



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS GENES CODIFICANTES PARA LAS PROTEÍNAS
NITROREDUCTASA TIPO I Y SUBUNIDAD B DE LA CALCINEURINA DE
*TRYPANOSOMA RANGELI***

Presentado por:

MARJORIE CAROLINA MONTENEGRO ARCILA

Microbióloga Agrícola y Veterinaria

Tesis presentada como requisito para optar al título de Magíster en Ciencias Biológicas

Bajo la Tutoría de:

CONCEPCIÓN JUDITH PUERTA BULA, Bacterióloga, Ph.D.

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

Bogotá, Colombia

Junio de 2014

Artículo 23 de la Resolución No. 13 de julio de 1946

La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por qué las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia.

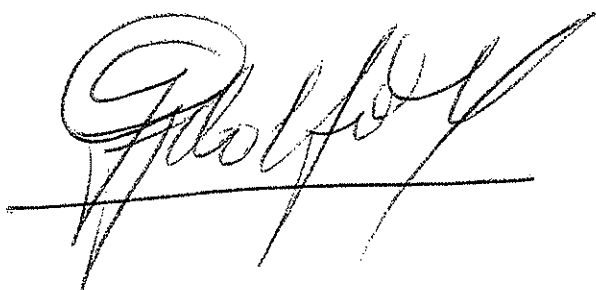
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS GENES CODIFICANTES PARA LAS PROTEÍNAS
NITROREDUCTASA TIPO I Y SUBUNIDAD B DE LA CALCINEURINA DE
TRYPANOSOMA RANGELI

MARJORIE CAROLINA MONTENEGRO ARCILA



CONCEPCIÓN JUDITH PUERTA BULA, Ph.D.

DIRECTOR



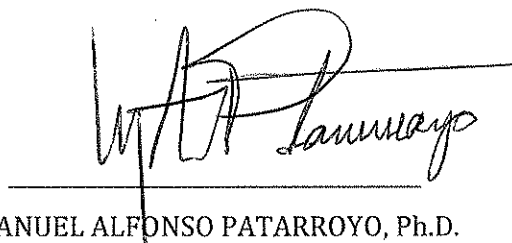
GUSTAVO ADOLFO VALLEJO, Ph.D.

JURADO



OMAR TRIANA, Ph.D.

JURADO



MANUEL ALFONSO PATARROYO, Ph.D.

JURADO

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS GENES CODIFICANTES PARA LAS PROTEÍNAS
NITROREDUCTASA TIPO I Y SUBUNIDAD B DE LA CALCINEURINA DE
*TRYPANOSOMA RANGELI***

MARJORIE CAROLINA MONTENEGRO ARCILA

CONCEPCIÓN JUDITH PUERTA B, Ph.D.
DECANA ACADÉMICA

MANUEL ANTONIO FRANCO, Ph.D.
DIRECTOR DE POSGRADO

RESUMEN

Trypanosoma (Herpetosoma) *rangeli* es un parásito protozoo capaz de infectar hospederos mamíferos sin producir patología en estos. La caracterización biológica y molecular de este parásito se ha enmarcado en el contexto de *Trypanosoma cruzi*, por cuanto estos parásitos comparten un gran número de características biológicas y presentan una diferencia muy específica en su ciclo de vida: mientras el patógeno *T. cruzi* puede invadir y replicarse en células del hospedero mamífero, *T. rangeli* no posee dicha capacidad.

En el presente trabajo, se seleccionaron dos proteínas asociadas al proceso de invasión celular de *T. cruzi*: la Nitroreductasa tipo I (NTR tipo I) y la Subunidad B de la Calcineurina (CnB), para ser caracterizadas en términos de presencia, expresión y localización en *T. rangeli*. Los resultados mostraron que *T. rangeli* posee los genes codificantes para dichas proteínas, con una alta identidad y conservación con respecto a *T. cruzi*. Análisis posteriores mostraron que ambos genes se expresan a nivel de ARNm y proteína, y que existe una tendencia a una mayor expresión de la NTR tipo I en *T. cruzi*.

La búsqueda de motivos funcionales conservados y el modelamiento de las proteínas de *T. rangeli* permitió hipotetizar que estas proteínas presentan actividades enzimáticas conservadas con respecto a las reportadas para otros tripanosomátidos. Sin embargo, el patrón de localización sub-celular diferencial encontrado para la NTR tipo I, siendo mitocondrial y citoplasmática en *T. cruzi* y *T. rangeli*, respectivamente, sugiere que la función endógena de la proteína puede ser diferente entre especies mientras que para CnB la localización citoplasmática y el patrón de expresión similar entre especies sugeriría una función endógena conservada y que estaría implicada en diversos procesos celulares del parásito.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1 <i>Trypanosoma rangeli</i>	4
2.1.1 Ciclo de vida.....	5
2.1.2 Variabilidad genética	8
2.1.3 Caracterización molecular.....	9
2.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>.....	10
2.2.1 Ciclo de vida.....	11
2.2.2 Enfermedad de Chagas.....	12
2.2.3 Variabilidad genética	13
2.2.4 Caracterización molecular.....	14
2.3 Bases moleculares de la invasión por <i>T. cruzi</i>.....	15
2.3.1 Nitroreductasa tipo I (NTR).....	17
2.3.1.1 NTR tipo I en tripanosomátidos	19
2.3.2 Subunidad B de la Calcineurina (CnB).....	21
2.3.2.1 CnB y Calcineurina en tripanosomátidos	22
3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	23
4. OBJETIVOS.....	23
4.1 Objetivo general.....	23
4.2 Objetivos específicos.....	23
5. MATERIALES Y MÉTODOS	24
5.1 Parásitos y obtención de ácidos nucleicos	24
5.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	24
5.2.1 Gen <i>ntr</i>	25
5.2.2 Gen <i>cnb</i>	25
5.3 Clonación y secuenciación de productos de PCR	26
5.4 Southern blot	27
5.4.1 Digestión y transferencia de ADN a soporte sólido.....	27
5.4.2 Obtención y marcaje de la sonda	28
5.4.3 Hibridación	28

5.5 Análisis “in silico” de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos obtenidas.....	29
5.5.1 Identidad, búsqueda de motivos y dominios conservados.....	29
5.5.2 Relaciones filogenéticas	29
5.5.3 Construcción de modelos estructurales de las proteínas NTR y CnB de <i>T. rangeli</i> ..	29
5.5.3.1 NTR tipo.....	29
5.5.3.1 CnB.....	30
5.6 Determinación de la expresión de los transcritos <i>ntr</i> y <i>cnb</i> en <i>T. cruzi</i> 058PUJ y <i>T. rangeli</i> Tre.....	31
5.6.1 Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR)	31
5.6.1.1 Síntesis de ADN copia (ADNc)	31
5.6.1.2 Amplificación de transcritos incluyendo región 5'UTR	31
5.6.2 Cuantificación relativa de transcritos por PCR en tiempo real (qPCR)	32
5.6.2.1 Gen normalizador.....	33
5.6.2.2 Diseño de iniciadores y puesta a punto de qPCR	33
5.6.2.3 Curvas estándar	38
5.6.2.4 Determinación del número de copias relativo de cada transcrito	39
5.7 Determinación de la expresión y localización de las proteínas NTR y CnB de <i>T. cruzi</i> 058PUJ y <i>T. rangeli</i> Tre	40
5.7.1 Obtención anticuerpos policlonales anti rTrCnB.....	40
5.7.1.1 Expresión y purificación de la proteína recombinante rTrCnB.....	40
5.7.1.2 Inmunización de conejo Nueva Zelanda con rTrCnB y obtención de sueros.....	43
5.7.1.3 Evaluación de la reactividad del suero anti rTrCnB mediante ELISA indirecto	43
5.7.2 Citometría de flujo	44
5.7.3 Inmunofluorescencia	45
6. RESULTADOS	46
6.1 El genoma de <i>T. rangeli</i> Tre contiene los genes <i>ntr</i> y <i>cnb</i>	46
6.1.1 <i>ntr T. rangeli</i> Tre.....	46
6.1.2 <i>ntr T. cruzi</i> 058PUJ.....	49
6.1.3 <i>cnb T. rangeli</i> Tre.....	52
6.1.4 <i>cnb T. cruzi</i> 058PUJ.....	55
6.2 Análisis in silico de secuencias obtenidas	58
6.2.1 Identidad.....	58
6.2.1.1 NTR tipo I <i>T. rangeli</i> Tre.....	59
6.2.1.2 NTR tipo I <i>T. cruzi</i> 058PUJ.....	60

6.2.1.3 CnB <i>T. rangeli</i> Tre.....	62
6.2.1.2 CnB <i>T. cruzi</i> 058PUJ.....	63
6.2.2 Búsqueda de motivos y dominios conservados.....	65
6.2.2.1 NTR tipo I de <i>T. rangeli</i>	65
6.2.2.1 CnB <i>T. rangeli</i> Tre.....	68
6.2.3 Relaciones filogenéticas	69
6.2.3.1 <i>ntr</i>	69
6.2.3.2 <i>cnb</i>	71
6.2.4 Modelos tridimensionales	72
6.2.4.1 NTR Tipo I de <i>T. rangeli</i> Tre	72
6.2.4.2 CnB de <i>T. rangeli</i> Tre.....	73
6.3 Los genes <i>ntr</i> y <i>cnb</i> de <i>T. rangeli</i> se expresan a nivel de ARNm	74
6.3.1 <i>ntr</i> <i>T. rangeli</i> Tre.....	75
6.3.2 <i>ntr</i> <i>T. cruzi</i> 058PUJ.....	76
6.3.3 <i>cnb</i> <i>T. rangeli</i> Tre.....	77
6.3.4 <i>cnb</i> <i>T. cruzi</i> 058PUJ.....	79
6.4 Cuantificación relativa de transcritos <i>ntr</i> y <i>cnb</i>.....	80
6.4.1 Identificación gen <i>hgprt</i> en genoma de <i>T. rangeli</i> Tre	80
6.4.2 Curvas estándar	82
6.4.2.1 <i>ntr</i>	83
6.4.2.2 <i>cnb</i>	84
6.4.2.3 <i>hgprt</i>	85
6.4.3 Amplificación de los transcritos de cada gen a partir de ADNc de ambos parásitos	86
6.4.4 Determinación de número de copias de cada transcrito y comparación entre y <i>T.</i> <i>rangeli</i> Tre y <i>T. cruzi</i> 058PUJ.....	87
6.4.4.1 Transcrito <i>ntr</i>	87
6.4.4.2 Transcrito <i>cnb</i>	89
6.4.4.3 Transcrito <i>hgprt</i>	92
6.4.5 Relación número de copias de cada transcrito vs gen normalizador (<i>hgprt</i>)	94
6.4.5.1 Transcrito <i>ntr</i>	94
6.4.5.2 Transcrito <i>cnb</i>	96
6.5 Obtención y chequeo de anticuerpos policlonales anti rTrCnB	97
6.6 Las proteínas NTR tipo I y CnB se expresan en epimastigotes de <i>T. rangeli</i> Tre... 99	
6.6.1 NTR tipo I.....	99
6.6.2 CnB.....	103

6.6 Determinación de localización sub-celular de las proteínas NTR tipo I y CnB en epimastigotes de <i>T. rangeli</i> Tre y <i>T. cruzi</i> 058PUJ.....	107
6.6.1 NTR tipo I.....	107
6.6.2 CnB.....	111
7. DISCUSIÓN	115
7.1 Nitroreductasa tipo I (NTR).....	116
7.2 Subunidad B de la Calcineurina (CnB).....	120
8. CONCLUSIÓN	125
9. RECOMENDACIONES	126
10. BIBLIOGRAFÍA	127
11. ANEXOS	138
11.1 Amplificación, clonación y secuenciación genes <i>ntr</i> y <i>cnb</i> de <i>T. rangeli</i> Choachí y SC-58.....	138
11.1.1 <i>ntr</i>	138
11.1.2 <i>cnb</i>	140
11.2 Secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las proteínas NTR tipo I y CnB reportadas para varias especies de tripanosomátidos.....	143
11.3 Prueba PCR convencional de iniciadores diseñados para qPCR.....	150
11.3.1 <i>ntr</i>	150
11.3.2 <i>cnb</i>	151
11.4 Evaluación de relaciones filogenéticas en tripanosomátidos mediante el método Neighbor Joining.....	152
11.4.1 <i>ntr</i>	152
11.4.2 <i>cnb</i>	153
11.5 Resultados del procesamiento muestras qPCR	154
<u>Primera réplica</u>	154
<u>Segunda réplica</u>	162
<u>Tercera réplica</u>	170
11.6 Proteínas recombinantes rTcNTR y rTrNTR	180
11.7 Artículos científicos	181
11.6.1 Molecular characterization of calcineurin B from the non-virulent <i>Trypanosoma rangeli</i> kinetoplastid indicates high gene conservation.....	181

11.6.2 The type I nitroreductase homologous gene of <i>Trypanosoma rangeli</i> lacks the mitochondrial targeting signal and localizes at the cytoplasm.....	181
11.8 Presentaciones en congresos	182

1. INTRODUCCIÓN

Trypanosoma (Herpetosoma) *rangeli* es un parásito protozoo capaz de infectar hospederos mamíferos sin producir patología en estos (Cuba Cuba 1998; Guhl & Vallejo 2003). Este hemoflagelado posee un ciclo de vida digenético (Garcia *et al.* 2012) y comparte esta característica con otros tripanosomátidos de importancia clínica como *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania sp* y *Trypanosoma brucei*, agentes causales de la enfermedad de Chagas, leishmaniasis y enfermedad del sueño, respectivamente (El-Sayed *et al.* 2005).

La caracterización biológica y molecular de *T. rangeli* se ha enmarcado en el contexto de *T. cruzi*, por cuanto estos parásitos comparten un gran número de características que incluyen los insectos triatomíneos del género *Rhodnius sp* que los transmiten, reservorios domésticos y salvajes, una distribución geográfica que se sobrelapa en América Central y en países del norte de América del Sur y que son similares en cerca del 60% de sus antígenos, hecho que ha desencadenado falsos positivos por reacción cruzada en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas (Cuba Cuba 1998; Grisard *et al.* 1999b; Guhl & Vallejo 2003; Bayer Santos *et al.* 2006).

Pese a la similitud ya descrita entre *T. rangeli* y *T. cruzi*, existen diferencias marcadas durante el ciclo de vida de estos flagelados. A nivel del hospedero invertebrado, aunque ambos parásitos se transforman y dividen en su interior, solamente el primero es capaz de generarle daño al invadir y multiplicarse libremente en sus células (Azambuja & Garcia 2005; Garcia *et al.* 2012). Adicionalmente, las formas infectivas de estos parásitos, denominadas tripomastigotes metacíclicos, son eliminadas por saliva, en el caso de *T. rangeli* y por heces fecales, en el caso de *T. cruzi* (Cuba Cuba 1998).

Ahora bien, otra de las diferencias entre ambas especies radica en el ciclo de vida en el mamífero. Este se ha descrito de manera detallada en *T. cruzi* e involucra una serie de procesos ligados principalmente a la expresión de proteínas específicas en cada paso,

que desencadenan la invasión celular y subsecuente producción de enfermedad (de Souza *et al.* 2010). Por el contrario, en *T. rangeli* este ciclo no está completamente elucidado (Cuba Cuba 1998; Guhl & Vallejo 2003), sin embargo se reconoce que este parásito no es capaz de invadir las células del hospedero, lo que desemboca en la resolución de la infección en periodos de tiempo que pueden ser variables pero que en ningún caso llevan a producción de enfermedad.

Teniendo en cuenta la importancia de las características compartidas, así como las diferencias expuestas entre ambos flagelados, estudios de genómica comparativa de *T. rangeli* con el patógeno *T. cruzi*, centrados en el análisis de genes implicados en el proceso de invasión y establecimiento de la infección de este último, pueden aportar conocimiento relevante para ayudar a entender los mecanismos responsables de la virulencia de *T. cruzi*.

A la fecha se han realizado diversos estudios de caracterización de proteínas asociadas a invasión celular en *T. cruzi* (Burleigh & Woolsey 2002; de Souza *et al.* 2010). Entre ellos se destacan los resultados reportados por Wilkinson y colaboradores en 2008 para la Nitroreductasa tipo I (NTR tipo I), una proteína que posee actividad oxido-reductasa dependiente de oxígeno y flavin mononucleótido, y de la cuál se demostró que está relacionada con el crecimiento y metacicloogénesis del parásito, así como con su capacidad de invadir células en cultivo. Así mismo, reportes de otros autores han mostrado que la NTR tipo I es esencial para el desarrollo de *T. brucei* y *L. donovani* (Wilkinson *et al.* 2008; Wyllie *et al.* 2013), esto último debido a la imposibilidad de obtener mutantes nulos del gen que la codifica en ambos géneros.

Por otro lado, Araya y colaboradores en 2008 reportaron la presencia y expresión de la subunidad regulatoria de la calcineurina o CnB de *T. cruzi*. Los resultados obtenidos mediante el uso estrategias de bloqueo de la actividad serina-treonina fosfatasa de la calcineurina (Cn) utilizando inhibidores de la enzima y adicionalmente iniciadores anti-sentido dirigidos específicamente contra CnB demostraron su implicación en la invasión celular productiva del parásito. En *L. major* se ha visto que CnB está

implicada en la respuesta al choque térmico y en la proliferación intracelular en el hospedero mamífero (Naderer *et al.* 2011).

Con base en la importancia de la NTR tipo I y CnB en *T. cruzi* y otros tripanosomátidos de importancia clínica en el proceso de infección, así como la similitud descrita entre *T. rangeli* y *T. cruzi*, en el presente trabajo se seleccionaron los genes codificantes para dichas proteínas para ser caracterizados en *T. rangeli* y compararlos con sus homólogos en *T. cruzi*.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 *Trypanosoma rangeli*

Trypanosoma rangeli es un protozoo flagelado perteneciente al orden *Kinetoplastida*, familia *Trypanosomatidae* (Cuba Cuba 1998), subgénero *Herpetosoma* (Maia Da Silva *et al.* 2007). Es la segunda especie de tripanosoma más frecuente en América Latina (Guhl & Vallejo 2003) y es reconocido por el amplio número de características biológicas y epidemiológicas que comparte con el agente causal de la enfermedad de Chagas: *Trypanosoma cruzi*, diferenciándose principalmente por su carácter no patógeno en los mamíferos a los cuales infecta y en los cuáles puede sobrevivir por tiempos variables (Stevens *et al.* 1999; Bayer Santos *et al.* 2006).

En principio, esta especie fue descubierta en Venezuela por Tejera (Tejera 1920) y se ha reportado su presencia en países de Centro América y el norte de Sur América tales como: México, Guatemala, Belice, Honduras, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, Brasil, Guayana Francesa, Surinam, Guyana y Trinidad (D' Alessandro & Saravia 1992; Guhl & Vallejo 2003).

Este parásito es transmitido por insectos vectores de la familia *Reduviidae*, en su mayoría del género *Rhodnius* (D' Alessandro & Saravia 1992; Cuba Cuba 1998; Guhl & Vallejo 2003; Azambuja & Garcia 2005; Garcia *et al.* 2012). Al interior del insecto, las dos formas que se desarrollan corresponden al estadio replicativo o epimastigote y al infectivo denominado tripomastigote metacíclico, ambos muy largos y finos, presentando una longitud de 45 a 56 micras; adicionalmente, poseen una membrana ondulante más desarrollada que la de *T. cruzi*, un cinetoplasto puntiforme que se localiza en el extremo posterior del parásito para la forma replicativa y en el anterior para la infectiva (Cuba Cuba 1998). Por el contrario, en el hospedero mamífero sólo se reporta la presencia de tripomastigotes sanguíneos que miden de 26 a 35 micras,

alguno autores han reportado que estas formas podrían ser replicativas, sin embargo existe controversia al respecto (Cuba Cuba 1998; Stevens *et al.* 1999).

2.1.1 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *T. rangeli* es considerado digenético, ya que transcurre en dos hospederos: uno invertebrado que corresponde al insecto vector que lo trasmite y un mamífero vertebrado al cuál puede infectar (Cuba Cuba 1998; Guhl & Vallejo 2003; Garcia *et al.* 2009; Garcia *et al.* 2012).

- Hospedero invertebrado

El ciclo comienza cuando el insecto consume formas infectivas del parásito, éste se replica en forma de epimastigote a través del intestino y es capaz de atravesar el epitelio del mismo para invadir el hemocele y hemocitos. Formas transicionales alcanzan las glándulas salivales del vector, y por reconocimiento de carbohidratos de superficie, invaden, se multiplican y completan su desarrollo a formas infectivas o tripomastigotes metacíclicos que son eliminadas vía saliva (Figura 1) (Vallejo *et al.* 2003; Garcia *et al.* 2009; Garcia *et al.* 2012).

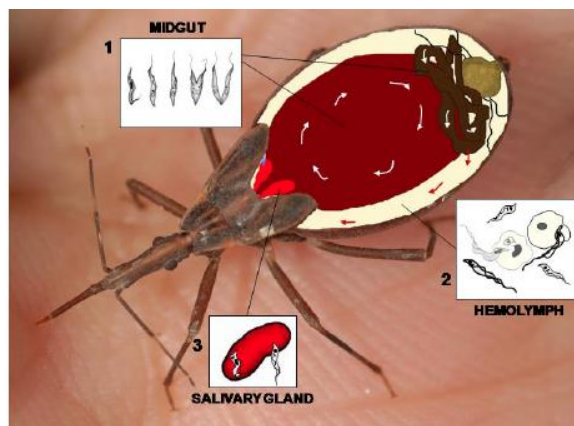


Figura 1. Esquema del ciclo biológico de *T. rangeli* en el vector. (Tomado de García *et al.* 2009)

La invasión y proliferación del parásito en células del insecto lleva a la producción de patología; esta se evidencia por una lisis en células musculares del intestino medio,

aumento en la cantidad de hemolinfa, interferencia en la muda, deformaciones en los insectos, alteraciones en comportamientos alimenticios, problemas en digestión de la sangre ingerida y letalidad (D' Alessandro & Saravia 1992; Cuba Cuba 1998; Guhl & Vallejo 2003; Garcia *et al.* 2012).

El reporte de infección en insectos triatominos ha mostrado que diferentes especies del género *Rhodnius sp* son capaces de transmitir el parásito vía saliva. La confirmación como vector de *T. rangeli* de una especie de insecto está dada por el aislamiento de las formas infectivas del parásito a partir de glándulas salivales. Bajo este concepto, 12 especies de *Rhodnius* han sido reportadas como experimental o naturalmente infectadas: *R. brethesi*, *R. colombiensis*, *R. dalessandroi*, *R. domesticus*, *R. ecuadoriensis*, *R. nasutus*, *R. neglectus*, *R. neivai*, *R. pallescens*, *R. prolixus*, *R. pictipes* y *R. rubustus* (Guhl & Vallejo 2003; Vallejo *et al.* 2009).

En estas especies infectadas se han estudiado además los mecanismos humorales y celulares del vector tales como la producción lisozimas, factores tripanolíticos, la activación del sistema pro-fenol-oxidasa, fagocitosis y micro-aglutinación de hemocitos que actúan como factores limitantes para el desarrollo del parásito (Cuba Cuba 1998; Garcia *et al.* 2009; Vallejo *et al.* 2009; Garcia *et al.* 2012). Adicionalmente, se han descrito mecanismos del parásito para estimular una transmisión efectiva al hospedero vertebrado mediante la inhibición de la expresión del sistema anti-hemostático por deficiencia de síntesis de componentes de la saliva, lo cual desemboca en tiempos mayores de alimentación (Garcia *et al.* 1994; Ribeiro *et al.* 1998; Garcia *et al.* 2009; Garcia *et al.* 2012).

- Hospedero vertebrado

T. rangeli infecta seres humanos y otros hospederos vertebrados posterior a la inoculación a través de la saliva del vector, sin embargo parece no poseer la maquinaria biológica necesaria para producir patología en estos. A la fecha no se ha reportado un estadio intracelular replicativo (Figura 2) como ocurre con los

amastigotes en su contraparte patógena: *T. cruzi* (Burleigh & Woolsey 2002). Se ha reportado que las parasitemias se mantienen a través del tiempo y son controladas por el sistema inmune mediante lisis mediada por complemento o endocitosis y digestión por fagocitos (Cuba Cuba 1998).

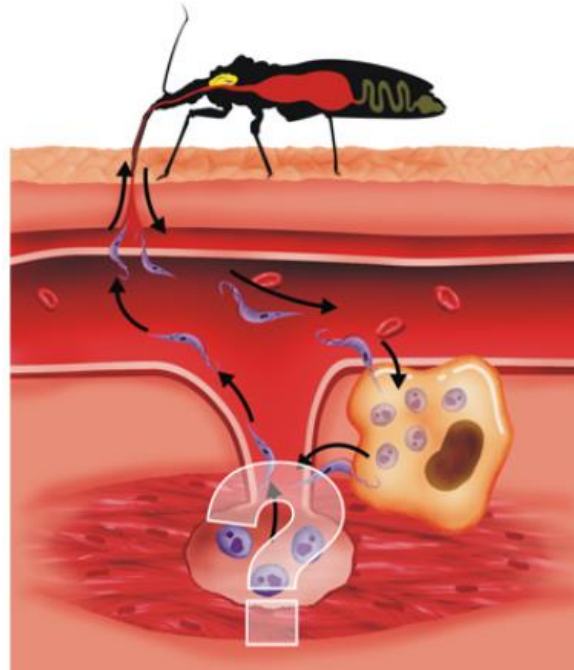


Figura 2. Ciclo de vida de *T. rangeli* en el vertebrado. No existe reporte de formas intracelulares replicativas. Tomado de: <http://www.coroflot.com/eschenazi/scientific-and-medical>

El ciclo de vida en el vertebrado ha sido controversial ya que existen reportes en los cuales *T. rangeli* es capaz de ingresar a las células del hospedero y sobrevivir por tiempos limitados (Urdaneta-Morales & Tejero 1986), así como otros que enfatizan en la ausencia de formas intracelulares de ningún tipo. Así, estudios realizados en tres líneas celulares (VERO, macrófagos murinos y pro-monocitos) *in vitro* mostraron una baja infectividad por parte de *T. rangeli* y la desaparición de las formas intracelulares posterior a 144h, sin evidencia de multiplicación (Eger-Mangrich *et al.* 2001).

2.1.2 Variabilidad genética

A la fecha se han realizado numerosos estudios con base en diferentes marcadores moleculares que soportan la variabilidad genética de *T. rangeli* (Steindel *et al.* 1994; Maia da Silva *et al.* 2009; Puerta *et al.* 2009; Urrea *et al.* 2011). La caracterización molecular de cepas aisladas en diferentes regiones geográficas con base en la región intergénica del codificante para miniexón o Spliced leader mostró una división en dos grupos (Grisard *et al.* 1999a), que fue soportada más adelante con base en la presencia del minicírculo K1 del cinetoplasto como marcador (Vallejo *et al.* 2002; Vallejo *et al.* 2003).

Teniendo en cuenta dichos resultados, se planteó que la especie está dividida en dos genotipos denominados KP1+ y KP1- (Vallejo *et al.* 2003). Adicionalmente, la evaluación de la presencia de un linaje u otro en los insectos vectores del género *Rhodnius*, mostró que existe una co-evolución de cada genotipo con un grupo de vectores determinado; es así como las cepas pertenecientes al genotipo KP1+ son transmitidas por vectores del complejo *Rhodnius prolixus*, mientras que aquellas caracterizadas como KP1- son transmitidas por el grupo que incluye a *R. pallescens*, *R. colombiensis* y *R. ecuadoriensis* (Urrea *et al.* 2005; Urrea *et al.* 2011). De manera interesante, se ha descrito que en la hemolinfa de vectores del grupo *R. prolixus* se encuentra un factor tripanolítico que actúa sobre cepas de *T. rangeli* KP1-, soportando la teoría de una adaptación específica de cada grupo de vectores y las cepas (Pulido *et al.* 2008).

Por otro lado, polimorfismos moleculares detectados en el gen del Spliced leader y la subunidad pequeña ribosomal SSU rARN han clasificado a *T. rangeli* en 5 genotipos: (A-E). El grupo A corresponde a aquellas cepas aisladas en el norte de Suramérica y que muestran cercanía filogenética por otras técnicas moleculares como RAPDs, zimodemas y secuencias del gen mini-exón; el grupo B a aislados de la Amazonía brasilera; el C contiene aislados humanos de Panamá y El Salvador; el D conformado

por una única cepa: SC-58 de Brasil y que se aleja de otros grupos cuando se utilizan técnicas moleculares diferentes a la PCR y por último, el genotipo E, que contiene exclusivamente cepas de murciélagos. Esta agrupación demuestra que existe un alto grado de complejidad en *T. rangeli* y que existen otros factores como la localización geográfica y el tipo de hospederos mamíferos, que inciden sobre su agrupamiento (Maia da Silva *et al.* 2004; Maia Da Silva *et al.* 2007; Maia da Silva *et al.* 2009; Vallejo *et al.* 2009). Esta clasificación también soportó la co-evolución y co-existencia de los grupos y sus vectores simpátricos (Maia Da Silva *et al.* 2007).

2.1.3 Caracterización molecular

Dado su carácter no patógeno, la caracterización molecular de *T. rangeli* se ha visto un poco retrasada en comparación con los tripanosomátidos de importancia clínica, cuyos genomas fueron revelados en el año 2005 (El-Sayed *et al.* 2005). Sin embargo, en 2010 se publicó el transcriptoma de epimastigotes y tripomastigotes, derivados de cultivo, de las cepas Choachí (KP1-) y SC-58 (KP1+). Análisis bioinformáticos de las secuencias obtenidas permitieron la asignación de funciones putativas y lo que es más importante, permitió confirmar la presencia en *T. rangeli* de transcritos codificados por genes que en otros tripanosomátidos han sido asociados a virulencia y/o invasión celular (Grisard *et al.* 2010).

Recientemente, fue publicada la comparación del proteoma de superficie de tripomastigotes de *T. rangeli* y *T. cruzi* en donde se encontraron factores protéicos diferenciales entre ambas especies que probablemente permitirían superar el problema a nivel de diagnóstico y reacciones cruzadas entre el parásito patógeno *T. cruzi* y *T. rangeli* (Wagner *et al.* 2013).

También se han realizado esfuerzos aislados para la caracterización de proteínas importantes en la relación hospedero mamífero-parásito en *T. rangeli*. Por ejemplo, proteínas como las sialidasas, trans-sialidasas *like*, tirosina amino-transferasas,

Histona H2A, proteína transportadora de D-glucosa y la fosfo-tirosina fosfatasa entre otras (Medina-Acosta *et al.* 1994; Bontempi *et al.* 2000; Puerta *et al.* 2000; Anez-Rojas *et al.* 2005; Anez-Rojas *et al.* 2006; Cuervo *et al.* 2006; Gomes *et al.* 2006; Milette *et al.* 2006; Wagner *et al.* 2013).

2.2 *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma (Schizotrypanum) *cruzi*, el agente causal de la enfermedad de Chagas (Rassi *et al.* 2010), es un hemoflagelado clasificado como perteneciente al orden *Kinetoplastida*, familia *Trypanosomatidae*, transmitido por insectos vectores del género *Reduviidae* (Teixeira *et al.* 2006).

El parásito y sus vectores están distribuidos a través de toda América del Sur y en algunos países de América Central. Las medidas de control de la enfermedad han sido establecidas con base en la localización de los vectores en relación a los hospederos en riesgo, y se ha dividido principalmente en cuatro zonas geográficas: América Central, Región Andina, Región del Cono Sur y Región Amazónica, los principales vectores presentes en cada zona se muestran en la figura 3 (Guhl 2007; Vallejo *et al.* 2009). Se reconoce además la importancia de la presencia de reservorios salvajes y domésticos en el ciclo de transmisión de la enfermedad, algunos de ellos corresponden a marsupiales, caninos salvajes y domésticos, armadillos, entre otros (Noireau *et al.* 2009).

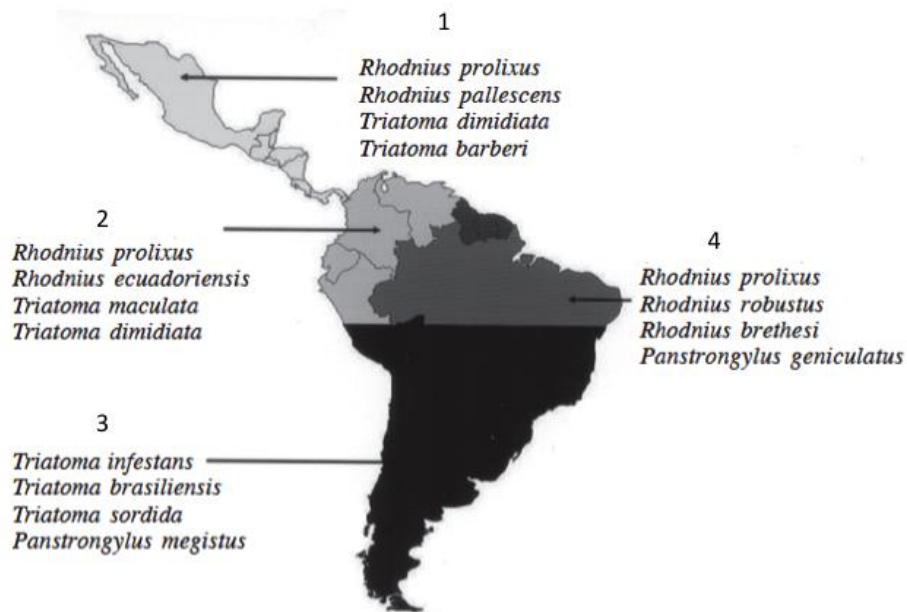


Figura 3. Distribución geográfica de *T. cruzi* y principales vectores asociados a cada región. América Central (1), Región Andina (2), Región del Cono Sur (3), Región Amazónica (4) Tomado y modificado de (Guhl 2007)

2.2.1 Ciclo de vida

T. cruzi posee igualmente un ciclo de vida digenético, en el insecto vector el ciclo comienza cuando este consume formas infectivas o tripomastigotes sanguíneos y estos a través del intestino se transforman en epimastigotes que se replican y que en el intestino posterior se convierten en tripomastigotes metacíclicos que son eliminados por heces fecales durante la alimentación (Figura 4) (García et al. 1995; Caradonna & Burleigh 2011).

En el vertebrado, las formas infectivas son inoculadas por el vector en el torrente sanguíneo y estas son capaces de invadir la mayoría de las células nucleadas. Los mecanismos moleculares de dicha invasión serán descritos más adelante, sin embargo, se reconoce que el éxito de dicho proceso radica en la localización en un compartimento ácido lisosomal (vacuola parasitófora), la ruptura de la misma y su posterior establecimiento en el citoplasma, en donde se replica en el estadio amastigote (Burleigh & Woolsey 2002; Tanowitz et al. 2009). La replicación de los amastigotes produce lisis celular y una nueva morfogénesis al estadio infectivo

sanguíneo que va a invadir otras células del hospedero o a ser consumido por un nuevo vector durante la alimentación (Figura 4) (Rassi *et al.* 2010; Caradonna & Burleigh 2011).

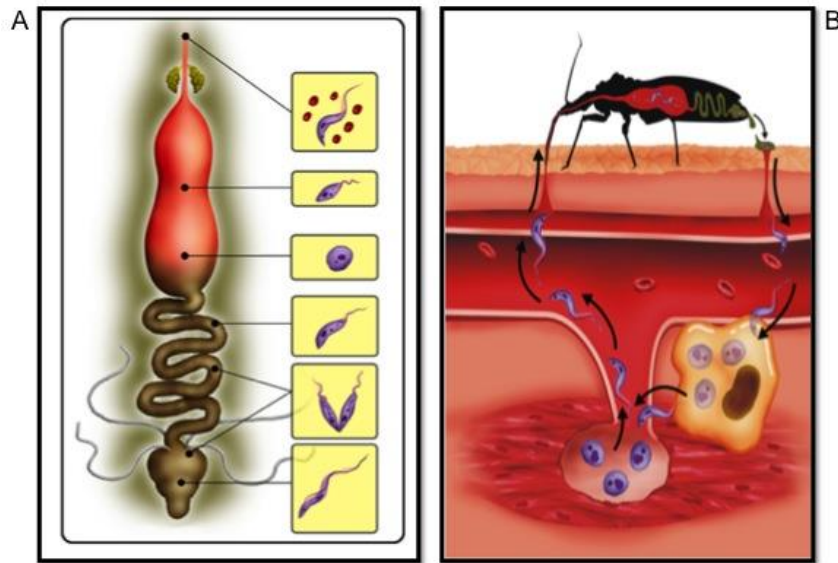


Figura 4. Ciclo de vida de *T. cruzi* en el hospedero invertebrado (A) y vertebrado (B). Tomado y modificado de: <http://www.coroflot.com/eschenazi/scientific-and-medical>

2.2.2 Enfermedad de Chagas

Producida por *T. cruzi*, es una de las 13 enfermedades tropicales desatendidas en el mundo (Hotez *et al.* 2009), siendo así una de las mayores causas de morbilidad y muerte en América latina, con aproximadamente ocho millones de personas infectadas, más de veinticinco millones en riesgo de contraerla y produciendo cerca de quince mil muertes al año (Hotez *et al.* 2009; Perez *et al.* 2014).

Las principales vías de transmisión de la enfermedad de Chagas son: la vectorial descrita previamente, vía congénita y vía oral; así mismo, puede ocurrir transmisión por trasplantes de órganos, transfusiones sanguíneas y por último accidentes de laboratorio (Rassi *et al.* 2010). Por otro lado, la enfermedad cursa en tres fases: aguda, indeterminada y crónica (Coura & Borges-Pereira 2010; Rassi *et al.* 2010).

La fase aguda cuya duración es de aproximadamente 4 a 8 semanas, está asociada a la migración de parásitos a través del torrente sanguíneo previo al establecimiento en tejidos del hospedero. Generalmente es asintomática o puede cursar como un síndrome febril auto-limitante, con presencia en algunos casos del signo de Romaña o chagoma de inoculación, además de síntomas inespecíficos como fatiga, anorexia, diarrea o vómito. Las manifestaciones de la fase aguda se resuelven espontáneamente en cerca del 90% de los individuos infectados (Rassi *et al.* 2010; Perez *et al.* 2014).

Cerca del 60-70% de estos pacientes infectados no desarrollan la forma clínica y por el contrario se mantienen en la fase indeterminada caracterizada por seropositividad y normalidad en sus registros de función cardíaca y digestiva (Coura & Borges-Pereira 2010; Rassi *et al.* 2010). El 30 % restante desarrolla en un término de 10 a 30 años post-infección, la forma crónica con síndromes cardíacos o digestivos severos, generalmente relacionados con el agrandamiento de órganos (cardiomegalia, esplenomegalia, hepatomegalia, megacolon, mega-esófago), que llevan a falla de los mismos y en ocasiones a la muerte del paciente (Tanowitz *et al.* 2009; Coura & Borges-Pereira 2010; Rassi *et al.* 2010; Perez *et al.* 2014).

2.2.3 Variabilidad genética

T. cruzi corresponde a una especie muy heterogénea y diversa. Trabajos iniciales enfocados en la caracterización y clasificación de sus miembros utilizaron factores biológicos (Andrade & Malgahaes 1997) o metabólicos (Miles & Cibulskis 1986), sin embargo, el uso posterior de herramientas moleculares como electroforesis de enzimas multialélicas (MLEE) (Barnabe *et al.* 2000), RAPDs (Steindel *et al.* 1993) y secuencias de ADN como el mini-exón o la subunidad ribosomas 24S (Souto *et al.* 1996; Fernandes *et al.* 2001), permitieron clasificar a este parásito en dos grandes linajes: TcI y TcII.

