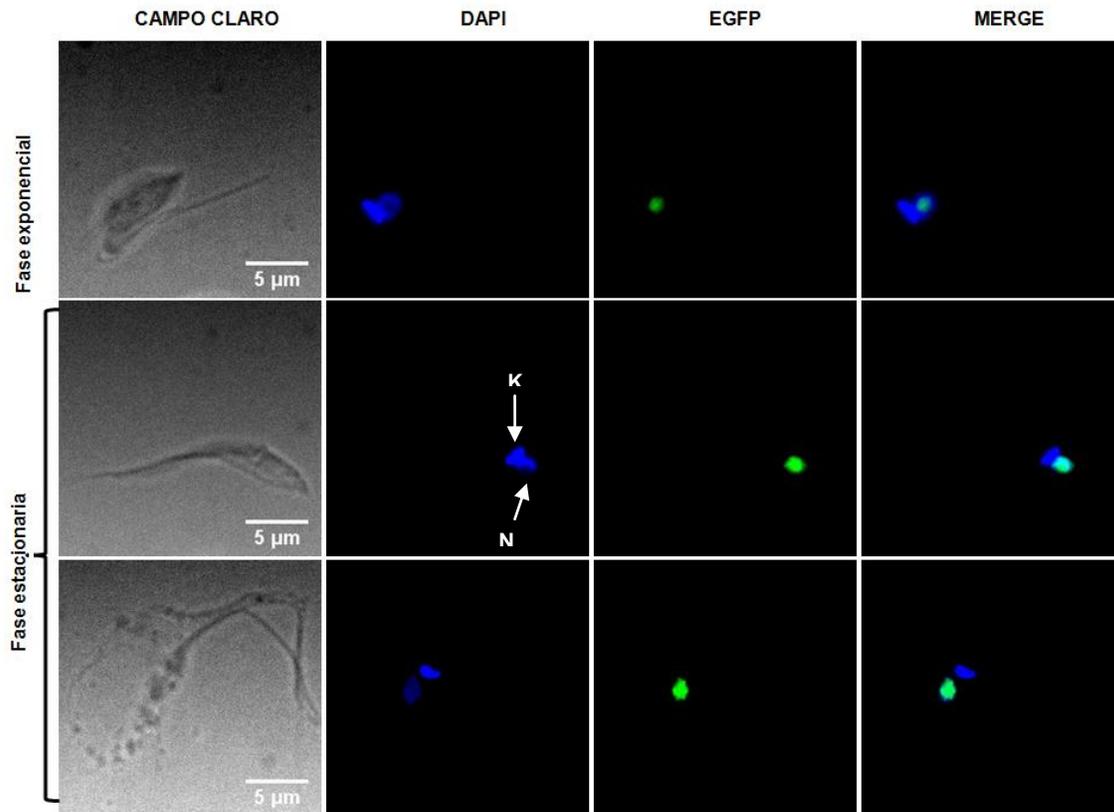


Figura 14. Microscopía de fluorescencia de epimastigotes transfectados con RPA31-EGFP. En fase de crecimiento exponencial RPA31 (verde) se ubica en la zona nucleolar, mientras que en fase estacionaria RPA31 aparentemente se localiza en todo el nucleoplasma y el nucléolo al superponerse con DAPI (azul). Se observa el cinetoplasto (K) y el núcleo (N).

6.3 Análisis *in silico* para la predicción de señales de localización nuclear (NLS) de las subunidades de la RNA Pol I de *T. cruzi*

Con el fin de conocer los mecanismos involucrados en el transporte al núcleo de RPA31-EGFP, se realizó la predicción de las señales de localización nuclear (NLS) de las distintas subunidades de la RNA Pol I. Con el programa PSORT II, se identificaron varias NLSs para las dos subunidades mayores (RPA1 Y RPA2) y una para RPA31. En el caso de RPA1 se detectaron dos NLSs monopartitas y una bipartita cuya secuencia y posición son las siguientes: 196RHRR199, 200KRPR203 y 232KRSSNCNHNENARQRHK248. En el caso de la subunidad RPA2 se detectaron cinco NLSs monopartitas cuya secuencia y posición son las siguientes: 196RHRR199, 1227PRKR1230, 1481RKRH1484, 1227PRKRAVP1233 y 1477PVKGRKR1483. Para la subunidad RPA31 solo se detectó la NLS 163PIRKTRA169. En las subunidades RPC40, RPB5z, RPB6z, RPB8, RPA12, RPB10z y RPC19 no se logró detectar ninguna NLS (Tabla IV).

Tabla IV. Análisis *in silico* de la predicción de las señales de localización nuclear (NLS) de las subunidades que conforman a la RNA Pol I de *T. cruzi*. A la derecha de cada NLS se indica la posición del aminoácido en la que se encuentra. Solo las subunidades RPA1, RPA2 y RPA31 contienen una NLS detectada con el programa PSORT II.

Subunidad de la RNA Pol I	NLS detectada en <i>T. cruzi</i>
RPA1	¹⁹⁶ RHRR ₁₉₉ ²⁰⁰ KRPR ₂₀₃ ²³² KRSSNCNHENARQRHK ₂₄₈
RPA2	³¹ RHRR ₃₄ ¹²²⁷ PRKRAVP ₁₂₃₃ ¹⁴⁷⁷ PVKGRKR ₁₄₈₃
RPC40	No detectada
RPB5z	No detectada
RPB6z	No detectada
RPA31	¹⁶³ PIRKTRA ₁₆₉
RPB8	No detectada
RPA12	No detectada
RPB10z	No detectada
RPC19	No detectada

6.4 Alineamiento de las secuencias proteicas ortólogas de RPA31 en distintos miembros de la familia Trypanosomatidae y sus señales de localización nuclear

Desde su descripción en *T. brucei*, RPA31 mostró similitudes reconocibles solo con proteínas de tripanosomátidos. Con fines de una comparación entre las secuencias de las proteínas ortólogas de TcRPA31 de cinetoplástidos, se realizó una búsqueda haciendo un análisis BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) y posteriormente una búsqueda en la base de datos TritrypDB (tritrypdb.org/tritrypdb/). Se lograron encontrar las proteínas ortólogas de TcRPA31 de los siguientes miembros de la familia Trypanosomatidae indicando también su número de acceso: *T. brucei* (Tb927.10.3540), *T. congolense* (TcIL3000_10_2950), *T. vivax* (TvY486_1003520), *T. cruzi* (*esmeraldo*) (TcCLB.510311.110), *T. cruzi* (*No esmeraldo*) (TcCLB.508153.1140), *L. major* (LmjF03.0580), *L. infantum* (LinJ.03.0560), *L. braziliensis* (LbrM.03.0490). Para ver la similitud entre las secuencias se realizó un alineamiento múltiple. La longitud de las secuencias se asemejan más entre *L. major*, *L. infantum*, *L. braziliensis* y *T. cruzi* que tienen un rango que va de 178 a 184 aa de longitud mientras que las secuencias de *T. vivax*, *T. brucei* y *T. congolense* tienen un rango longitudinal que va de 202 a 226 aa. Por otra parte también se realizó un análisis individual de cada secuencia ortóloga para predecir su NLS, sólo en *T. congolense* se detectó una NLS monopartita y una bipartita. Para la secuencia de *T. brucei* se detectaron dos NLS monopartitas, mientras que para el resto solo se detectaron NLSs monopartitas. Los dos haplotipos de *T. cruzi* muestran cambios de aa de las cuales una llama la atención ya que se encuentra en la señal de localización nuclear en el aminoácido 169 (Figura 15).