Propuestas posteriores basadas en genotipificación multilocus introdujeron el término Unidad discreta de tipificación (DTU, por sus siglas en inglés) entendido

como un grupo conformado por organismos que comparten marcadores genéticos, moleculares e inmunológicos (Tibayrenc 1998). Es así como actualmente *T. cruzi* se clasifica en seis DTUs (I-VI) (Zingales *et al.* 2009) y recientemente se ha descrito un nuevo genotipo que incluye cepas aisladas de murciélagos denominado Tc-Bat (Guhl & Ramirez 2013).

2.2.4 Caracterización molecular

Como se había mencionado previamente, el genoma de *T. cruzi* fue publicado en el año 2005 junto con el de otros tripanosomátidos de importancia clínica; la cepa seleccionada correspondió al híbrido CL-Brener (DTU VI) (El-Sayed *et al.* 2005). Teniendo en cuenta la alta diversidad genética del parásito, posterior a la publicación de este genoma se han caracterizado cepas pertenecientes a otras DTUs, como Sylvio X10/1 perteneciente a la DTU I (Franzen *et al.* 2011), y otros aislados como JR cl.4 o Esmeraldo. Actualmente esta información se encuentra disponible en la base de datos de tripanosomátidos TriTrypDB (Aslett *et al.* 2010), permitiendo acceder además a datos experimentales u obtenidos *in silico* a nivel de expresión de las proteínas codificadas.

El acceso a la información genética del parásito, así como el desarrollo de técnicas moleculares cada vez más finas, han permitido enfocar los estudios a nivel de búsqueda de blancos terapéuticos o selección de antígenos para el diseño racional de vacunas contra este patógeno. Se han realizado numerosos estudios de caracterización de factores protéicos asociados a funciones biológicas del parásito, con la intención de buscar nuevas alternativas para el tratamiento o la prevención de la enfermedad que además permitan obtener una visión panorámica de la biología del parásito y su interacción con el hospedero. Esto se ha realizado a nivel de una sola molécula (Neres *et al.* 2008) o de transcriptoma (Minning *et al.* 2009) y proteoma del parásito (Atwood *et al.* 2005) o proteínas con características y funciones particulares (Bayona *et al.* 2011; Bayer-Santos *et al.* 2013).

2.3 Bases moleculares de la invasión por *T. cruzi*

El término invasión comprende todos los procesos que incluyen el reconocimiento de la célula del hospedero vertebrado por parte del parásito, adhesión, señalización, entrada y multiplicación, actividades que pueden ser llevadas a cabo por tripomastigotes metacíclicos, sanguíneos y amastigotes (Burleigh & Woolsey 2002; Caradonna & Burleigh 2011).

A la fecha se han descrito factores protéicos clave asociados al proceso de invasión en células no fagocíticas (de Souza *et al.* 2010; Osorio *et al.* 2012), la figura 5 describe los principales y muestra el punto en el proceso sobre el cual actúan.

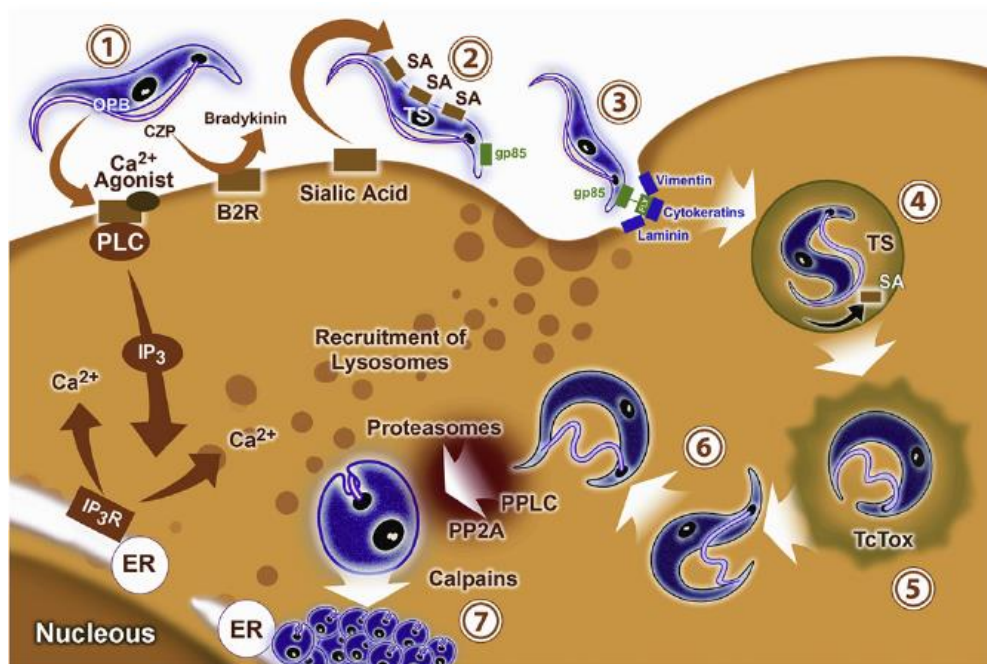


Figura 5. Principales factores de virulencia descritos en la invasión celular de *T. cruzi*. (Tomado de Osorio *et al.* 2012)

En un principio, se destaca la glicoproteína gp82 que facilita la adhesión y promueve la entrada por cascadas de señalización y movilización de calcio (de Souza *et al.* 2010),

así como las proteasas citoplasmáticas oligopeptidasas *like* como la OPB (Figura 5-1), que adicionalmente regulan la exocitosis lisosomal. De especial importancia, la cruzipaina (Figura 5-1), una cisteína proteasa que se expresa en los cuatro estadíos del parásito, está relacionada con la síntesis de bradiquinina para la promoción del aumento de calcio citoplasmático y adicionalmente participa en eventos de degradación proteolítica de tejidos del hospedero y evasión de la respuesta inmune (Osorio *et al.* 2012).

El parásito posee entre 500 y 3000 genes que codifican para glicoproteínas de superficie que le permiten invadir diferentes tipos de células. Aunque existe un amplio rango de proteínas implicadas en reconocimiento y adhesión, la información más completa de la cual se dispone corresponde los miembros de la super familia gp85/TS que son expresadas por los estadíos infectivos del parásito (Caradonna & Burleigh 2011). Se ha reportado que el ácido siálico presente en la membrana del parásito es muy importante en el proceso de invasión, sin embargo, *T. cruzi* no posee la capacidad de sintetizarlo y por tal motivo requiere de la actividad trans-sialidasa de proteínas del grupo TcSI (TS) (Anez-Rojas *et al.* 2005). Por otro lado, la gp-85, expresada por tripomastigotes de cultivo y sanguíneos se une a laminina, colágeno, fibronectina y proteoglicanos de la matriz extracelular del hospedero mediante un dominio adhesivo al C- terminal denominado FLY o VTV (VTVXNVFLYNR) (Caradonna & Burleigh 2011; Freitas *et al.* 2011) (Figura 5-2).

Ahora bien, el establecimiento del parásito en el citoplasma es un paso crítico para la supervivencia y replicación en las células del hospedero (Burleigh & Woolsey 2002; de Souza *et al.* 2010; Caradonna & Burleigh 2011). La principal vía de entrada corresponde a la vía de señalización de aumento de calcio intracelular, reclutamiento de lisosomas y una posterior fusión de la vacuola en la cuál el parásito se encuentra, formando la vacuola parasitófora, un ambiente ácido de gran importancia, en donde el parásito inicia su transformación al estadio replicativo amastigote. Previo a la terminación del proceso de cambio de estadio, el parásito rompe la vacuola parasitófora mediante la acción de diferentes proteínas como la porina Tc-Tox y

transialidasas de superficie (TS) (Sibley 2011; Osorio *et al.* 2012) (Figura 5-4 y 5-5). Finalmente, la diferenciación y replicación de los amastigotes, se da por acción de varias proteínas que incluyen la fosfolipasa C (PPLC), fosfatasa 2A (PP2A), proteasomas y calpaínas (Osorio *et al.* 2012) (Figura 5-7).

Además de las proteínas descritas, algunos estudios de caracterización molecular de proteínas en *T. cruzi* han confirmado su participación en el proceso de invasión celular, principalmente mediante la evaluación del efecto de su delección o bloqueo sobre la entrada, establecimiento o proliferación del parásito en cultivo celular (Osorio *et al.* 2012). Tal es el caso de la proteína de unión a calmodulina y ubiquitina (CUB) (Ajioka & Swindle 1996; Barrio *et al.* 2007), la dihidrofolato reductasa-timidilato (DHFR-TS) (Perez Brandan *et al.* 2011), la proteína LYT1 (Manning-Cela *et al.* 2001) y por último la Subunidad B de la Calcineurina (CnB) (Araya *et al.* 2008) y la Nitroreductasa tipo I (NTR) (Wilkinson *et al.* 2008).

Se realiza un énfasis principal en las últimas dos proteínas mencionadas, ya que corresponden al objeto de estudio del presente proyecto:

2.3.1 Nitroreductasa tipo I (NTR)

Las Nitroreductasas tipo I corresponden a oxido reductasas independientes de oxígeno y dependientes de NADH, que utilizan Flavin mononucleótido (FMN) como cofactor y poseen un dominio oxidoreductasa que se caracteriza por la presencia de dos sitios de unión a FMN y un sitio de unión a sustrato (Hall *et al.* 2012).

Estas enzimas, mediante reducciones de 2 electrones, transforman compuestos nítricos hasta la formación de derivados de hidroxilamina y en el caso específico de los nitrofuranos pueden mediante reducciones sucesivas producir aminas, consideradas compuestos inertes, iones de nitrenio que son moléculas capaces de causar daño a nivel de ADN y, alternativamente, pueden producir además cadenas abiertas de nitrilo (Hall *et al.* 2011) (Figura 6).

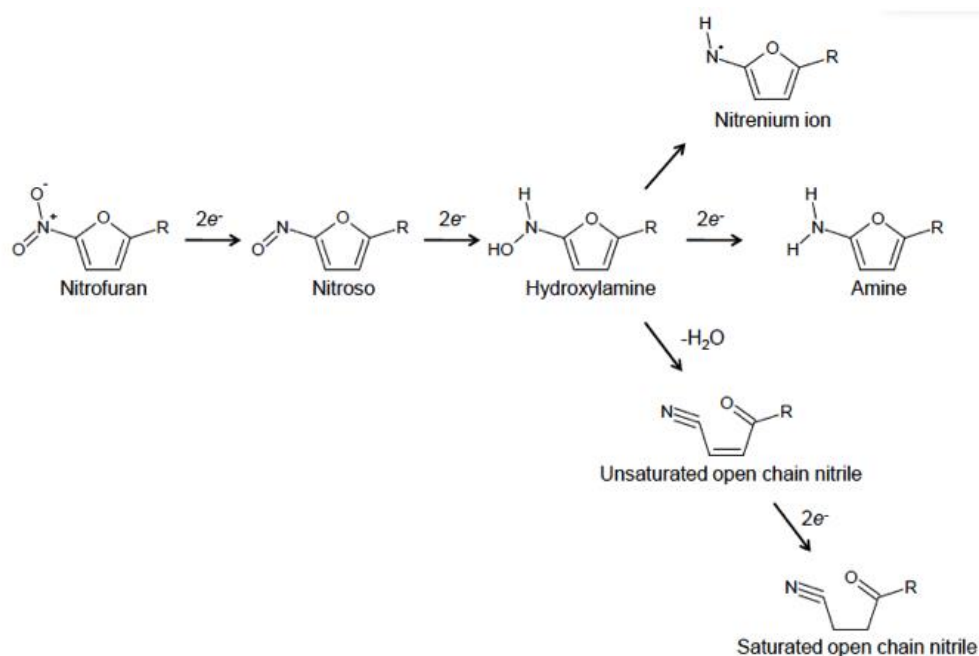


Figura 6. Reducción de nitrofuranos por acción de NTR I. Se muestran reducción sucesivas de dos electrones. (Tomado de Hall *et al.* 2011)

El origen de las nitroreductasas se remite a ancestros procariotas (Brandt 2006; Wilkinson *et al.* 2008), los cuáles presentan dos tipos de flavoenzimas con actividad nitroreductasa que se distinguen principalmente por el requerimiento de oxígeno en dicha reacción (Peterson *et al.* 1979). Las nitroreductasas tipo II, sensibles al oxígeno, contienen FMN o Flavin adenin dinucleótido (FAD) como cofactor y mediante reducciones de un electrón, catalizan un sustrato nítrico hasta la formación de nitro aniones que en presencia de oxígeno producen aniones super-óxido y la regeneración del compuesto parental (Peterson *et al.* 1979; Wilkinson *et al.* 2008; Hall *et al.* 2011; Hall *et al.* 2012).

La función principal de las NADH deshidrogenasas tipo I parece estar relacionada con la obtención de energía mediante la catálisis de la transferencia de electrones de NADH a ubiquinona para la producción de ubiquinol en la cadena respiratoria, tanto en la mitocondria de algunos protozoarios como en la membrana de organismos

procariotas (Yagi 1991; Brandt 2006; Wilkinson *et al.* 2008). Es así como, la caracterización de este tipo de enzimas se ha llevado a cabo en diferentes géneros de bacterias como: *Escherichia coli* (Bryant *et al.* 1981; Zenno *et al.* 1996b), *Enterobacter cloacae* (Bryant *et al.* 1991) y *Salmonella thyphimurium* (Watanabe *et al.* 1998) y de eucariotas como diferentes miembros de la familia *Trypanosomatidae* (Wilkinson *et al.* 2008; Wyllie *et al.* 2012; Wyllie *et al.* 2013), *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis*, entre otros (Pal *et al.* 2009).

Adicional a la función endógena de estas proteínas, se ha reportado que su actividad oxido reductasa está implicada en la activación de pro-fármacos nitroheterocíclicos utilizadas en el tratamiento de patógenos procariotas y eucariotas tales como nitrofurazona en *E. coli* (Whiteway *et al.* 1998) metronidazol en *G. lamblia* (Nillius *et al.* 2011), *E. histolytica* y *T. vaginalis* (Pal *et al.* 2009).

2.3.1.1 NTR tipo I en tripanosomátidos

La caracterización molecular de la NTR tipo I de *T. cruzi* y *T. brucei* mostró que está codificada por genes de copia única en el genoma de cada especie y que tiene un tamaño molecular de 34 kDa. Mutantes nulos de la NTR en *T. cruzi* mostraron crecimiento, metaciclologénesis e invasión a células VERO deficientes así como una movilidad disminuída, lo cual permitió concluir que la proteína está asociada al proceso de invasión celular del parásito (Wilkinson *et al.* 2008; Mejia *et al.* 2012). Así mismo, se demostró que esta proteína es esencial en *T. brucei* ante la imposibilidad de generar mutantes nulos de la misma y se localiza en la mitocondria de dicho parásito (Wilkinson *et al.* 2008).

La expresión de los dominios catalíticos de la NTR de ambos tripanosomas permitió determinar que esta proteína tiene actividad enzimática en la reducción de compuestos nitroheterocíclicos y posteriores ensayos a nivel de preferencia de sustrato, espectro de fluorescencia de la proteína a pH ácido y básico, consumo de oxígeno durante la reacción y catabolitos de la misma, la identificaron como una

NADH:ubiquinona oxidoreductasa, dependiente de FMN, insensible al oxígeno que produce cadenas abiertas de nitrilo a partir de la metabolización de nitrocompuestos aromáticos que causan daño al parásito y a células mamíferas en menor proporción (Wilkinson *et al.* 2008; Hall *et al.* 2011; Hall *et al.* 2012), características que confirmaron su similitud con las NADH deshidrogenasas bacterianas (Yagi 1991; Hall *et al.* 2011).

Similares resultados se han reportado para *L. major* y *L. donovani*, en los cuales la NTR tipo I posee características de preferencia de sustrato y donación de electrones que permiten suponer que se trata de una NADH:ubiquinona oxidoreductasa. En ambas especies fue imposible generar un mutante nulo de la NTR tipo I, lo que sugiere que es esencial para el desarrollo de estos parásitos y adicionalmente se demostró su implicación en la invasión celular del parásito al observar que parásitos heterocigotos eran incapaces de establecer infección *in vitro* y presentaban patologías tardías y más leves en ratones (Voak *et al.* 2013; Wyllie *et al.* 2013).

Por último, mediante la generación de parásitos resistentes a medicamentos nitroheterocíclicos como Benzonidazol y Nifurtimox por pasajes sucesivos de cultivo y un posterior estudio de su genotipo, se determinó que la resistencia a dichos fármacos está relacionada con la pérdida de uno de los alelos del gen codificante para la proteína NTR tipo I (Wilkinson *et al.* 2008; Mejia-Jaramillo *et al.* 2011). Así mismo, mutantes de *T. cruzi* presentaron una resistencia 2,5 veces mayor al Nifurtimox y 5 veces mayor al Benzonidazol cuando se trataba de heterocigotos y del doble cuando se trataba de nulos, lo cual llevó a concluir que la NTR tipo I es la proteína encargada de la activación de estos pro-fármacos durante el tratamiento de las patologías producidas por dichos tripanosomátidos.

Estudios posteriores en *T. cruzi* mostraron que la pérdida del alelo así como la generación de mutaciones puntuales sobre los dominios de unión a FMN son estrategias del parásito que llevan a la presentación de resistencia a los medicamentos (Wilkinson *et al.* 2008; Hall *et al.* 2011; Mejia *et al.* 2012).

2.3.2 Subunidad B de la Calcineurina (CnB)

La calcineurina es una serina-treonina fosfatasa regulada por calcio y calmodulina que participa en diversas vías de señalización. A nivel estructural, es un heterodímero formado por una subunidad catalítica denominada CnA con un tamaño de 57-70 kDa y una subunidad regulatoria denominada **CnB** de 18 a 20 kDa; en algunos organismos además, posee un dominio de unión a calmodulina y uno autoinhibitorio (Stie & Fox 2008).

En CnB se localizan 4 dominios de unión a calcio de tipo EF-hand, que permiten la regulación de la actividad enzimática. Cuando los niveles de calcio intracelular aumentan debido a movilización del mismo, estos cationes se unen a los dominios EF-hand, de igual forma la calmodulina se une a su dominio permitiendo la liberación de la subunidad catalítica del dominio autoinhibitorio, iniciándose así la actividad fosfatasa (Rusnak & Mertz 2000).

Esta proteína es altamente conservada a lo largo de la escala evolutiva, presentando funciones asociadas a la movilización de calcio en diferentes organismos. Es así como en eucariotas inferiores como levaduras del género *Saccharomyces sp* y *Schyzosaccharomyces pombe* se relaciona con recuperación del arresto de crecimiento inducido por feromonas y en crecimiento y división celular en condiciones normales (Cyert *et al.* 1991; Plochocka-Zulinska *et al.* 1995) y en hongos de los géneros *Neurospora* y *Cryptococcus* con crecimiento, virulencia y homeóstasis (Odom *et al.* 1997; Prokisch *et al.* 1997). En eucariotas superiores se localiza en las células de diferentes tejidos que incluyen el óseo, cardiaco y digestivo, entre otros (Rusnak & Mertz 2000).

2.3.2.1 CnB y Calcineurina en tripanosomátidos

Moreno y colaboradores en el 2007 realizaron la caracterización molecular de CnA en *T. cruzi*, demostrando que esta no posee los dominios autoinhibitorio ni de unión a calmodulina, sugiriendo, por tanto, la importancia de CnB en la regulación de la actividad serina-treonina fosfatasa de la calcineurina en este parásito y que se localiza en citoplasma y núcleo del parásito. Esta conformación carente de los dominios se mantiene en *T. brucei* mientras que *L. major* si posee la estructura característica descrita previamente (Moreno *et al.* 2007).

Posteriormente, la caracterización molecular de CnB en *T. cruzi* mostró que el gen que la codifica se expresa a nivel de ARNm y proteína, localizándose esta última en núcleo y citoplasma del parásito. Adicionalmente, el bloqueo de la expresión por medio de iniciadores anti-sentido disminuyó la entrada a células HELA en un 50% y el uso de inhibidores de la calcineurina como la ciclosporina A y la cipermetrina mostraron que esta es esencial en el proceso de invasión celular del parásito (tripomastigotes metacíclicos y derivados de cultivo) con una inhibición del 62 al 64% de la invasión celular (Araya *et al.* 2008). Recientemente, se ha reportado que la actividad fosfatasa de la calcineurina es estimulada por la presencia de una proteína secretada por *T. cruzi* denominada ciclofilina y se confirmó su relación con el proceso de invasión ya que dicha activación conlleva a una estimulación en el proceso de infección del parásito (Kulkarni *et al.* 2013).

Por último, mediante la estrategia de generación de mutantes heterocigotos y nulos de CnB en *L. major*, se estableció que el flujo de Ca^{2+} intracelular y la calcineurina, son esenciales para la respuesta al estrés causado por el choque térmico durante la invasión de dicho parásito. Más aun, ensayos posteriores mostraron que parásitos nulos de CnB presentan una proliferación en macrófagos deficiente y no pueden generar lesiones en ratones (Naderer *et al.* 2011), lo cual, en conjunto, confirma la implicación de esta proteína en la invasión y desarrollo de patología subsecuente.

3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Los genes *ntr* y *cnb*, implicados en la invasión celular de *Trypanosoma cruzi* se encuentran en el genoma de *Trypanosoma rangeli*?

Y en caso de confirmar su presencia:

¿Existe expresión diferencial de estos genes entre ambos parásitos?

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Caracterizar los genes *ntr* y *cnb* de *Trypanosoma rangeli* y compararlos con sus respectivos homólogos de *Trypanosoma cruzi*.

4.2 Objetivos específicos

1. Determinar la presencia de los genes *ntr* y *cnb* en el genoma de *T. rangeli*
2. Comparar las secuencias a nivel de nucleótidos y aminoácidos de los genes en estudio con respecto a los homólogos presentes en *T. cruzi*
3. Comparar la expresión a nivel de ARN mensajero de los genes *ntr* y *cnb* entre *Trypanosoma rangeli* y *Trypanosoma cruzi*
4. Comparar la expresión de las proteínas NTR y CnB entre *Trypanosoma rangeli* y *Trypanosoma cruzi*

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Parásitos y obtención de ácidos nucleicos

Para la realización de los experimentos, se utilizaron epimastigotes de los aislados *T. rangeli* Tre (Puerta *et al.* 2009) y *T. cruzi* 058PUJ (Pavia *et al.* 2012) cultivados en medio Infusión de hígado y triptosa (LIT, por sus siglas en inglés) a 27°C sin agitación (Montenegro *et al.* 2013).

A partir de cultivos en fase exponencial de crecimiento de ambas especies se realizó la extracción de ADN genómico utilizando el método de fenol-cloroformo (Sambrook *et al.* 2006) y de ARN citoplasmático por el método de Trizol según indicaciones del fabricante (Life Technologies, Carlsbad, USA). La calidad de los ácidos nucleicos fue determinada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) para ADN y gel de agarosa al 1,2% en condiciones denaturantes (6% formaldehído 1X MOPS) para el ARN. Adicionalmente la relación de pureza dada por la absorbancia (Abs) a 260nm/Abs 280 nm y la concentración de los mismos fue obtenida mediante cuantificación utilizando el espectrofotómetro Thermo Scientific™ NanoDrop™ 2000.

5.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Con el objetivo de amplificar las regiones codificantes de los genes *ntr* y *cnb* de *T. rangeli* Tre, se realizó el diseño de iniciadores y programas específicos. Teniendo en cuenta que el aislado *T. cruzi* 058PUJ se usó como control, la caracterización de dichos genes en dicho aislado fue realizada en paralelo.

Las reacciones de amplificación para ambas especies fueron realizadas en un volumen final de 25 µL usando 125 ng de ADN genómico de cada parásito como molde, 0.8 µM de cada iniciador, 200 µM de dNTPs, 1X de amortiguador (10 mM Tris-HCl, pH 8.5;

500 mM KCl), 1.5mM de MgCl₂ y 0,052 U/μL de ADN polimerasa High-fidelity Taq System (Roche, Manheim, Germany). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador MJ Research PTC-100 utilizando el siguiente perfil de amplificación: 95 °C/5 min, 35 ciclos de 95 °C/1 min, T_m específica de cada pareja de iniciadores/45 s y 72°C/ 45 s con una elongación final de 72 °C/5 min.

De manera adicional se realizó la amplificación de los genes *ntr* y *cnb* en las cepas Choachí y SC-58 de *T. rangeli* (Ver Anexo 10.1).

5.2.1 Gen *ntr*

Con base en las secuencias del gen *ntr* disponibles en el genoma secuenciado de la cepa CL Brener (códigos en Genbank: XM_807133.1 y XM_805552.1) se diseñaron los iniciadores NTR-FW (5'-GAG AAA TGG CAT AAA AAG AGG CC-3') y NTR-RW (5'-AAA ACT TTC CCC ACC GAA CCA -3'), los cuales fueron utilizados para la amplificación del gen en *T. cruzi* 058PUJ y *T. rangeli* Tre con temperaturas de anillamiento de 62 °C y 50 °C, respectivamente.

5.2.2 Gen *cnb*

Para la amplificación del gen *cnb* de *T. cruzi* 058PUJ se diseñaron los iniciadores CalB-FW (5'- GGC GAG GGG TCT TCC TTC AC -3') y CalB-RW (5'- CTA AAT GGA GAG GCT AAG GCG -3') con base en las secuencias de la cepa CL Brener reportadas en TriTrypDB: Tc00.1047053506869.50 y Tc00.1047053510519.60 (temperatura de anillamiento de 64 °C). Los iniciadores CaNB-ATG (5'- ATG GAT AAC AGA CCT GGA CT -3') y CaNB-TAG (5'- CTA AAA GAA AAG GTT GAG ACG -3') diseñados para amplificar en *T. rangeli* se diseñaron basados en el genoma de la cepa brasilera SC-58 (Grisard *et al.* 2010) y su temperatura de anillamiento correspondió a 58 °C.

5.3 Clonación y secuenciación de productos de PCR

Los productos de las PCR descritas en el numeral 5.2 fueron purificados a partir de geles de agarosa al 1% (p/v) utilizando el Kit Wizard SV Gel and PCR Clean Up System (Promega, Madison, USA). Posteriormente fueron clonados en el plásmido pGEM-T Easy, representado en la figura 7, en una relación molar 3:1 según las indicaciones del fabricante (Promega, Madison, USA).

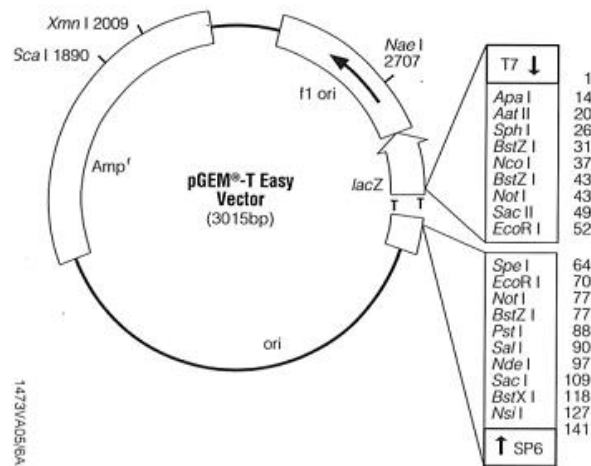


Figura 7. Plásmido pGEM-T easy® (Promega, Madison, USA). Mapa circular del vector y puntos de referencia de la secuencia.

La ligación se realizó en una relación molar inserto:vector de 3:1 durante 1h a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, bacterias *E. coli* XL1/Blue (Stratagene, La Jolla, USA) fueron transformadas por choque térmico a 42 °C como se ha reportado previamente (Sambrook *et al.* 2006). Tres colonias recombinantes de cada gen y especie fueron seleccionadas, congeladas y por otro lado masificadas para la extracción de ADN plasmídico con el Kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, USA) para verificar la presencia del respectivo inserto mediante digestión con la endonucleasa *EcoRI* que permite la liberación de los fragmentos (Figura 7).

Una vez seleccionados los clones que contenían el inserto, dos de cada gen y especie fueron enviados a secuenciación. Esta fue realizada en ambas cadenas por el método

de Sanger (Sanger *et al.* 1977) por Macrogen Inc (Seúl, Korea), utilizando un secuenciador automático 3730XL ADN Sequencer y los iniciadores universales T7 (5-AAT ACG ACT CAC TAT AG -3) y SP6 (5- ATT TAG GTG ACA CTA TAG -3). Todas las secuencias obtenidas fueron sometidas a la base de datos del NCBI GenBank para la asignación de números de acceso.

5.4 Southern blot

La presencia de los genes *ntr* y *cnb* en el genoma de *T. rangeli* Tre y *T. cruzi* 058PUJ fue evidenciada mediante la técnica de Southern blot.

5.4.1 Digestión y transferencia de ADN a soporte sólido

Brevemente, 3 µg de ADN genómico total de cada parásito fueron digeridos a 37°C por 3 h con endonucleasas de restricción seleccionadas (tabla 1). Posteriormente, los ADNs digeridos se resolvieron en geles de agarosa al 0,8% y mediante transferencia salina fueron inmovilizados en una membrana de nylon Zeta-Probe blotting según las instrucciones del fabricante (BIO-RAD, Philadelphia, USA).

Tabla 1. Enzimas de restricción seleccionadas para Southern blot de los genes *ntr* y *cnb*

	<i>T. cruzi</i> 058PUJ		<i>T. rangeli</i> Tre	
	Enzima	Sitio de corte (nt)	Enzima	Sitio de corte (nt)
Gen <i>ntr</i>	<i>Bam</i> HI	No corta	<i>Eae</i> I	245
	<i>Eae</i> I	506	<i>Hind</i> III	No corta
	<i>Hind</i> III	No corta	<i>Nru</i> I	399
			<i>Pst</i> I	318
			<i>Sph</i> I	374
	<i>Hin</i> fI	125	<i>Bam</i> HI	No corta
	<i>Pst</i> I	403	<i>Bgl</i> I	163

Gen <i>cnb</i>	<i>Rsa</i> I	190,312,456	<i>Eco</i> RI	No corta
			<i>Hind</i> III	No corta
			<i>Pst</i> I	No corta
			<i>Rsa</i> I	313

5.4.2 Obtención y marcaje de la sonda

Los fragmentos amplificados, correspondientes a las regiones codificantes de los genes *ntr* y *cnb* de cada especie fueron utilizados como sondas. ADN plasmídico de los clones **TcNTR-1**, **TrNTR-1**, **TcCnB-1** y **TrCnB-1** fue amplificado utilizando los iniciadores universales M13-F (5'- GTA AAA CGA CGG CCA GT -3') y M13-R (5'- GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG G-3'), dichos fragmentos fueron corridos y purificados a partir de un gel de agarosa al 0,8% utilizando el Kit Wizard SV Gel and PCR Clean Up System (Promega, Madison, USA). Finalmente, los fragmentos purificados fueron marcados con [α -³²P]dCTP usando el Kit Prime IT II Random Primer Labeling según indicaciones del fabricante (Stratagene, La Jolla, USA) y almacenados a -20 °C hasta su uso.

5.4.3 Hibridación

Las membranas fueron pre-hibridadas por 2h con la solución PerfectHyb™ Plus Hybridization Buffer (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) y posteriormente se adicionó la sonda para hibridación a 42 °C toda la noche. Se realizaron 5 lavados en una solución 2X de citrato de sodio (SSC) y 0,5% (p/v) de Dodecil sulfato de sodio (SDS) a 42°C por 5 min en agitación constante y un lavado por 30 min en solución 0.1 X de SSC y 0,5% (p/v) SDS a 55°C. Finalmente, fueron expuestas toda la noche a películas Curix RP2 medical X-ray (Agfa, Morsel, Bélgica).

5.5 Análisis “in silico” de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos obtenidas

5.5.1 Identidad, búsqueda de motivos y dominios conservados

Las secuencias de nucleótidos obtenidas presentaron una alta calidad (Phred ≥ 20) y fueron analizadas entre ellas y con respecto a otras secuencias reportadas para tripanosomátidos en las bases de datos GenBank, GeneDB y TriTrypDB (Ver 10.2).

El análisis de identidad de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos se realizó mediante la herramienta ALIGN (Pearson 1990) del Biology Workbench (Subramaniam 1998). Por otro lado, la búsqueda de motivos y dominios conservados de las proteínas se realizó utilizando Prosite (Sigrist *et al.* 2013), la base de datos de dominios conservados del NCBI (Marchler-Bauer *et al.* 2011) y Pfam (Punta *et al.* 2012). Para la NTR tipo I, la señal de localización mitocondrial fue determinada con MitoProt (Claros & Vincens 1996) e iPSORT (Bannai *et al.* 2002).

5.5.2 Relaciones filogenéticas

Los análisis de evolución molecular fueron realizados con las secuencias de nucleótidos de los genes *cnb* y *ntr* (Anexo 10.2), utilizando el software MEGA versión 5 (Nei & Kumar 2000; Tamura *et al.* 2011) por los métodos máxima verosimilitud (Eck & Dayhoff 1966) y Neighbor-Joining (Saitou & Nei 1987), con valores *bootstrap* obtenidos a partir de 1000 réplicas.

5.5.3 Construcción de modelos estructurales de las proteínas NTR y CnB de T. rangeli

5.5.3.1 NTR tipo

El modelo estructural (ID en PMDB: PM0079460) fue construido a través del portal Protein model (Arnold *et al.* 2009), usando como molde la NADH deshidrogenasa de *Thermus thermophilus* (ID en PDB: 1NOX) y seleccionando el mejor modelo en el

servidor I-Tasser (Zhang 2008; Roy *et al.* 2010). Igualmente, a través de éste servidor se obtuvo la información sobre la estructura secundaria de la proteína.

Posteriormente, dicho modelo fue sometido al servidor Chiron para eliminar errores estéricos (Kota *et al.* 2011; Ramachandran *et al.* 2011) y la calidad del modelo fue evaluada mediante diferentes servidores como Swiss-Model Workspace (Bordoli *et al.* 2009), Prosa server (Wiederstein & Sippl 2007) y PDBsum (Laskowski *et al.* 2005; Laskowski 2009). El modelo fue comparado a través de PDBeFOLD (Krissinel & Henrick 2004) con estructuras de proteínas de la misma familia obtenidas experimentalmente y finalmente los gráficos fueron realizados utilizando el software UCSF Chimera package (Pettersen *et al.* 2004).

5.5.3.1 CnB

El modelo estructural (ID en PMDB: PM0078711) fue construido a través del portal Protein model (Arnold *et al.* 2009), usando como molde la calcineurina bovina (ID en PDB: 1TCO) y seleccionando el mejor modelo en el servidor I-Tasser (Zhang 2008; Roy *et al.* 2010). Igualmente, a través de éste servidor se obtuvo la información sobre la estructura secundaria de la proteína.

Los motivos tipo EF-hand y los sitios potenciales de unión a calcio fueron determinados mediante el servidor SMART (Letunic *et al.* 2012) y conforme a dicha predicción se agregaron átomos de calcio al modelo tridimensional. La calidad del modelo fue evaluada mediante los servidores Swiss-Model Workspace (Bordoli *et al.* 2009), Prosa server (Wiederstein & Sippl 2007) y MoldFOLD tool (McGuffin & Roche 2010). El modelo fue comparado a través de PDBeFOLD (Krissinel & Henrick 2004) con estructuras de proteínas de la misma familia obtenidas experimentalmente y finalmente los gráficos fueron realizados utilizando el software VMD (Humphrey *et al.* 1996).

5.6 Determinación de la expresión de los transcritos *ntr* y *cnb* en *T. cruzi* 058PUJ y *T. rangeli* Tre

La expresión a nivel de ARNm de los genes *ntr* y *cnb* de ambas especies fue determinada mediante dos estrategias metodológicas: amplificación y caracterización de los transcritos mediante RT-PCR y cuantificación relativa de los transcritos mediante qPCR.

5.6.1 Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR)

5.6.1.1 Síntesis de ADN copia (ADNc)

A partir de 5 µg de ARN citoplasmático extraído de epimastigotes de ambas especies y tratado con ADNasa según instrucciones del fabricante (Promega, Madison, USA), se realizó una síntesis de ADNc utilizando el kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (Roche®, Mannheim, Germany). La mezcla de ARN y 2,5 mM Oligo (dT)₁₅ fue denaturada a 70 °C y posteriormente agregada a la mezcla de transcripción reversa que contenía 10 U de la transcriptasa reversa *Transcriptor*, 1 mM de dNTPs, 1X de amortiguador, 8 mM MgCl₂ y 1 U/ul RNase out (Roche®, Mannheim, Germany). La síntesis se realizó bajo el siguiente perfil térmico: 25 °C/10 min, 55 °C/30 min, 85 °C/15 min. y el ADNc obtenido fue almacenado a 4 °C hasta su uso.

5.6.1.2 Amplificación de transcritos incluyendo región 5'UTR

Para la amplificación de los genes *ntr* y *cnb* a partir de ADNc, se utilizó el iniciador SL/TcTr (5'- AAC TAA CGC TAT TAT TGA TAC AGT T -3') que anilla al 5' de la secuencia del spliced-leader, (común a todos los transcritos maduros en tripanosomátidos), y un reverso específico de cada gen y especie, siendo: NTR-RW para *T. cruzi* 058PUJ, CalB-Rw y CaNB-TAG para *T. cruzi* 058PUJ y *T. rangeli* Tre,

respectivamente (Ver numeral 5.2) y un iniciador diseñado sobre la codificante del gen *ntr* de *T. rangeli* Tre: NTRTr/430 Rw (5'- ACC GGC AAA CAC AAT TGT CA -3') cuya temperatura de anillamiento fue de 58 °C.

Las reacciones de amplificación para ambas especies fueron realizadas en un volumen final de 25 µL usando 1 µL de ADNc de cada parásito como molde, 0,8 µM de cada iniciador, 200 µM de dNTPs, 1X de amortiguador (10 mM Tris-HCl, pH 8,5; 500 mM KCl), 1,5mM de MgCl₂ y 0,052 U/µL de ADN polimerasa High-fidelity Taq System (Roche, Manheim, Germany). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador MJ Research PTC-100 utilizando el siguiente perfil de amplificación: 95 °C/5 min, 35 ciclos de 95 °C/1 min, T_m específica de cada pareja de iniciadores/45 s (tabla 2) y 72°C/ 1 m con una elongación final de 72 °C/8 min.

Tabla 2. Temperatura de anillamiento amplificación de transcritos *ntr* y *cnb* en ambas especies

Gen	<i>T. cruzi</i> 058PUJ	<i>T. rangeli</i> Tre
<i>ntr</i>	62 °C	58 °C
<i>cnb</i>	58 °C	58 °C

Los fragmentos obtenidos fueron clonados, secuenciados según lo descrito previamente (numeral 5.3) y comparados a nivel de identidad entre especies (numeral 5.5.1).

5.6.2 Cuantificación relativa de transcritos por PCR en tiempo real (qPCR)

Para todas las qPCR diseñadas se utilizó el kit LightCycler® FastStart DNA Master^{Plus} SYBR Green I hot start reaction mix (Roche®, Mannheim, Germany) y el corrido fue realizado en un termociclador LightCycler 1.5 (Roche®, Mannheim, Germany).

5.6.2.1 Gen normalizador

Teniendo en cuenta el objetivo de cuantificar de manera relativa los transcritos mencionados, se seleccionó el gen normalizador: Hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa (*hgprt*), previamente reportado para *T. cruzi* (Murta *et al.* 2006; Mejia-Jaramillo *et al.* 2011).

El primer paso fue identificar la presencia de este gen en el genoma de *T. rangeli* Tre. Esto fue realizado mediante PCR utilizando los iniciadores previamente reportados (Murta *et al.* 2006): TcHGPRT-F (5'-CTA CAA GGG AAA GGG TCT GC -3') y TcHGPRT-R (5'- TGG AGG ACA TTG TTG ACA CC 3') con el siguiente perfil térmico: 95 °C/5 min, 35 ciclos de 95 °C/1 min, 60 °C/45 s y 72°C/ 1 m y con una elongación final de 72 °C/8 min. Esta amplificación se llevo a cabo de igual forma en *T. cruzi* 058PUJ y ambos productos fueron clonados y enviados a secuenciación.

Una vez confirmada la presencia del gen *hgprt* en *T. rangeli* Tre, se realizó el diseño de iniciadores para la amplificación de los transcritos a partir de ADNc.

5.6.2.2 Diseño de iniciadores y puesta a punto de qPCR

Se diseñaron parejas específicas para cada gen a evaluar, se probaron en PCR convencional (Anexo 10.3) y posteriormente se pusieron a punto en qPCR. Las características de cada ensayo se describen a continuación:

5.6.2.2.1 *ntr*

La tabla 3 contiene la información correspondiente a los iniciadores diseñados para *ntr*.

Tabla 3. Iniciadores diseñados para qPCR del transcrito *ntr*

Iniciador	Especie	Secuencia	Posición	Tm	Fragmento amplificado y Temperatura de fusión
qNTRTre/620Fw	<i>T. rangeli</i> Tre	5'- ACCC GCT GCT GTC CGT TCC- '3	620-638	64 °C	131 pb 87 °C
qNTRTre/750Rw		5'- CTC GTC AAA CCC CTC AAG AAT G -'3	728-750	66 °C	
NTRTc/288Fw	<i>T. cruzi</i> 058PUJ	5'- CCT GAC GGT GCG GGC TCC -'3	288- 306	64 °C	130 pb 90 °C
NTRTc417Rw		5'- CAC CGG TGC GTC GCG AGG- '3	400-417	64 °C	

Las qPCR de cada especie se realizaron en una mezcla de volumen final de 20 µL que contenía la mix LightCycler® 480 SYBR Green I Master-Roche 1X, 0,5 µM de cada iniciador y 1 µL de ADNc para el control positivo o 1 µL de agua para el negativo, bajo el perfil térmico descrito en la tabla 4.

Tabla 4. Programa de las qPCR diseñadas para el transcrito *ntr*

	Temperatura	Tiempo	Modo de lectura	Número de ciclos
Pre-calentamiento	95 °C	10 min	Ninguno	1
Denaturación	95 °C	10 s	Ninguno	40
Anillaje	64 °C	10 s	Ninguno	
Extensión	72 °C	10 s	Single	
Melting	95 °C	10 s	Ninguno	1
	65 °C	15 s	Ninguno	
	95 °C	0 s	Continuous Ramp rate: 0,2 s	
Enfriamiento	40 °C	30 s	Ninguno	1

La figura 8 muestra la curva de amplificación y melting de *T. cruzi* 058PUJ y *T. rangeli* Tre para el transcrito *ntr*.

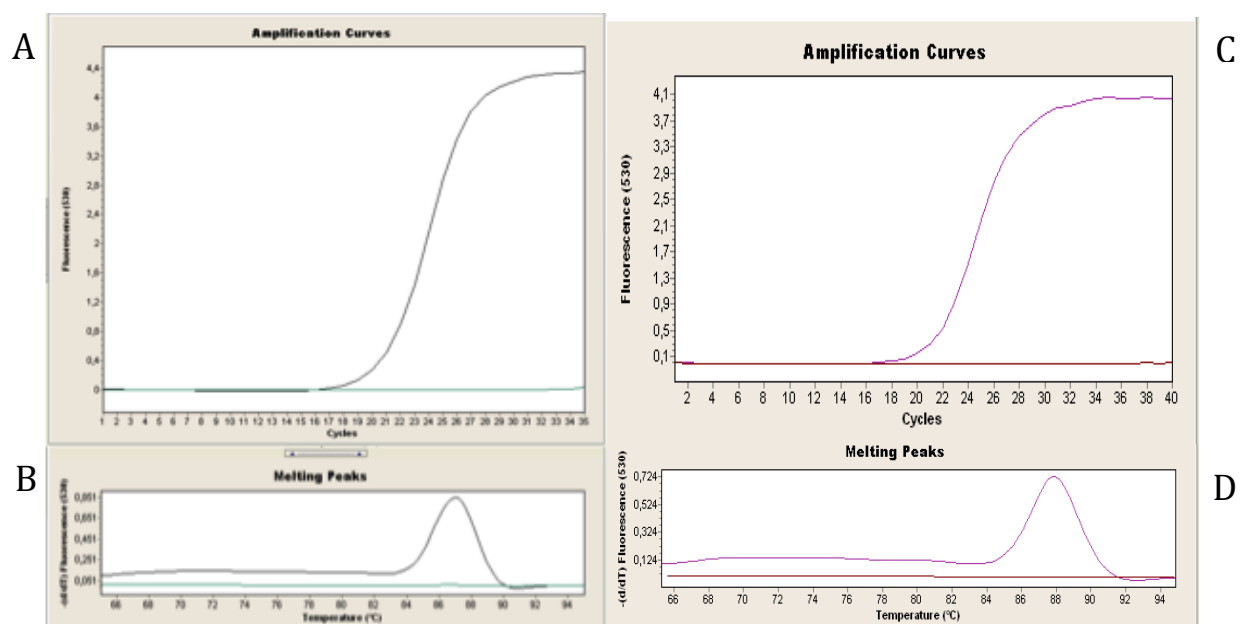


Figura 8. qPCR del cDNA de *T. cruzi* 058PUJ y *T. rangeli* Tre usando los iniciadores NTRTc288Fw y NTRTc417Rw para *T. cruzi* 058PUJ y qNTRTre/620Fw y qNTRTre/750Rw para *T. rangeli* Tre. La figura A corresponde a las curvas de amplificación del parásito *T. cruzi* 058PUJ (negro) y del control negativo (verde) La figura C corresponde a las curvas de amplificación de *T. rangeli* Tre (rosado) y el control negativo (rojo). Las figura B y D corresponden a la curva melting para los productos de amplificación obtenidos; la convención de colores es igual a la mencionada en A y C.

5.6.2.2.2 *cnb*

Teniendo en cuenta la alta identidad entre las secuencias de los genes *cnb* en *T. cruzi* 058PUJ y *T. rangeli* Tre, se diseñó una sola pareja de iniciadores en una región conservada para ambas especies, que permite diferenciar los productos mediante la temperatura de fusión (T_m). La tabla 5 contiene la información correspondiente a dichos iniciadores.

Tabla 5. Iniciadores diseñados para el transcrito *cnb*

Iniciador	Secuencia	Posición	T_m	Fragmento amplificado y Temperatura de fusión
CnBTc/Tr323Fw	5'ATGGCGACGGCAAGATCAG'3	323-341	60°C	147 pb <i>T. cruzi</i> : 85,8 °C <i>T. rangeli</i> : 84,4 °C
CnBTc/Tr469Rw	5'CAAATGTAATGTACCCGTCAC'3	449-469	60°C	

La qPCR de cada especie se realizó en una mezcla de volumen final de 20 μ L que contenía la mix LightCycler® 480 SYBR Green I Master-Roche 1X, 0,5 μ M de cada iniciador y 1 μ L de ADNc para el control positivo o 1 μ L de agua para el negativo, bajo el perfil térmico descrito en la tabla 6.

Tabla 6. Programa de la qPCR diseñadas para el transcrito *cnb*

	Temperatura	Tiempo	Modo de lectura	Número de ciclos
Pre-calentamiento	95 °C	10 min	Ninguno	1
Denaturación	95 °C	10 s	Ninguno	40
Anillaje	60 °C	10 s	Ninguno	
Extensión	72 °C	10 s	Single	
Melting	95 °C	10 s	Ninguno	1
	65 °C	15 s	Ninguno	
	95 °C	0 s	Continuous Ramp rate: 0,2 s	
Enfriamiento	40 °C	30 s	Ninguno	1

La figura 9 muestra la curva de amplificación y melting de *T. cruzi* 058PUJ y *T. rangeli* Tre para el transcrito *cnb*.

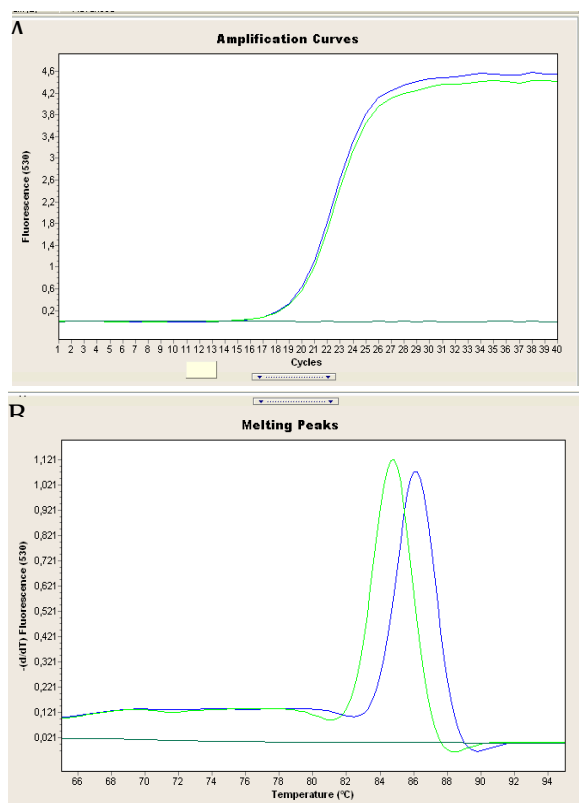


Figura 9. qPCR a partir de cDNA de *T. cruzi* 058PUJ y *T. rangeli* Tre usando los iniciadores CnBTc/Tr323Fw y CnBTc/Tr469Rw. La figura A corresponde a las curvas de amplificación de cada parásito: Azul (cDNA *T. cruzi* 058PUJ) y Verde (cDNA *T. rangeli* Tre) y del control negativo: Verde oscuro (agua como molde). La figura B corresponde a la curva melting para los productos de amplificación obtenidos; la convención de colores es igual a la mencionada en A.

5.6.2.2.3 *hgp*

Con base en las secuencias obtenidas (numeral 5.6.2.1) se realizó el diseño de los iniciadores, cuyas características se describen en la tabla 7.

Tabla 7. Iniciadores diseñados para *hgp*

Iniciador	Especie	Secuencia	Posición	Tm	Fragmento amplificado y Temperatura de fusión
HGPRT/Tre-Fw	<i>T. rangeli</i> Tre	5' TCCCTTGTGCTCATCTGTGT '3	----*	60°C	164 pb 88,7 °C
HGPRT/Tre197 Rw		5' ATGTCAAGCAGCAACCGCAC '3	----*	60°C	
TcHGPRT329-Fw	<i>T. cruzi</i> 058PUJ	5' TGGAGGACATTGTTGACACC'3	329-348	60°C	178 pb 86 °C
TcHGPRT-R		5'ACCGTAGCCAATCACAAAGG'3	489-507	60°C	

---*No se dispone de posición ya que no se conoce la secuencia de la codificante completa del gen *hgp* de *T. rangeli* Tre.

La qPCR de cada especie se realizó en una mezcla de volumen final de 20 µL que contenía la mix LightCycler® 480 SYBR Green I Master-Roche 1X, 0,5 µM de cada iniciador y 1 µL de ADNc para el control positivo o 1 µL para el negativo, bajo el perfil térmico descrito en la tabla 8.

Tabla 8. Programa de la PCR

	Temperatura	Tiempo	Modo de lectura	Número de ciclos
Pre-calentamiento	95 °C	10 min	Ninguno	1
Denaturación Anillaje Extensión	95 °C	10 s	Ninguno	40
	60 °C	10 s	Ninguno	
	72 °C	10 s	Single	
Melting	95 °C	10 s	Ninguno	1
	65 °C	15 s	Ninguno	
	95 °C	0 s	Continuous Ramp rate: 0,2 s	
Enfriamiento	40 °C	30 s	Ninguno	1

La figura 9 muestra la curva de amplificación y melting de *T. cruzi* 058PUJ y *T. rangeli* Tre para el transcrito *hgp*.

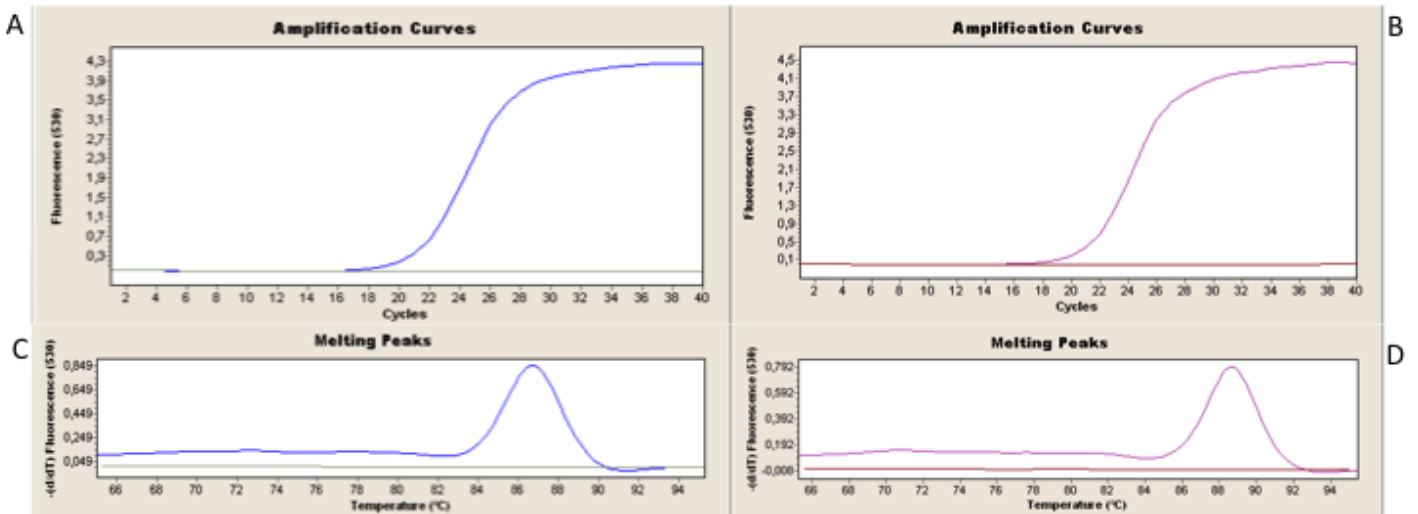


Figura 10. qPCR del cDNA de *T. cruzi* 058PUJ y *T. rangeli* Tre usando los iniciadores TcHGPRT329-Fw y TcHGPRT-R para *T. cruzi* 058PUJ y HGPRT/Tre-Fw y HGPRT/Tre197Rw para *T. rangeli* Tre. La figura A corresponde a las curvas de amplificación del parásito *T. cruzi* 058PUJ (azul) y del control negativo (gris) La figura B corresponde a las curvas de amplificación de *T. rangeli* Tre (rosado) y el control negativo (rojo). Las figura C y D corresponden a la curva melting para los productos de amplificación obtenidos; la convención de colores es igual a la mencionada en A y B.

5.6.2.3 Curvas estándar

Se realizaron curvas estándar para definir la eficiencia y el error de cada qPCR utilizando plásmidos recombinantes que contenían las regiones codificantes de los genes en estudio y se realizaron diluciones en base 10 desde 10^8 hasta 10^2 copias del plásmido. Cada concentración fue montada por triplicado y corrida bajo el perfil térmico definido para cada gen (numeral 5.6.2.2). Cada corrido incluía tres controles grises que correspondían a un control de ambiente del área de ADNc y tres controles blancos que correspondían a la mezcla de amplificación sin ADNc y sellada en el área de PCR. La construcción de las curvas se realizó con base en al menos 5 diluciones y mediante el software LightCycler 1.5 (Roche®, Mannheim, Germany).

5.6.2.4 Determinación del número de copias relativo de cada transcrito

5 µg de ARN citoplasmático extraídos a partir de 50×10^6 epimastigotes en fase exponencial de cultivo de ambas especies fueron utilizados para sintetizar ADNc según se describió en el numeral 5.6.1.1. 1 µL de ADNc fue utilizado para el montaje de cada PCR y cada muestra fue corrida por triplicado. Finalmente, se realizaron tres réplicas biológicas del experimento para cada transcrito de interés (*ntr* y *cnb*) y el normalizador (*hgprt*). Cada corrido incluía los controles descritos en la construcción de curvas estándar.

La estrategia de análisis de los datos correspondió a la comparación del número de copias promedio de cada transcrito, normalizando con respecto al número de copias del transcrito *hgprt* de cada especie.

El valor Ct (del inglés Cycle Treshold) corresponde al ciclo a partir del cual las muestras emiten fluorescencia que permite considerarlas positivas. Cada muestra procesada poseía su propio Ct y mediante el software LightCycler 1.5 y el uso de las curvas estándar de cada gen, se realizó una regresión lineal que permitía identificar el número de copias de cada transcrito en la muestra. De esa manera, se obtuvo el número de copias promedio de cada réplica biológica junto con la desviación estándar y coeficiente de variación de la misma.

Se obtuvo el valor promedio de número de copias entre réplicas biológicas para cada parásito y transcrito, reportando además la desviación estándar y coeficiente de variación entre réplicas. Y se estableció el radio de número de copias de cada transcrito *versus* el promedio del normalizador *hgprt*. La comparación entre el nivel de expresión de ARNm de *T. cruzi* y *T. rangeli* se logró mediante la comparación de los radios entre las dos especies. Por último, se aplicó una prueba de Mann-Whitney para evaluar la diferencia a nivel de expresión de ARNm entre especies. Los gráficos se realizaron utilizando el software Prism para Mac OS X, version 6.0b (GraphPad, San Diego, USA)

5.7 Determinación de la expresión y localización de las proteínas NTR y CnB de *T. cruzi* 058PUJ y *T. rangeli* Tre

La expresión y localización de las proteínas NTR y CnB en epimastigotes en fase exponencial de cultivo de *T. cruzi* 058PUJ y *T. rangeli* Tre fue determinada mediante ensayos de Citometría de flujo e Inmunofluorescencia indirecta. Teniendo en cuenta que ambas técnicas requieren el uso de anticuerpos dirigidos contra las proteínas en cuestión, los anticuerpos policlonales contra CnB de *T. rangeli* Tre fueron producidos y los anticuerpos policlonales dirigidos contra TcNTR y TrNTR fueron donados (Castro et al. Manuscrito en preparación).

5.7.1 Obtención anticuerpos policlonales anti rTrCnB

5.7.1.1 Expresión y purificación de la proteína recombinante rTrCnB

Para la clonación dirigida de CnB en el plásmido de expresión pQE30 (Figura 11), la estrategia consistió en la adición de dianas de restricción al 5' y 3' de la región codificante clonada previamente en pGEM-T easy (Clon **TrCnB-1**). En principio, se diseñó el iniciador CnBBamHI-ATG (5'- CAT TGG ATC CGA TAA CAG ACC TGG -'3) y se utilizó el primer universal SP6 (5'- ATT TAG GTG ACA CTA TAG -'3) como reverso para la amplificación de un fragmento que contendría la diana *Bam*HI y *Sac*I (contenida en el poli-linker del vector pGEM-T easy).

La reacción de amplificación fue realizada en un volumen final de 100 µL usando 200 ng de ADN plasmídico del clon **TrCnB-1**, 1 µM de cada iniciador, 125 µM de dNTPs, 1X de amortiguador (10 mM Tris-HCl, pH 8,5; 500 mM KCl), 1,5mM de MgCl₂ y 0,068 U/µL de ADN polimerasa High-fidelity Taq System (Roche, Mannheim, Germany). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador MJ Research PTC-100 utilizando el siguiente perfil de amplificación: 94 °C/5 min, 20 ciclos de 94 °C/1 min, 38 °C/45 s y

72°C/ 45 s, 25 ciclos de 94 °C/1 min, 48 °C/45 s y 72°C/ 45 s, con una elongación final de 72 °C/5 min.

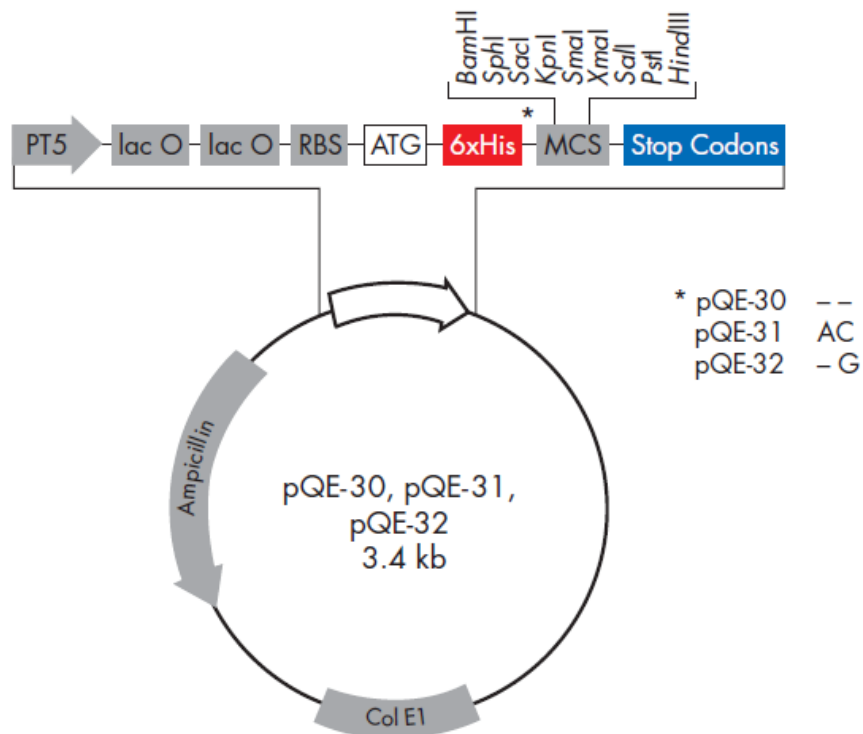


Figura 11. Esquema general del plásmido pQE30, se observan las enzimas de restricción localizadas en el poli-linker, las cola de seis histidinas que el plásmido le provee a la proteína en su 5' y el gen de resistencia a ampicilina que posee.

Posteriormente, el fragmento obtenido fue tratado con la enzima Klenow y dNTPs 2,5 mM por 20 min a 37 °C y purificado con el Kit Wizard SV Gel and PCR Clean Up System. Este producto purificado y 1 µg de plásmido pQE30 fueron sometidos paralelamente a digestión para generar extremos cohesivos con las endonucleasas *Bam*HI y *Sac*I. En un volumen final de 30 µl se agregó el buffer compatible con ambas enzimas, 10 U de cada enzima y el ADN correspondiente, incubando a 37 °C durante 2,5 h y cada producto de la digestión fue purificado a partir de un gel de agarosa al 0,8 % (p/v).

Los productos de la purificación fueron ligados en una relación 1:3 vector:inserto utilizando 1X amortiguador de ligación y 1 U de ligasa en un volumen final 25 µL

incubando a 16°C por 4h y posteriormente a 37°C por 2h. Se realizó una ligación de plásmido linealizado únicamente como control de circularización del mismo.

Las ligaciones fueron transformadas por choque térmico a células termocompetentes *E. coli* XL1/Blue y se seleccionaron dos colonias recombinantes: CnB-BamHI/SacIclon1 y CnB-BamHI/SacIclon2, cuyo ADN plasmídico fue enviado a secuenciación con el iniciador pQE-Forward (5'-GGC GTA TCA ACG AGG CCC TTT CG-3') para verificar la correcta inserción de CnB. Con base en la secuenciación, se seleccionó el clon CnB-BamHI/SacIclon2 y se realizó un subclonaje en *E. coli* M15 para dar lugar a los ensayos de expresión de la proteína.

A partir de una colonia recombinante de *E. coli* M15 (M15Cnb2.2) se realizaron ensayos de expresión a pequeña escala que permitieron seleccionar las condiciones ideales de expresión de la proteína rTrCnB: Primero, un inóculo de 20 ml en LB con 100 µg/ml ampicilina y 25 µg/ml kanamicina, creciendo a 37° y 200 rpm toda la noche, posteriormente se colocó dicho inóculo en una dilución 1/30 en medio LB con 100 µg/ml Ampicilina y 25 µg/ml kanamicina y cuando alcanzaron una densidad óptica de 0,4 se indujo la expresión con IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) 0,1 mM por 1.30 h.

Tras seleccionar las condiciones de inducción de la expresión descritas, la solubilización de la proteína se realizó mediante la resuspensión del pellet de 250 mL de cultivo en 8 mL de buffer de sonicación 1 (0,3 M NaCl; 50 mM Fosfato disódico pH 8) agregando lisozima y agitando 1 h a 4 °C. Posteriormente se sonicó a una amplitud del 40% por ocho minutos con pulsos 1 s encendido (ON) y 2 s apagado (OFF), se centrifugó a 5000 rpm por 30 min y se recogió el sobrenadante (solubilizado # 1). El pellet resultante se resuspendió en 8 mL de buffer de sonicación 2 (0,3 M NaCl; 50 mM Fosfato disódico; 0,025% (p/v) SDS; pH 8) se agitó por 1 h, se sonicó y centrifugó (solubilizado # 2). Este procedimiento se repitió dos veces más con agitaciones de 2 h y toda la noche respectivamente para obtener los solubilizados # 3 y # 4 y el pellet final.

La proteína rTrCnB se purificó utilizando un gradiente de concentración de Imidazol. Se utilizó una resina de Ni²⁺NA (Qiagen, Hilden, Alemania) equilibrada con buffer de sonicación 1 pH 7,5 e incubada con la mezcla de solubilizados durante 1 H a TA, posteriormente la proteína se inmovilizó en una columna “Econo-Pac Chromatography colum” (Biorad, Berkeley, USA) y se lavó con buffer de sonicación 1 pH 7,5 y PMSF 1mM usando bajas concentraciones de Imidazol (15-20 mM) pH 7,5, finalmente la proteína fue eluida con buffer de sonicación 1 pH 7,5 e imidazol 400 mM (2ml) y 500 mM (3 ml). Estas fracciones purificadas fueron chequeadas mediante SDS-PAGE y teñidas con azul de coomassie (Biorad, Berkeley, USA).

5.7.1.2 Inmunización de conejo Nueva Zelanda con rTrCnB y obtención de sueros

La inmunización fue llevada a cabo según el Protocolo para inmunización y sangría del conejo Nueva Zelanda blanco, POE número 108 del Laboratorio de Parasitología Molecular de la Pontificia Universidad Javeriana.

Brevemente: se realizaron cuatro inmunizaciones en intervalos de 14 días cada uno en los que se inoculó la proteína rTrCnB, 0,5 mg del péptido FIS (Prieto *et al.* 1995) y adyuvante completo de Freund en la primera inmunización e incompleto en las demás (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). En la primera inmunización se inocularon 0,50 mg y en las otras tres 0,25 mg de proteína recombinante pura y dializada. Se realizaron tres sangrías: pre-inmune antes de la primera inmunización, post-inmune I, en el día 35 y post-inmune II o sangría final, en el día 56. La sangre extraída fue centrifugada a 5000 rpm a TA y los sueros fueron alicuotados y congelados a -80°C hasta su uso.

5.7.1.3 Evaluación de la reactividad del suero anti rTrCnB mediante ELISA indirecto

Placas de fondo plano fueron sensibilizadas con 10 µg/ml de rTrCnB en PBS 1X, se incubaron tres horas a 37°C y 16 horas a 4°C. Luego, se bloquearon durante 2 h a 37

°C con solución de bloqueo (5% leche descremada, Tween 20 0,05%, PBS 1x.) y se lavaron 3 veces con solución de lavado (Tween 20 0,05%, PBS 1x.). Los sueros policlonales obtenidos en las sangrías post-inmune I y II fueron diluidos 1/10000, 1/50000, 1/100000, 1/250000 y 1/500000 en solución de bloqueo, así mismo, el suero pre -inmune fue diluido 1/100 y por último se utilizó solución de bloqueo como un control blanco de la reacción. Dichas muestras fueron utilizadas como anticuerpo primario, se agregaron en un volumen final de 100 µL a los pozos (por triplicado) y fueron incubados durante 2 h a 37 °C.

El anticuerpo primario fue lavado cinco veces con solución de lavado, se agregaron 100 µL de conjugado anti IgG de conejo marcado con fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) diluído 1:20000 en solución de bloqueo y se incubó 1 hora a 37°C. Posterior a 5 lavados, se agregaron 100 µL de p-nitrofenilfosfato 1mg/ml diluido en amortiguador de dietanolamina (Dietanolamina 10 %, MgCl₂.6H₂O 0,01 %, NaN₃ 0,02 %), se incubó 15 min en oscuridad, se detuvo la reacción con NaOH 3N y se realizó la lectura a 405 nm en el Lector multiskan modelo 347 MTX Lab system.

5.7.2 Citometría de flujo

1 x 10⁶ epimastigotes en fase exponencial de cultivo de *T. cruzi* 058PUJ y *T. rangeli* Tre, fueron fijados con metanol durante 2 min a -20 ° C. Posteriormente, se incubaron 20 min a temperatura ambiente con 50 µL de sueros policlonales dirigidos contra la proteínas recombinantes, en PBS 1X y diluidos 1/100 para la NTR tipo I y 1/250 para CnB. Se realizaron 3 lavados con 3 ml de PBS 1X y se incubaron durante 20 min a 4 ° C con 50 µL de un anticuerpo secundario anti IgG de conejo acoplado a FITC (Life Techonologies, Carlsbad, USA), diluido 1:100 en PBS 1X, y se lavaron nuevamente.

1 x 10⁴ epimastigotes fueron adquiridos y seleccionados por sus patrones FSC y SSC utilizando un FACS Canto II (BD Bioscience, San José, USA). Se realizó la detección de la frecuencia de parásitos positivos para la expresión de las proteínas NTR tipo I y CnB

a 530 nm y la intensidad media de fluorescencia (IMF) de estos. Se utilizaron parásitos permeabilizados sin marcar y parásitos permeabilizados y marcados solamente con el anticuerpo secundario como controles y guías para la selección de las poblaciones. Por último, los datos obtenidos se analizaron usando el software FlowJo 8.7 (Árbol Star, Inc. Ashland, EE.UU).

5.7.3 Inmunofluorescencia

4×10^5 epimastigotes de *T. cruzi* 058PUJ y *T. rangeli* Tre, en fase exponencial de cultivo, fueron fijados en pozos de láminas portaobjetos con metanol absoluto y almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Posteriormente, se incubaron durante 30 min en cámara húmeda con 10 μL de sueros policlonales dirigidos contra la proteínas recombinantes, en PBS 1X y diluidos 1/100 para la NTR tipo I y 1/250 para CnB. Se realizaron 3 lavados con 20 μL de PBS 1X y se incubaron durante 25 min en cámara húmeda con 10 μL del conjugado Alexa 594 anti-IgG de conejo (Molecular Probes, Grand Island, USA) en una dilución 1:1000 en PBS 1X, a continuación, los núcleos y cinetoplastos se tiñeron mediante la adición de 10 μL /pocillo de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) 30 nM e incubado durante 5 minutos extra. Los portaobjetos se lavaron de nuevo y se les agregó medio de montaje Gelvatol (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) para examinarlos en el microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse TI (Nikon Instruments, Melville, USA) en aumento 60X.

6. RESULTADOS

6.1 El genoma de *T. rangeli* Tre contiene los genes *ntr* y *cnb*

Se presentan los resultados relacionados con la amplificación por PCR, secuenciación e identificación en el genoma por Southern blot de los genes *ntr* y *cnb* en *T. rangeli* Tre, teniendo en cuenta que se utilizó el aislado *T. cruzi* 058PUJ como control durante toda la etapa experimental, este fue caracterizado de la misma forma.

6.1.1 *ntr* *T. rangeli* Tre

La amplificación de un fragmento de 890 pb del gen *ntr* a partir de ADN genómico de *T. rangeli* Tre utilizando los iniciadores NTR-FW y NTR-RW demostró la presencia de dicho gen en el genoma del parásito (Figura 12).

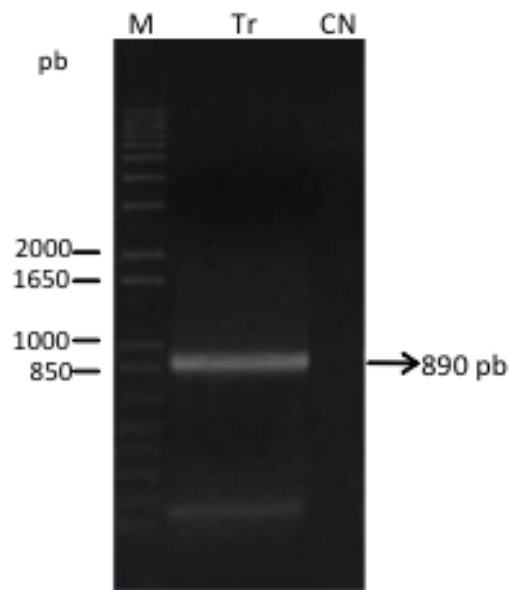


Figura 12. PCR del ADN de *T. rangeli* Tre usando los iniciadores NTR-FW/NTR-RW. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio conteniendo 15 μ l del producto de amplificación. ADN de *T. rangeli* Tre (Tr) y control de reacción con agua destilada (CN). Se usó 1Kb plus (Invitrogen) como marcador de peso molecular (M), cuyos pesos se indican a la izquierda. El tamaño del fragmento obtenido se indica a la derecha.

El fragmento obtenido fue clonado y secuenciado. Dicha secuencia (Figura 13) comprobó que se trataba del gen *ntr* de *T. rangeli* Tre, al presentar una identidad del 72% con la secuencia del mismo gen reportado para *T. cruzi*. Así mismo, se resalta que presenta un tamaño menor (890 pb) en comparación con sus ortólogos en otros tripanosomátidos, que poseen tamaños en un rango de 942 a 972 pb (Anexo 10.2).

```

1 GAGAAATGGC ATAAAAAGAG GCCTGTGGGA CTCTGTGCAG TCGTACTGGT GCTGGAAGCA
61 GTCAAACGTC GCCGCGGCGG TCGTCCGCGG CGGGAAGAAT GGGGGCCGCG GTGAGGCGGG
121 GTTGGGGCAC GGAACGGGC CTACGTCCAC TTTTTTCCCC TCTCTGATTT CATCCTCGTC
181 GCCGTTGGAT GCGGTGAAGG GCGTTGTGCG CGACCGTCGC AGTTGCAGGC GCTTTGACC
241 AACACGGCCA GTTGACTTTG ACGTGCTGAA CGATATTCTC GCCCTGACGG TGCGGGCTCC
301 CACATCTCTG AACCTGCAGC CGTGGGTGGC TGTCGTGGTG TGCGAGGAGG AGCAGCGAGC
361 GGCATCGCG CATGCGGCGC TGAGTCAGCC GCAACCTCGC GACGCACCGG TGACAATTGT
421 GTTTGCCGGT GACATGGAGC CGGAGCGCAA CGCCCCGGCG GCACTGGAGC ATGGCCTTGA
481 GAGTGGCTAC TTGCACCCAA TGTATGGCGC AAACATCTCTG CGCAACACGT ACTATCTACT
541 CCACGGTGGC CCAGTAGAAT CCATCTCGCA CATTAAAGTCT TTCCTGTCTG CGTGGTATAG
601 CAAGGCCACG GGCCACCCGC TGCTGTCCGT TCCGACAACC AAGCAGGGGT ATGCGTGGAA
661 GCAGGCGATG ATACCGGTGA CGACATTTCT GTACCTTGCC ACTGCGGCGG GGTTTGACAC
721 GAGCATTCTT GAGGGGTTT ACAGGCGCA AGTGAAGCAG ATTGTAGGGC TACCGCCACG
781 TTTCACTGTG CCGGTGATTA TGTGCGTTGG ATACGCCGCG AAGGACGGGT TTCACTCTGT
841 GCGCAGCCCG CGCTTTGACA CGCGGCACTT GGTTCGGTGG GGAAAGTTTT

```

Figura 13. Secuencia consenso de nucleótidos del gen *ntr* de *T. rangeli* Tre (Genbank: JKC797657). Los números a la izquierda indican la posición de los nucleótidos en la secuencia.

Así mismo, la traducción de la secuencia de nucleótidos mostró un fragmento de la proteína NTR tipo I de *T. rangeli* Tre de 296 aminoácidos (Figura 14).

```

1 RNGIKRGLWD SVQSYWCWKQ SNVAAAVVRG GKNNGRGEAG LGHNGPTST FFPGLISSSS
61 PLDAVKGVVR DRRSCRFRDP TRPVDFDVLN DILALTVRAP TSLNLQPWVA VVVCEEEQRA
121 ALAHAALSQP QPRDAPVTIV FAGDMEPERN APAALEHGLE SGYLHPMYGA NYLRNTYYLL
181 HGGPVEISH IKSFLSAWYS KATGHPLLSV PTTKQGYAWK QAMIPVTTFL YLATAAGFDT
241 SILEGFDEAQ VKQIVGLPPR FTVPVIMCVG YAAKDGFSV RSPRFDTRHL VRWGKF

```

Figura 14. Secuencia de aminoácidos de la proteína NTR de *T. rangeli* Tre (Genbank: KC797657). Los números a la izquierda indican la posición de los aminoácidos en la secuencia.

Una vez confirmada la secuencia del gen *ntr*, el fragmento de 890 pb fue utilizado como sonda en el ensayo de Southern blot. La figura 15 muestra el fragmento, los

iniciadores utilizados para su amplificación y las enzimas de restricción utilizadas que cortan en él (*EaeI*, *NruI*, *PstI*, *SphI*), la enzima *HindIII*, no está representada ya que no corta en el gen *ntr*.

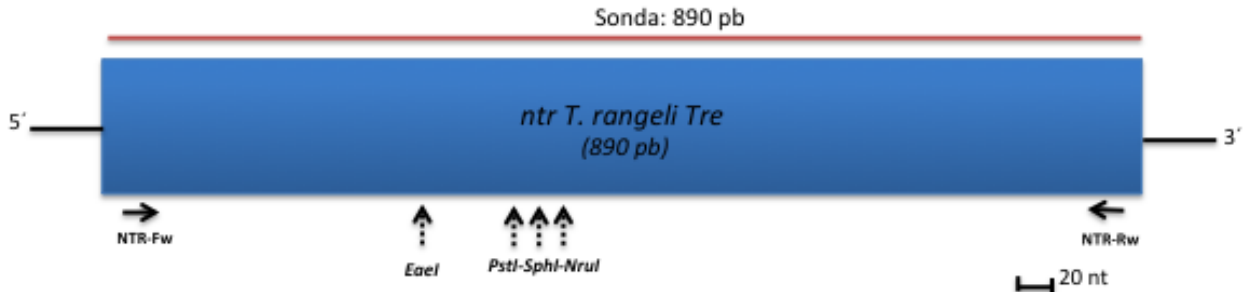


Figura 15. Esquema del gen *ntr* de *T. rangeli* Tre. Se muestra la posición de los iniciadores NTR-FW y NTR-RW, del sitio de corte de las enzimas de restricción utilizadas en el Southern blot y la sonda.