<i>L. major</i>	MKLLKFVNSDAP---HTLADVQLRNQRLWFP CR -----HGNAAVAAKSWT 42
<i>L. infantum</i>	MKLLKFVNSDAP---HTLVVDVQLRNQRLWFP CR -----NGNAAVAAKSWT 42
<i>L. braziliensis</i>	MKLLKFVNSDAP---HTLADVQLRNQRLWFP PGK -----RGNAAVAAKSWT 42
<i>T. cruzi-esmeraldo</i>	MKLVKFVNCDAPNV PADMLQLSV EE QRICVVS N -----QRSDGE-HETKSWH 46
<i>T. cruzi-No-esmeraldo</i>	MKLVKFVNCDAPNV PADMLQLSV EE QRICVVS N -----QRSDGE-HETKSWH 46
<i>T. vivax</i>	MKLLKFVSADAPDV SATSLELSLRKQRVSV SARRVGE GS DAG-SVAGRSHGEQSVAKTWR 59
<i>T. brucei</i>	MKLLKFVNCDAPNV SPEALHFSMSRQ R VSLSHSG-DTSDRRSG-SRSSATEGNASIGKTWR 58
<i>T. congolense</i>	MKLLKFINCDGPGV S QATLEVSRKRQ R VSVVGASAGDVEYSGRSAAGYGGDRSREIRAWH 60
	***:**:..*.***: . . : **
<i>L. major</i>	LTAASPASVSGGYWLLDDSDQPICEITDVL L LALPETAANAAGSS-GTFAPRGVTDKDV DG 101
<i>L. infantum</i>	LNAASPTSLSGGYWLLDDDDK P ICEITDVL L LALPETAANAAGSS-GTFAPRGVTDKDV DG 101
<i>L. braziliensis</i>	VDVASPTSLSGGYWLLDDSSNPICEITDVL L LAVPETATRVAGSSSGTFAPRGVTDKDV DG 102
<i>T. cruzi-esmeraldo</i>	LI SAAPS-MDGVYWLLNDNTPIGPI N EVLLATRDNANSAR K KV-----PEGVKECHIDG 100
<i>T. cruzi-No-esmeraldo</i>	LI SAAPS-MDGVYWLLNDNTPIGPI N EVLLATRDNANSAR T KV-----PEGVKECHIDG 100
<i>T. vivax</i>	LTSCGQT-LDGCYWLLDDNNEPVGPI R EVLLATRDDND D ASG-----PKGITDDHVKG 111
<i>T. brucei</i>	IAEGGTP-ITGGYWLLGDNNEPIG P VQEVILAVPEVKEADVT-----PRGINESVVKN 110
<i>T. congolense</i>	LRDGGIP-LGGCYWLLDDDRPMYPI G EVL L AVPDNETLSVM-----PKG V NEEDIKS 112
	: . . : * ****.*.. * : : : : ** : *.*.: ..
<i>L. major</i>	IDFRSKMGRQMERERATY GATSKTATKSARTMMNAEEMTEKKNERMKREREAVAEAI EDN 161
<i>L. infantum</i>	IDFRSKMGRQMERERATY GATSKTATKSARTMMNAEEVTEKKHERMKREREAVAEAI EDN 161
<i>L. braziliensis</i>	IDFRSKLGRQMERERATY GATSKTASKSARTMMNAEELTEKKHERMKRERETVAEAI ENN 162
<i>T. cruzi-esmeraldo</i>	VDLRSKMGKQLORS R EEYGQTFKTAARNA A V L MDADR L RVGREEKVR N GRKRV E AI ENG 160
<i>T. cruzi-No-esmeraldo</i>	VDLRSKMGKQLQ R TREEYGQTFKTAARNA A L L MDADR L RVGREEKVR K ERKRV E AI ENG 160
<i>T. vivax</i>	IDFRNKVGRRIQ K SREDYGN T YKTSARYATAMVDAGKQTSKREERIMQ E RKRV E AI ENG 171
<i>T. brucei</i>	VEFFSKFGRSMQRTRETFGDTYLSAPKSVI PLS DAERTFAKRAERARM L K R RAEAVDAE 170
<i>T. congolense</i>	ADFLTKAGRDM R RRKQEF G DTYKNSVKRPLSMTDVDGNSNKQDGK S LEGGCKAVARHLESG 172
	:: .* * : : : : * * : : : : : : : : . . ::
<i>L. major</i>	DAS---VME PRKKERK H S SK----- 178 168 <u>aa</u>
<i>L. infantum</i>	DAS---VME PRKKERK H S SK----- 178 168 <u>aa</u>
<i>L. braziliensis</i>	ETS---VME PRKKERK R S NKQ----- 180 169 <u>aa</u>
<i>T. cruzi-esmeraldo</i>	EE P --- IRKTRAK KEDGNKSN G SKH----- 184 163 <u>aa</u>
<i>T. cruzi-No-esmeraldo</i>	EE P --- IRKTRGK KEDGNKSN G SKH----- 184 163 <u>aa</u>
<i>T. vivax</i>	EDPSLVSKKEREKGRD S ERERGA V RESKREGGDSYTSRSDR K SER----- 217 -----
<i>T. brucei</i>	GGPGGEVVAAAATATAAAA N PTACVEPSPR PVKKEK SKKITTPTLTPVRSIKKET 226 159 <u>aa</u> , 201 <u>aa</u>
<i>T. congolense</i>	EELAQLPSE KRGDKANDKAKS SK S RKER----- 202 124 <u>aa</u> , 183 <u>aa</u>

Figura 15. Alineamiento de las secuencias proteicas ortólogas de RPA31 en distintos miembros de la familia Trypanosomatidae. Las posiciones de las señales de localización nuclear predichas con el programa PSORT II (rojo) se indican al final de cada secuencia. Para *T. congolense* se identificaron dos NLSs, una monopartita y otra bipartita. Todas las demás señales identificadas fueron monopartitas. Las diferencias entre las secuencias de los 2 haplotipos de *T. cruzi* están subrayadas.

6.5 Alineamiento de NLSs monopartitas de RPA31 en distintos miembros de la familia Trypanosomatidae

De las señales de localización nuclear predichas con el programa PSORT II se hizo un alineamiento entre las siete NLSs monopartitas obtenidas para observar su conservación. La única señal bipartita reconocida fue para *T. congolense*, además de tener también una posible señal monopartita. Es importante señalar que de las ocho NLSs monopartitas del alineamiento, están las dos posibles NLSs que se identificaron en *T. brucei*. El alineamiento muestra que todas las NLSs contienen aminoácidos básicos en particular arginina y lisina que son característicos de las NLSs clásicas (Lange *et al.*, 2007). Con excepción de la NLS monopartita de *T. congolense*, todas las demás señales comienzan con prolina que es un aminoácido no polar y cinco de ellas tienen ácido glutámico (Figura 16).

<i>L. infantum</i>	PRKKERK
<i>L. braziliensis</i>	PRKKERK
<i>L. major</i>	PRKKERK
<i>T. brucei-2</i>	PVKKEKK
<i>T. brucei-1</i>	PLKRRAE
<i>T. cruzi-esmeraldo</i>	PIRKTRA
<i>T. cruzi-no-esmeraldo</i>	PIRKTRG
<i>T. congolense</i>	--RRRK-
	∴

Figura 16. Alineamiento entre las secuencias de las señales de localización nuclear monopartitas de las proteínas ortólogas de RPA31 predichas con PSORT II. Note que para *T. brucei* se encontraron dos señales de localización nuclear. Los colores indican las características fisicoquímicas de los aminoácidos. Básicos (rosa), no polares (rojo), polares sin carga (verde), ácidos (azul).