El Southern blot mostró que el gen *ntr* de *T. rangeli* Tre se encuentra en el genoma del parásito y presenta un patrón de gen de única copia (Figura 16), con presencia de dos señales de hibridación en los carriles correspondientes a las enzimas que cortan el gen (*EaeI*, *NruI*, *PstI*) y una señal de alto peso molecular en aquella que no lo corta (*HindIII*). En las enzimas *NruI* y *PstI* se observa una hibridación a alto peso molecular que podría ser explicada por digestión parcial del ADN genómico o polimorfismos al interior de los cromosomas que contienen al gen *ntr*, una característica común en tripanosomátidos (Diez *et al.* 2005; Cuervo *et al.* 2006).

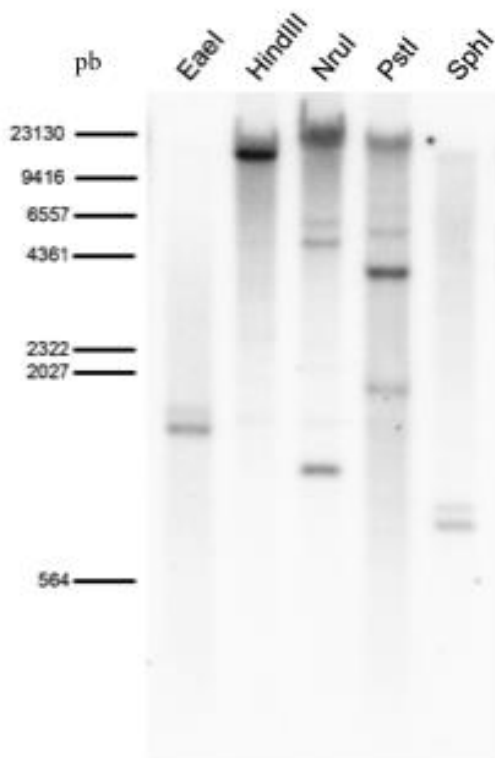


Figura 16. Southern blot del gen *ntr* de *Trypanosoma rangeli* Tre. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% teñido con bromuro de etidio conteniendo 30µl del producto de digestión con las diferentes endonucleasas. Se utilizó el marcador Lambda *HindIII* cuyos pesos se indican a la izquierda. Sonda utilizada gen *ntr* de *T. rangeli* Tre completo excepto codón stop e inicio

6.1.2 *ntr* *T. cruzi* 058PUJ

Los iniciadores NTR-FW y NTR-RW permitieron amplificar un fragmento de 935 pb de la región codificante del gen *ntr* del aislado *T. cruzi* 058PUJ (Figura 17).

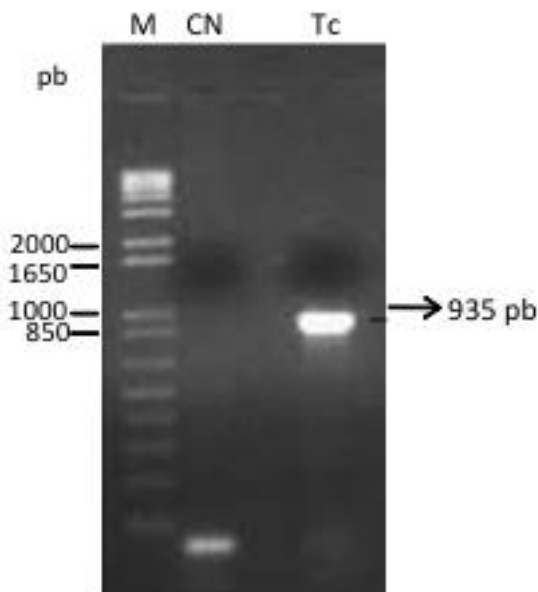


Figura 17. PCR del ADN de *T. cruzi* 058PUJ usando los iniciadores NTR-FW/NTR-RW. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio conteniendo 15 μ l del producto de amplificación. ADN del aislado 058PUJ de *T. cruzi* (Tc) y control de reacción con agua destilada (CN). Se usó 1Kb plus (Invitrogen) como marcador de peso molecular (M), cuyos pesos se indican a la izquierda. El tamaño del fragmento obtenido se indica a la derecha.

El fragmento obtenido fue clonado y secuenciado. Dicha secuencia (Figura 18) presentó una identidad del 97% con otras secuencias reportadas para *T. cruzi*. (Anexo 10.2). Es importante resaltar que a dicha secuencia le faltan los primeros 5 nucleótidos y los 2 últimos nucleótidos, para tener un marco de lectura abierto completo. Lo anterior, debido a los sitios donde fueron diseñados los iniciadores.

```

1 GAGAAATGGC ATAAAAAGAG GCCTGTGGGA TTCTTTAATT TTGTATTGGC GTTGGAAATCG
61 AGAAAGCCTT TTGAGGAATG TTTCTGCATT TGCGGAAAAT GGCAGGCACG TGATTGGTAT
121 GGATGGTCCT GTGGAGACAG GTAGTAAAAA GGGCGTGGGG CGTGGGAATT CGTCCATGCC
181 TCCTTTTTTT TCCTCGATGC CGCCATCACT ATCATCATCA TCATCATTGC CGCTGGATGC
241 CATGAAACGT GTAGTACACG AGCGTCGCTC CTGCAAGCGA TTTGACCCAA CAAAGCCAAT
301 TGACCTCGAC GTGGTTTCTG ATCTTCTCGC CATGACGGTG CGGGCTCCTA CCGCCCTGAA
361 CTTACAGCCG TGGGTGGCTG TTGTCATACA CGAGGAGGAG CAACGAGAAA CCCTCTCGCG
421 TGCGGCCCTG GGGCAACCGC AGCCTCGTGA CGCACC GG TG ACAGTTGTGT TCGCTGGTGA
481 CATGGAGCCG GAGAGCAATG CCCC GGCCGC GCTTGAGATG GGGCTGGAGA GTGGGTACTA
541 CCACTCACTT TATGGCGCAG CCTATCTGCG ACATGTGTAC TACCTACTTC ACGGTGGCCC
601 ATGTGAAGCC ATGTCACATG TTAAGGCGAT TGTGTCTGCA TGGTATAGTG AAAGCACTGG
661 CAACGCGATG CTGTCGGTTC CTAGAAATAA GCAGGCGTAT GCGTGGAAGC AGGTTATGAT
721 ACCGGCAACG ACGTTTCTTT ATCTTGCAAC GGCAGCAGGG TTTGACACGG CAATTTTGGA
781 AGGGTTTGAT GAGGCGCAGG TGCGGCGTGT GGCAGGGTTA CCACCACGAT TCACAGTGCC
841 GGTGATTATT AGTGTGGGC ACGGTGCGAA GAACGGGTTT CACTCCGTAC GCAGCCCACG
901 ATTTCCACG AAGCATTTGG TTCGGTGGGG AAAGTTTT

```

Figura 18. Secuencia consenso de nucleótidos del gen *ntr* de *T. cruzi* 058PUJ (Genbank: JF410861). Los números a la izquierda indican la posición de los nucleótidos en la secuencia.

Así mismo, la traducción de la secuencia de nucleótidos mostró un fragmento de la proteína NTR tipo I de *T. cruzi* 058PUJ de 312 aminoácidos (Figura 19).

```

1 RNGIKRGLWD SLILYWRWNR ESLLRNVSFA AENGRHVIGM DGPVETGSEK GVVRGNS SMP
61 PFFSSMPPSL SSSSSLPLDA MKRVVHERRS CKRFDPTKPI DLDVVS DLLA M TVRAPTALN
121 LQPWVAVVIH EEEQRETLR AALGQPQPRD APVTVV FAGD MEPESNAPAA LEMGLESGYY
181 HSLYGAAAYLR HVYYLLHGGP CEAMSHVKAI VSAWYSESTG NAMLSVPRNK QAYAWKQVMI
241 PATTFLYLAT AAGFDTAILE GFDEAQVRRV AGLPPRF TVP VIIISVGHGAK NGFHSVRSR
301 FPTKHLV RWG KF

```

Figura 19. Secuencia de aminoácidos de la proteína nitroreductasa tipo I de *T. cruzi* 058PUJ (Genbank: AEM23728.1). Los números a la izquierda indican la posición de los aminoácidos en la secuencia

Igualmente, se realizó un ensayo de Southern blot para el aislado 058PUJ de *T. cruzi*. La figura 20 muestra el esquema del gen, la localización de los iniciadores y la enzima de restricción *EaeI* que corta en dicho fragmento. Las enzimas *Bam*HI y *Hind*III no cortan al interior del gen. La sonda utilizada correspondió al fragmento completo de 935 pb y se señala en la figura.

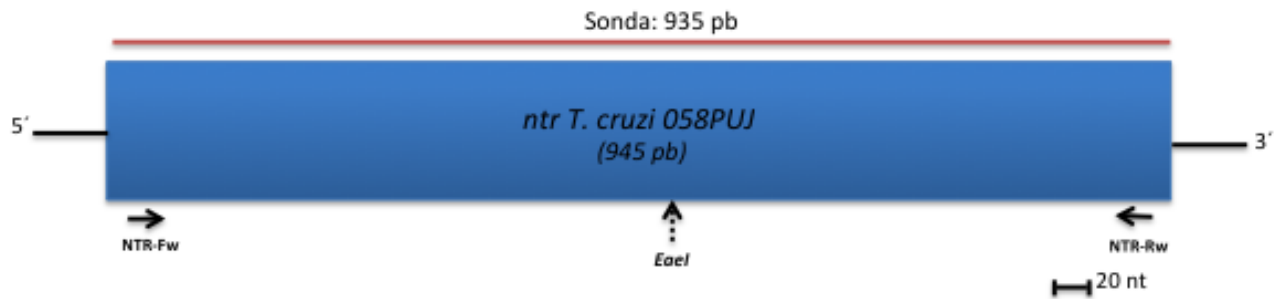


Figura 20. Esquema del gen *ntr* de *T. cruzi* 058PUJ. Se muestra la posición de los iniciadores NTR-FW y NTR-RW, del sitio de corte de las enzimas de restricción utilizadas en el Southern blot y la sonda.

El Southern blot (Figura 21) mostró el patrón característico de gen de única copia para *ntr* en *T. cruzi* 058PUJ. En el que las enzimas que no cortan en el gen (*Bam*HI y *Hind*III) presenta una sola señal de hibridación y en el caso de *Eae*I, como se esperaba, se observan dos señales.

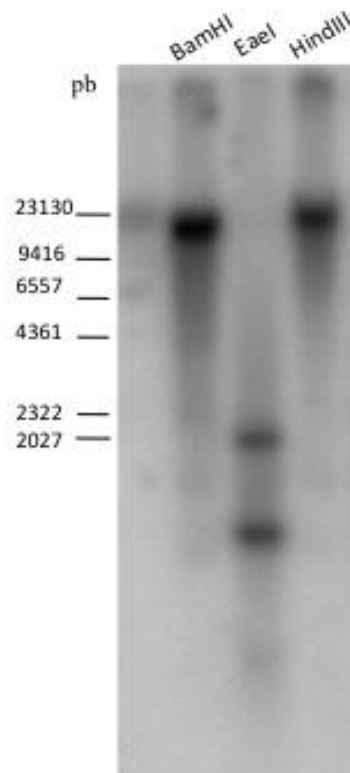


Figura 21. Southern blot del gen *ntr* de *Trypanosoma cruzi* 058PUJ. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% teñido con bromuro de etidio conteniendo 30µl del producto de digestión con las diferentes endonucleasas. ADN genómico de *T. cruzi* 058PUJ digerido con *Bam*HI; *Eae*I y *Hind*III. Se usó Lambda *Hind*III como marcador de peso molecular (MW), cuyos pesos son indicados a la izquierda. Sonda utilizada, gen *ntr* de *T. cruzi* 058PUJ menos codón de inicio y stop.

6.1.3 *cnb* *T. rangeli* Tre

La amplificación de la región codificante completa del gen *cnb* (531 pb) a partir de ADN genómico de *T. rangeli* Tre utilizando los iniciadores CaNB-ATG y CaNB-TAG demostró la presencia de dicho gen en el genoma del parásito (Figura 22).

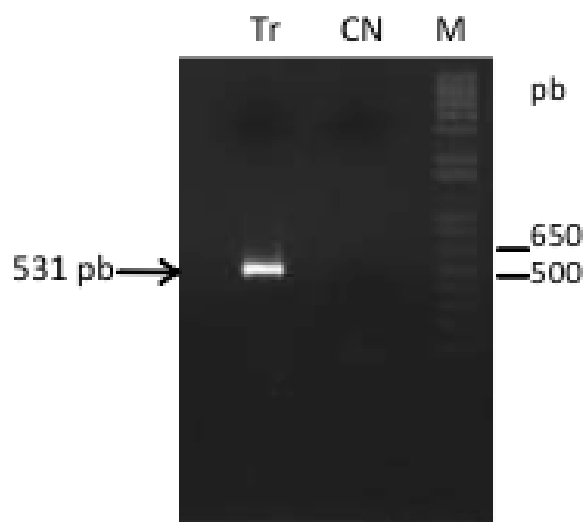


Figura 22. PCR del ADN de *T. rangeli* Tre usando los iniciadores CaNB-ATG/CaNB-TAG. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Control positivo de la PCR: ADN de *T. rangeli* cepa Tre 15 μ l de reacción (Tr), control de reacción con agua destilada (CN). Se usó 1Kb plus (Invitrogen) como marcador de peso molecular (M), cuyos pesos se indican a la derecha (pb).

El fragmento obtenido fue clonado y secuenciado. Producto de este procedimiento se obtuvieron dos clones (**TrCnB-1** y **TrCnB-5**) que presentaban una identidad de 99,8% entre ellos debido al polimorfismo 314A>C. Además, poseen identidades de aproximadamente 78% con las secuencias reportadas en diferentes cepas de *T. cruzi* (Anexo 10.2). Las figuras 23 y 24 muestran las secuencias del gen *cnb* de ambos clones.

```

1 ATGGATAACA GACCTGGACT CACTCCGGAA AAAATTCGGG AGTTGAAGGA GGCAACGGTG
61 CTTTCTGAGG CGCAGATTCT TCGACTTCAT CAACGATTCA TGTTGCTTGA CCAGGCTGGT
121 CAAGGAGCTA TAACGGCAGA GCGGTTTCAGT TCTATTGCCT CTGTGGCCTC AAACCCCTCTC
181 CTAGGCCGCA TATTGGCGGT ATTGGATACA ACTGGTGATG GAAAAATTGA TTTTACGGAG
241 TTTGCAAAGA CGCTGGCCAT TTTTTCCTCA CAGGCTGACA AGCTGGAGAA GCTGCGTTTT
301 ACCTACAAGA TGTACGACTT TGATGGCGAC GGCAAGATCA GCAACAAGGA CCTCTTTGAA
361 ACCCTGAAAA TCATGGTGGG AACAAACCTA ACGGAGGTTT AGTTGCAGCA GATTGTTGAC
421 AAAACATTCA TTGAGGTGGA TCTGGACCGT GACGGGTATA TTACATTTGA TGAATTTGAG
481 AAGTTGACAC TTTTGAACAA TTTTGGTGAT CGTCTCAACC TTTTCTTTTA G

```

Figura 23. Secuencia de nucleótidos del gen *cnb* de *T. rangeli* Tre clon TrCnB-1 (Genbank: JQ691947). Los números a la izquierda indican la posición de los nucleótidos en la secuencia.

```

1 ATGGATAACA GACCTGGACT CACTCCGGAA AAAATTCGGG AGTTGAAGGA GGCAACGGTG
61 CTTTCTGAGG CGCAGATTCT TCGACTTCAT CAACGATTCA TGTTGCTTGA CCAGGCTGGT
121 CAAGGAGCTA TAACGGCAGA GCGGTTTCAGT TCTATTGCCT CTGTGGCCTC AAACCCCTCTC
181 CTAGGCCGCA TATTGGCGGT ATTGGATACA ACTGGTGATG GAAAAATTGA TTTTACGGAG
241 TTTGCAAAGA CGCTGGCCAT TTTTTCCTCA CAGGCTGACA AGCTGGAGAA GCTGCGTTTT
301 ACCTACAAGA TGTCCGACTT TGATGGCGAC GGCAAGATCA GCAACAAGGA CCTCTTTGAA
361 ACCCTGAAAA TCATGGTGGG AACAAACCTA ACGGAGGTTT AGTTGCAGCA GATTGTTGAC
421 AAAACATTCA TTGAGGTGGA TCTGGACCGT GACGGGTATA TTACATTTGA TGAATTTGAG
481 AAGTTGACAC TTTTGAACAA TTTTGGTGAT CGTCTCAACC TTTTCTTTTA G

```

Figura 24. Secuencia de nucleótidos del gen *cnb* de *T. rangeli* Tre Clon TrCnB-5 (Genbank: JQ691948). Los números a la izquierda indican la posición de los nucleótidos en la secuencia

La traducción de estas secuencias de nucleótidos arrojó a su vez dos secuencias (Figuras 25 y 26) puesto que la mutación no sinónima mencionada anteriormente lleva al cambio Y105S.

```

1 MDNRPGLTPE KIRELKEATV LSEAQILRLH QRFMLLDQAG QGAI TAEAFS SIA SVASNPL
61 LGRILAVLDT TGDGKIDFTE FAKTLAIFSP QADKLEKLRF TYKMYDFDGD GKISNKDLFE
121 TLKIMVGTNL TEVQLQQIVD KTFIEVDLDR DGYITFDEFE KLTLNNEFGD RLNLFF

```

Figura 25. Secuencia de aminoácidos de la proteína CnB de *T. rangeli* Tre Clon TrCnB-1 (Genbank: AFY97635.1). Los números a la izquierda indican la posición de los aminoácidos en la secuencia.

1	MDNRPGLTPE	KIRELKEATV	LSEAQILRLH	QRFMLLDQAG	QGAI TAEAFS	SIASVASNPL
61	LGRILAVLDT	TGDGKIDFTE	FAKTLAIFSP	QADKLEKLRF	TYKMSDFDGD	GKISNKDLFE
121	TLKIMVGTNL	TEVQLQQIVD	KTFIEVDLDR	DGYITFDEFE	KL TLLN NFGD	RLNLFF

Figura 26. Secuencia de aminoácidos de la proteína CnB de *T. rangeli* Tre Clon TrCnB-5 (Genbank: AFY97636.1). Los números a la izquierda indican la posición de los aminoácidos en la secuencia.

Una vez confirmada la secuencia del gen *cnb*, este fragmento fue utilizado como sonda en el ensayo de Southern blot. La figura 27 muestra el esquema del gen, los iniciadores utilizados para su amplificación y las enzimas de restricción que cortan en él (*Bgl*I y *Rsa*I), adicionalmente fueron utilizadas las enzimas *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III y *Pst*I.

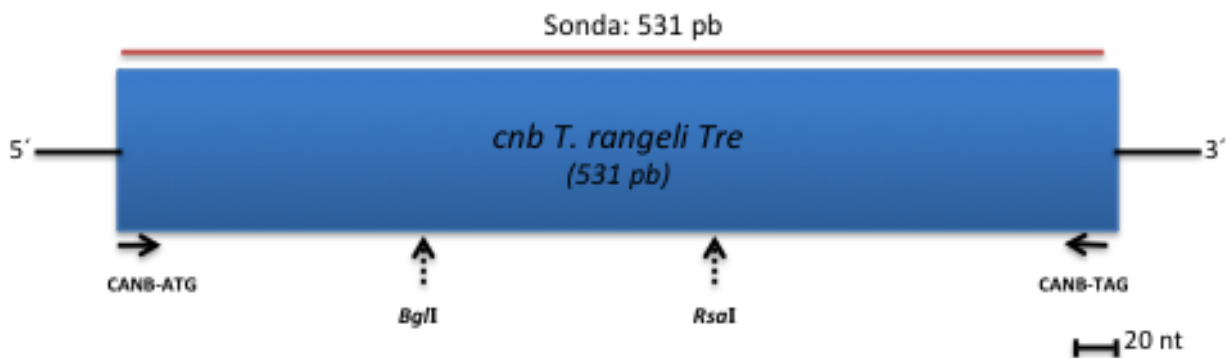


Figura 27. Esquema del gen *cnb* de *T. rangeli* Tre. Se muestra la posición de los iniciadores CaNB-ATG y CaNB-TAG, del sitio de corte de las enzimas de restricción utilizadas en el Southern blot y la sonda.

El Southern blot mostró que el gen *cnb* de *T. rangeli* Tre se encuentra en el genoma del parásito y presenta un patrón de gen de única copia. (Figura 28). El corte con las enzimas *Bgl*I y *Rsa*I produjo dos fragmentos mientras que el uso de enzimas que no cortan en el gen como *Eco*RI, *Hind*III y *Pst*I mostraron una única señal de hibridación de alto peso molecular. La presencia de dos señales en el carril correspondiente a *Bam*HI podría estar relacionada con la presencia de polimorfismos en los cromosomas que contienen al gen *cnb*, una característica que es común en tripanosomátidos (Diez *et al.* 2005; Cuervo *et al.* 2006).

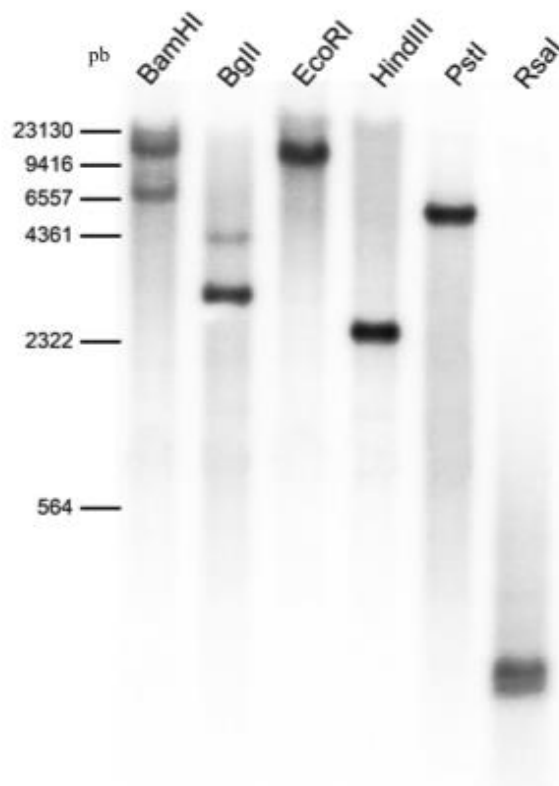


Figura 28. Southern blot del gen *Cnb* de *Trypanosoma rangeli* Tre. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% teñido con bromuro de etidio conteniendo 30 μ del producto de digestión con las diferentes endonucleasas. ADN genómico de *T. rangeli* Tre con las endonucleasas mencionadas. Se utilizó el marcador Lambda HindIII cuyos pesos se indican a la izquierda. Sonda utilizada: gen completo de *T. rangeli* Tre.

6.1.4 *cnb* *T. cruzi* 058PUJ

Los iniciadores CalB-Fw y CalB-Rw permitieron amplificar un fragmento de 528 pb de la región codificante del gen *ntr* del aislado *T. cruzi* 058PUJ (Figura 29), es decir, toda la región codificante excepto el codón de inicio.

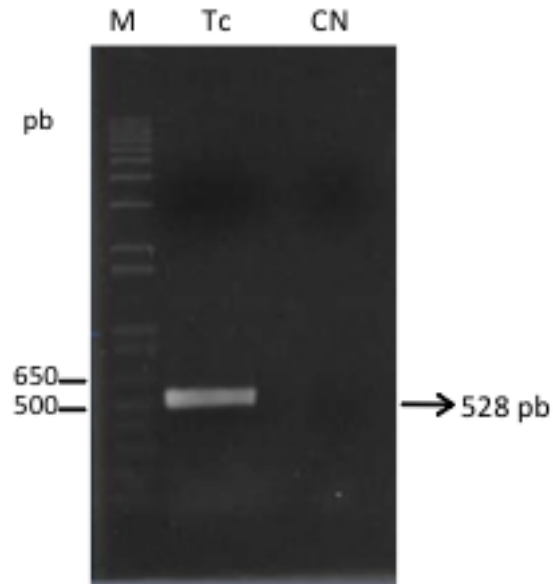


Figura 29. PCR del ADN de *T. cruzi* 058PUJ usando los iniciadores CalB-FW/CalB-RW. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñido con bromuro de etidio conteniendo 20 μ l del producto de amplificación. ADN del aislado 058PUJ de *T. cruzi* (Tc) y control de reacción con agua destilada (CN). Se usó 1Kb plus (Invitrogen) como marcador de peso molecular (MW), cuyos pesos se indican a la izquierda

El fragmento obtenido fue clonado y secuenciado. La secuencia consenso (Figura 30) presentó una identidad del 98% con otras reportadas para *T. cruzi*. (Anexo 10.2).

```

1  GGCGAGGGGT  CTTCTTCAC  GCCCGAGGAA  ATGCGGCAGT  TGCAGAGAAGC  GACCGCATTT
61  TCCGAGGCAC  AAATTGTTTCG  ACTTCAAAG  CGGTTTGCGA  CGCTCGCTCA  GGGGGGACGG
121  GGAGTCCTGA  CAGCGGAGGC  GCTCAGCTCC  ATCTCCTCAG  TGGCCTCAAA  CCCTCTGCTC
181  GGGCGTGTAC  TGGCGGTGTT  GGATACAAGT  GGAGATGGAA  AAATTGACTT  TATGACGTTT
241  GCAAAGGCC  TTGCCGTTTT  TTCCCCGCGAG  GCTGACAAGC  GGGAAAGGCT  GCGTTTTACC
301  TTCAAGATGT  ACGATGTTGA  TGGCGACGGC  AAGATCAGTA  ACAAGGACCT  GTTTGAGACG
361  CTGACGATCA  TGGTGGGAAC  CAATCTCACG  GGGGTTTACG  TGCAGCAGAT  TGTGGACAAA
421  ACATTTATTG  AAGTGGACCT  GAACCGTGAC  GGGTACATTA  CATTTGAAGA  ATTTGAGAAA
481  TTGTCCCTCC  TGAACAATTT  TGGAGATCGC  CTTAGCCTCT  CCATTTAG

```

Figura 30. Secuencia de nucleótidos del gen *cnb* de *T. cruzi* 058PUJ (Genbank: JN638994). Los números a la izquierda indican la posición de los nucleótidos en la secuencia

Así mismo, la traducción de la secuencia de nucleótidos mostró que la proteína CnB de *T. cruzi* 058PUJ posee 176 aminoácidos (Figura 31).

```

1 MEGGSSFTPE EMRQLREATA FSEAQIVRLQ KRFATLAQGG RGVLTAEALS SISSVASNPL
61 LGRVLAVLDT SGD GKIDFMT FAKALAVFSP QADKRERLRF TFKMYDVDGD GKISNKDLFE
121 TLTIMVGTNL TGVQLQQIVD KTFIEVDLNR DGYITFEEFE KLSLLNFGD RLSLSI@

```

Figura 31. Secuencia de aminoácidos de la proteína CnB de *T. cruzi* 058PUJ (Genbank: JN638994). Los números a la izquierda indican la posición de los aminoácidos en la secuencia.

Igualmente, se realizó un ensayo de Southern blot para el aislado 058PUJ de *T. cruzi*. La figura 32 muestra el esquema del gen, la localización de los iniciadores y el sitio de corte de las enzimas de restricción utilizadas (*Bam*HI, *Eae*I y *Hind*III) que corta en dicho fragmento. La sonda utilizada correspondió al fragmento completo de 528 pb y se señala en la figura.

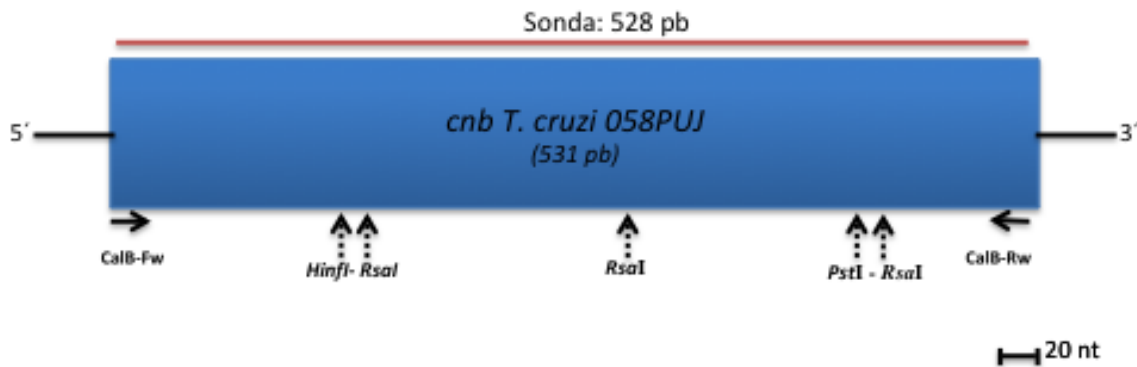


Figura 32. Esquema del gen *cnb* de *T. cruzi* 058PUJ. Se muestra la posición de los iniciadores NTR-FW y NTR-RW, del sitio de corte de las enzimas de restricción utilizadas en el Southern blot y la sonda.

El Southern blot (Figura 33) mostró un patrón característico, de gen de única copia para *cnb* en *T. cruzi* 058PUJ, en el que las enzimas *Hinf*I y *Pst*I, por realizar un corte en el gen, generaron dos fragmentos y la enzima *Rsa*I, con tres cortes sobre la secuencia permitió observar tres señales de hibridación, el hecho de que no se

observe una cuarta, estaría relacionado con el tamaño de la misma ya que correspondería a 70 pb hacia el 3' del gen.

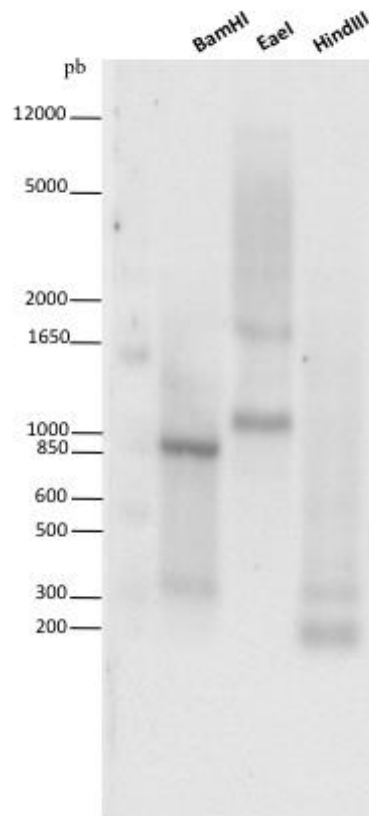


Figura 33. Southern blot del gen *CnB* de *Trypanosoma cruzi* 058PUJ. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% teñido con bromuro de etidio conteniendo 80 μ l del producto de digestión con las diferentes endonucleasas. ADN genómico de *T. cruzi* 058PUJ digerido con *HinfI* ; *PstI* y *RsaI*. Se usó 1Kb plus (Invitrogen) como marcador de peso molecular (MW), cuyos pesos son indicados a la izquierda. Sonda utilizada: Gen completo de *T. cruzi* 058PUJ

6.2 Análisis *in silico* de secuencias obtenidas

6.2.1 Identidad

Las secuencias consenso obtenidas para los genes *ntr* y *cnb* de ambas especies (Figuras 13-14, 18-19, 23-26 y 30-31) fueron comparadas a nivel de identidad entre sí y con secuencias de otros tripanosomátidos reportadas en las bases de datos Genbank, TriTrypDB y GeneDB (consignadas en el anexo 10.2). Los resultados se

muestran en las tablas 9-12 para el gen codificante y la proteínas NTR tipo I y en las tablas 13-16 para el gen y la proteína CnB.

6.2.1.1 NTR tipo I *T. rangeli* Tre

La secuencia consenso de nucleótidos (Figura 13) presentó un identidad de 71% con secuencias de *T. cruzi*, de 58% con secuencias de *T. brucei* y de 57-59% con secuencias del género *Leishmania sp* (Tabla 9).

Tabla 9. Porcentaje de identidad a nivel de la secuencia de nucleótidos del gen *ntf* de *T. rangeli* Tre y otros tripanosomátidos

Especie/Especie	Porcentaje de identidad (%)	
<i>T. rangeli</i> Tre	<i>T. cruzi</i> 058PUJ	72,6
	<i>T. cruzi</i> Sylvio X10/1	71,7
	<i>T. cruzi</i> JRcl4	72
	<i>T. cruzi</i> CL Brener non esmeraldo like	71,3
	<i>T. cruzi</i> CL Brener Esmeraldo like	71,6
	<i>T. cruzi</i> Esmeraldo	71,5
	<i>T. brucei</i> TREU927	58
	<i>T. brucei gambiense</i>	57,8
	<i>T. brucei</i> Lister	58
	<i>T. vivax</i>	57
	<i>T. congolense</i>	58,1
	<i>Leishmania infantum</i>	57
	<i>Leishmania braziliensis</i>	59,4
	<i>Leishmania major</i>	56
<i>Leishmania mexicana</i>	57,9	

La secuencia consenso de 296 aminoácidos de la nitroreductasa tipo I (Figura 14), tiene una identidad de aproximadamente 66% con las secuencias reportadas para *T. cruzi*, de 54% con *T. brucei*, de 46,4% con *L. major*, de 48,7% con *L. braziliensis* y de 48% con *L. infantum* (Tabla 10), un punto isoeléctrico de 9,28 y un peso molecular de 32,6kDa (www.expasy.org).

Tabla 10. Porcentaje de identidad a nivel de la secuencia de aminoácidos de la proteína NTR de *T. rangeli* Tre y otros tripanosomátidos

Especie/Especie	Porcentaje de identidad (%)	
<i>T. rangeli</i> Tre	<i>T. cruzi</i> 058PUJ	67,3
	<i>T. cruzi</i> Sylvio X10/1	66,6
	<i>T. cruzi</i> JRcl4	66,6
	<i>T. cruzi</i> CL Brener non esmeraldo like	66,5
	<i>T. cruzi</i> CL Brener Esmeraldo like	66,3
	<i>T. cruzi</i> Esmeraldo	66,6
	<i>T. brucei</i> TREU927	54,5
	<i>T. brucei gambiense</i>	54,5
	<i>T. brucei</i> Lister	54,5
	<i>T. vivax</i>	51,6
	<i>T. congolense</i>	55
	<i>Leishmania infantum</i>	46,4
	<i>Leishmania braziliensis</i>	48,7
	<i>Leishmania major</i>	48
	<i>Leishmania mexicana</i>	47

6.2.1.2 NTR tipo I *T. cruzi* 058PUJ

La secuencia consenso de nucleótidos (Figura 18), presenta una identidad a nivel de de aproximadamente 97% con las secuencias previamente reportadas para *T. cruzi*, de 57,4% con *T. brucei*, 56% con *L. braziliensis*, 55% con *L. major*, 55,6% con *L. infantum* y 56,4% con *L. mexicana* (Tabla 11).

Tabla 11. Porcentaje de identidad a nivel de la secuencia de nucleótidos del gen *ntr* de *T. cruzi* 058PUJ y otros tripanosomátidos

Especie/Especie	Porcentaje de identidad (%)	
<i>T. cruzi</i> 058PUJ	<i>T. cruzi</i> Sylvio X10/1	98,7
	<i>T. cruzi</i> JRcl4	98,9
	<i>T. cruzi</i> CL Brener non esmeraldo like	97,4
	<i>T. cruzi</i> CL Brener Esmeraldo like	96,3
	<i>T. cruzi</i> Esmeraldo	96,8
	<i>T. brucei</i> TREU927	57,4
	<i>T. brucei gambiense</i>	57,9
	<i>T. brucei</i> Lister	57,4
	<i>T. vivax</i>	57,9
	<i>T. congolense</i>	57,6
	<i>Leishmania infantum</i>	55,6
	<i>Leishmania braziliensis</i>	56
	<i>Leishmania major</i>	55
	<i>Leishmania mexicana</i>	56,4

La secuencia consenso de 312 aminoácidos de la proteína nitroreductasa tipo I (Figura 19), tiene una identidad de aproximadamente 96% con las secuencias reportadas para *T. cruzi*, de 54% con *T. brucei*, de 48,3% con *L. major*, de 46% con *L. braziliensis* y de 46,8% con *L. infantum* (Tabla 12), un punto isoeléctrico de 9,32 y un peso molecular de 34,4kDa (www.expasy.org).

Tabla 12. Porcentaje de identidad a nivel de la secuencia de aminoácidos de la proteína NTR de *T. cruzi* 058PUJ y otros tripanosomátidos

Especie/Especie	Porcentaje de identidad (%)	
<i>T. cruzi</i> 058PUJ	<i>T. cruzi</i> Sylvio X10/1	99
	<i>T. cruzi</i> JRcl4	99
	<i>T. cruzi</i> CL Brener non esmeraldo like	96,2
	<i>T. cruzi</i> CL Brener Esmeraldo like	94,3
	<i>T. cruzi</i> Esmeraldo	94,6
	<i>T. brucei</i> TREU927	54,2
	<i>T. brucei gambiense</i>	54,2
	<i>T. brucei</i> Lister	54,2
	<i>T. vivax</i>	52
	<i>T. congolense</i>	52,5

	<i>Leishmania infantum</i>	46,8
	<i>Leishmania braziliensis</i>	46
	<i>Leishmania major</i>	48,3
	<i>Leishmania mexicana</i>	46,3

6.2.1.3 CnB *T. rangeli* Tre

Las secuencias de nucleótidos de los clones TrCnB-1 y TrCnB-5 (Figura 23 y 24) (con una identidad de 99,8% entre ellas) presentaron además identidades de aproximadamente 78% con las secuencias reportadas en diferentes cepas de *T. cruzi*, de 65% para *T. brucei*, 62,3% y de 63% con diferentes especies del género *Leishmania sp* (Tabla 13).

Tabla 13. Porcentaje de identidad a nivel de secuencia de nucleótidos del gen *cnb* de *T. rangeli* Tre y otros tripanosomátidos

	<i>T. rangeli</i> Tre clon 1	<i>T. rangeli</i> Tre clon 5
<i>T. rangeli</i> Tre Clon 5	99,8	-
<i>T. cruzi</i> 058PUJ	80,1	78,5
<i>T. cruzi</i> CL EF375622	78,9	77,4
<i>T. cruzi</i> CL AJ878873	79,9	78,3
<i>T. cruzi</i> G AY570505	78,7	79,9
<i>T. cruzi</i> Sylvio X10/1	78,5	79,7
<i>T. cruzi</i> JRcl4	78,7	78,5
<i>T. cruzi</i> CL Brener non esmeraldo like	79,2	79,7
<i>T. cruzi</i> CL Brener Esmeraldo like	80,1	78,5
<i>T. cruzi</i> Esmeraldo	78,2	78
<i>T. brucei</i> TREU927	64,9	64,7
<i>T. brucei</i> gambiense	66,9	66,7
<i>T. brucei</i> Lister 427	64,5	64,3
<i>T. vivax</i>	62,3	62
<i>T. congolense</i>	63,7	63,5
<i>Leishmania infantum</i>	63,2	63
<i>Leishmania braziliensis</i>	63,5	63,3
<i>Leishmania major</i>	62,6	62,4
<i>Leishmania mexicana</i>	62	61,8

Por otra parte, las secuencias de aminoácidos (Figuras 25 y 26), las cuales tienen una identidad de hasta 75% con el gen de la subunidad B de la calcineurina de varias cepas de *T. cruzi*, de 56% para *T. brucei* y 56% para diferentes especies de *Leishmania* (Tabla 14), un punto isoeléctrico de 4,2 y un peso molecular de 19,89 y 19,81 kDa, respectivamente (www.expasy.org).

Tabla 14. Porcentaje de identidad a nivel de secuencia de aminoácidos de la proteína CnB de *T. rangeli* Tre y otros tripanosomátidos

	<i>T. rangeli</i> Tre clon 1	<i>T. rangeli</i> Tre clon 5
<i>T. rangeli</i> Tre Clon 5	99,4	-
<i>T. cruzi</i> 058PUJ	76,1	75,6
<i>T. cruzi</i> CL ABO14295.1	76,1	75,6
<i>T. cruzi</i> CL CAI48025.1	76,1	75,6
<i>T. cruzi</i> G AAU10598.1	76,1	75,6
<i>T. cruzi</i> Sylvio X10/1	76,7	76,1
<i>T. cruzi</i> JRcl4	76,7	76,1
<i>T. cruzi</i> CL Brener Non Esmeraldo like	76,1	75,6
<i>T. cruzi</i> CL Brener Esmeraldo like	77,3	76,7
<i>T. cruzi</i> Esmeraldo	76,7	76,1
<i>T. brucei</i> TREU927	59,1	58,6
<i>T. brucei</i> gambiense	58,6	58
<i>T. brucei</i> Lister 427	58,6	58
<i>T. vivax</i>	52	51,4
<i>T. congolense</i>	53,6	53,1
<i>Leishmania infantum</i>	56,8	56,2
<i>Leishmania braziliensis</i>	56,8	56,2
<i>Leishmania major</i>	56,2	55,7
<i>Leishmania mexicana</i>	56,2	55,7

6.2.1.2 CnB *T. cruzi* 058PUJ

La secuencia consenso de nucleótidos de 528 pb (Figura 30), presenta identidades de aproximadamente 98% con las secuencias reportadas en diferentes cepas de *T. cruzi*, de 64% para *T. brucei*, y de 63% con diferentes especies del género *Leishmania sp* (tabla 15).

Tabla 15. Porcentaje de identidad a nivel de la secuencia de nucleótidos de la proteína *CNB* de *T. cruzi* 058PUJ y otros tripanosomátidos

	Especie/Especie	Porcentaje de identidad (%)
<i>T. cruzi</i> 058PUJ	<i>T. cruzi</i> CL EF375622	97,7
	<i>T. cruzi</i> CL AJ878873	98,5
	<i>T. cruzi</i> G AY570505	100
	<i>T. cruzi</i> Sylvio X10/1	99.4
	<i>T. cruzi</i> JRcl4	99.2
	<i>T. cruzi</i> CL Brener non esmeraldo like	98.5
	<i>T. cruzi</i> CL Brener Esmeraldo like	98.3
	<i>T. cruzi</i> Esmeraldo	97.9
	<i>T. brucei</i> TREU927	64.5
	<i>T. brucei gambiense</i>	64.2
	<i>T. brucei</i> Lister 427	64.2
	<i>T. vivax</i>	60.4
	<i>T. congolense</i>	59.6
	<i>Leishmania infantum</i>	63.3
	<i>Leishmania braziliensis</i>	62.9
	<i>Leishmania major</i>	63.9
	<i>Leishmania mexicana</i>	62.7

Por otra parte, se encontró que dicha secuencia genera una proteína de 176 aminoácidos (Figura 31), la cual tiene una identidad de 99-100% con la subunidad B de la calcineurina de varias cepas de *T. cruzi*, de 58% para *T. brucei* y 57% para diferentes especies de *Leishmania* (tabla 16), un punto isoeléctrico de 4,98 y un peso molecular de 19,45 kDa (www.expasy.org).

Tabla 16. Porcentaje de identidad a nivel de la secuencia de aminoácidos de la proteína CnB de *T. cruzi* 058PUJ y otros tripanosomátidos

Especie/Especie	Porcentaje de identidad (%)
<i>T. cruzi</i> CL EF375622	100
<i>T. cruzi</i> CL AJ878873	100
<i>T. cruzi</i> G AY570505	100
<i>T. cruzi</i> Sylvio X10/1	98.9
<i>T. cruzi</i> JRcl4	98.9
<i>T. cruzi</i> CL Brener non esmeraldo like	100
<i>T. cruzi</i> CL Brener Esmeraldo like	98.9
<i>T. cruzi</i> Esmeraldo	97.7
<i>T. brucei</i> TREU927	58.1
<i>T. brucei</i> gambiense	57.5
<i>T. brucei</i> Lister 427	57.5
<i>T. vivax</i>	55.9
<i>T. congolense</i>	53.1
<i>Leishmania infantum</i>	57.4
<i>Leishmania braziliensis</i>	57.4
<i>Leishmania major</i>	57.4
<i>Leishmania mexicana</i>	52.4

6.2.2 Búsqueda de motivos y dominios conservados

6.2.2.1 NTR tipo I de *T. rangeli*

A partir de las secuencias obtenidas para la NTR tipo de *T. rangeli* Tre y Choachí, junto con las reportadas para los dos alelos de la cepa CL Brener de *T. cruzi* y *T. cruzi* 058PUJ, se realizó un alineamiento y se señalaron los hallazgos más importantes a nivel de dominios asociados a función (Figura 34). Adicionalmente, en dicha figura se muestran las mutaciones puntuales o SNPs (del inglés Single Nucleotide polymorphisms) existentes entre *T. rangeli* Tre y *T. rangeli* Choachí, a saber: C19R, G33R y A125S.

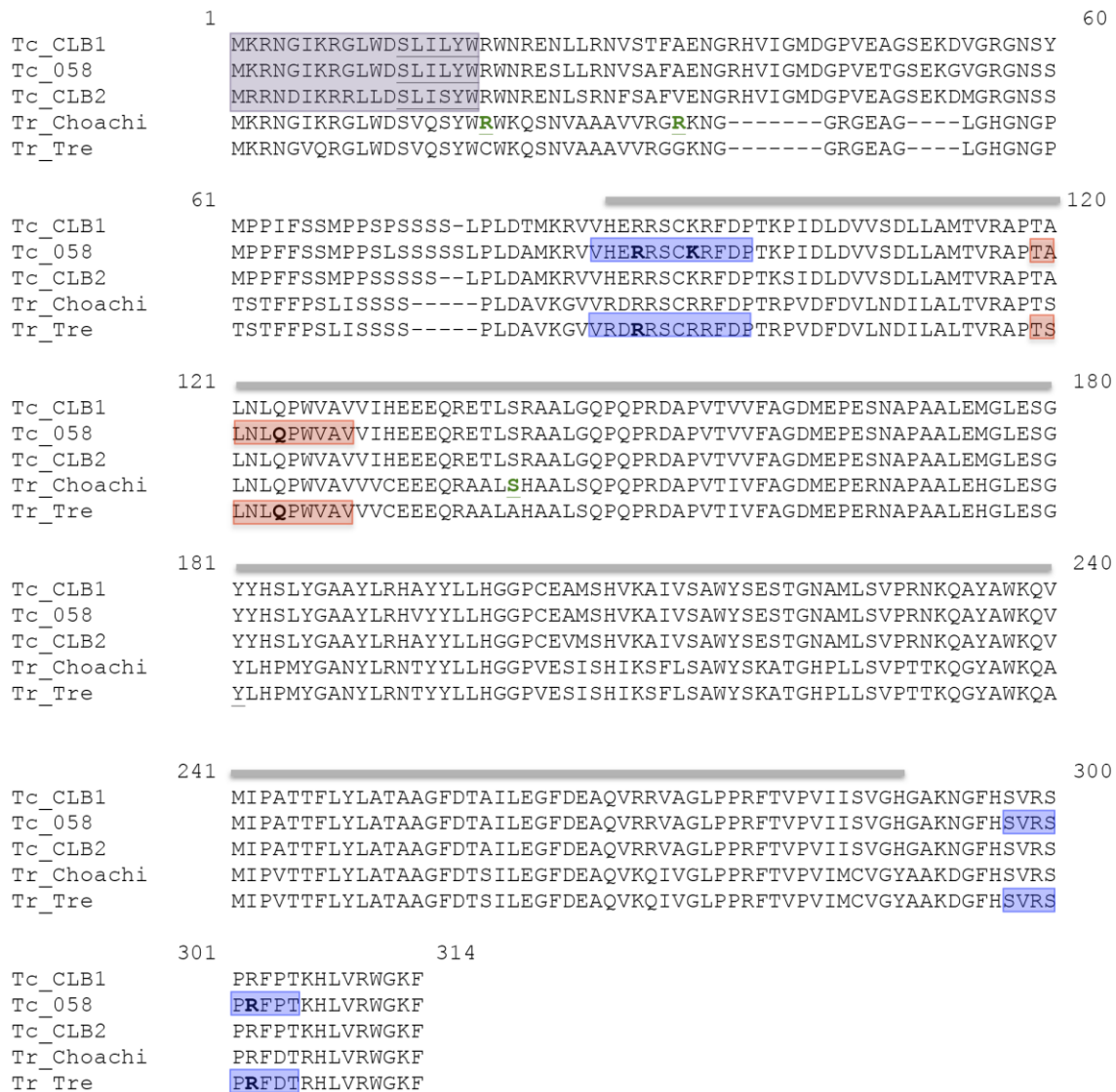


Figura 34. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de la NTR tipo I de *T. cruzi* y *T. rangeli*. El dominio de la familia nitroreductasa predicho por pfam se señala con una línea gris. Para ambas especies, los motivos de unión a FMN y la región de unión de sustrato se resaltan en azul y rojo, respectivamente. Los residuos críticos que participan en estas interacciones se muestran en negrita. Adicionalmente, la secuencia mitocondrial predicha por MitoProt para *T. cruzi* se resalta en color púrpura, y los aminoácidos de mayor importancia en el patrón mitocondrial según iPSORT están subrayados. Los SNPs presentes entre *T. rangeli* Tre y Choachí se muestran en negrita, subrayadas y letras verdes. Las secuencias utilizadas en el alineamiento fueron: Tr Tre (GenBank: KC797657), Tr Choachí (GenBank: KC797656), Tc CLB1 (GeneDB: TcCLB.506791.70), Tc CLB2 (GeneDB: TcCLB.510611.60) y Tc 058PUJ (GenBank: AEM23728.1).

La figura 34 muestra la señal de localización mitocondrial (aa 1 al 18) predicha para la NTR tipo I de *T. cruzi*, que no fue observada en *T. rangeli*. Adicionalmente y mediante el servidor Pfam, se encontró que estas proteínas poseen un dominio de la familia nitroreductasa (PF00881) localizado entre los aminoácidos 71 y 273 en *T. rangeli*. Por último, en la proteína se señalan dos dominios de unión a Flavin mononucleótido comprendidos entre los aminoácidos V71-P82 y S281-T289 y un dominio de unión a sustrato localizado entre T102 y V112, reportados previamente para *T. cruzi* (Hall *et al.* 2012), cuyos residuos más importantes son R74, R285 y Q108.

Adicionalmente, teniendo en cuenta que la secuencia de *T. rangeli* Tre no presentó una señal de localización mitocondrial, se realizó un nuevo alineamiento incluyendo secuencias de NTR tipo I de otros tripanosomátidos, el protozoo a-mitocondrial *Giardia lamblia* y algunas bacterias (Figura 35).

```

Tr_Tre      MKRNGVQR-----GLWDSVQSYWCWKQS---NVAADVVRG---GKNG-----GRGEAGLGHGNGPTSTFF---PSLISSSS-LDAVKGVVRDRRSCRRFPDTRPVDFVLDNDILA 96
Tc_058     MKRNGIKR-----GLWDSLILYWRWNRESLLRNVSFAFAENGRHVIGMDGPV--ETGSEKGVGRGNSMPPFFSSMPPSLSSSSSL-PLDAMKRVVHERRSCKRFDPKPIDLDVVSDDL 112
T_brucei   MNVSRCRWQ---GVIKSLRSYWKWNAGAALSATNSQNSTSPYETWGSIGSRFFTFLRSSIAATAQEVPREPDRIPTYYSKASRKSLEDAFIRVVERRHSSKRFDSRPVDHTLIARLLE 116
L_major    MLRRSPRLLVAAGARPAASTPRASEAAGTCGNEERHSNTSSGHGGFLATLRHLVAVNRNTAAAAAASSSVSCAETPACVSSSA--ALDAVEAVVRDRWTCRQFDTAKPIDLDTLKRVL 118
L_infantum MLRRSRRLLLAAAGARPAAFTPRAREAAGTCGNEERDSNTSSGHGGFLATLRHLVAVNRNTAAAAAASSSVSCAETPACVSNNA--ALDAVEAVVRARWTCRQFDTAKPIDLDTLKRVL 118
L_braziliensis MFRHSR-----CSNKARNG-TSS--GFLATLRSLVTWGRASATVASSSSPASCGRTAGCISAGV--ALDAVEAAVNRWTCRQFDTAKTIDLDTLRRVLT 90
G_lamblia1 -----MVEGYPVFLTDCTGCNMCVEVCPTAVLKVDPEPKVYAYANRDNCIFCGHCGAICPTESISMFGITPESEENAIKTDPPAVRAVKMARTCRKYH 94
G_lamblia2 -----MSRFPEVDEDLICGNVCVQCPTQCEIVNAETRKLTVFRAKETCISCGHCASVCRATAAISMFGLPDTVEEEMADKPVVRSIKMARQHRFFR 93
B_cereus   -----MTNSVKTNDNFNEILTGRRSIRKYDPSVKISKEEMTEILT 39
E_coli     -----MDIISVALKRHSKAFDASKKLTPEQAEQIKT 32

```

Figura 35. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos al N-terminal de la NTR tipo I de tripanosomátidos, *G. Lamblia*, *E. coli* y *B. cereus*. La extensión del N terminal está señalada con una línea negra. La secuencia mitocondrial predicha por MitoProt para *T. cruzi* se resalta en color gris, y los aminoácidos de mayor importancia en el patrón mitocondrial según iPSORT están subrayados. Las secuencias utilizadas fueron: Tr Tre (GenBank: KC797657), Tc 058PUJ (GenBank: AEM23728.1), *T. brucei* TREU927 (TriTrypDB: Tb927.7.7230), *L. major* (GenBank: XP_001687543.1), *Leishmania infantum* (GenBank: XP_001463029.1), *Leishmania braziliensis*: (GenBank: XP_001561879.1), *Giardia lamblia1* (GenBank: XP_001707931.1) *Giardia lamblia2* (GenBank: XP_001705312.1), *Bacillus cereus* (GenBank: AAP09971) and *Escherichia coli* (GenBank: NP_415110.1).

Este alineamiento permitió observar la presencia de una extensión N-terminal que incluye la señal de localización mitocondrial en tripanosomátidos, ausente en

Figura 36. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos CnB de *T. cruzi* y *T. rangeli*.

En gris se señalan los dominios de unión a calcio predichos con SMART. Los motivos de unión a calcio están señalados en rosado para *T. rangeli* y en azul para *T. cruzi*. El # muestra la mutación Y105S entre los clones TrCnB-1 y TrCnB-5. Las secuencias utilizadas fueron: Tr Tre1 (TrCnB-1) (GenBank: JQ691947.1), Tr Tre2 (TrCnB-5) (GenbankTr: JQ691948.1), Tr Choachí (GenBank: AGE15431), Tr SC-58 (Comunicación personal, Grisard E), Tc CLB1 (GeneDB: XP_808544.1), Tc CLB2 (GeneDB: XP_812709) y Tc 058PUJ (GenBank: JN638994.1).

El análisis de esta proteína mostró que posee cuatro dominios de unión a calcio tipo EF.-hand (SMART: SM00054). Al interior de estos dominios se señalaron a su vez, los motivos de unión a calcio, sin embargo solamente los dominios D69 a E80, D106 a D117 y D147 a E158 cumplen con el patrón característico del motivo $[(D-x-[DNS]-\{ILVIFYW\}-[DENSTG]-[DNQGHRK]-\{GP\}-[LIVMC]-[DENQSTAGC]-x(2)-[DE]:false)]$ en el que los residuos encargados de la coordinación de la interacción con el calcio se mantienen. Por otro lado, en *T. cruzi* 058PUJ no hay presencia del motivo de unión a calcio número uno (D37 a D47), lo que concuerda con reportes previos para esta proteína en *T. cruzi* y *L. major* (Moreno *et al.* 2007; Araya *et al.* 2008).

6.2.3 Relaciones filogenéticas

Con base en las secuencias de nucleótidos de los genes *ntr* y *cnb* en tripanosomátidos, se realizó la construcción de árboles filogenéticos.

6.2.3.1 *ntr*

La figura 37 muestra el árbol construido mediante el método de máxima verosimilitud a partir de 1000 réplicas y que describe las relaciones filogenéticas entre tripanosomátidos para el gen *ntr*.

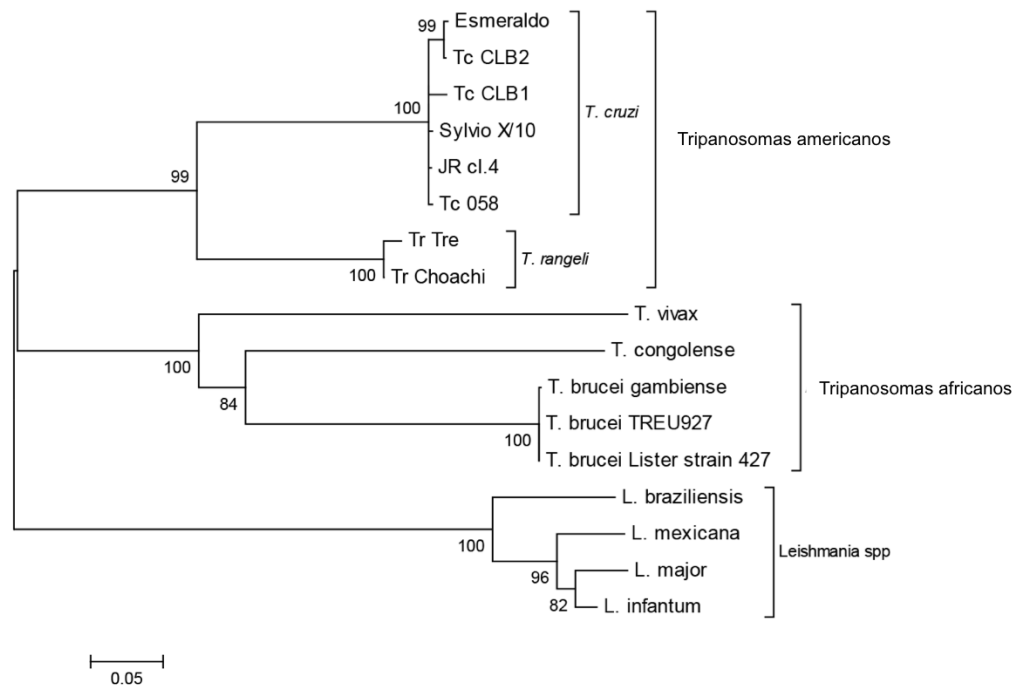


Figura 37. Análisis filogenético de las secuencias de nucleótidos del gen *ntr* en tripanosomátidos mediante el método de máxima verosimilitud. Se muestran los valores de bootstrap que soportan cada rama en un análisis de 1000 réplicas. Las secuencias analizadas fueron: *Trypanosoma cruzi*: Tc 058 (GenBank: JF410861), SylvioX10/1 (GeneDB: contig 426), JR cl.4 (GeneDB: contig 44), Tc CLB1 (GeneDB: TcCLB.506791.70), Tc CLB2 (GeneDB: TcCLB.510611.60), y Esmeraldo (GeneDB: scf7180000307541), *Trypanosoma rangeli*: Tr Tre (GenBank: KC797657) y Tr Choachí (GenBank: KC797656), *Leishmania* sp: *L. mexicana* (GeneDB: LmxM.05.0660), *L. braziliensis* (GeneDB: LbrM.05.0650), *L. major* (GeneDB: LmjF.05.0660) y *L. infantum* (GeneDB: LinJ.05.0660), *T. vivax*: (GeneDB: TvY486_0706850), *T. congolense* (GeneDB: TcL3000_0_00440.1), *T. brucei*: TREU927 (GeneDB: Tb927.7.7230), Lister strain 427 (GeneDB: Tb427.07.7230), y *T. b. gambiense* (GeneDB: Tbg972.7.8530).

Todas las ramas de este árbol presentaron altos valores de bootstrap (superiores al 82%) y fueron soportadas por un resultado muy similar cuando se utilizó el método Neighbor Joining (Anexo 10.4.1). Se observaron dos grupos principales: el primero formado por las secuencias del género *Trypanosoma* y que a su vez se divide en africanos (100% bootstrap) y americanos (99% bootstrap), este último incluyendo a *T. cruzi* y *T. rangeli*, y por lo tanto evidenciando su estrecha relación evolutiva. El segundo grupo estuvo conformado exclusivamente por las secuencias del género *Leishmania* (100% bootstrap) y sus subgéneros (Figura 37).

6.2.3.2 *cnb*

La figura 38 muestra el árbol construido mediante el método de máxima verosimilitud a partir de 1000 réplicas y que describe las relaciones filogenéticas entre tripanosomátidos para el gen *cnb*.

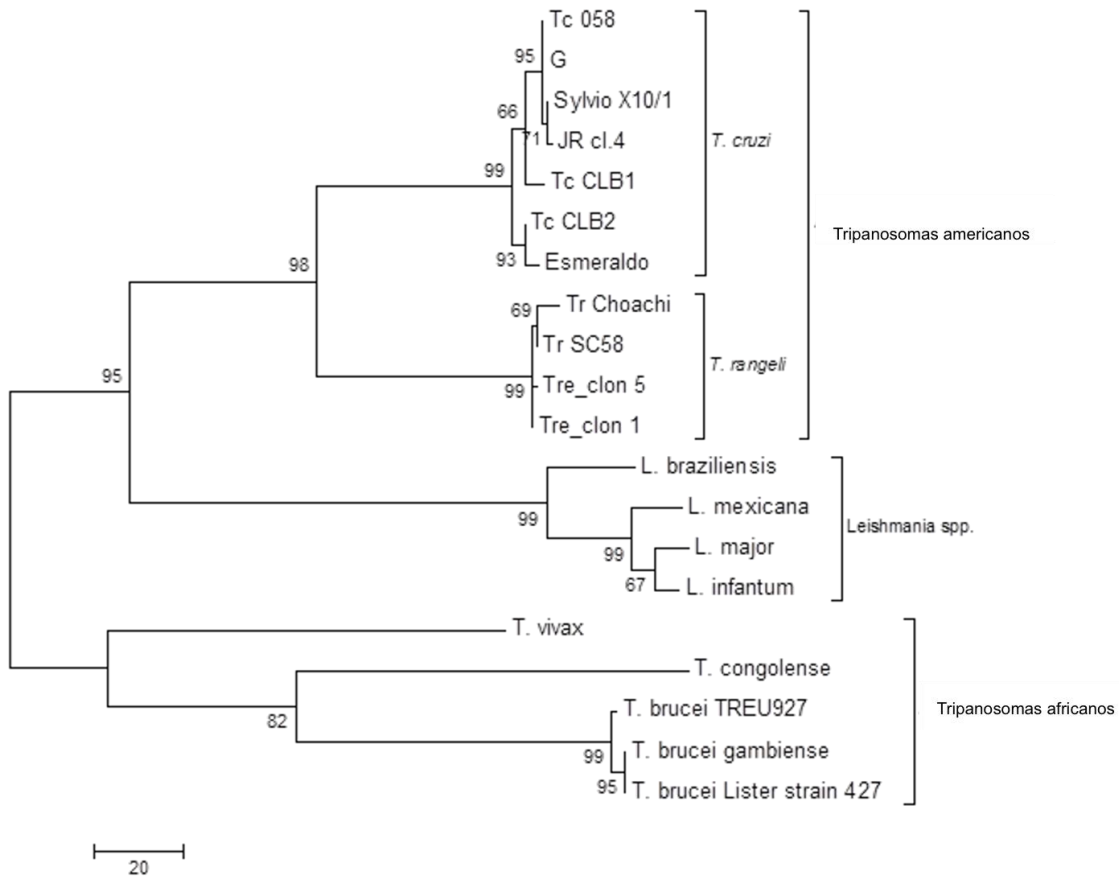


Figura 38. Análisis filogenético de las secuencias de nucleótidos del gen *cnb* en tripanosomátidos mediante el método de máxima verosimilitud. Se muestran los valores de bootstrap que soportan cada rama en un análisis de 1000 réplicas. Las secuencias analizadas fueron: *Trypanosoma cruzi*: Tc058 (GenBank: JN638994), G (GenBank: AY570505), SylvioX10/1 (contig 1013 de GeneDB), JR cl.4 (contig 9 de GeneDB), TcCLB1 (GeneDB: TcCLB.510519.60), TcCLB2 (GeneDB: TcCLB.506869.50), y Esmeraldo (GeneDB: scf7180000308132). *Trypanosoma rangeli*: Tre_clon1 (TrCnB-1) (GenBank: JQ691947), Tre_clon5 (TrCnB-5) (GenBank: JQ691948), y Tr SC-58 (contig 04001, comunicación personal Grisard E.). *Leishmania* sp: *L. mexicana* (GeneDB: LmxM21.1630), *L. braziliensis* (GeneDB: LbrM21_V2.1920), *L. major* (GeneDB: LmjF21.1630) y *L. infantum* (LinJ21_V3.1990 from

GeneDB)], *T. vivax* (GeneDB: TvY486_1000310), *T. congolense* (GeneDB: TcIL3000.10.230), *T. brucei*: TREU927 (GeneDB: Tb927.10.370), y cepa Lister 427 (GeneDB: Tb427.10.370) y *T. b. gambiense* (GeneDB: Tbg972.10.300 from).

Todas las ramas de este árbol presentaron altos valores de bootstrap con excepción de algunas internas que fueron soportadas por un resultado similar cuando se utilizó el método Neighbor Joining (Anexo 10.4.2). Los resultados sugirieron la existencia de dos grupos: uno formado por *T. cruzi*, *T. rangeli* y el género *Leishmania sp* y un segundo formado por tripanosomas africanos.

6.2.4 Modelos tridimensionales

6.2.4.1 NTR Tipo I de *T. rangeli* Tre

El modelo (PMDB ID: PM0079460) fue construido a partir de los residuos 65 a 298 puesto que la región al N- terminal no presentaba una estructura secundaria definida. El molde utilizado correspondió a la NADH deshidrogenasa de *T. thermophilus* (Figura 39) y permitió observar que esta proteína presenta una estructura tridimensional similar a la de otras enzimas de la familia nitroreductasa. La estructura secundaria de la proteína se conserva igualmente entre miembros de dicha familia y se localizaron los dominios de unión a FMN y a sustrato con los residuos señalados como de gran importancia en la figura 33. En conjunto, el modelo sugiere que la nitroreductasa tipo I de *T. rangeli* podría conservar la función enzimática característica de esta familia protéica.

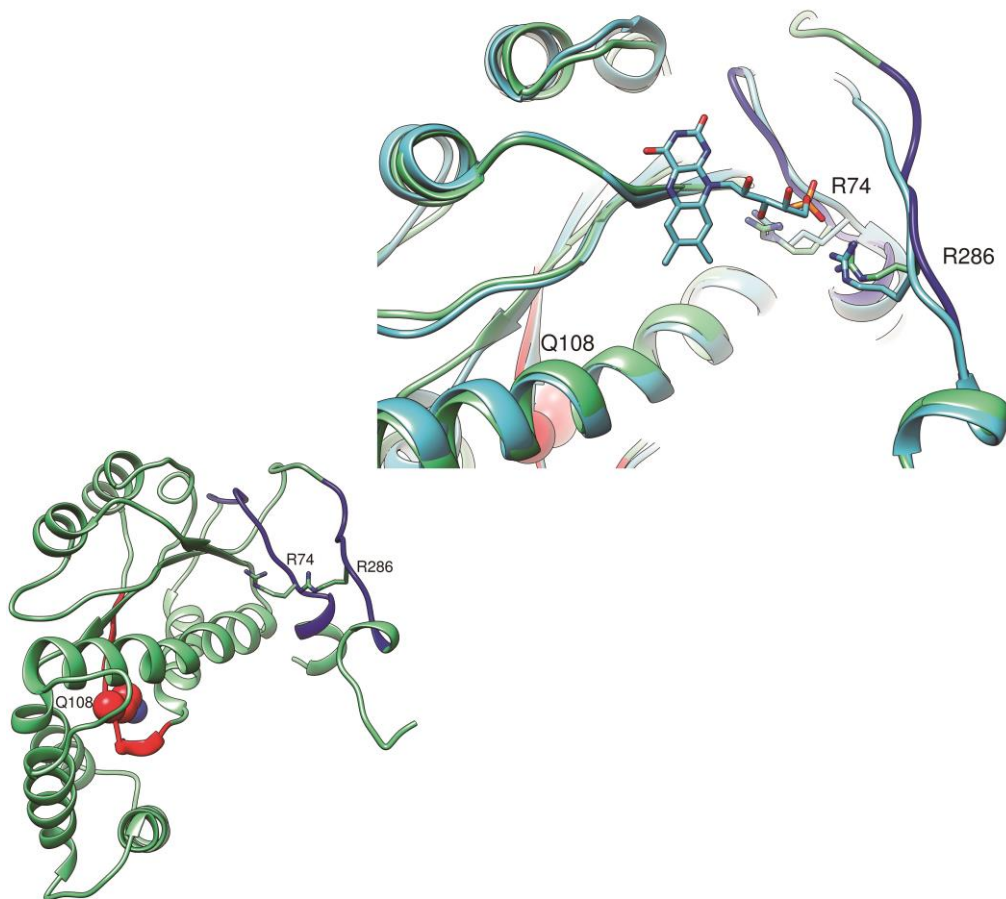


Figura 39. Modelo tridimensional de la NTR tipo I de *T. rangeli* Tre (PMDB ID: PM0079460). En el panel de la izquierda se muestra el modelo para los residuos 63 a 298 de la proteína. En azul se observan los dominios de unión a FMN con énfasis en los residuos claves para dicha función (R74 y R286) y en rojo el dominio de unión a sustrato con Q108 como residuo de alta importancia. En el panel de la derecha se observa una ampliación del modelo y la superposición con la NADH deshidrogenasa de *T. thermophilus* (PDB ID: 1NOX).

6.2.4.2 CnB de *T. rangeli* Tre

El modelo (PMDB ID: PM0078711), fue construido con los 176 residuos de la proteína utilizando la calcineurina bovina como molde (PDB ID: 1TCO) (Figura 40). El modelo demostró las predicciones realizadas con base en la presencia de los cuatro dominios

de tipo EF-hand, cada uno con un motivo de unión a calcio conformado por 12 residuos que forman un loop flanqueado por regiones de alfa-hélice. Como se había mencionado anteriormente, solamente tres dominios conservan los residuos involucrados en la coordinación de la interacción con moléculas de calcio y estos se resaltan en la figura. El modelo sugiere que CnB de *T. rangeli* Tre podría conservar su función de regulación de la actividad serina-treonina fosfatasa de la calcineurina.

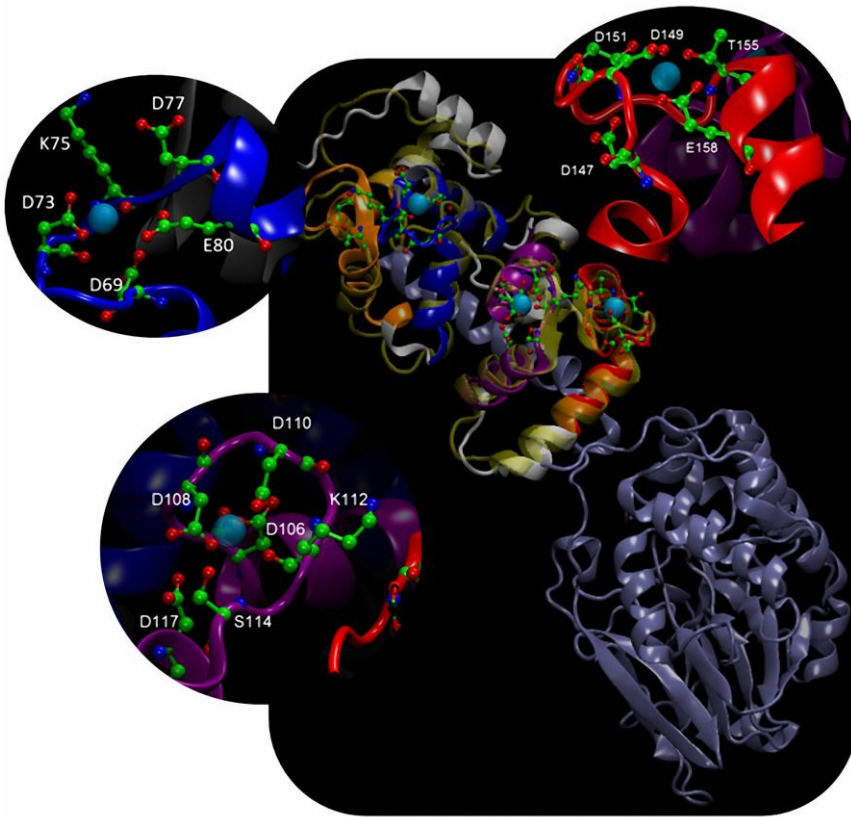


Figura 40. Modelo tridimensional de CnB de *T. rangeli* Tre. El modelo CnB en blanco se superpone con la calcineurina bovina (PDB ID: 1TCO, subunidad catalítica en cian y subunidad B en amarillo transparente). Los dominios EF-Hand y los residuos pertenecientes al motivo de unión a calcio se resaltan en colores: D69 a E80 (azul), D106 a D117 (morado) y D147 a E158 (rojo). (Montenegro *et al.* 2013)

6.3 Los genes *ntr* y *cnb* de *T. rangeli* se expresan a nivel de ARNm

La estrategia de amplificación de los *transcritos ntr* y *cnb* por RT-PCR permitió confirmar la expresión de los mismos en epimastigotes de *T. rangeli* Tre, adicionalmente, el uso el iniciador SLTc/Tr resultó en la obtención de la secuencia de la región 5'UTR de cada transcrito. Se presentan los resultados obtenidos y el modelo

de transcrito generado tanto para *T. rangeli* Tre como para *T. cruzi* 058PUJ a partir de la secuenciación de los productos.

6.3.1 *ntr* *T. rangeli* Tre

Se obtuvo un producto de 686 pb (Figura 41) que contenía el Spliced leader, la región 5'UTR del transcrito y 434 pb de región codificante del gen al 5'.

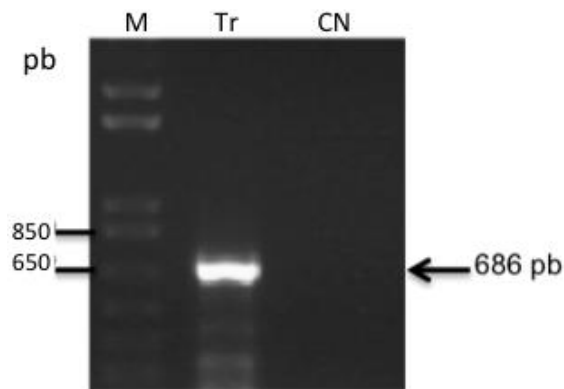


Figura 41. Amplificación de la 5'UTR del gen *ntr* de *T. rangeli* Tre SLTc/Tr-NTRTr/430Rw. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio conteniendo 125µl del producto de amplificación. ADNc de la cepa Tre de *T. rangeli* (Tr); Control negativo de la PCR con agua destilada (CN). Se usó 1Kb plus (Invitrogen) como marcador de peso molecular (M) cuyos pesos se indican a la izquierda.

Posteriormente, el producto fue clonado y secuenciado (Figura 42). Dicha secuencia permitió obtener además la bases faltantes al 5' del gen *ntr* para concluir que la región codificante completa posee 895 pb.

1	AACTAACGCT	ATTATTGATA	CAGTTTCTGT	ACTATATTGG	AGGAAAGAAG	AAGCAGCGGG
61	AACGCGCCGT	GGGCGGTGGT	GCATTTGTGC	CTTGGCAGGG	CTCACCAGAC	GACGAGGACG
121	CCGGGAAGC	GGTGC GCGCA	CGCACGTGCC	CACAGAGCGC	AGGTTTCATT	TGCATCGAGT
181	CGCTGCACCG	TGCGGAGAAA	AGGGAGGAGA	AGCAACGGGG	AATAAGGGAA	GAAGAGGAAG
241	GATAGGGGCA	CGTCGCC				

Figura 42. Secuencia 5'UTR *ntr* de *T. rangeli* Tre. Los números a la izquierda indican la posición de nucleótidos en la secuencia, en negrita se señala la secuencia del SL común a todos los transcritos de *T. cruzi* y *T. rangeli*.

El modelo de la figura 43 ilustra la estructura parcial del transcrito según los resultados presentados:

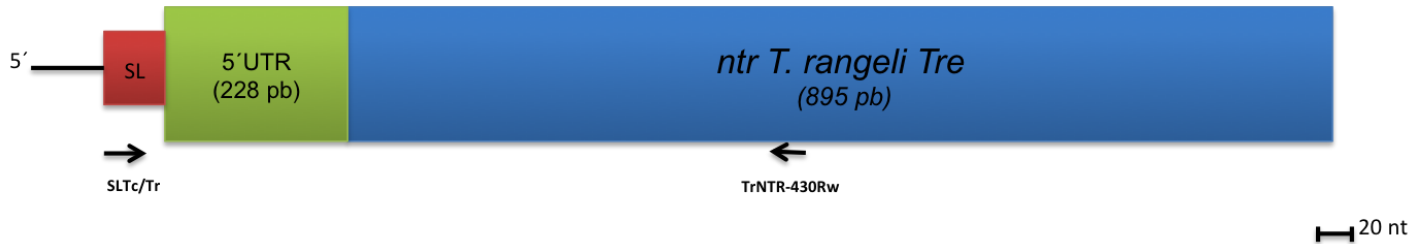


Figura 40. Modelo de transcrito *ntr* de *T. rangeli* Tre. Se señala la secuencia del Spliced leader en rojo (39 pb), la 5'UTR en verde y la región codificante en azul. Se muestra la posición y dirección de los iniciadores utilizados.

6.3.2 *ntr T. cruzi* 058PUJ

Se obtuvo un producto de 1119 pb (Figura 44) que contenía el Spliced leader, la región 5'UTR del transcrito y la región codificante completa del gen.