6.6 Evaluación de la NLS de RPA31

A la secuencia proteica de RPA31 de *T. cruzi* se le realizó un segundo análisis para la predicción de la señal de localización nuclear con el programa PredictProtein el cual predijo la NLS monopartita ¹⁶⁵RKTRAKKE₁₇₂, recordando que ya se tenía la NLS monopartita ¹⁶³PIRKTRA₁₆₉ predicha con el programa PSORT II. Estos resultados fueron consistentes ya que ambas secuencias se traslapan en 5 aminoácidos (Figura 17). Para el análisis posterior se consolidó la predicción con dos NLSs como una sola dando como resultado la NLS teórica ¹⁶³PIRKTRAKKE₁₇₂ con esta base se realizaron dos construcciones. Una construcción la nombramos pRPA31-NLS-EGFP (NLS) que contiene el gen de la proteína RPA31 con la señal ¹⁶³PIRKTRAKKE₁₇₂ y a la otra construcción llamada pRPA31-DNLS-EGFP la cual se le deletó la NLS (Δ NLS) (Figura 18). Los epimastigotes transfectados con la construcción pRPA31-NLS-EGFP muestran la señal de RPA31 en una zona intranuclear, cuya localización al compararse con DAPI aparentemente es en el nucléolo, igual que la fusión RPA31-EGFP. Por otra parte los epimastigotes transfectados con la construcción pRPA31-DNLS-EGFP expresan a RPA31 en todo el cuerpo celular, este fenómeno es igual al observado con epimastigotes transfectados solo con EGFP (Figura 19).

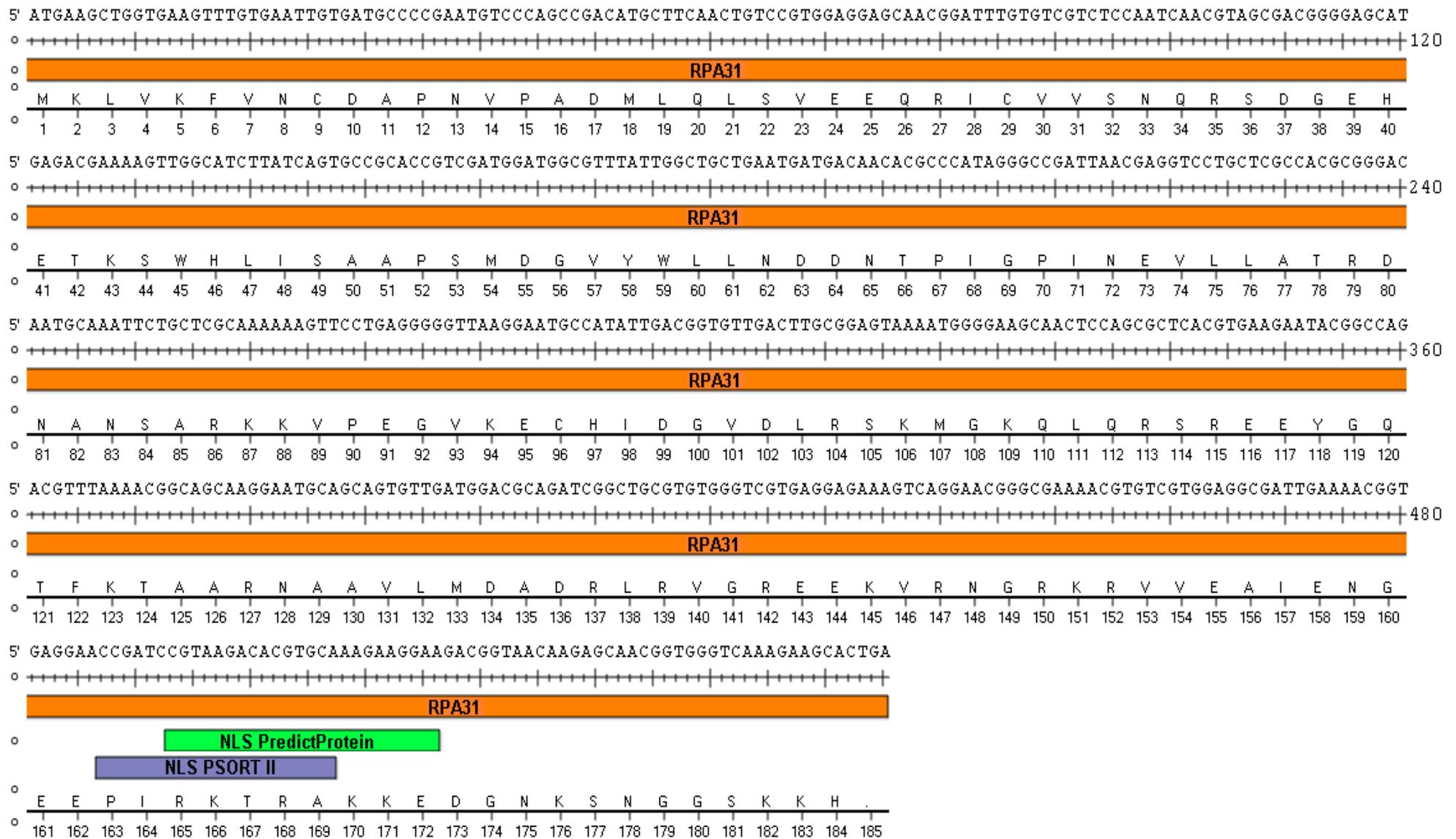
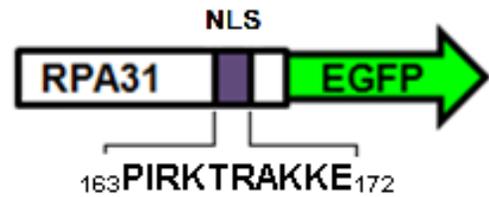


Figura 17. Secuencia codificante del gen RPA31 de *T. cruzi* indicando su codón de inicio (rectángulo negro) y codón de paro (rectángulo rojo). Las barras verde ($_{165}\text{RKTRAKKE}_{172}$) y azul ($_{163}\text{PIRKTRA}_{169}$) corresponden a las secuencias de las señales de localización nuclear predichas con los programas PredictProtein y PSORT II respectivamente.

EGFP



RPA31-EGFP



pRPA31-NLS-EGFP



pRPA31-DNLS-EGFP (Δ NLS)

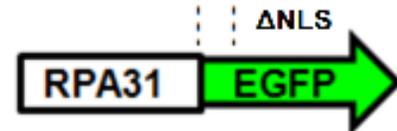


Figura 18. Representación esquemática de las construcciones para evaluar la NLS de RPA31. Para la construcción RPA31-EGFP y pRPA31-NLS-EGFP se observa una barra morada que corresponde a la señal de localización nuclear 163 PIRKTRAKKE $_{172}$ la cual fue deletada en la construcción pRPA31-DNLS-EGFP (Δ NLS).