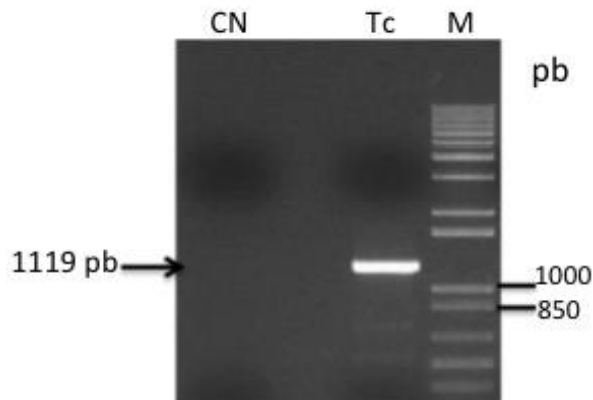


Figura 44. Amplificación de la 5'UTR del gen *ntr* de *T. cruzi* 058PUJ utilizando los iniciadores SLTc/Tr y NTR-RW. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio conteniendo 15µl del producto de amplificación. Control negativo de la PCR (CN); ADNc del aislado 058PUJ de *T. cruzi* (Tc); Se usó 1Kb plus (Invitrogen) como marcador de peso molecular (MW) cuyos pesos se indican a la derecha.

Posteriormente, el producto fue clonado y secuenciado (Figura 45). Dicha secuencia permitió obtener además la bases faltantes al 5' del gen *ntr* para concluir que la región codificante completa posee 945 pb.

1	AACTAACGCT	ATTATTGATA	CAGTTTCTGT	ACTATATTGG	GGTTTAGGTG	GGGAACGATT
61	ACATTTTAGT	TGTTTGTGTG	TGTGTGTGTG	TGTGTGTGTG	TGTGTGGCTG	TATTTTGGT
121	GGTATTGGCG	GGTTGCAACG	GTGCATGTGT	CTTTGATTGG	GATATATCCG	AAGAAAAGAA
181	GGAAGTTGCA	TCAATAGTGA	GAGGAGCACA	AGGGTATTAC	AAACATAAAG	GGGTGTGGTT
241	GATCGTACAG	TGGGACAATA	GCGGCGGTA	GTTAGAAGGG	AGTGGTTTGG	GTAGCCA

Figura 45. Secuencia 5'UTR *ntr* de *T. cruzi* 058PUJ. Los números a la izquierda indican la posición de nucleótidos en la secuencia, en negrita se señala la secuencia del SL común a todos los transcritos de *T. cruzi* y *T. rangeli*

El modelo de la figura 46 ilustra la estructura parcial del transcrito según los resultados presentados:



Figura 46. Modelo de transcrito *ntr* de *T. cruzi* 058PUJ. Se señala la secuencia del Spliced leader en rojo (39 pb), la 5'UTR en verde y la región codificante en azul. Se muestra la posición y dirección de los iniciadores utilizados.

Por último, cabe resaltar que la secuencia 5'UTR de *T. rangeli* Tre presenta una identidad del 49,8% con la UTR obtenida para *T. cruzi* 058PUJ.

6.3.3 *cnb T. rangeli* Tre

Se obtuvo un producto de 682 pb (Figura 47) que contenía el Spliced leader, la región 5'UTR del transcrito y la región codificante completa del transcrito.

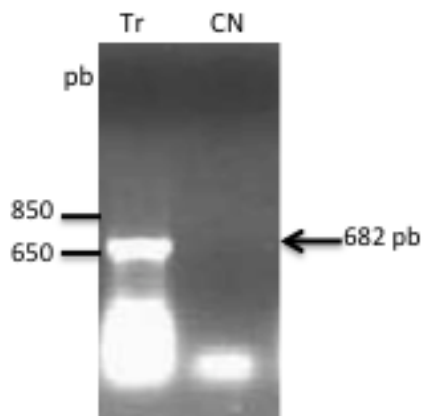


Figura 47. Amplificación de la 5'UTR de *cnb* de *T. rangeli* Tre utilizando los iniciadores SLTc/Tr-CaNB-TAG. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio conteniendo 25µl del producto de amplificación. ADNc de la cepa Tre de *T. rangeli* (Tr); Control negativo de la PCR con agua destilada (CN) . Se usó 1Kb plus (Invitrogen) como marcador de peso molecular, cuyos pesos se indican a la izquierda.

El producto fue clonado y secuenciado (Figura 48).

```

1  AACTAACGCT ATTATTGATA CAGTTTCTGT ACTATATTGG CAGTGGTTGC CGTGGCTCGC
61  ACCCGCACGT GTCGCCCAGG AAGGAGGAAA TAGCGAAATA ACAAGAAAAA AAAACGTGAG
121 GGTGAAGGGA CTAGAAGAGG TGGATTGCAC C

```

Figura 48. Secuencia 5'UTR *cnb* de *T. rangeli* Tre. Los números a la izquierda indican la posición de nucleótidos en la secuencia, en negrita se señala la secuencia del SL común a todos los transcritos de *T. cruzi* y *T. rangeli*.

El modelo de la figura 49 ilustra la estructura parcial del transcrito según los resultados presentados:



Figura 49. Modelo de transcritor *cnb* de *T. rangeli* Tre. Se señala la secuencia del Spliced leader en rojo (39 pb), la 5'UTR en verde y la región codificante en azul. Se muestra la posición y dirección de los iniciadores utilizados.

6.3.4 *cnb T. cruzi* 058PUJ

Se obtuvo un producto de 707 pb (Figura 50) que contenía el Spliced leader, la región 5'UTR del transcritor y la región codificante completa del mismo.

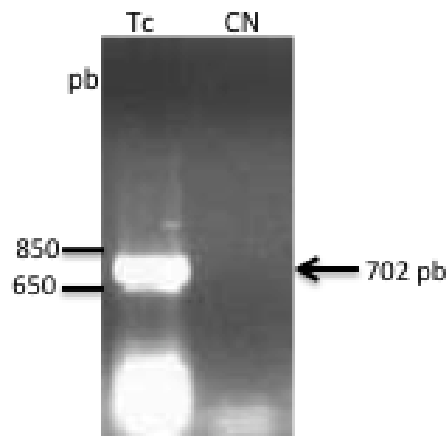


Figura 50. Amplificación de la 5'UTR de *cnb* de *T. cruzi* 058PUJ utilizando los iniciadores SLTc/Tr-CalB-RW. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio conteniendo 25µl del producto de amplificación. ADNc del aislado 058PUJ de *T. cruzi* (Tc); Control negativo de la PCR con agua destilada (CN). Se usó 1Kb plus (Invitrogen) como marcador de peso molecular (MW), cuyos pesos se indican a la izquierda.

El producto fue clonado y secuenciado (Figura 51).

```

1  AACTAACGCT ATTATTGATA CAGTTTCTGT ACTATATTGG GGAGGGGAGT CATAACAGTCG
61 CAAGCAGGAG CCGCAGAAAT AGTTTTTCTT TCCGTTGTGC GGTACCAATA ATAACAATAA
121 GTGCTATCAT TACTGTTAGT AGTTGTTGTG GTAGTTGCTC GTGTTCGCAT C

```

Figura 51. Secuencia 5'UTR del gen *cnb* de *T. cruzi* 058PUJ. Los números a la izquierda indican la posición de nucleótidos en la secuencia, en negrita se señala la secuencia del SL común a todos los transcritos de *T. cruzi* y *T. rangeli*

El modelo de la figura 52 ilustra la estructura parcial del transcrito según los resultados presentados:



Figura 52. Modelo de transcrito *cnb* de *T. cruzi* 058PUJ. Se señala la secuencia del Spliced leader en rojo (39 pb), la 5'UTR en verde y la región codificante en azul. Se muestra la posición y dirección de los iniciadores utilizados.

La secuencia 5'UTR de *T. cruzi* 058PUJ presenta una identidad del 87% la cepa CL de *T. cruzi* (Moreno *et al.* 2007); por otro lado, presenta una identidad del 57% con la UTR obtenida para *T. rangeli* Tre.

6.4 Cuantificación relativa de transcritos *ntr* y *cnb*

6.4.1 Identificación gen *hgprt* en genoma de *T. rangeli* Tre

Teniendo en cuenta que el gen normalizador *hgprt*, seleccionado para la cuantificación de los transcritos, no había sido identificado en el genoma de *T. rangeli* y con base en los iniciadores reportados para *T. cruzi* (Murta *et al.* 2006) se realizó la amplificación

del mismo en la cepa Tre de dicho parásito y en la cepa control *T. cruzi* 058PUJ, los productos de amplificación de ambas especies se muestran en la figura 53.

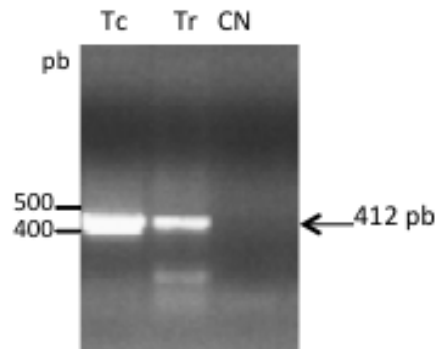


Figura 53. Amplificación del gen *hgprt* de *T. cruzi* 058PUJ y *T. rangeli* Tre utilizando los iniciadores HGPRT-F y HGPRT-R. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio conteniendo 25µl del producto de amplificación. ADN genómico del aislado 058PUJ de *T. cruzi* (Tc); ADN genómico de la cepa Tre de *T. rangeli* (Tr) Control negativo de la PCR con agua destilada (CN). Se usó 1Kb plus (Invitrogen) como marcador de peso molecular (MW), cuyos pesos se indican a la izquierda.

Los productos fueron clonados y enviados a secuenciación, Se obtuvieron las secuencias para el gen *hgprt* de *T. cruzi* 058PUJ y *T. rangeli* Tre (Figuras 54 y 55), que presentan un 77,2% de identidad entre sí.

1	CTACAAGGGA	AAGGGTCTGC	ATCCTTATGT	CAACCCTCTT	GTGCTTATAT	CTGTTCTGAA
61	GGGAAGCTTT	ATGTTTACTG	CTGACTTGTG	CCGTGCACTC	TGTGATTTCA	ACGTGCCGGT
121	GCGAATGGAG	TTCATTTGCG	TCTCATCATA	TGGTGAATGT	CTCACGAGCT	CCGGTCAGGT
181	GCGCATGTTG	CTTGACACGC	GTCACAGCAT	TGAGGGGCAC	CATGTGTTGA	TTGTGGAGGA
241	CATTGTTGAC	ACCGCCCTCA	CGCTGAATTA	CTTGTACCAC	ATGTATTTTA	CACGCAGGCC
301	AGCGAGCTTA	AAAACAGTTG	TGTTGCTTGA	CAAGCGTGAG	GGACGACGCG	TGCCCTTTTC
361	TGCGGACTAC	GTTGTGGCGA	ATATACCCAA	CGCCTTTGTG	ATTGGCTACG	GT

Figura 54. Secuencia de fragmento del gen *hgprt* de *T. cruzi* 058PUJ amplificado con los iniciadores TcHGRT-F/TcHGPRT-R. Los números a la izquierda indican la posición de nucleótidos en la secuencia.

1	CTACAAGGGA	AAGGGTCTGC	GTCCCCTTGA	CAACTCCCTT	GTGCTCATCT	GTGTGCTGAA
61	GGGCAGCTTC	ATGTTTACGG	CCGACCTCTG	CCGCGCATTG	AGCGACTTCA	ACGTGCCGGT
121	GCACGTTGAG	TTTATTTGCG	TCTCATCCTA	CGGCTCCGGT	GTCATCACCT	CTGGTCAGGT
181	GCGGTTGCTG	CTTGACATCC	GCCACAGCAT	TGAGGGCCGC	CATGCGATGA	TTGTGGAGGA
241	CATCGTCGAC	TCCGCCCTCA	CACTTAAGTA	CCTGCAGCGC	GCCTACACCG	AACGCCGACC
301	GGCAAGTCTG	AAGACCGTTG	TGTTGCTCGA	CAAGTGTGAA	GGGCGACAAG	TGAAGTTTGT
361	TCCAGACTAC	GTTGTGGCGA	GTGTGCCCAA	CGCCTTTGTG	ATTGGCTACG	GT

Figura 55. Secuencia de fragmento del gen *hgprt* de *T. rangeli* Tre amplificado con los iniciadores TcHGRT-F/TcHGPRT-R. Los números a la izquierda indican la posición de nucleótidos en la secuencia.

A partir de las secuencias obtenidas se realizó el diseño de los iniciadores descritos en la tabla 7 para los ensayos de qPCR. Una vez evaluadas las condiciones adecuadas para la amplificación de los productos esperados con PCR convencional (Anexo 10.3; Figuras 8-10), estos fueron utilizados para la realización de curvas estándar y posterior cuantificación relativa de los transcritos *ntr* y *cnb*.

6.4.2 Curvas estándar

Para cada parásito y gen, incluyendo el normalizador *hgprt*, se realizaron curvas estándar utilizando como molde ADN plasmídico en concentraciones desde 10^8 hasta 10^2 copias del producto de interés, por triplicado y seleccionando al menos 5 puntos para la construcción de la curva. Se determinó la eficiencia y el error de cada PCR mediante dichos experimentos. Así mismo, cada experimento contó con controles de ambiente (grises) y de reacción por triplicado.

Teniendo en cuenta que se utilizó SYBR GREEN como método de detección, en algunos experimentos se observó la formación de dímeros de iniciadores que amplificaban en ciclos tardíos y con temperaturas de fusión menores a los amplicones esperados.

6.4.2.1 ntr

Se presentan las curvas estándar para el gen *ntr* de *T. rangeli* Tre y *T. cruzi* 058PUJ, incluyendo eficiencia y error estándar de cada una en las figuras 56 y 57.

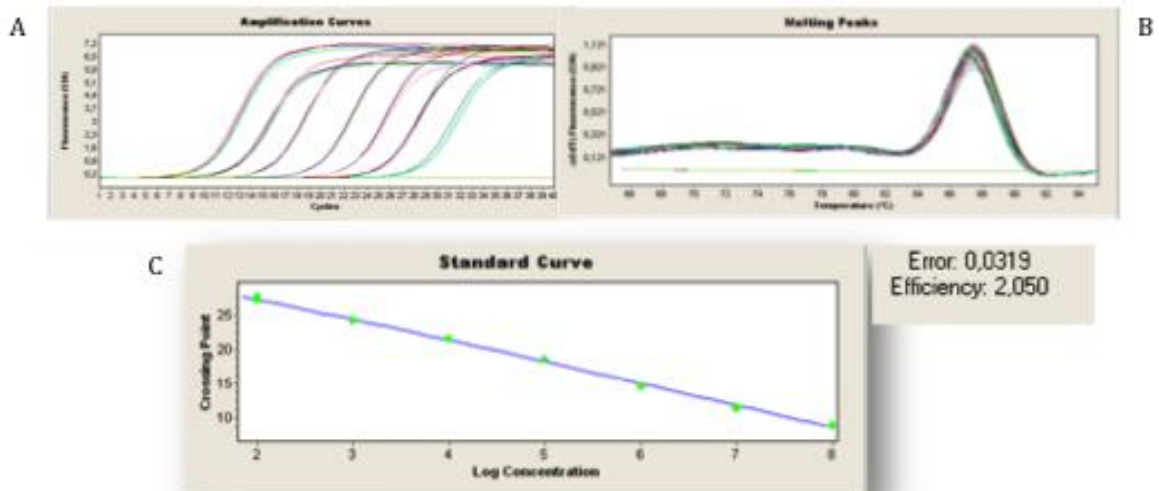


Figura 56. Curva estándar para amplificación del transcrito de *ntr* de *T. rangeli* Tre. Se muestran las curvas de amplificación correspondientes a triplicados de cada concentración de plásmido (A), la curva melting de dichos productos (B) y la curva generada con su error y eficiencia correspondiente (C).

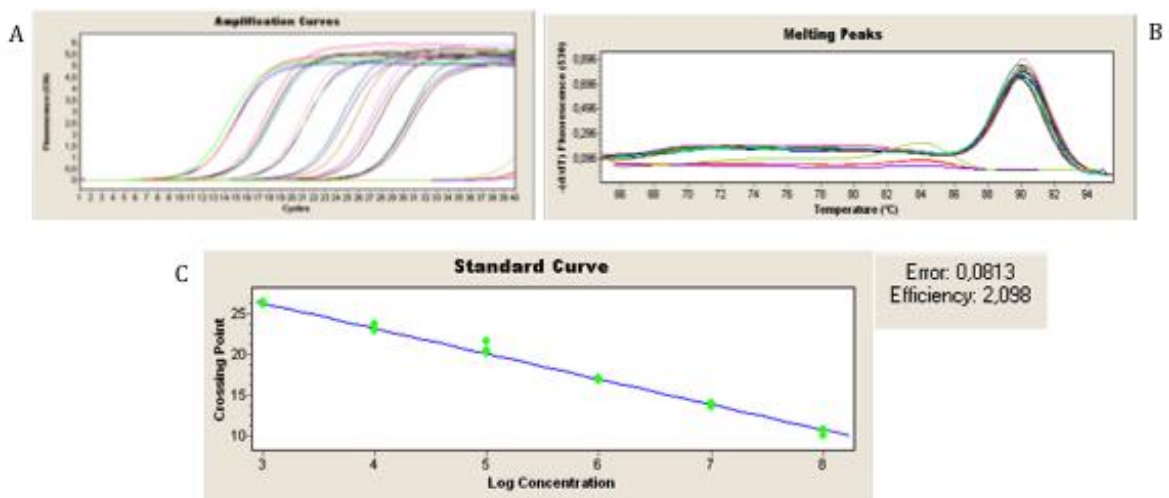


Figura 57. Curva estándar para amplificación del transcrito de *ntr* de *T. cruzi* 058PUJ. Se muestran las curvas amplificación correspondientes a triplicados de cada concentración de plásmido (A), la curva melting de dichos productos (B) y la curva generada con su error y eficiencia correspondiente (C).

6.4.2.2 *cnb*

Se presentan las curvas estándar para el gen *cnb* de *T. rangeli* Tre y *T. cruzi* 058PUJ, incluyendo eficiencia y error estándar de cada una en las figuras 58 y 59.

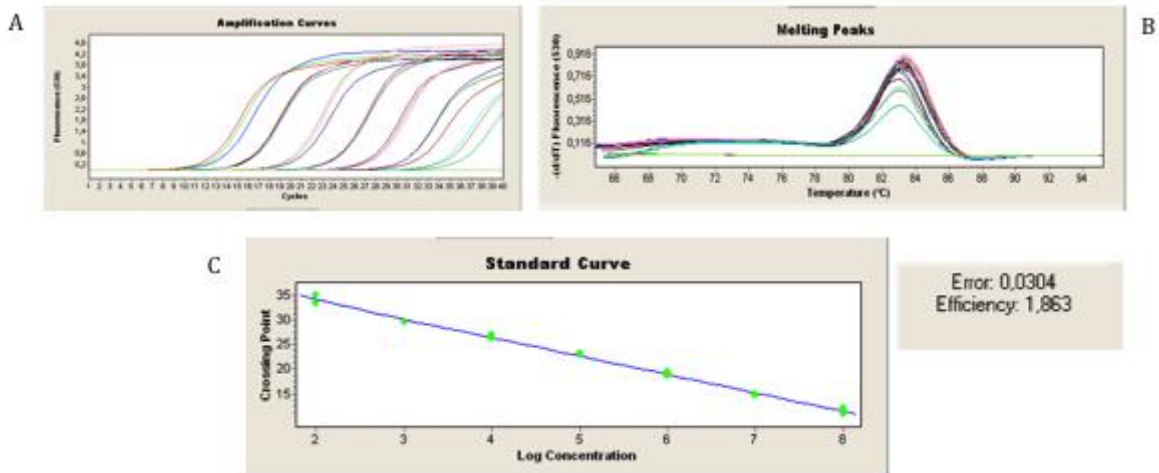


Figura 58. Curva estándar para amplificación del transcrito de *cnb* de *T. rangeli* Tre. Se muestran las curvas de amplificación correspondientes a triplicados de cada concentración de plásmido (A), la curva melting de dichos productos (B) y la curva generada con su error y eficiencia correspondiente (C).

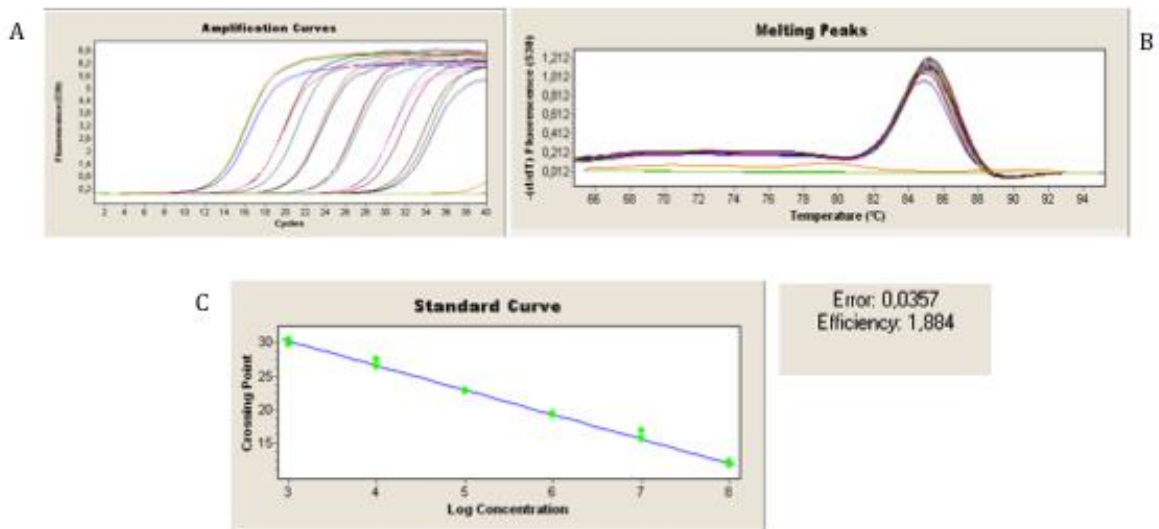


Figura 59. Curva estándar para amplificación del transcrito de *cnb* de *T. cruzi* 058PUJ. Se muestran las curvas amplificación correspondientes a triplicados de cada concentración de plásmido (A), la curva melting de dichos productos (B) y la curva generada con su error y eficiencia correspondiente (C).

6.4.2.3 *hgprt*

Se presentan las curvas estándar para el gen *hgprt* de *T. rangeli* Tre y *T. cruzi* 058PUJ, incluyendo eficiencia y error estándar de cada una en las figuras 60 y 61.

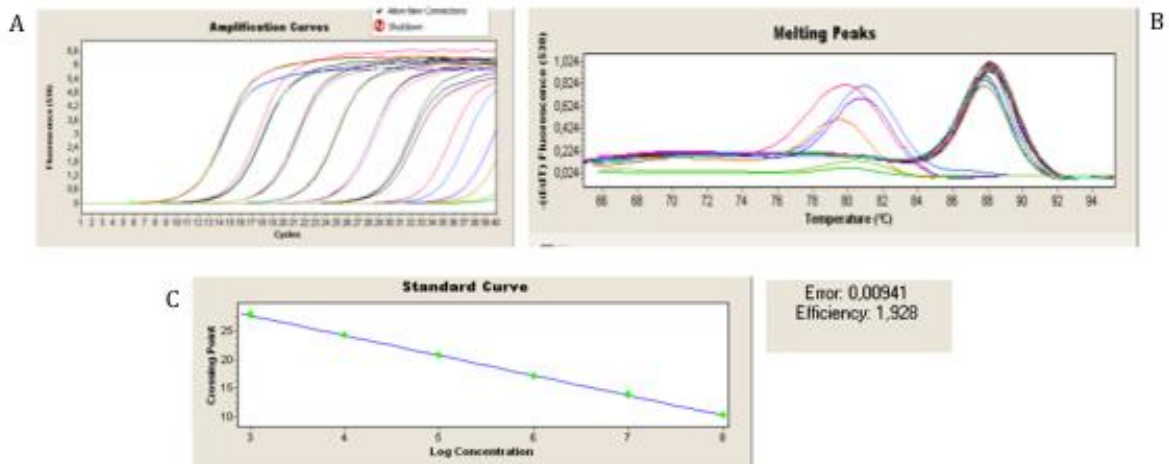


Figura 60. Curva estándar para amplificación del transcrito *hgprt* de *T. rangeli* Tre. Se muestran las curvas de amplificación correspondientes a triplicados de cada concentración de plásmido (A), la curva melting de dichos productos (B) y la curva generada con su error y eficiencia correspondiente (C). Se observan amplificaciones inespecíficas en controles, correspondientes a dímeros de iniciadores.

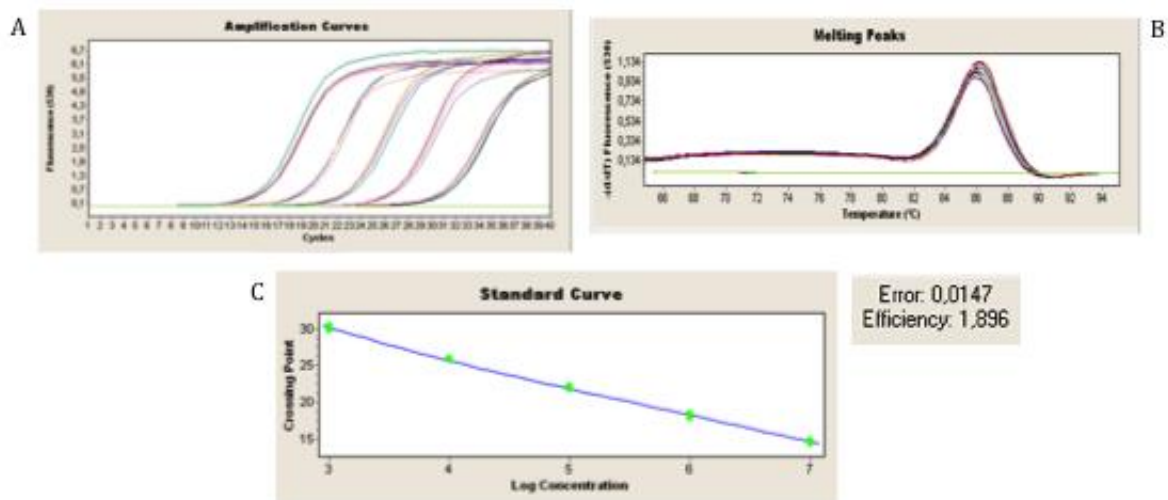


Figura 61. Curva estándar para amplificación del transcrito *hgprt* de *T. cruzi* 058PUJ. Se muestran las curvas amplificación correspondientes a triplicados de cada concentración de plásmido (A), la curva melting de dichos productos (B) y la curva generada con su error y eficiencia correspondiente (C)

La tabla 17 resume la eficiencia de cada una de las curvas realizadas:

Tabla 17. Eficiencias curva estándar para cada gen evaluado

Gen	Eficiencia en <i>T. cruzi</i>	Eficiencia en <i>T. rangeli</i>
<i>cnb</i>	1,884	1,863
<i>cub</i>	1,844	1,870
<i>ntr</i>	2,098	2,050
<i>hgprt</i>	1,896	1,92

6.4.3 Amplificación de los transcritos de cada gen a partir de ADNc de ambos parásitos

La estrategia utilizada consistió en la extracción de ARN total de 50×10^6 epimastigotes en fase exponencial de *T. cruzi* 058PUJ y *T. rangeli* Tre, posteriormente se trató con ADNasa tipo I para eliminar el ADN contaminante de la muestra y 5 μ g de dicho ARN tratado se utilizó para sintetizar ADNc, que a su vez funcionaría como molde en la PCR de los transcritos *ntr* y *cnb* de cada parásito así como el normalizador *hgprt*.

Posterior al tratamiento con ADNasa tipo I, se realizó la síntesis de ADNc. Los controles de esta síntesis incluyeron un control de reacción o CN y un control sin transcriptasa reversa para verificar que no hubiese ADN remanente en la muestra de ARN. Previo al montaje de los experimentos, los controles y el ADNc sintetizado se verificaron en tiempo real utilizando los iniciadores del gen *cnb* que permitían además verificar que cada ADN correspondiera al parásito extraído y que no hubiera contaminación entre especies.

Cada muestra se montó por triplicado en un experimento y se realizaron 3 réplicas biológicas utilizando ARN extraído bajo las mismas condiciones pero de cultivos diferentes. Se realizó además el montaje de 3 controles de ambiente, denominados grises y 3 controles de reacción en cada corrido (Anexo 11.5).

6.4.4 Determinación de número de copias de cada transcrito y comparación entre y *T. rangeli* Tre y *T. cruzi* 058PUJ.

6.4.4.1 Transcrito *ntr*

Con base en las curvas estándar realizadas para el gen *ntr* (figuras 56 y 57), se realizó la cuantificación absoluta del número de copias de cada transcrito en cada muestra procesada, es decir tres muestras en cada réplica biológica (Anexo 11.5). Este dato se presenta junto con la desviación estándar y coeficiente de variación de cada réplica en cada especie de parásito en las tablas 18A y 18B.

Tabla 18A. Número de copias transcrito *ntr* *T. rangeli*

		1 réplica biológica	2 réplica biológica	3 réplica biológica
	1	2,28E+04	2,93E+04	2,29E+04
	2	2,53E+04	2,80E+04	2,29E+04
	3	2,29E+04	3,00E+04	2,36E+04
Promedio de cada réplica		2,37E+04	2,91E+04	23133
Desviación estándar		1415	1015	404,1
Coeficiente de variación		5,98%	3,49%	1,75%

Tabla 18B. Número de copias transcrito *ntr* *T. cruzi*

		1 réplica biológica	2 réplica biológica	3 réplica biológica
	1	5,29E+04	6,32E+04	6,20E+04
	2	5,62E+04	7,48E+04	6,30E+04
	3	6,00E+04	6,53E+04	5,94E+04
Promedio de cada réplica		5,64E+04	6,78E+04	6,15E+04
Desviación estándar		3,55E+03	6,18E+03	1,85E+03
Coeficiente de variación		6,30%	9,12%	3,02%

La figura 62 muestra la distribución del número de copias de cada transcrito en las réplicas biológicas disponibles:

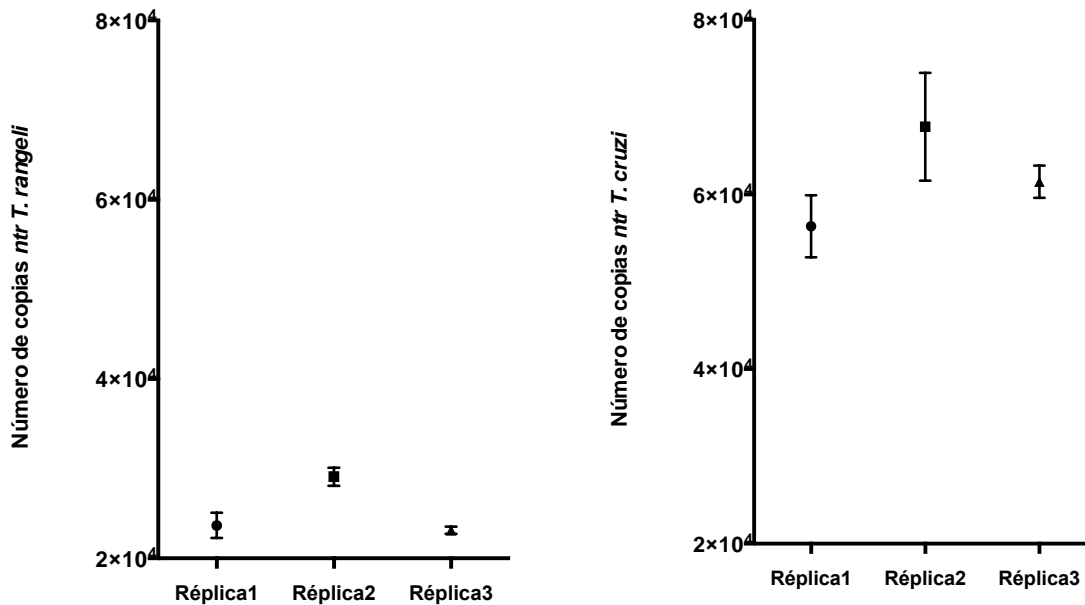


Figura 62. Número de copias del transcrito *ntr* en tres réplicas biológicas. Se grafica promedio y desviación estándar para cada réplica en cada especie de parásito.

Con base en los datos consignados en las tablas 18A y 18B se calculó el promedio de número de copias del transcrito *ntr* para *T. rangeli* (Tabla 19A) y *T. cruzi* (Tabla 19B). Se presenta la desviación estándar y coeficiente de variación entre réplicas biológicas.

Tabla 19A. Número de copias *ntr T. rangeli* réplicas 1 a 3

Promedio réplicas	2,42E+04
Desviación estándar	707,1
Coefficiente de variación entre réplicas	2,92%

Tabla 19B. Número de copias *ntr T. cruzi* réplicas 1 a 3

Promedio réplicas	6,19E+04
Desviación estándar	5,71E+04
Coefficiente de variación entre réplicas	9.23%

La figura 63 muestra el número promedio de copias para cada especie.

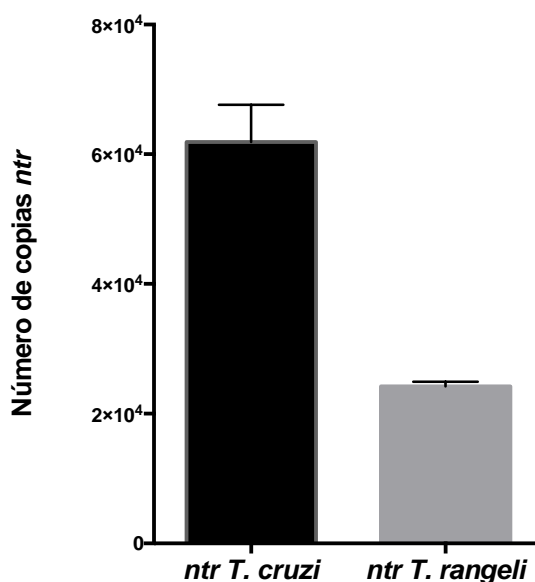


Figura 63. Número de copias promedio del transcrito *ntr* en tres réplicas biológicas. Se grafica promedio y desviación estándar para cada especie de parásito.

6.4.4.2 Transcrito *cnb*

Con base en las curvas estándar realizadas para el gen *cnb* (figuras 58 y 59), se realizó la cuantificación absoluta del número de copias de cada transcrito en cada muestra procesada, es decir tres muestras en cada réplica biológica (Anexo 11.5), este dato se presenta junto con la desviación estándar y coeficiente de variación de cada réplica en cada especie de parásito en las tablas 20A y 20B.

Tabla 20A. Número de copias *cnb T. rangeli*

		1 réplica biológica	2 réplica biológica	3 réplica biológica
	1	3,40E+05	3,64E+05	4,63E+05
	2	3,57E+05	3,30E+05	4,62E+05
	3	3,35E+05	3,11E+05	4,89E+05
Promedio cada réplica		3,44E+05	3,35E+05	4,71E+05
Desviación estándar		11533	26851	16862
Coeficiente de variación		3,35%	8,02%	3,50%

Tabla 20B. Número de copias *cnb* *T. cruzi*

		1 réplica biológica	2 réplica biológica	3 réplica biológica
	1	7,10E+05	7,55E+05	9,79E+05
	2	7,34E+05	7,71E+05	8,65E+05
	3	7,34E+05	7,57E+05	8,72E+05
Promedio cada réplica		7,26E+05	7,61E+05	9,05E+05
Desviación estándar		1,39E+04	8718	63893
Coficiente de variación		1,91%	1,15%	7,06%

La figura 64 muestra la distribución del número de copias de cada transcrito en las tres réplicas biológicas:

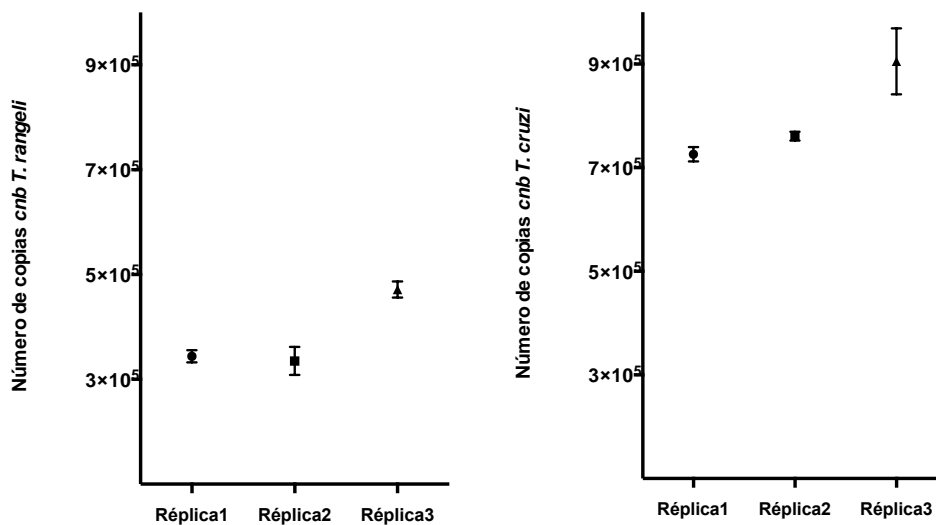


Figura 64. Número de copias del transcrito *cnb* en tres réplicas biológicas. Se grafica promedio y desviación estándar para cada réplica en cada especie de parásito.

Con base en los datos consignados en las tablas 35A y 35B se calculó el promedio de número de copias del transcrito *cnb* para *T. rangeli* (Tabla 21A) y *T. cruzi* (Tabla 21B). Se presenta la desviación estándar y coeficiente de variación entre réplicas biológicas.

Tabla 21A. Número de copias *cnb* *T. rangeli* réplicas 1 a 3

Promedio réplicas	3,83E+05
Desviación estándar	7,61E+04
Coefficiente de variación entre réplicas	19,84%

Tabla 21B. Número de copias *cnb* *T. cruzi* réplicas 1 a 3

Promedio réplicas	7,97E+05
Desviación estándar	9,49E+04
Coefficiente de variación entre réplicas	11,90%

La figura 65 muestra el número promedio de copias para cada especie.

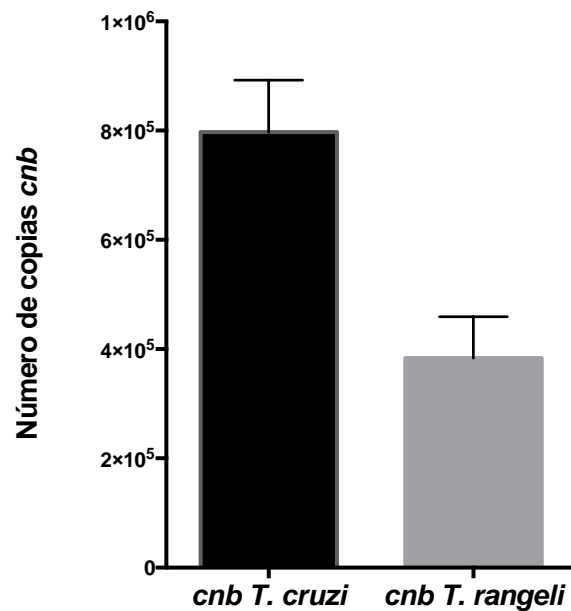


Figura 65. Número de copias promedio del transcrito *cnb* en tres réplicas biológicas. Se grafica promedio y desviación estándar para cada especie de parásito.

6.4.4.3 Transcrito *hgprt*

Con base en las curvas estándar realizadas para el gen *hgprt* (figuras 60 y 61), se realizó la cuantificación absoluta del número de copias de cada transcrito en cada muestra procesada, es decir tres muestras en cada réplica biológica (Anexo 11.5). Este dato se presenta junto con la desviación estándar y coeficiente de variación de cada réplica en cada especie de parásito en las tablas 22A y 22B.

Tabla 22A. Número de copias *hgprt T. rangeli*

		1 réplica biológica	2 réplica biológica	3 réplica biológica
	1	1,06E+05	1,85E+05	1,60E+05
	2	1,09E+05	1,72E+05	1,55E+05
	3	1,04E+05	1,87E+05	1,58E+05
Promedio de cada réplica		1,06E+05	1,81E+05	1,58E+05
Desviación estándar		2517	8145	2517
Coeficiente de variación		2,37%	4,49%	1,60%

Tabla 22B. Número de copias *hgprt T. cruzi*

		1 réplica biológica	2 réplica biológica	3 réplica biológica
	1	1,47E+05	1,45E+05	3,01E+05
	2	1,64E+05	1,42E+05	2,88E+05
	3	1,68E+05	1,69E+05	3,01E+05
Promedio de cada réplica		1,60E+05	1,52E+05	2,97E+05
Desviación estándar		1,12E+04	1,48E+04	7506
Coeficiente de variación		6,98%	9,74%	2,53%

La figura 66 muestra la distribución del número de copias de cada transcrito en las tres réplicas biológicas:

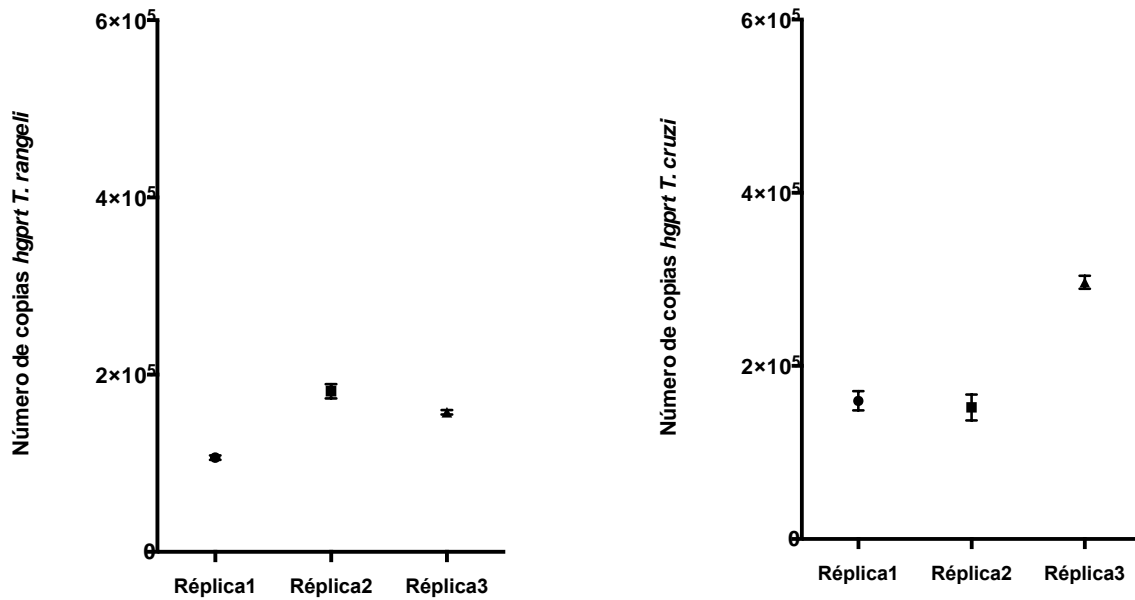


Figura 66. Número de copias del transcrito *hgprt* en tres réplicas biológicas. Se grafica promedio y desviación estándar para cada réplica en cada especie de parásito.

Con base en los datos consignados en las tablas 23A y 23B se calculó el promedio de número de copias del transcrito *hgprt* para *T. rangeli* (Tabla 38A) y *T. cruzi* (Tabla 38B). Se presenta la desviación estándar y coeficiente de variación entre réplicas biológicas.

Tabla 23A. Número de copias *hgprt* *T. rangeli* réplicas 1 a 3

Promedio réplicas	148333
Desviación estándar	38423
Coficiente de variación entre réplicas	25,90%

Tabla 23B. Número de copias *hgprt* *T. cruzi* réplicas 1 a 3

Promedio réplicas	203000
Desviación estándar	8,15E+04
Coficiente de variación entre réplicas	40,15%

La figura 67 muestra el número promedio de copias para cada especie

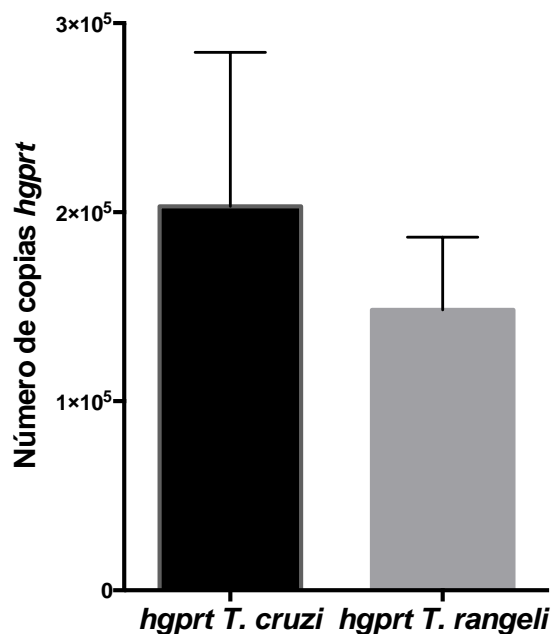


Figura 67. Número de copias promedio del transcrito *hgprt* en tres réplicas biológicas. Se grafica promedio y desviación estándar para cada especie de parásito.

6.4.5 Relación número de copias de cada transcrito vs gen normalizador (*hgprt*)

El número de copias cuantificado en cada réplica, para cada transcrito y en ambas especies, fue normalizado con respecto al número de copias promedio del transcrito *hgprt*. La relación se expresa como un valor relativo de número de copias de cada transcrito con respecto al número de copias del normalizador. Las gráficas muestran el valor de dicha relación en las tres réplicas de cada parásito.

6.4.5.1 Transcrito *ntr*

Tabla 24A. Número de copias del transcrito *ntr* normalizadas con respecto al transcrito *hgprt* en *T. rangeli* Tre

Promedio réplicas/normalizador	0,1704
Desviación estándar	0,02224
Coficiente de variación entre réplicas	13,05%

Tabla 24B. Número de copias del transcrito *ntr* normalizadas con respecto al transcrito *hgprt* en *T. cruzi* 058PUJ

Promedio réplicas/normalizador	0,3051
Desviación estándar	0,02816
Coefficiente de variación entre réplicas	9,23%

La figura 68 muestra que el transcrito *ntr* de *T. cruzi* tiende a expresarse 0.79 veces más que el transcrito del mismo gen en *T. rangeli*. Sin embargo, no hubo diferencia estadísticamente significativa entre el número de copias del transcrito *ntr* de *T. rangeli* y *T. cruzi* normalizados con su respectivo transcrito *hgprt* ($p= 0,1$), este último análisis se realizó mediante un test de Mann-Whitney.

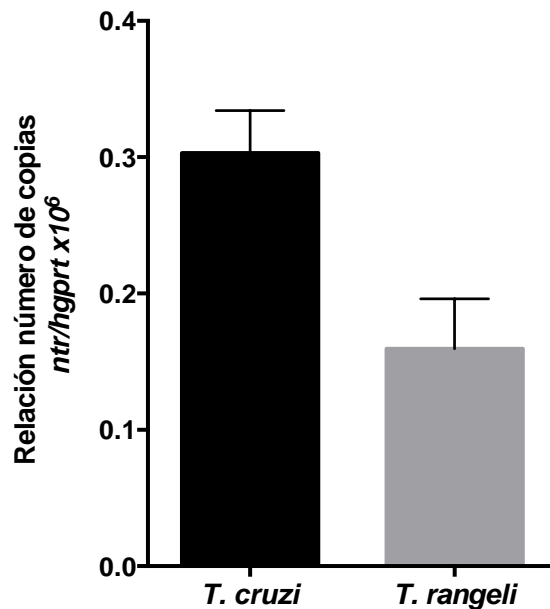


Figura 68. Número de copias del transcrito *ntr* en *T. cruzi* 058PUJ y *T. rangeli* Tre. Los valores fueron normalizados con aquellos obtenidos para el transcrito *hgprt* de cada especie y representan la mediana y rango de triplicados de análisis de RT-qPCR de 3 réplicas biológicas independientes.

6.4.5.2 Transcrito *cnb*

Tabla 25A. Número de copias del transcrito *cnb* normalizadas con respecto al transcrito *hgprt* en *T. rangeli* Tre

Promedio réplicas/normalizador	2,583
Desviación estándar	0,5136
Coefficiente de variación entre réplicas	19,88%

Tabla 25B. Número de copias del transcrito *cnb* normalizadas con respecto al transcrito *hgprt* en *T. cruzi* 058PUJ

Promedio réplicas/normalizador	3,933
Desviación estándar	0,4688
Coefficiente de variación entre réplicas	11,92%

La gráfica 69 muestra que el transcrito *cnb* de *T. cruzi* tiende a expresarse 0.52 veces más que el transcrito del mismo gen en *T. rangeli*. Sin embargo, no hubo diferencia estadísticamente significativa entre el número de copias del transcrito *cnb* de *T. rangeli* y *T. cruzi* normalizados con su respectivo transcrito *hgprt* ($p= 0,1$), este último análisis se realizó mediante un test de Mann-Whitney.

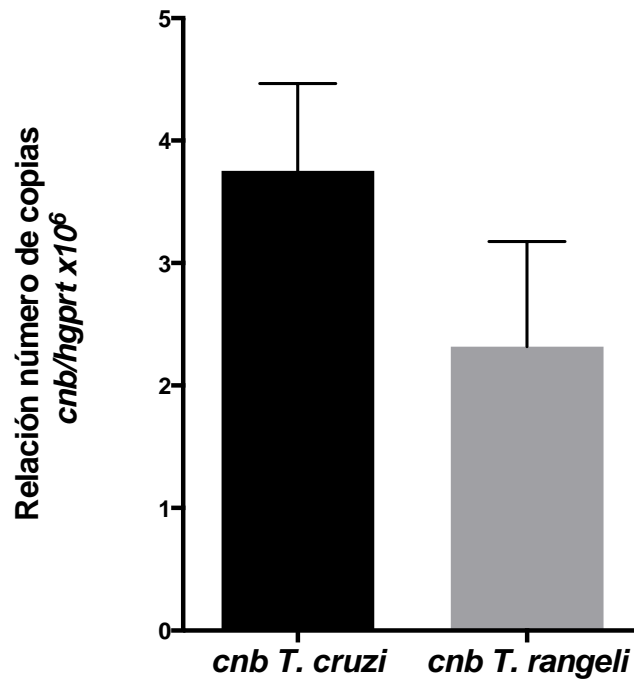


Figura 69. Número de copias del transcrito *cnb* en *T. cruzi* 058PUJ y *T. rangeli* Tre. Los valores fueron normalizados con aquellos obtenidos para el transcrito *hgprt* de cada especie y representan la mediana y rango de triplicados de análisis de RT-qPCR de 3 réplicas biológicas independientes.

6.5 Obtención y chequeo de anticuerpos policlonales anti rTrCnB

A partir del protocolo descrito en materiales y métodos (numeral 5.7.1.1) se obtuvieron fracciones puras de la proteína recombinante rTrCnB (Figura 70).

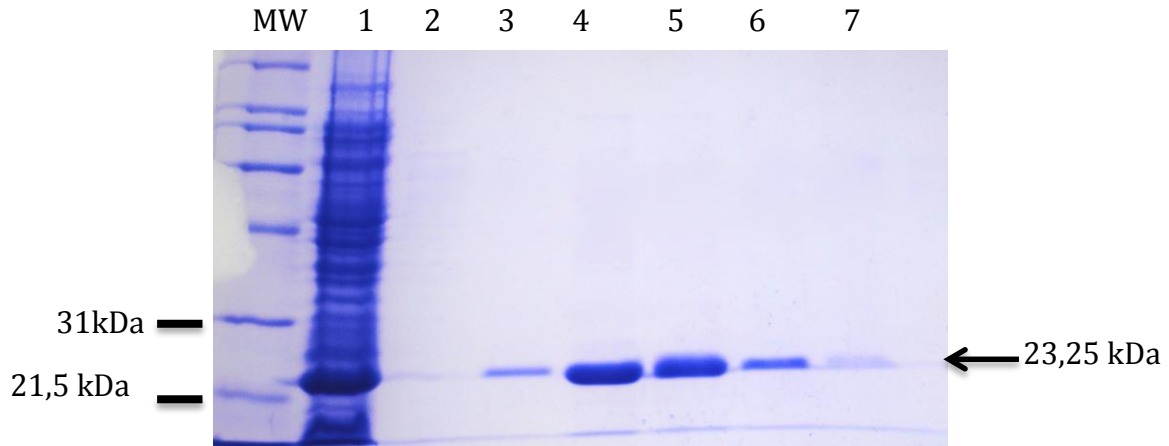


Figura 70. Purificación de rTrCnB por gradiente de Imidazol. Lisado de cultivo inducido (1); Lavado con buffer de sonicación (2); Elución con 400 mM de Imidazol (3); Elución con 500 mM de Imidazol (4); Elución con 500 mM de Imidazol (5); Elución con 500 mM de Imidazol (6); Resina (7).

La inmunización del conejo Nueva Zelanda permitió obtener sueros policlonales cuya reactividad fue evaluada mediante ELISA. El suero policlonal post-inmune presentó reactividad a la proteína recombinante en diluciones hasta 1/500000 (Figura 71). El control realizado con el suero pre-inmune del conejo, mostró que éste no reacciona de manera inespecífica contra la proteína recombinante .

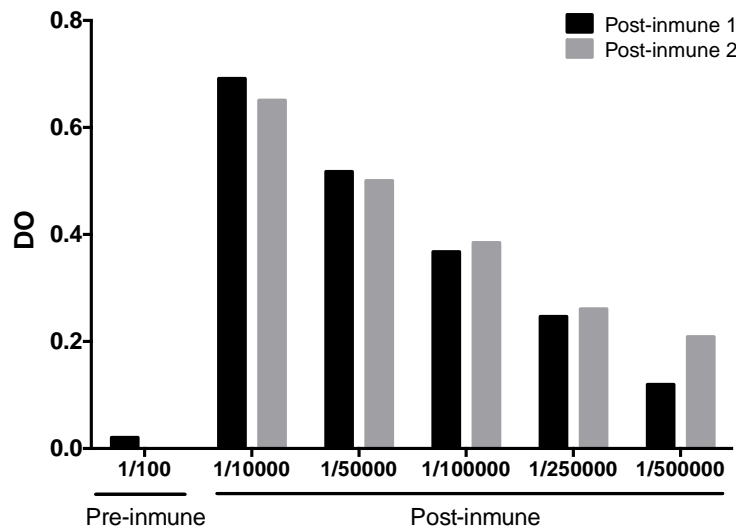


Figura 71. ELISA indirecto suero policlonal obtenido de sangría post inmune I y II de conejos inmunizados con rTrCnB.

6.6 Las proteínas NTR tipo I y CnB se expresan en epimastigotes de *T. rangeli* Tre

La expresión de las proteínas en estudio fue determinada mediante citometría de flujo. Los resultados obtenidos confirmaron la expresión de la NTR tipo I y CnB en *T. rangeli* Tre.

6.6.1 NTR tipo I

Los ensayos fueron realizados utilizando los anticuerpos policlonales producidos contra las proteínas recombinantes de la NTR de *T. cruzi* y *T. rangeli* (Castro *et al*, manuscrito en preparación) (Anexo 11.6).

Se realizaron tres réplicas biológicas del experimento. La tabla 26 muestra los valores promedio de frecuencia de células positivas para *T. rangeli* Tre y *T. cruzi* 058PUJ en 10000 eventos. Adicionalmente, se muestran las frecuencias para los controles de parásitos sin marcar y parásitos permeabilizados y marcados únicamente con anticuerpo secundario.

Tabla 26. Frecuencia promedio de células que expresan NTR en tres réplicas biológicas

Muestra	Frecuencia de células positivas (%)
Control: <i>T. cruzi</i> marcar	0,133
Control: <i>T. cruzi</i> Ac 2 ^a	0,117
<i>T. cruzi</i> NTR tipo I	86,1
Control: <i>T. rangeli</i> sin marcar	0,306
Control: <i>T. rangeli</i> Ac 2 ^a	0,126
<i>T. rangeli</i> NTR tipo I	76,20

La figura 72 corresponde a una de las tres réplicas biológicas como representativo de la selección de la población positiva para la expresión de la NTR tipo I. Se muestra la población de parásitos sin marcar, parásitos permeabilizados y marcados únicamente con anticuerpo secundario y finalmente la población que expresa la proteína NTR tipo I.

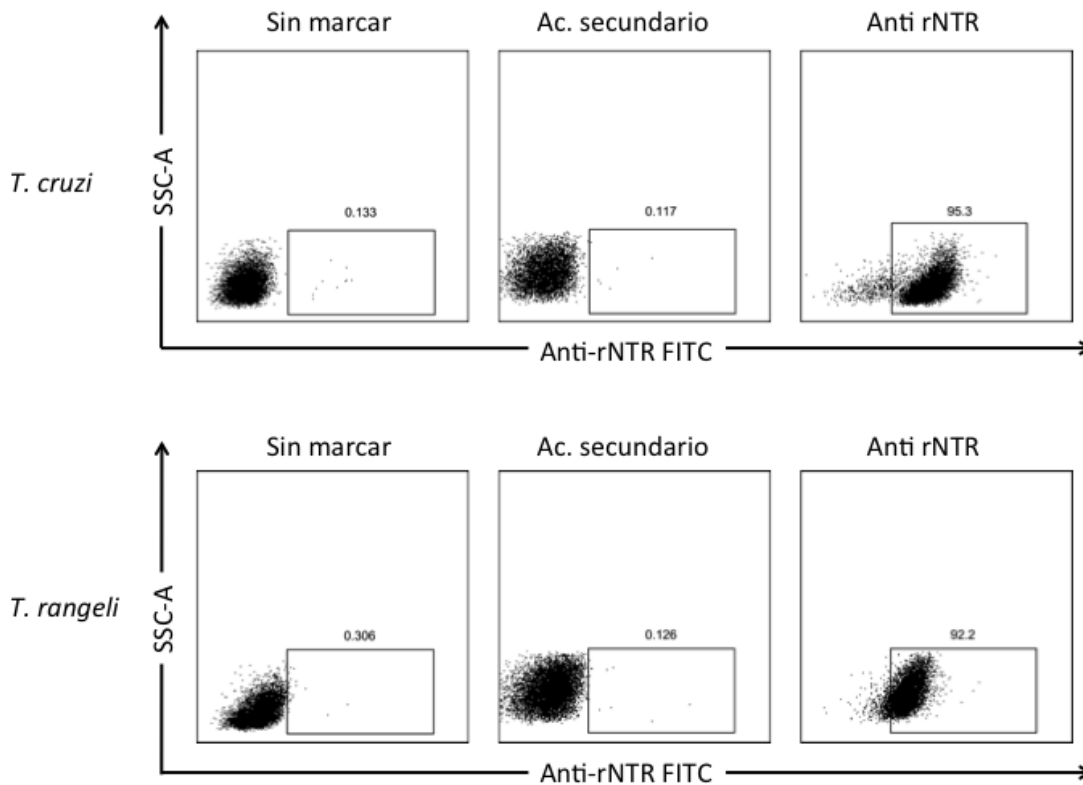


Figura 72. Dispersogramas representativos de la expresión de la NTR tipo I en *T. cruzi* y *T. rangeli*. Se muestran controles de parásitos sin marcar, parásitos marcados solamente con el Ac secundario la frecuencia de parásitos que expresan la NTR tipo I en ambas especies.

Además, para cada réplica biológica, se determinó la intensidad media de fluorescencia (IMF) en las células que expresan la NTR tipo I. La tabla 27 muestra las IMF promedio para *T. rangeli* Tre y *T. cruzi* 058PUJ

Tabla 27. Intensidad media de fluorescencia promedio de células que expresan la NTR tipo I en tres réplicas biológicas

Muestra	IMF NTR tipo I
Control: <i>T. cruzi</i> Ac 2 ^a	273
<i>T. cruzi</i> NTR tipo I	861
Control: <i>T. rangeli</i> Ac 2 ^a	708
<i>T. rangeli</i> NTR tipo I	625,7

El histograma de la figura 73 corresponde a un representativo de la intensidad media de fluorescencia de parásitos marcados con el anticuerpo anti-rNTR de *T. cruzi* y *T. rangeli* respectivamente, y solo con el anticuerpo secundario.

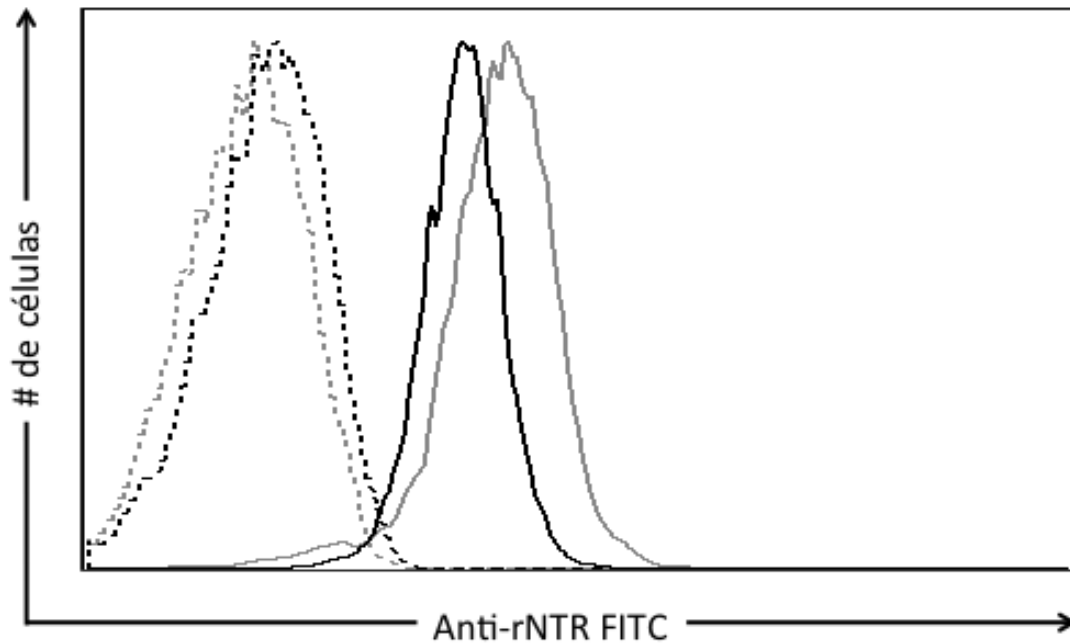


Figura 73. Histograma que muestra la intensidad media de fluorescencia para 10000 epimastigotes que expresan la proteína NTR tipo I en *T. cruzi* y *T. rangeli*. Epimastigotes de *T. rangeli* Tre marcados con anti rNTR \blacksquare \square , *T. rangeli* marcado con sólo anticuerpo secundario \blacksquare \square , *T. cruzi* 058PUJ marcados con anti rNTR \blacksquare \square y *T. cruzi* marcado con sólo anticuerpo secundario \blacksquare \square .

La figura 74 muestra la comparación de la frecuencia de expresión de la NTR tipo I entre ambas especies, considerando las tres réplicas biológicas realizadas. Los datos se presentan como la mediana y rango para cada especie. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre los datos obtenidos ($p= 0,1$), este último análisis se realizó mediante un test de Mann-Whitney.

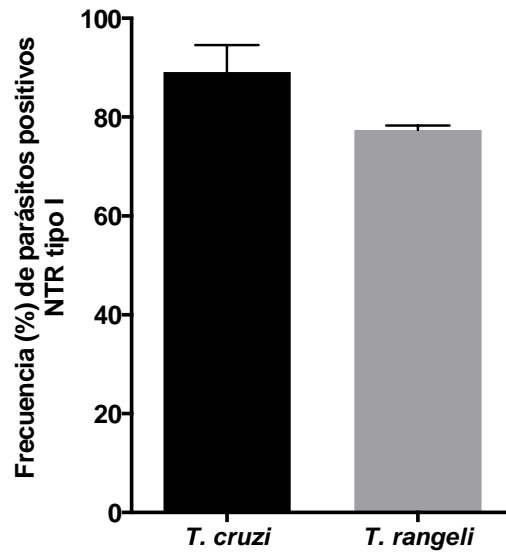


Figura 74. Comparación de frecuencia de parásitos que expresan la NTR tipo I. Los valores representan la mediana y rango de 3 réplicas biológicas independientes.

La figura 75 muestra la comparación de la IMF de células que expresan la NTR tipo I entre ambas especies y considerando las tres réplicas biológicas realizadas. Los datos se presentan como la mediana y rango para cada especie. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre los datos obtenidos ($p= 0,4$), este último análisis se realizó mediante un test de Mann-Whitney.

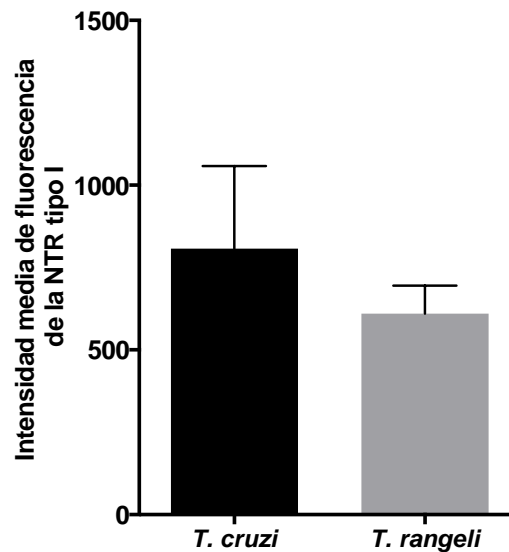


Figura 75. Comparación de Intensidad media de fluorescencia de la NTR tipo I. Los valores representan la mediana y rango de 3 réplicas biológicas independientes.

6.6.2 CnB

Para los ensayos planteados, se utilizaron los anticuerpos policlonales producidos contra la proteína rTrCnB (Figuras 70 y 71). Se realizaron tres réplicas biológicas del experimento. La tabla 28 muestra los valores promedio de frecuencia de células positivas para *T. rangeli* Tre y *T. cruzi* 058PUJ en 10000 eventos. Adicionalmente, se muestran las frecuencias para los controles de parásitos sin marcar y parásitos permeabilizados y marcados únicamente con anticuerpo secundario.

Tabla 28. Frecuencia promedio de células que expresan CnB en tres réplicas biológicas

Muestra	Frecuencia de células positivas
Control: <i>T. cruzi</i> marcar	0,133%
Control: <i>T. cruzi</i> Ac 2 ^a	0,0887%
<i>T. cruzi</i> CnB	52,43%
Control: <i>T. rangeli</i> sin marcar	0,306%
Control: <i>T. rangeli</i> Ac 2 ^a	0,0754%
<i>T. rangeli</i> CnB	44,23%

La figura 76 corresponde a una de las tres réplicas biológicas como representativo de la selección de la población positiva para la expresión de CnB. Se muestra la población de parásitos sin marcar, parásitos permeabilizados y marcados únicamente con anticuerpo secundario y finalmente la población que expresa la proteína CnB.

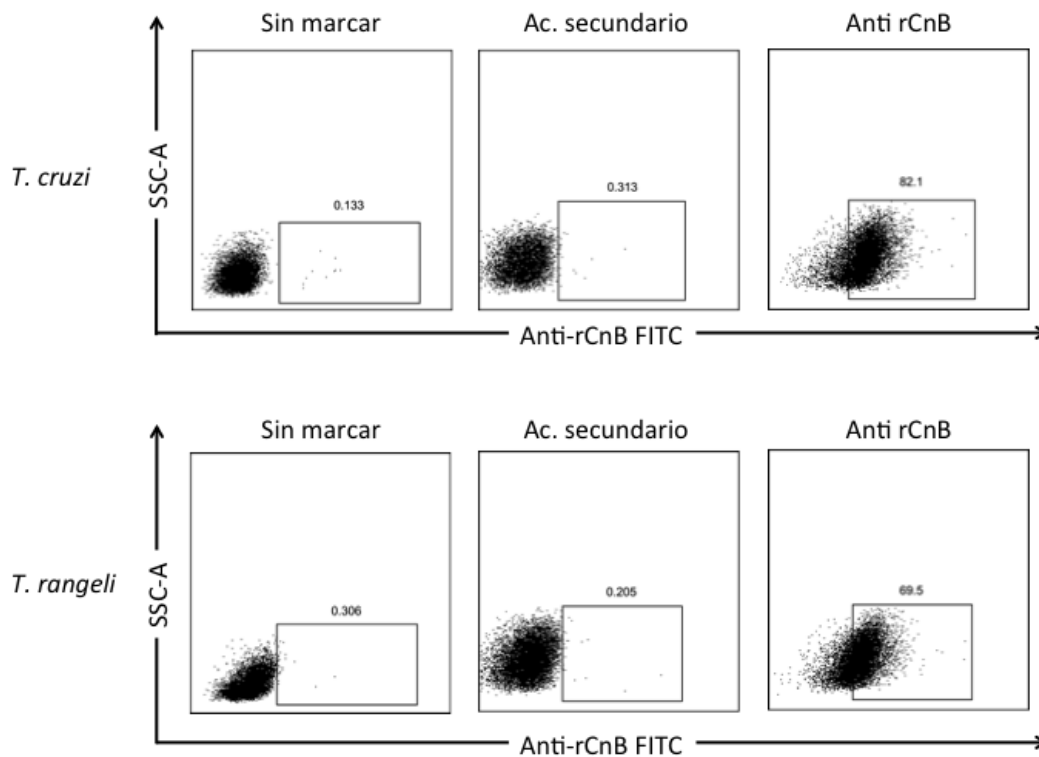


Figura 76. Dispersogramas representativos de la expresión de CnB en *T. cruzi* y *T. rangeli*. Se muestran controles de parásitos sin marcar, parásitos marcados solamente con el Ac secundario y la frecuencia de parásitos que expresan CnB en ambas especies.

Además, para cada réplica biológica, se determinó la intensidad media de fluorescencia (IMF) en las células que expresan CnB. La tabla 29 muestra las IFM promedio para *T. rangeli* Tre y *T. cruzi* 058PUJ.

Tabla 29. Intensidad media de fluorescencia promedio de células que expresan CnB en tres réplicas biológicas

Muestra	IMF CnB
Control: <i>T. cruzi</i> Ac 2 ^a	642
<i>T. cruzi</i> CnB	484
Control: <i>T. rangeli</i> Ac 2 ^a	653
<i>T. rangeli</i> CnB	506

El histograma de la figura 77 corresponde a un representativo de la intensidad media de fluorescencia de parásitos marcados con el anticuerpo anti-rCnB y solo con el anticuerpo secundario.

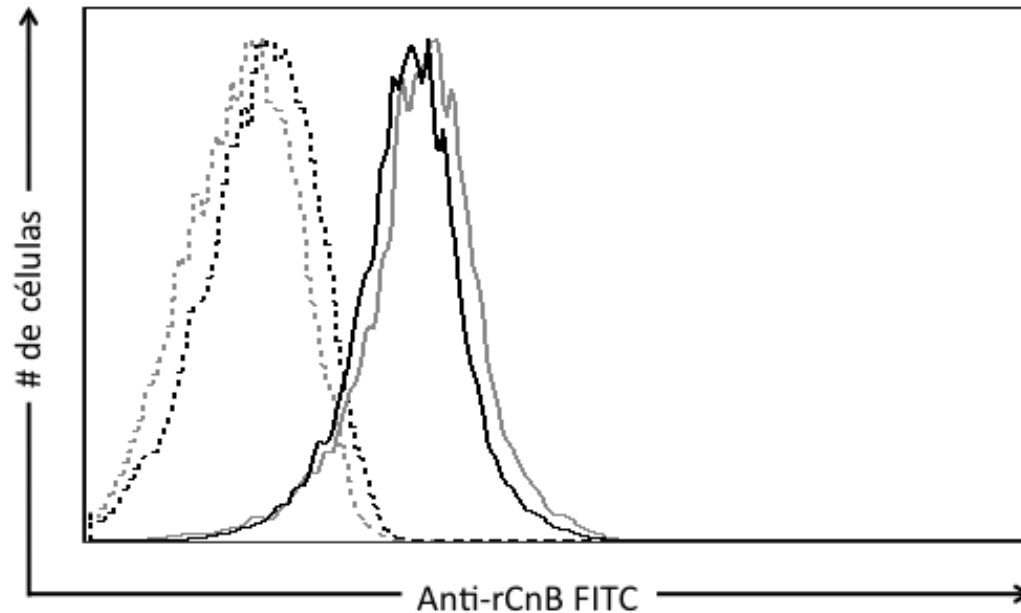


Figura 77. Histograma que muestra la intensidad media de fluorescencia para 10000 epimastigotes que expresan la proteína CnB en *T. cruzi* y *T. rangeli*. Epimastigotes de *T. rangeli* Tre marcados con anti rCnB ■□, *T. rangeli* marcado con sólo anticuerpo secundario ■□, *T. cruzi* 058PUJ marcados con anti rCnB □□ y *T. cruzi* marcado con sólo anticuerpo secundario □□.

La figura 78 muestra la comparación de la frecuencia de expresión de CnB entre ambas especies, considerando las tres réplicas biológicas realizadas. Los datos se presentan como la mediana y rango para cada especie. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre los datos obtenidos ($p= 0,2$), este último análisis se realizó mediante un test de Mann-Whitney.

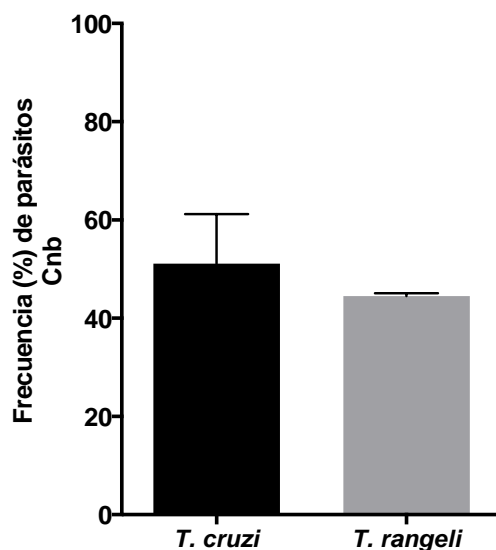


Figura 78. Comparación de frecuencia de parásitos que expresan CnB. Los valores representan la mediana y rango de 3 réplicas biológicas independientes.

La figura 79 muestra la comparación de la IMF de células que expresan CnB entre ambas especies y considerando las tres réplicas biológicas realizadas. Los datos se presentan como la mediana y rango para cada especie. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre los datos obtenidos ($p= 0,5$), este último análisis se realizó mediante un test de Mann-Whitney.

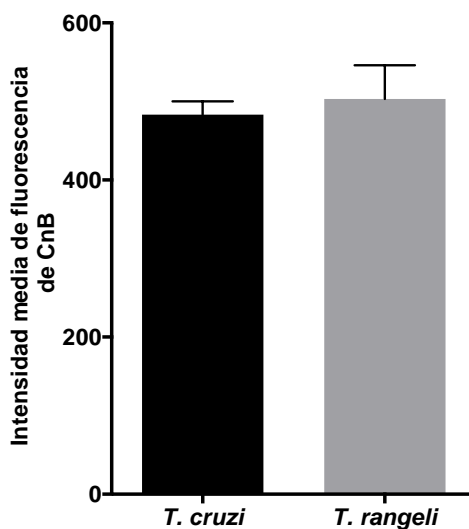


Figura 79. Comparación de Intensidad media de fluorescencia de CnB. Los valores representan la mediana y rango de 3 réplicas biológicas independientes.

6.6 Determinación de localización sub-celular de las proteínas NTR tipo I y CnB en epimastigotes de *T. rangeli* Tre y *T. cruzi* 058PUJ

La localización de las proteína fue analizada mediante inmunofluorescencia indirecta, utilizando los mismos anticuerpos policlonales descritos en el numero 6.5.

6.6.1 NTR tipo I

La figura 80 muestra la localización en zona cinetoflagelar de la proteína NTR tipo I en *T. cruzi*, lo cual concuerda con previos reportes de la localización de la proteína (Wilkinson *et al.* 2008) y la predicción *in silico* realizada en el presente trabajo (Figura 34). Por el contrario, dicha proteína en *T. rangeli* Tre mostró una localización citoplasmática, como se observa en la figura 81.

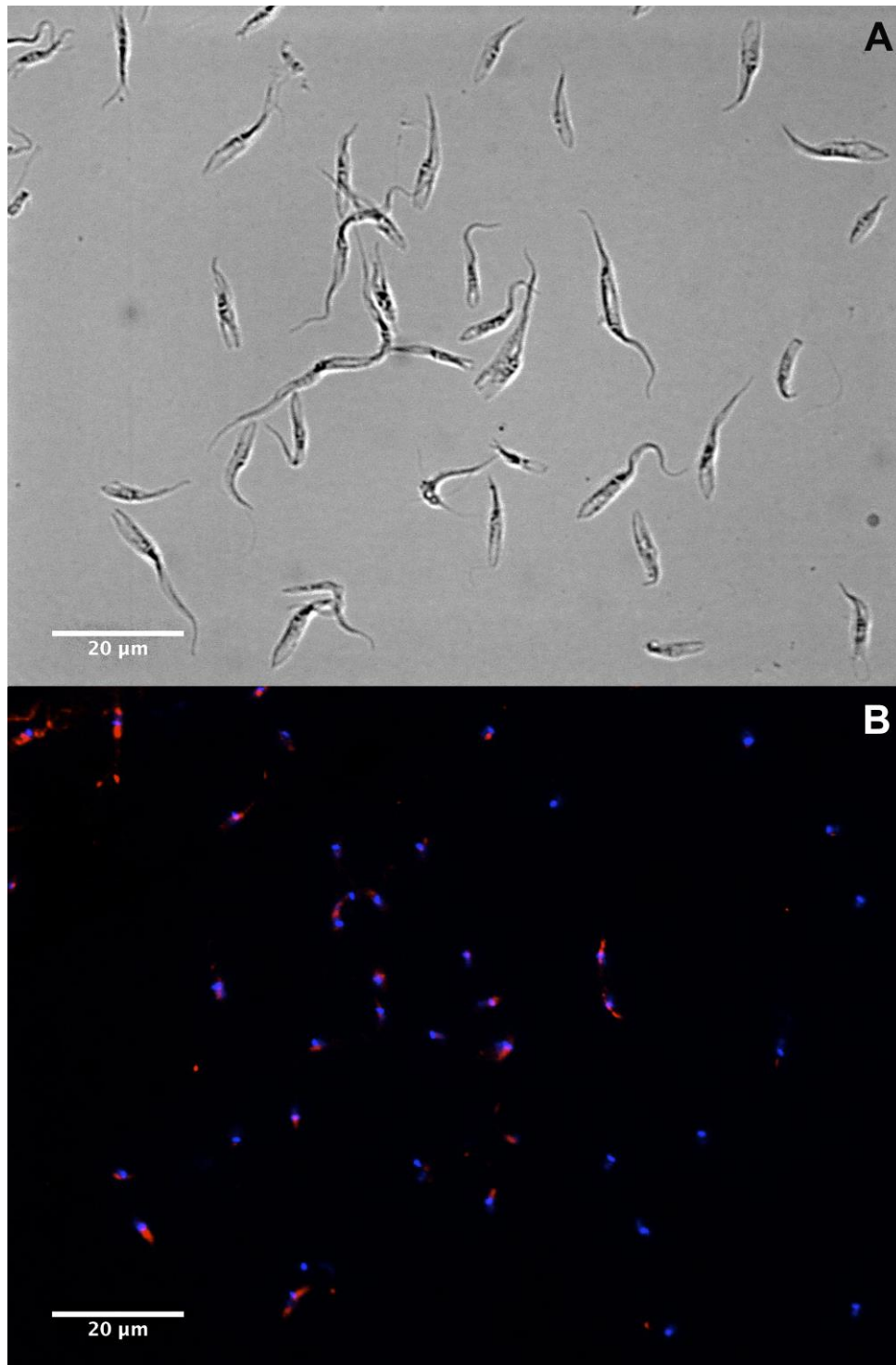


Figura 80. Inmunofluorescencia indirecta de la NTR tipo I en epimastigotes de *T. cruzi* 058PUJ. La figura A muestra los parásitos con luz blanca (DIC). Se muestra la detección en zona cinetoflagelar de la proteína NTR tipo I (B) mediante fluorescencia emitida por el fluorocromo TRITC (rojo). Se utilizó DAPI para tinción de ADN (azul), mostrando posición de núcleo y cinetoplasto en los parásitos. Las fotografías fueron tomadas en aumento 60X.