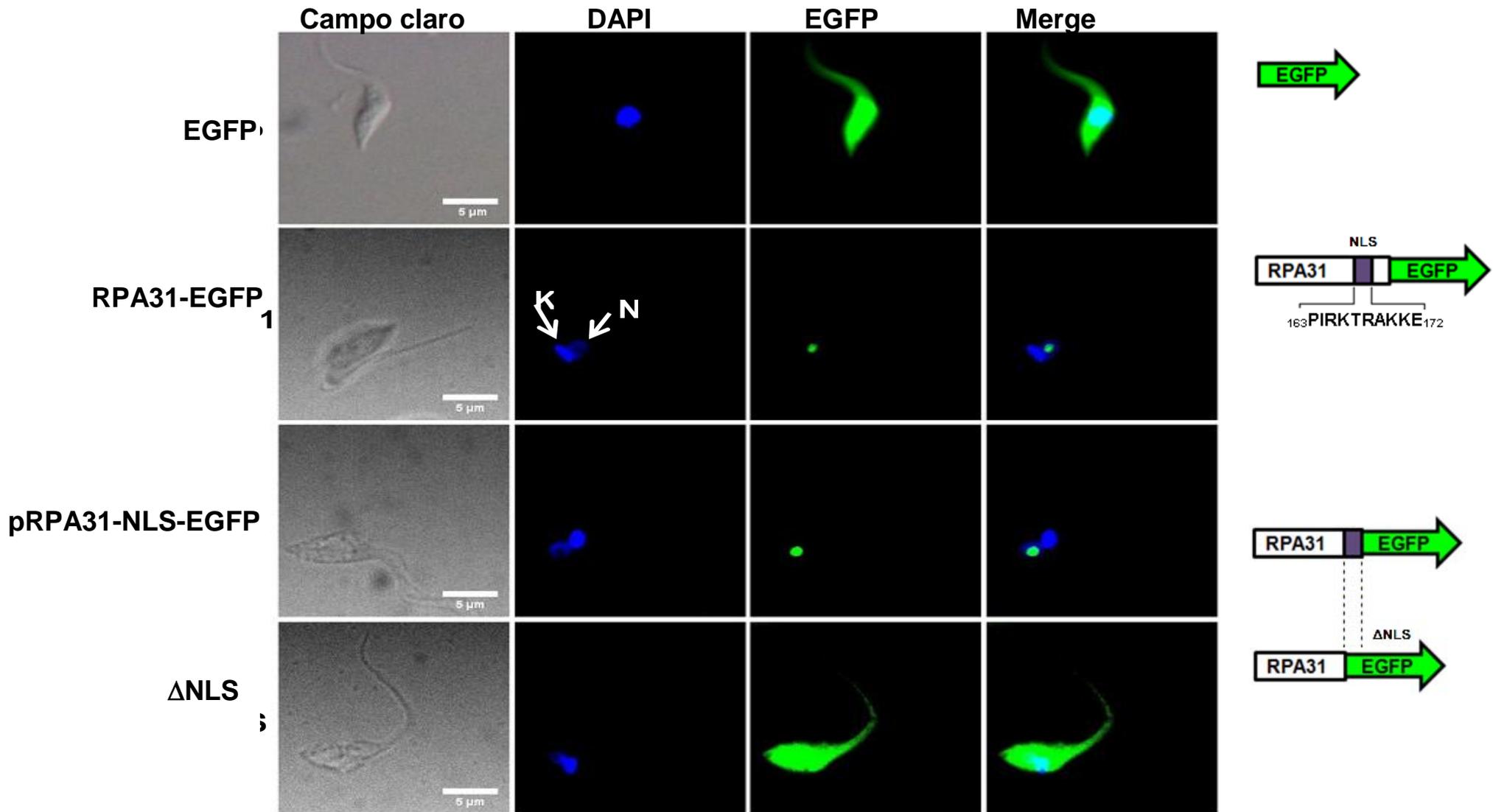


Figura 19. Microscopía de fluorescencia de epimastigotes transfectados con EGFP, RPA31-EGFP, pRPA31-NLS-EGFP (NLS) y pRPA31-DNLS-EGFP (Δ NLS). La señal de RPA31 en los parásitos con RPA31-EGFP y pRPA31-NLS-EGFP se localiza en el nucléolo, mientras que en los parásitos Δ NLS la distribución es en todo el cuerpo celular igual que los parásitos que solo contienen EGFP. A la derecha del panel se muestran los mapas de las construcciones transfectadas. Se observa el kinetoplasto (K) y el núcleo (N).

7. Discusión

El gen TbRPA31 fue reportado por primera vez en *T. brucei*, este gen codifica a la proteína RPA31, tras su caracterización se encontró que es una subunidad de la RNA Pol I, además es específica y esencial de tripanosomátidos, posteriormente se encontró el gen ortólogo TcRPA31 de *T. cruzi* (Nguyen et al., 2007). Como caracterización bioquímica realizamos un análisis por inmunorreplicación tipo Western blot del lisado de epimastigotes transfectados con RPA31-EGFP, con un anticuerpo contra EGFP en el que se detectó una banda que corresponde a la masa molecular de esta proteína de fusión (49 kDa), esto indica que *T. cruzi* es capaz de sintetizar esta proteína de fusión. La localización subcelular de RPA31 no ha sido reportada, por lo que en este estudio se realizó la construcción de la proteína de fusión RPA31-EGFP (fusión carboxilo), cuya señal de fluorescencia fue detectada en la zona subnuclear que sugiere fuertemente corresponder al nucléolo. Esta localización nucleolar de TcRPA31 es un fenómeno que se esperaba ya que está bien documentado que la RNA Pol I sintetiza el rRNA en esta región del núcleo (Russel y Zomerdiijk, 2005). De manera contrastante, se pudo observar que la señal de la proteína EGFP se extiende en todo el cuerpo celular indicando que la localización nucleolar de la proteína de fusión RPA31-EGFP es debido a TcRPA31 y no a EGFP. Una vez que logramos observar la señal nucleolar de TcRPA31 decidimos saber si su secuencia poseía una señal de localización nuclear (NLS) que le permitiera ser importada al núcleo. Al realizar la búsqueda bioinformática con los programas PSORT II y PredictProtein se detectaron las señales monopartitas $_{163}\text{PIRKTRA}_{169}$ y $_{165}\text{RKTRAKKE}_{172}$ en el extremo carboxilo respectivamente, por lo que se consideró a la NLS $_{163}\text{PIRKTRAKKE}_{172}$ como una NLS de diez aminoácidos. Los epimastigotes transfectados con la construcción pNLS-EGFP mostraron una señal de fluorescencia nucleolar igual que la proteína RPA31-EGFP, mientras que con la construcción ΔNLS mostraron la señal de fluorescencia a lo largo del cuerpo celular como ocurre con la proteína EGFP. Estos resultados indican que la secuencia decapeptídica $_{163}\text{PIRKTRAKKE}_{172}$ es responsable de la importación al

núcleo ya que la construcción pRPA31-NLS-EGFP lleva la secuencia codificante de TcRPA31 del aminoácido 1 al 172 descartando los 12 aminoácidos restantes del extremo carboxilo que se encuentran río abajo de la NLS y aun así la localización fue en la región nucleolar. Mientras que la construcción Δ NLS contiene la secuencia codificante de TcRPA31 del aminoácido 1 al 162 descartando la NLS de 10 aminoácidos y el extremo carboxilo se ubica en toda la célula. Resulta ser evidente que la secuencia decapeptídica $_{163}\text{PIRKTRAKKE}_{172}$ es indispensable para la importación nuclear de la proteína TcRPA31 sin la intervención de los aminoácidos restantes del extremo carboxilo. Sin embargo, la señal de fluorescencia a lo largo del cuerpo celular de los epimástigotes transfectados con la construcción Δ NLS implica una localización tanto citoplásmica como nuclear, esto podría deberse a la portación de alguna NLS no canónica que involucre su importación al núcleo. Por otra parte surge la duda de por qué la proteína EGFP se localiza a lo largo del cuerpo celular incluyendo el núcleo, esto puede deberse a que el complejo de poro nuclear tiene un rango permisible de 40 kDa dejando pasar por difusión simple a proteínas menores a ese peso molecular como es el caso de EGFP (28 kDa) (Chumakov y Prassolov, 2009).

Al realizar el análisis predictivo de las NLSs de todas las subunidades de la RNA Pol I de *T. cruzi* con el programa PSORT II se encontró que sólo RPA31 y las dos subunidades mayores RPA1 y RPA2 contienen NLSs mientras que RPC40, RPB5z, RPB6z, RPB8, RPA12, RPB10z y RPC19 carecen de NLS. Con estos resultados surge la pregunta de cómo estas subunidades logran ser importadas al núcleo. Una posible hipótesis para este fenómeno es que las subunidades que carecen de NLSs formen complejos multiproteínicos con proteínas que si tienen una NLS y sean internalizadas al núcleo junto con estas proteínas. Por otra parte podría ser que cada subunidad contenga en su secuencia una NLS no canónica como son los motivos de reconocimiento a RNA (RRM) que ya se ha reportado con algunas proteínas de tripanosomátidos (Freitas y Cunha, 2009; Cámara et al., 2013; Cassola y Frasch, 2009).

Debido a que muy pocos estudios de caracterización y predicción de NLSs de *T. cruzi* han sido reportados tanto bioinformática como experimentalmente (Tabla V), resulta importante señalar que en este trabajo se lograron encontrar mediante análisis *in silico* las NLSs de cinco proteínas ortólogas de TcRPA31 y las de las subunidades RPA1 y RPA2 (Tabla VI).

Tabla V. Señales de localización nuclear reportadas en *T. cruzi*. En negrita se resaltan los aminoácidos básicos ya que es una característica predominante en las señales de localización nuclear.

Proteína que contiene la NLS	Secuencia y tipo de NLS	Determinación	Referencia
Retrotransposón L1Tc	¹³⁶⁶ RRR ₁₃₆₈ --- ¹³⁷² RRRKEK ₁₃₇₇	Experimental	Heras <i>et al.</i> , 2005 Heras <i>et al.</i> , 2009
Proteína de unión a Spliced Leader XB1	³⁴³ RGRKRPRR ₃₅₀	<i>In silico</i>	Xu <i>et al.</i> , 2001
Factor de vía lítica LTY1	¹¹⁵ PKKRVLQ ₁₂₁	Experimental	Manning-Cela <i>et al.</i> , 2002; Ballesteros-Rodea <i>et al.</i> , 2012; Lugo-Cabllero <i>et al.</i> , 2013
Factor de Splicing p14	⁹⁰ RRKRR ₉₄	Experimental	Westergaard <i>et al.</i> , 2010
Topoisomerasa Topo-II	¹³³² VKKEAA ₁₃₃₇	Experimental	Obado <i>et al.</i> , 2011
Proteína de unión a RNA TcSR62	³⁶⁵ RRARSRSDSYERHRRR ₃₈₀	<i>In silico</i>	Nazer <i>et al.</i> , 2011

Tabla VI. Señales de localización nuclear encontradas en este trabajo. Para TcRPA1 y TcRPA2 se detectaron tres NLS mientras que para TcoRPA31 y TbRPA31 se detectaron dos. La únicas señales bipartitas que se encontraron son para TcRPA1 y TcoRPA31. En negrita se resaltan los aminoácidos básicos.

Proteína que contiene la NLS	Secuencia de la NLS	Determinación
Subunidad de la RNA Pol I TcRPA31	¹⁶³ PIRKTRAKKE ₁₇₂	Experimental
Subunidad de la RNA Pol I TcoRPA31	¹⁸³ KRGDKANDKAKSSKKS ₁₉₉ ¹²⁴ RRRK ₁₂₇	<i>In silico</i>
Subunidad de la RNA Pol I TbRPA31	¹⁵⁹ PLKRRAE ₁₆₅ ²⁰¹ PVKKEKK ₂₀₇	<i>In silico</i>
Subunidad de la RNA Pol I LmRPA31	¹⁶⁸ PRKKERK ₁₇₄	<i>In silico</i>
Subunidad de la RNA Pol I LIRPA31	¹⁶⁸ PRKKERK ₁₇₄	<i>In silico</i>
Subunidad de la RNA Pol I LbrRPA31	¹⁶⁹ PRKKERK ₁₇₅	<i>In silico</i>
Subunidad de la RNA Pol I TcRPA1	¹⁹⁶ RHRR ₁₉₉ ²⁰⁰ KRPR ₂₀₃ ²³² KRSSNCNHENARQRHK ₂₄₈	<i>In silico</i>
Subunidad de la RNA Pol I TcRPA2	³¹ RHRR ₃₄ ¹²²⁷ PRKRAVP ₁₂₃₃ ¹⁴⁷⁷ PVKGRKR ₁₄₈₃	<i>In silico</i>

La señal de fluorescencia de RPA31 en fase de crecimiento exponencial es nucleolar mientras que en fase estacionaria aparentemente se observa en todo el nucleoplasma; sin embargo, es necesario que estos resultados preliminares sean reforzados mediante microscopía confocal e inclusive por microscopía electrónica para tener una observación más precisa del fenómeno que aparentemente se está presentando. Este fenómeno nos resulta interesante ya que en nuestro grupo de investigación se ha logrado demostrar recientemente que existen cambios en la estructura nucleolar de *T. cruzi* en fase de crecimiento exponencial y fase estacionaria (Nepomuceno *et al.*, 2010).

Finalmente la secuencia decapeptídica $_{163}\text{PIRKTRAKKE}_{172}$ que hemos logrado caracterizar como una NLS funcional debe seguir siendo estudiada y caracterizarse mediante mutagénesis dirigida para encontrar qué aminoácidos están implicados en la importación nuclear de TcRPA31.

8. Conclusiones

- 1) La señal de fluorescencia de RPA31-EGFP indica fuertemente una localización nucleolar, además en fase de crecimiento exponencial su localización aparentemente es nucleolar, mientras que en fase estacionaria parece ser nucleoplasmática y nucleolar pero no en el citoplasma.
- 2) Las proteínas ortólogas de RPA31 de *L. major*, *L. infantum* y *L. braziliensis* son similares de un 86 % a un 95 %, mientras que las secuencias de *T. vivax*, *T. brucei* y *T. congolense* mostraron tener una inserción en el extremo amino. *T. cruzi* tiene una similitud de del 44 % con *T. vivax*, mientras que con las demás proteínas solo es similar en un ~34 %.
- 3) De las 10 subunidades de la RNA Pol I de *T. cruzi* analizadas con herramientas informáticas, solo RPA1, RPA2 y RPA31 mostraron posibles señales de localización nuclear.
- 4) Las señales de localización nuclear monopartitas de las proteínas ortólogas de RPA31 de distintos tripanosomátidos parecen conservar los aminoácidos básicos.
- 5) La señal de localización nuclear $_{163}\text{PIRKTRAKKE}_{172}$ de RPA31 parece ser indispensable para su importación al núcleo.

9. Perspectivas

- 1) Determinar si RPA31-EGFP se mantiene o es degradada en la fase infectiva de *T. cruzi*.
- 2) Monitorear la distribución de RPA31-EGFP por microscopía electrónica y analizar en qué zona específica del nucléolo se localiza en distintas fases de crecimiento.
- 3) Caracterizar por mutagénesis dirigida los aminoácidos específicos de la NLS de RPA31.
- 4) Mediante ensayos de co-precipitación ver con qué subunidades de la RNA pol I de *T. cruzi* interacciona RPA31 en especial con la subunidad RPB6z ya que en *T. brucei* se ha demostrado que pueden interactuar.
- 5) Cuantificar la expresión de RPA31-EGFP en epimástigotes por citometría de flujo para saber en qué día después de la transfección se tiene una mayor población que expresa la proteína de fusión. Esto servirá como un protocolo para nuestro laboratorio.
- 6) Dilucidar si una parte de la maquinaria de la RNA Pol I se ensambla en el citoplasma antes de entrar al núcleo debido a que solo las subunidades que presentan NLS predichas son RPA31, RPB1 y RPB2.

10. Referencias

- 1) Ballesteros-Rodea G., Santillán M., Cruz-Aguilaretal M. (2012). The alternative products of *Trypanosoma cruzi* LYT1 have different localization patterns. *Vet Méx.* 43 (1): 29-43.
- 2) Bertani G., Weigle J. (1953). Host controlled variation in bacterial viruses. *J Bacteriol.* 65: 113-121.
- 3) Bindereif A. (2012). RNA metabolism in trypanosomes. *Nucleic Acids and Molecular Biology.* 28: 1-27.
- 4) Calvillo S., De Rueda J., Martinez L., Cela R., Angulo E. (2010). Gene expression in trypanosomatid parasites. *J Biomed Biotechnol.* 2010: 1-15.
- 5) Cámara M., Bouvier A., Canepa E., Miranda R., Pereira A. (2013). Molecular and functional characterization of a *Trypanosoma cruzi* nuclear adenilato kinase isoform. *PLoS Negl Trop Dis.* 7 (2): 1-15.
- 6) Camargo E. (1964). Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. origin of metacyclic trypanosomes in liquid medium. *Rev Inst Med Trop S Paulo.* 6: 93-100.
- 7) Carod-Artal F. (2013). American trypanosomiasis. *Handb Clin Neurol.* 114: 103-123.
- 8) Cassola A., Frasch C. (2009). An RNA recognition motif mediates the nucleocytoplasmic transport of a trypanosome RNA-binding protein. *J Biol Chem.* 284 (50): 35015-35028.
- 9) Cassola A., Noé G., Frasch C. (2010). RNA recognition motifs involved in nuclear import of RNA-binding proteins. *RNA biol.* 7 (3): 339-344.
- 10) Cevallos A., Escobar M., Espinosa N., Herrera J., Villasenor I., Hernandez R. (2005). The stabilization of housekeeping transcripts in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes evidences a global regulation of RNA decay during stationary phase. *FEMS Microbiol Lett.* 246: 259-264.

- 11) Cevallos A., Hernández R. (2014). Chagas' disease: pregnancy and congenital transmission. *BioMed Res Int.* 2014: 1-10.
- 12) Ciganda M., Williams N. (2012). Characterization of a novel association between two Trypanosome-specific proteins and 5S rRNA. *PLoS one.* 7 (1): 1-9.
- 13) Chook Y., Süel K. (2011). Nuclear import by karyopherin β s: recognition and inhibition. *Biochim Biophys Acta.* 1813 (9): 1593-1606.
- 14) Clark D., (2010). *Molecular Biology. Update Edition.* Academic Press. USA. 34-35.
- 15) Chumakov P., Prassolov S. (2010). Organization and regulation of nucleocytoplasmic transport. *Molecular Biology.* 44 (2): 211-228.
- 16) Clayton J. (2010). Chagas disease 101. *Nature.* 465: S4-S5.
- 17) Conti E., Uy M., Leighton L., Blobel G., Kuriyan J. (1998). Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. *Cell.* 94: 193-204.
- 18) Cooper M., Hausman E. (2010). *The cell: a molecular approach.* 5^{ta} edición. ASM Press. Washington. 355.
- 19) Cremer T., Cremer C., (2001). Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet.* 2: 292-301.
- 20) Cruz-Reyes A., Pickering-López J. (2006). Chagas disease in Mexico: an analysis of geographical distribution during the past 76 years - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 101 (4): 345-354.
- 21) Daniels J., Gull K., Wickstead B., (2012). The trypanosomatid-specific N terminus of RPA2 is required for RNA polymerase I assembly, localization, and function. *Eukaryot Cell.* 11 (5): 662-672.
- 22) Das A, Dasgupta A, Sharma S, Ghosh M, Sengupta T, Bandopadhyay S, Majumder HK. (2001). Characterisation of the gene encoding type II DNA

- topoisomerase from *Leishmania donovani*: a key molecular target in antileishmanial therapy. *Nucleic Acids Res.* 29 (9): 1844-1851.
- 23) De souza W. (1984). Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Int Rev Cytol.* 86: 197-283.
- 24) De Souza W. (2002), Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des.* 8: 269-285.
- 25) De Souza W., de Carvalho T., Barrias E. (2010). Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction. *Int J Cell Biol.* 2010: 1-18.
- 26) De Souza W., Meyer H. (1974). On the fine structure of the nucleus in *Trypanosoma cruzi* in tissue culture forms. Spindle fibers in the dividing nucleus. *J Protozool.* 21: 48-52.
- 27) Delaporte F. (1997). Romaña's sign. *J Hist Biol.* 30: 357-366.
- 28) Deschamps P., Lara E., Marande W., López-García P., Ekelund F., Moreira D. (2011). Phylogenomic analysis of kinetoplasts supports that trypanosomatids arose from within bodonids. *Mol Biol Evol.* 28 (1): 53-58.
- 29) Deslandes L., Rivas S., (2011). The plant cell nucleus a true arena for the fight between plants and pathogens. *Plant Signaling Behav.* 6 (1): 42-48.
- 30) Devaux S., Kelly S., Lecordier L., Wickstead B., Perez-Morga D., Pays E., Vanhamme L., Gull K. (2007). Diversification of function by different isoforms of conventionally shared RNA polymerase subunits. *Mol Biol Cell.* 18 (4): 1293-1301.
- 31) Dingwall C., Sharnick S., Laskey R. (1982). A polypeptide domain that specifies migration of nucleoplasmin into the nucleus. *Cell.* 30 (2): 449-458.
- 32) Dingwall C., Robbins J., Dilworth M., Roberts B., Richardson D. (1988). The nucleoplasmin nuclear location sequence is larger and more complex than that of SV-40 large T antigen. *J Cell Biol.* 107 (3): 841-849.
- 33) El-Sayed N., Myler P., Bartholomeu D., Nilsson D., Aggarwal G., Tran A., Ghedin E., Worthey E., Delcher A., Blandin G., Westenberger S., Caler E.,

- Cerqueira G., Branche C., Haas B., Anupama A., Arner E., Aslund L., Attipoe P., Bontempi E., Bringaud F., Burton P., Cadag E., Campbell D., Carrington M., Crabtree J., Darban H., da Silveira J., de Jong P., Edwards K., Englund P., Fazelina G., Feldblyum T., Ferella M., Frasch A., Gull K., Horn D., Hou L., Huang Y., Kindlund E., Klingbeil M., Kluge S., Koo H., Lacerda D., Levin M., Lorenzi H., Louie T., Machado C., McCulloch R., McKenna A., Mizuno Y., Mottram J., Nelson S., Ochaya S., Osoegawa K., Pai G., Parsons M., Pentony M., Pettersson U., Pop M., Ramirez J., Rinta J., Robertson L., Salzberg S., Sanchez D., Seyler A., Sharma R., Shetty J., Simpson A., Sisk E., Tammi M., Tarleton R., Teixeira S., Van Aken S., Vogt C., Ward P., Wickstead B., Wortman J., White O., Fraser C., Stuart K., Andersson B. (2005). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of chagas disease. *Science*. 309 (5733): 409-415.
- 34) Elias M., Marques-Porto R., Freymüller E., Schenkman S. (2001). Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation. *Mol Biochem Parasitol*. 112 (1): 79-90.
- 35) Fahrenkrog B., Aebi U. (2003). The nuclear pore complex: nucleocytoplasmic transport and beyond. *Nature Rev Mol Cell Biol*. 4 (10): 757-766.
- 36) Fatica A., Tollervey D. (2002). Making ribosomes. *Curr Opin Cell Biol*. 14 (3): 313-318.
- 37) Floch A., Palancade B., Doye B. (2014). Fifty years of nuclear pores and nucleocytoplasmic transport studies: multiple tools revealing complex rules, *Methods Cell Biol*. 122: 1-40.
- 38) Freitas N., Cunhas C., (2009), Mechanisms and signals for the nuclear import of proteins, *Curr Genomics*, 10 (8): 550-557.
- 39) Garcia E., Azambuja P. (1991). Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol Today*. 7 (9): 240-244.
- 40) Goldfarb D., Corbett A., Mason D., Harreman M., Adam S. (2004). Importin α : a multipurpose nuclear-transport receptor. *Trends Cell Biol*. 14 (9): 505-514.

- 41) Gorlich E., Henklein P., Laskey R., Hartmann E. (1996). A 41 aminoacid motif in importin α confers binding to importin β and hence transit into the nucleus, *EMBO J.* 15 (8): 1810-1817.
- 42) Gourse R., Gaal T., Bartlett M., Appleman J., Ross W. (1996). rRNA transcription and growth rate-dependent regulation of ribosome synthesis in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol.* 50: 645-677.
- 43) Heras S., Thomas M., Macias F., Patarroyo M., Alonso C., López M. (2009). Nucleic-acidbinding properties of the C2-L1Tc nucleic acid chaperone encoded by L1Tc retrotransposon. *Biochem J.* 424 (3): 479-490.
- 44) Heras S., López M., García-Pérez J., Martin S., Thomas M. (2005). The L1Tc C-terminal domain from *Trypanosoma cruzi* non-long terminal repeat retrotransposon codes for a protein that bears two C2H2 zinc finger motifs and is endowed with nucleic acid chaperone activity. *Mol Cell Biol.* 25 (21): 9209-9220.
- 45) Hernández-Rivas R., Díaz –De León F., Castañeda M., (1988). Molecular cloning and partial characterization of ribosomal RNA genes from *Trypanosoma cruzi*. *Mol biochem Parasitol.* 27 (2-3): 275-280.
- 46) Hernández R., Calvillo S., Hernández-Rivas R., Gómez E. (1993). *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA genes: a review. *Biol Res.* 26 (1-2): 109-114.
- 47) Hernández R., Cevallos A. (2014). Ribosomal RNA gene transcription in trypanosomes. *Parasitol Res.* 113 (7): 2415-2424.
- 48) Hoelz A., Debler W., Blobel G. (2011). The structure of the nuclear pore complex. *Annu Rev Biochem.* 80: 613-643.
- 49) Jensen R., Englund P. (2012). Network news: the replication of kinetoplast DNA, *Annu Rev Microbiol.* 66: 473-491.
- 50) Jiménez-García L., Zavala G., Chavez-Munguía B., Ramos-Godínez M., López-Velazquez G., Segura-Valdez M., Montañez C., Hehl A., Argüello-

- García R., Ortega-Pierres G. (2008). Identification of nucleoli in the early branching protist *Giardia duodenalis*. *Int J Parasitol.* 38 (11): 1297-1304.
- 51) Kalab P., Heald R. (2008). The RanGTP gradient-a GPS for the mitotic spindle. *J Cell Sci.* 121 (Pt 10): 1577-1586.
- 52) Kalderon D., Roberts B., Richardson W., Smith E. (1984). A short amino acid sequence able to specify nuclear location, *Cell.* 39 (3 Pt 2): 499-509.
- 53) Kanutson A., Luo J., Ranish J., Hahn S., (2014). Architecture of the *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase I core factor complex. *Nature.* 21 (9): 810-816.
- 54) Kohler A., Hurt E. (2007). Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Mol cell biol.* 8 (10): 761-773.
- 55) Lange A., Mills R., Lange J., Steward M., Devine E., Corbett H., (2007). Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with Importin α . *J Biol Chem.* 282 (8): 5101-5105.
- 56) Lazzari C., Pereira M., Lorenzo M. (2013). Behavioural biology of chagas disease vectors. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 108 (Suppl. I): 34-47.
- 57) Lenser T., Weissbart K., Ulbricht T., Klement K., Hemmerich P. (2010). Fluorescence fluctuation microscopy to reveal 3D architecture and function in the cell nucleus. *Methods Cell Biol.* 98: 3-33.
- 58) Lee S., Matsuura Y., Liu S., Steward M. (2005). Structural basis for nuclear import complex dissociation by Ran GTP. *Nature.* 435: 693-696.
- 59) López-Velázquez G., Hernández R., López-Villaseñor I., Reyes- Vivas H., Segura-Valdez M., Jiménez-García L., (2005). Electron microscopy analysis of the nucleolus of *Trypanosoma cruzi*. *Microsc Microanal.* 11 (4): 293-299.
- 60) Lott K., Cingolani G. (2011). The importin β binding domain as a master regulator of nucleocytoplasmic transport. *Biochim Biophys Acta.* 1813 (9): 1578-1592.

- 61) Lugo-Caballero C, Ballesteros-Rodea G, Martínez-Calvillo S, Manning-Cela R. (2013). Identification of protein complex associated with LYT1 of *Trypanosoma cruzi*. *Biomed Res Int*. 2013: 493525.
- 62) Lukeš J., Skalický T., Týc J , Votýpka J, Yurchenko Y. (2014). Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates. *Mol Biochem Parasitol*. 195 (2): 115-122.
- 63) Macedo A., Machado C., Oliveira R., Pena S. (2004), *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease, *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 99 (1): 1-12.
- 64) Manning-Cela R., González A., Swindle J., (2002). Alternative splicing of LYT1 transcripts in *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*. 70 (8): 4726-4728.
- 65) Marchetti MA, Tschudi C, Kwon H, Wolin SL, Ullu E. (2000). Import of proteins into the trypanosome nucleus and their distribution at karyokinesis. *J Cell Sci*. 113 (Pt 5): 899-906.
- 66) Mélése T., Xue Z. (1995). The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome: *Curr Opin Cell Biol*. 7 (3): 319-324.
- 67) Misteli T. (2011). The inner life of the genome. *Sci Am*. 304 (2): 66-73.
- 68) Moss T., Stefanovsky V. (2002). At the center of eukaryotic life. *Cell*. 109 (5): 545-548.
- 69) Marfori M., Mynott A., Ellis J., Mehdi A., Saunders N., Curmi P. (2011), Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization. *Biochim Biophys acta*. 1813 (9): 1562-1577.
- 70) Myles M. (2009). American trypanosomiasis (Chagas' Disease). In *Manson's Tropical diseases*, 22nd edition, Elsevier. 1327-1340.
- 71) Mosgoeller W., (2004). Nucleolar ultrastructure in vertebrates. en: Olson MOJ (ed) *The nucleolus*. Landes Biosciences. 10-20.

- 72) Mosammaparast N., Pemberton L. (2004). Kariopherins: from the nuclear transport mediators to nuclear-function regulators. *Trends Cell Biol.* 14 (10): 547-556.
- 73) Nardelli C., Ávila R., Freund A., Motta C., Manhaes L., leandro de Jesus C., Shenkman S., Fragoso P., Krienger A., Goldenberg S., Dallagiovanna B. (2007). Small-subunit rRNA procesome proteins are translationally regulated during differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Eukaryot Cell.* 6 (2): 337-345.
- 74) Názer E., Verdún R., Sánchez D. (2011). Nucleolar localization of RNA binding proteins induced by actinomycin D and heat shock in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One.* 6 (5): 1-13.
- 75) Nepomuceno T., Lara R., Cevallos A., López I., Jiménez L., Hernández R. (2010). The *Trypanosoma cruzi* nucleolus: a morphometrical analysis of cultured epimastigotes in the exponential and stationary phases. *FEMS Microbiol Lett.* 313 (1): 41-46.
- 76) Nguyen N., Schimanski B., Gunzl A. (2007). Active RNA polymerase I of *Trypanosoma brucei* harbors a novel subunit essential for transcription. *Mol Cell Biol.* 27 (17): 6254-6263.
- 77) Nguyen T., Schimanski B., Zahn A., Klumpp B., Gunzl A. (2006). Purification of an eight subunit RNA polymerase I complex in *Trypanosoma brucei*, *Mol Biochem Parasitol.* 149 (1): 27-37.
- 78) Norman F., López-Vélez R. (2013). Chagas disease and breast-feeding. *Emerg Infect Dis.* 19 (10): 1561-1566.
- 79) Nunes M., Barbosa M., Ribeiro A. (2009). Ischemic cerebrovascular events in patients with chagas cardiomyopathy: a prospective follow-up study. *J Neurol Sci.* 278 (1-2): 96-101.
- 80) Obado SO, Bot C, Echeverry MC, Bayona JC, Alvarez VE, Taylor MC, Kelly JM. (2011). Centromere-associated topoisomerase activity in bloodstream form *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res.* 39 (3): 1023-1033.

- 81) Ogbadoyi E., Ersfeld K., Robinson D., Sherwin T., Gull K. (2000). Architecture of the *Trypanosoma brucei* nucleus during interphase and mitosis. *Chromosoma*. 108 (8): 501-513 pp.
- 82) Olson M. (2010). Introduction. en: Olson MOJ (ed) *The nucleolus*. Landes Bioscience. Austin.1-9.
- 83) OMS (2015), La enfermedad de chagas (tripanosomiasis americana). Hoja descriptiva. (340).
- 84) Pante N., Kann M. (2002). Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. *Mol Biol Cell*. 13 (2): 425-434.
- 85) Pinto A., Valente S., Valente Vda. (2008). Acute phase of chagas disease in the brazilian amazon region; study of 233 cases from Pará, Amapá and Maranhao observed between 1988 and 2005, *Rev Soc Bras Med Trop*. 41 (6): 602-614.
- 86) Prata A. (2001). Clinical and epimiological aspects of chagas disease. *Lancet Infect Dis*. 1 (2): 92-100.
- 87) Ramakrishnan V. (2014). The ribosome emerges from a black box. *Cell*. 159 (5): 979-984.
- 88) Raska I., Koberna K, Malinsk J., Fidlerova H., Masata M. (2004). The nucleolus and transcription of ribosomal genes. *Biol Cell*. 96 (8): 579-594.
- 89) Robbins J., Dilworth M., Laskey A., Dingwall C. (1991). Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell*. 64 (3): 615-623.
- 90) Russell J., Zomerdijk M. (2005). RNA-polymerase-I-directed rDNA transcription, life and works. *TRENDS in Biochemical Sciences*. 30 (2): 87-96.
- 91) Russell J., Zomerdijk M., (2006), The RNA Polimerase I transcription machinery. *Biochem Soc Symp*. 73: 203-216.

- 92) Sambrook J., Russell D. (2001), *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. 3rd ed. CSHL Press. USA. 1.109-1.111.
- 93) Schettino S., Arteaga Irene de haro, Bravo M., (2005). Tres especies de triatomos y su importancia como vectores de *Trypanosoma cruzi* en Mexico. *MEDICINA*. 65 (1): 63-69.
- 94) Schimanski B., Nguyen T., Gunzl A. (2005). Characterization of a multisubunit transcription factor complex essential for spliced-leader RNA gene transcription in *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol*. 25 (16): 7303-7313.
- 95) Schofield C., Galvao C. (2010). Clasificación, evolución, and species groups within the Triatominae. *Acta trop*. 110 (2-3): 88-100.
- 96) Steverding D., (2014). The history of chagas disease. *Parasit Vectors*. 7 (317): 1-8.
- 97) Steward M. (2007). Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8 (3): 196-208.
- 98) Souza W. (2009). Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 104 (suppl. 1): 89-100 pp.
- 99) Storino R., Milei J. (1994), *Enfermedad de chagas, Doyma Argentina, Buenos Aires*, 1-7.
- 100) Suntharalingam M., Wente S. (2003). Peering the pore: nuclear pore complex structure, assembly, and function. *Dev Cell*. 4 (6): 775-789.
- 101) Teixeira E., Benchimol M., Crepaldi H., de Sousa W. (2012). Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 6 (8): e1749.
- 102) Terry J., Shows B., Wente R. (2007). Crossing the nuclear envelope: hierarchical regulation of nucleocytoplasmic transport. *Science*. 318 (5855): 1412-1416.
- 103) Thiry M., Lafontaine D. (2005). Birth of a nucleolus: the evolution of nucleolar compartments. *Trends Cell Biol*. 15 (4): 194-199.

- 104) Troncon L., Aprile L., Oliveira R. (2000). Abnormally rapid gastric emptying of an isosmotic liquid meal in patients with megaduodenum. *Dig Dis Sci.* 45 (11): 2145-2150.
- 105) Uliel S., Liang X., Unger R., Michaeli S. (2004). Small nucleolar RNAs that guide modification in tripanosomatids: repertoire, targets, genome organization, and unique functions. *Int J Parasitol.* 34 (4): 445-454.
- 106) Vannini A., Cramer P. (2012). Conservation between the RNA polymerase I, II, and III transcription initiation machineries. *Mol Cell.* 45 (4): 439-446.
- 107) Velasco-Castrejón O., Rivas-Sánchez B. (2008). Apuntes para la enfermedad de chagas en México. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 65: 57-79.
- 108) Villalobos G., Martínez-Hernández F., de la Torre P., Lacclette J., Espinoza B. (2011). Entomological indices, feeding sources, and molecular identification of *Triatoma phyllosoma* (Hemiptera: Reduviidae) one of the main vectors of chagas disease in the Istmo de Tehuantepec, Oaxaca, Mexico, molecular phylogenetics and evolution. *Am J Trop Med Hyg.* 85 (3): 279-287.
- 109) Wanderley de Souza (1999). A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 94 (suppl I): 17-36.
- 110) Wagner P., Kunz J., Koller A., Hall M. (1990). Active transport of proteins into the nucleus. *FEBS Lett.* 275 (1-2): 1-5.
- 111) Warner J. (1999). The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci.* 24 (11): 437-440.
- 112) Westergaard GG, Bercovich N, Reinert MD, Vazquez MP. (2010). Analysis of a nuclear localization signal in the p14 splicing factor in *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol.* 40 (9): 1029-1035.
- 113) Weis K. (2003). Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell.* Vol 112 (4): 441-451.

- 114) Weis K. (2007). The nuclear pore complex: oily spaghetti or gummy bear?.
Cell. 130 (3): 405-407.
- 115) Weiss K., Ryder U., Lamond A. (1996). The conserved amino-terminal domain of hSRP1 is essential for nuclear protein import. EMBO J. 15 (8): 1818-1825.
- 116) Weiser F. (2011). Protozoa and human disease. Garland Science. New York. 105.
- 117) Xu P., Wen L., Benegal G., Wang X., Buck G. (2001). Identification of a spliced leader RNA binding protein from *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol. 112 (1): 39-49.
- 118) Zárate L., Zárate R. (1985). A checklist of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) of Mexico. Int J Entomol. 27 (1-2): 102-127.

Fuentes electrónicas

- 1) <http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001749>
- 2) <http://www.cdc.gov/globalhealth/ntd/diseases/otherNTDs.html>
- 3) <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- 4) <http://tritrypdb.org/tritrypdb/>

11. APÉNDICE

Amortiguador fosfato salino (PBS)

- NaCl 8 g
- KCl 0.2 g
- Na₂HPO₄ 1.44 g
- KH₂PO₄ 0.24 g
- Aforar a 1 L con agua desionizada y esterilizar en autoclave

Amortiguador TBE (5x)

- Tris base 54 g
- H₃BO₃ 27.4 g
- EDTA 4.65 g
- Aforar a 1 L
- Amortiguador TE (10,0.2)
- 10mM Tris pH 7.4
- 0.2mM EDTA pH 7.2

Medio LB líquido

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

Medio LB Agar

- A 1 L de Medio LB líquido se le agrega además 15 g de bacto agar.

Medio LIT (Liver Infusion triptone medium)

- NaCl 4 g
- KCl 0.4 g
- Na₂HPO₄ 8 g
- Glucosa 2 g

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

Medio SOC

- Triptona 20g
- Extracto de levadura 5g
- NaCl 0.5g
- Disolver en 950 mL de agua desionizada
- KCl 250mM 10mL
- Llevar a 980 mL
- Ajustar pH 7 con NaOH 5M y esterilizar en autoclave.
- A 55°C agregar 10 mL de MgCl₂ y 10 mL de glucosa 2 M (esterilizados por filtración 0.22 μm).

Medio YT2X

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

TB con DMSO

- PIPES 0.15 g
- CaCl₂ 0.11 g
- KCl 0.93 g
- MnCl₂ 0.54 g
- Aforar a 50 mL
- Disolver en agua desionizada, ajustar pH a 6.7 con KOH 1 N
- Filtrar por en filtros (Millipore) de 0.45 μm
- Al resuspender el botón de células agregar DMSO a una concentración final de 7%