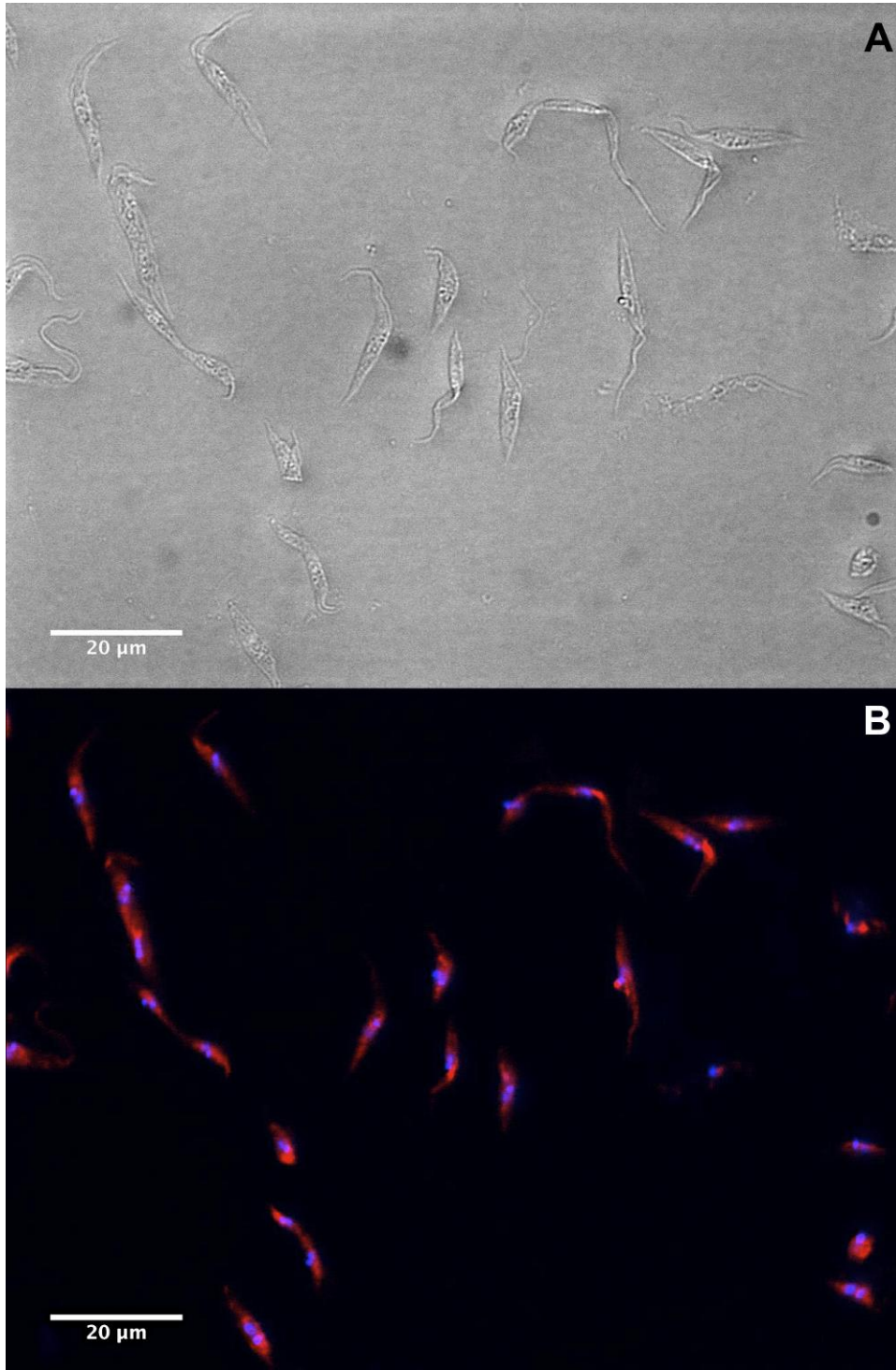


Figura 81. Inmunofluorescencia indirecta de la NTR tipo I en epimastigotes de *T. rangeli* Tre. La figura A muestra los parásitos con luz blanca (DIC). Se muestra la detección citoplasmática de la proteína NTR tipo I (B) mediante fluorescencia emitida por el fluorocromo TRITC (rojo). Se utilizó DAPI para tinción de ADN (azul), mostrando posición de núcleo y cinetoplasto en los parásitos. Las fotografías fueron tomadas en aumento 60X.

Como control, se realizó la inmunofluorescencia en ambas especies de parásito, sin adicionar anticuerpo primario. La figura 82 muestra que no hay señal del anticuerpo secundario y por el contrario sólo se observan núcleo y cinetoplasto teñidos con DAPI en ambas especies.

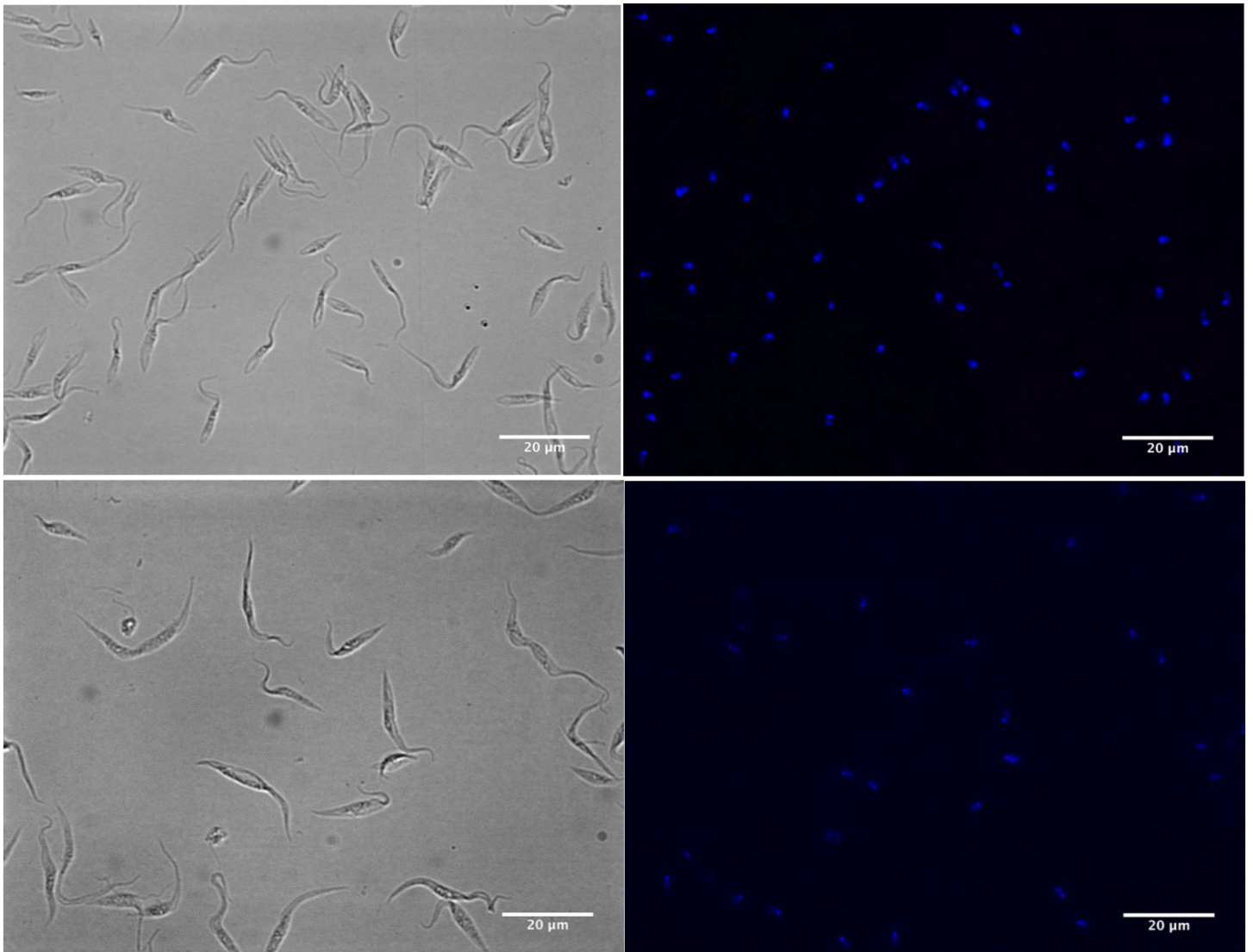


Figura 82. Controles negativos inmunofluorescencia indirecta de la NTR tipo I. La técnica fue realizada en epimastigotes de *T. cruzi* (Panel superior) y *T. rangeli* (Panel inferior). Se presenta foto de epimastigotes con luz blanca y fluorescencia. Se utilizó DAPI para tinción de ADN (azul), mostrando posición de núcleo y cinetoplasto en los parásitos. Las fotografías fueron tomadas en aumento 60X.

6.6.2 CnB

Las figura 83 y 84 muestran la localización citoplasmática de la proteína CnB en epimastigotes de *T. cruzi* 058PUJ y *T. rangeli* Tre, respectivamente. Estos resultados concuerdan con reportes de localización de la subunidad A de la calcineurina (con la cuál CnB forma un heterodímero) en *T. cruzi* (Moreno *et al.* 2007) y de CnB en *L. major* (Naderer *et al.* 2011). En *T. rangeli* se observa el mismo patrón reportado para dichos tripanosomatidos.

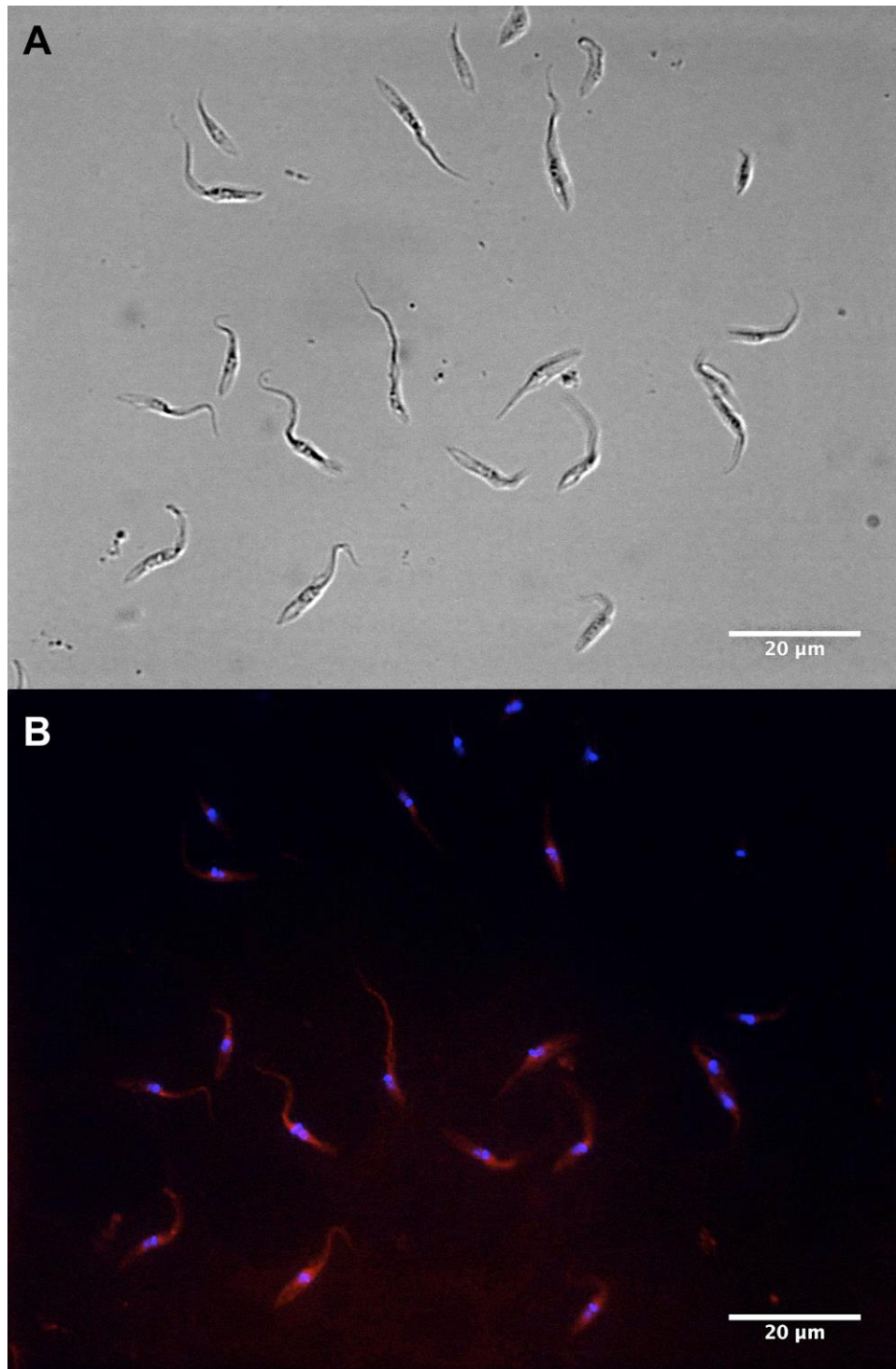


Figura 83. Inmunofluorescencia indirecta de CnB en epimastigotes de *T. cruzi* 058PUJ. La figura A muestra los parásitos con luz blanca (DIC). Se muestra la detección en citoplasma de la proteína CnB (B) mediante fluorescencia emitida por el fluorocromo TRITC (rojo). Se utilizó DAPI para tinción de ADN (azul), mostrando posición de núcleo y cinetoplasto en los parásitos. Las fotografías fueron tomadas en aumento 60X.

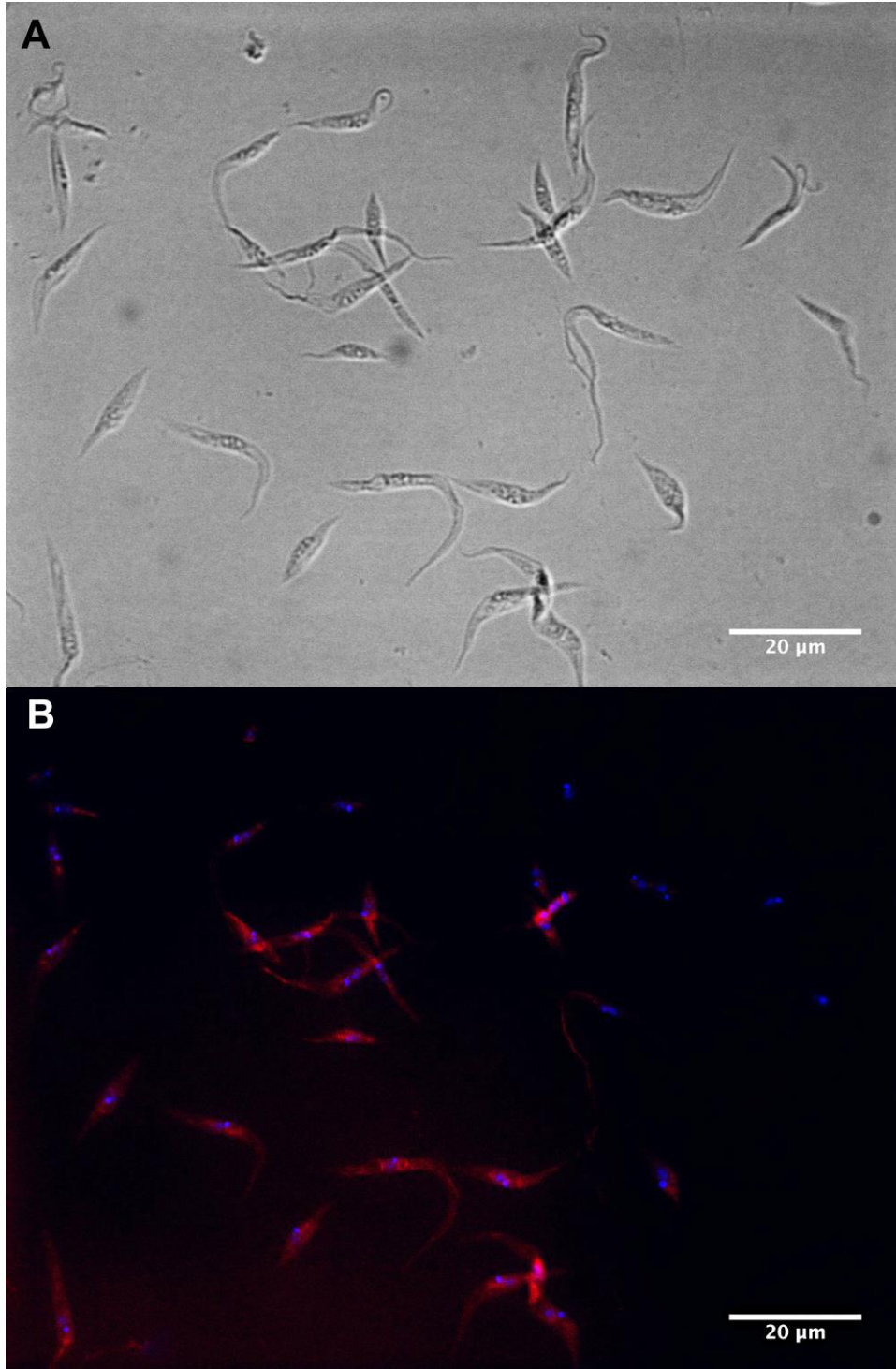


Figura 84. Inmunofluorescencia indirecta de CnB en epimastigotes de *T. rangeli* Tre. La figura A muestra los parásitos con luz blanca (DIC). Se muestra la detección en citoplasma de la proteína CnB (B) mediante fluorescencia emitida por el fluorocromo TRITC (rojo). Se utilizó DAPI para tinción de ADN (azul), mostrando posición de núcleo y cinetoplasto en los parásitos. Las fotografías fueron tomadas en aumento 60X.

Como control, se realizó la inmunofluorescencia sin adicionar anticuerpo primario. La figura 85 muestra que no hay señal del anticuerpo secundario y por el contrario sólo se observan núcleo y cinetoplasto teñidos con DAPI en ambas especies.

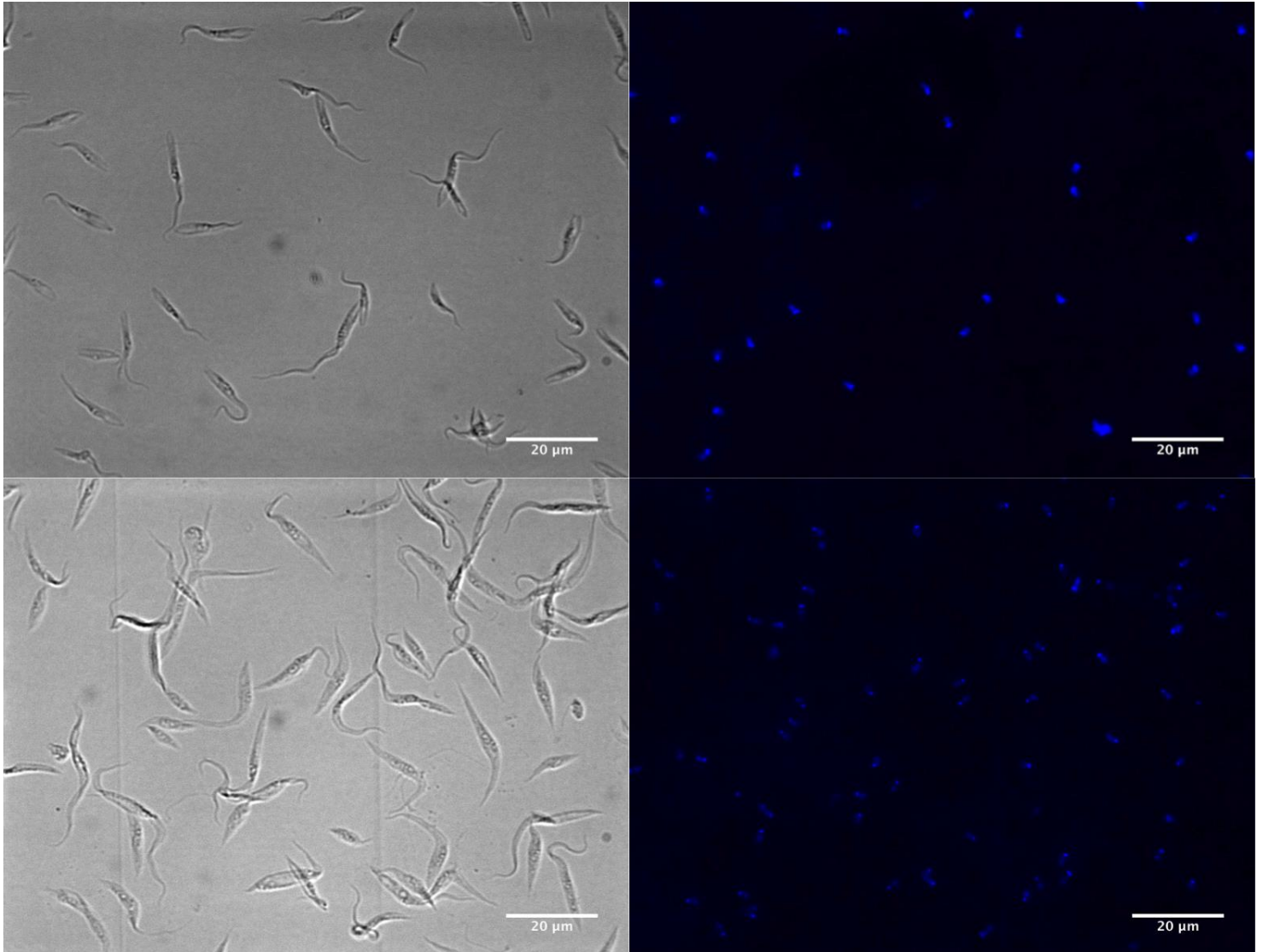


Figura 85. Controles negativos inmunofluorescencia indirecta de CnB. La técnica fue realizada en epimastigotes de *T. cruzi* (Panel superior) y *T. rangeli* (Panel inferior). Se presenta foto de epimastigotes con luz blanca y fluorescencia. Se utilizó DAPI para tinción de ADN (azul), mostrando posición de núcleo y cinetoplasto en los parásitos. Las fotografías fueron tomadas en aumento 60X.

7. DISCUSIÓN

El estudio de los tripanosomátidos a través del tiempo se ha centrado principalmente en los agentes causales de enfermedades tropicales de gran importancia como la enfermedad de Chagas, leishmaniasis y enfermedad del sueño, es decir: *T. cruzi*, *Leishmania sp* y *T. brucei*, respectivamente (El-Sayed *et al.* 2005; Cuervo *et al.* 2010). Sin embargo, recientemente se han realizado esfuerzos en la profundización del conocimiento de la biología de *T. rangeli*, un tripanosoma americano que pese a que no produce patología alguna en los mamíferos a los cuáles infecta, sí lo hace en el vector que lo transmite (D' Alessandro & Saravia 1992; Cuba Cuba 1998; Garcia *et al.* 2012).

T. rangeli comparte un gran número de características biológicas con el patógeno *T. cruzi*, estas incluyen los insectos vectores del género *Rhodnius sp*, una distribución geográfica que se sobrelapa en la región norte de América del Sur y en América Central, reservorios domésticos y salvajes y un gran número de antígenos muy conservados que incluso han llevado a reactividad cruzada y a inconvenientes en el diagnóstico de *T. cruzi* como patógeno de alta importancia (Cuba Cuba 1998; Guhl *et al.* 2002; Guhl & Vallejo 2003).

La principal diferencia existente entre estas dos especies de tripanosoma radica en el ciclo de vida que poseen al interior de los hospederos vertebrados a los que infectan. Mientras *T. cruzi* invade células no fagocíticas, se multiplica y produce enfermedad, la evidencia sugiere que *T. rangeli* no puede invadir células del hospedero y las parasitemias se resuelven en tiempos variables (Urdaneta-Morales & Tejero 1986; Guhl & Vallejo 2003; Caradonna & Burleigh 2011). En el presente trabajo se realizó la caracterización molecular de dos proteínas en *T. rangeli* Tre, implicadas en el proceso de invasión celular de *T. cruzi*: la Nitroreductasa tipo I y la Subunidad B de la Calcineurina.

7.1 Nitroreductasa tipo I (NTR)

La enzima nitroreductasa tipo I, originalmente descrita en bacterias (Zenno *et al.* 1996a; Zenno *et al.* 1996b; Parkinson *et al.* 2000), ha sido investigada recientemente en eucariotas, principalmente en protozoos de importancia clínica como *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania donovani* y *Leishmania major* en los cuáles se ha establecido que juega un papel esencial en la activación de pro-medicamentos de tipo nitro-heterocíclico y así mismo en el desarrollo de la resistencia a dichos compuestos (Wilkinson *et al.* 2008; Pal *et al.* 2009; Hall *et al.* 2011; Muller *et al.* 2013; Voak *et al.* 2013; Wyllie *et al.* 2013).

De manera interesante, la caracterización molecular y funcional de esta proteína en tripanosomátidos mostró que en *T. brucei*, *L. donovani* y *L. major*, parece ser esencial para el crecimiento del parásito y la supervivencia, puesto que diversos intentos de generar parásitos nulos en la expresión de la misma no fueron exitosos (Wilkinson *et al.* 2008; Voak *et al.* 2013; Wyllie *et al.* 2013). Por otro lado, en *T. cruzi* la delección o inactivación de ambas copias del gen *ntr* tiene un efecto perjudicial sobre la tasa de crecimiento del parásito y su infectividad (Wilkinson *et al.* 2008; Mejia *et al.* 2012). Teniendo en cuenta la evidencia descrita y especialmente la importancia de la NTR tipo I en el proceso de invasión de *T. cruzi* se discuten los resultados obtenidos para la caracterización molecular de esta proteína en la contraparte no patógena y filogenéticamente cercana de este patógeno: *T. rangeli* cepa Tre.

En un principio la identificación del gen *ntr* en el genoma de la cepa Tre de *T. rangeli* (KP1-) mediante PCR y Southern blot permitió caracterizarlo como un gen de copia única de 890 pb con una identidad del 72% con respecto al mismo gen en *T. cruzi* 058PUJ. De especial interés, las diferencias encontradas entre ambos genes se encuentran principalmente en las regiones N-terminal de las secuencias codificantes. En general, los hallazgos encontrados demuestran la alta similitud existente entre las

secuencias codificantes para dicho gen en estos dos tripanosomas americanos, que ya había sido reportada previamente para otros genes de importancia en *T. cruzi* (Puerta *et al.* 2000; Diez *et al.* 2005; Nocua *et al.* 2009; Cuervo *et al.* 2013; Montenegro *et al.* 2013). Adicionalmente, se resalta que este gen posee un 98,3% de identidad con su homólogo en la cepa Choachí (KP1+), lo cual confirma el alto grado de conservación de las secuencias entre linajes de *T. rangeli*, hallazgo previamente reportado (Diez *et al.* 2005; Cuervo *et al.* 2006).

Los resultados descritos anteriormente nos llevaron a investigar la relación filogenética entre los genes *ntr* al interior de la familia *Trypanosomatidae*. Los dendogramas resultantes (Figuras 37 y 132) mostraron dos grupos principales, formados por especies de tripanosomas y *Leishmania sp*, respectivamente. Dicha estructura reveló que el gen *ntr* refleja la historia evolutiva de las especies incluídas en el análisis (Deschamps *et al.* 2011; Leonard *et al.* 2011) y, por otro lado, mostró nuevamente que las secuencias de *T. rangeli* están altamente relacionadas con las reportadas para *T. cruzi*.

Posterior a la identificación y descripción del gen *ntr* en el genoma de *T. rangeli* Tre, el análisis de la expresión del transcrito y la comparación con el correspondiente a *T. cruzi* fue realizada. Los resultados obtenidos permitieron establecer que gen *ntr* se expresa a nivel de ARNm en epimastigotes de fase exponencial de *T. rangeli* Tre y que epimastigotes de *T. cruzi* 058PUJ en la misma fase de crecimiento, presentaron una tendencia a una mayor expresión del transcrito en mención. Sorprendentemente, las regiones 5' UTR de estas dos especies difieren tanto en longitud como en secuencia, presentando un 50 % de identidad. Dado que las regiones UTR son el blanco principal de interacción de los factores de regulación de expresión en tripanosomátidos (Martinez-Calvillo *et al.* 2010), se hipotetiza que estas podrían tener una influencia en la diferencia existente en el número de transcritos relativos en cada especie al ser blanco de unión de proteínas reguladoras diferentes.

Con el objetivo de averiguar si el anterior comportamiento se extendía a nivel de la proteína, su expresión se analizó mediante el uso de ensayos de citometría de flujo. El uso de anticuerpos anti-rNTR, específicos de especie, permitió confirmar que epimastigotes en fase exponencial tanto de *T. cruzi* 058PUJ como de *T. rangeli* Tre expresan la NTR tipo I y, de manera coherente con los resultados del número de copias del transcrito, la intensidad media de fluorescencia (es decir, el nivel de expresión por célula), fue mayor en *T. cruzi* que en *T. rangeli*, aunque sin diferencias estadísticamente significativas. Este resultado podría sugerir que esta proteína sería más abundante en el parásito patógeno.

Este hallazgo es de especial interés gracias a la influencia descrita de la proteína en la capacidad de invasión y la infección no sólo en *T. cruzi*, sino también en otros tripanosomátidos de importancia clínica (Wilkinson *et al.* 2008; Voak *et al.* 2013; Wyllie *et al.* 2013). Por lo tanto, una expresión disminuida en *T. rangeli*, un protozoo no patógeno para mamíferos, pero estrechamente relacionado con *T. cruzi* podría reforzar la importancia de esta proteína en el proceso de la infección y el desarrollo posterior de enfermedad.

En cuanto al análisis de las secuencias de la proteína NTR tipo I de *T. rangeli* Tre y su comparación con secuencias *T. cruzi*, se observó que la primera posee un dominio nitroreductasa que junto con la presencia de regiones de unión a FMN y a sustrato proporcionan una fuerte evidencia de la conservación de la actividad enzimática en *T. rangeli*. De especial interés, los residuos más importantes para la actividad funcional (Hall *et al.* 2012) se conservaron también. Cabe resaltar además, que el modelo estructural, modelado por homología, mostró una conservación de la estructura tridimensional a nivel de dominio NTR y en términos de los residuos clave implicados en FMN y de unión al sustrato, lo que también es compatible con la conservación de la actividad oxido-reductasa de la NTR tipo I en *T. rangeli* (Berg *et al.* 2002).

El análisis *in silico* de la NTR tipo I de *T. rangeli* comparada con otros microorganismos que poseen nitroreductasas independientes de oxígeno y

dependientes de FMN como *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* y el parásito mitocondrial *Giardia lamblia* permitió establecer la hipótesis de que la señal mitocondrial fue adquirida en tripanosomátidos durante la evolución, puesto que otros protozoos a pesar de conservar la extensión al N-terminal, carecen de señal mitocondrial. También se hipotetiza que en *T. rangeli* la señal mitocondrial se perdió en algún punto, probablemente durante la división de los subgéneros *Schizotrypanum* (*T. cruzi*) y *Herpetosoma* (*T. rangeli*).

En conjunto, los resultados de este trabajo indican que *T. rangeli* Tre expresa la NTR tipo I y que esta podría conservar su actividad oxido-reductasa. Por otro lado, los resultados de localización sub-celular de esta proteína mostraron un patrón diferencial de la NTR tipo I entre estas dos especies de tripanosomas. Mientras que en *T. cruzi* 058PUJ la proteína mostró, según lo reportado previamente para esta especie y *T. brucei* una ubicación mitocondrial (Wilkinson *et al.* 2008), en *T. rangeli* Tre la proteína se encuentra dispersa en el citoplasma del parásito, lo que no solo concuerda con la predicción bioinformática en la que la proteína no poseía una señal de localización mitocondrial en esta especie sino que además abre la posibilidad de cuestionar la similitud a nivel de función endógena que esta pueda cumplir en cada especie teniendo en cuenta que la localización sub-celular de las proteínas se ha asociado a inferencias de función y organización celular en tripanosomátidos (Cuervo *et al.* 2010).

Por último, aunque la función endógena de esta proteína aun no se ha elucidado en parásitos protozoarios, en tripanosomátidos patógenos para los humanos se ha relacionado con el crecimiento y la diferenciación de los estadios infecciosos e intracelulares, así como el desarrollo de la infección en el huésped mamífero (Wilkinson *et al.* 2008; Mejia *et al.* 2012; Wyllie *et al.* 2013). Debido a su localización mitocondrial y actividad enzimática de tipo oxido-reductasa en *T. cruzi*, se ha apuntado a un papel en el equilibrio de NADH/NAD⁺, probablemente en la generación de ubiquinol (QH₂) a partir de ubiquinona (Q) complementando la actividad de enzimática del complejo I mitocondrial (Brandt 2006; Wilkinson *et al.* 2008;

Cristodero *et al.* 2010) que en el caso de tripanosomátidos sólo es funcional en epimastigotes puesto que sufre edición del ARN (Cristodero *et al.* 2010; Hajduk & Ochsenreiter 2010; Goringe 2012), y en estadíos sanguíneos dicha actividad sería exclusiva de la NTR tipo I. Por el contrario, debido a la localización citoplasmática de la NTR tipo I en *T. rangeli*, se esperaría que la función de esta proteína fuese diferente, (probablemente en el mantenimiento del potencial redox citoplasmático) y tanto los epimastigotes como tripomastigotes de dicha especie presentarían proteínas diferentes que cumplieran la función de balance NADH/NAD⁺ mitocondrial, finalmente, esto podría además relacionarse con la incapacidad de este parásito de invadir de manera productiva las células del huésped mamífero. Sin embargo, se necesitarían más experimentos para explorar dichas hipótesis.

7.2 Subunidad B de la Calcineurina (CnB)

La calcineurina (Cn) es una proteína heterodimérica que posee una actividad enzimática serina-treonina fosfatasa dependiente de Ca²⁺. Ha sido reportada como un posible blanco terapéutico contra organismos patógenos como tripanosomátidos y hongos y se ha demostrado que su actividad fosfatasa puede ser inhibida por complejos formados por los fármacos inmunosupresores naturales ciclosporina A (CsA) y FK506 con ciclofilina A (CyPA) y la proteína de unión a FK-506, respectivamente (Rusnak & Mertz 2000; Steinbach *et al.* 2007; Araya *et al.* 2008; Stie & Fox 2008; Naderer *et al.* 2011).

De manera interesante, la caracterización molecular de esta proteína en *T. cruzi* demostró que está principalmente formada por una subunidad catalítica (CnA) y una subunidad regulatoria (CnB) y que esta última juega un papel determinante en el proceso de invasión celular del parásito, puesto que el bloqueo de la expresión del gen de copia única que la codifica desencadena en una disminución del 50% de la tasa de entrada de tripomastigotes a células HELA y del 62 % al 64 % cuando se utilizan inhibidores de la Calcineurina como CsA (Araya *et al.* 2008). Teniendo en cuenta la

evidencia científica descrita, se discuten los resultados obtenidos para la caracterización molecular de CnB en la contraparte no patógena y filogenéticamente cercana de *T. cruzi*: *T. rangeli* cepa Tre.

Inicialmente se realizó la identificación del gen *cnb* en el genoma de *T. rangeli* Tre y se obtuvieron dos clones, posiblemente correspondientes a los dos alelos del gen, de 531 pb y que poseían una identidad del 78% con secuencias del mismo gen en *T. cruzi* y del 98% con la misma secuencia en la cepa Choachí (Linaje KP1+) de *T. rangeli*. Estos resultados junto con la hibridación en el Southern blot permitieron concluir que el gen *cnb* presenta una única copia en el genoma de ambas especies filogenéticamente cercanas y que acorde con reportes anteriores para otros genes existe una alta conservación de genes entre estos dos tripanosomas.

El análisis de relaciones filogenéticas presentó resultados coherentes con esta afirmación ya que mostró la existencia de dos grupos principales: uno formado por *T. cruzi*, *T. rangeli* y *Leishmania sp.* y un segundo formado por tripanosomas africanos. Tales resultados corroboraron reportes previos de *T. cruzi* y *T. brucei* como grupos monofiléticos distintos (Leonard *et al.* 2011) y confirmaron la estrecha relación evolutiva entre *T. cruzi* y *T. rangeli*. Resulta interesante la inclusión del género *Leishmania sp.* en el primer grupo descrito. Resultado que podría estar relacionado con la función que la proteína CnB cumple en el ciclo de vida de estos tripanosomátidos que presentan una fase intracelular obligatoria en el huésped mamífero. La estructura de los dendogramas presentados estableció de manera clara que la historia evolutiva de un gen no necesariamente refleja la historia evolutiva de la especie a la que pertenece (Barton *et al.* 2007).

El análisis de la expresión a nivel de ARNm del transcrito *cnb* en *T. rangeli* Tre y *T. cruzi* 058PUJ permitió, en primera instancia, demostrar que epimastigotes en fase exponencial de ambas especies expresan transcritos maduros de *cnb* que portan la secuencia líder producto del trans-splicing y pueden ser por lo tanto traducidos. De interés, las regiones 5'UTR de estas dos especies de tripanosoma presentan

diferencias tanto en su longitud (*T. rangeli*: 151 pb y *T. cruzi*: 171 pb) como en secuencia (57% de identidad), hecho que como en el caso de la NTR tipo I puede dar origen a motivos de unión o reconocimiento de proteínas reguladoras diferentes. Estudios previos en la caracterización de CnB de *T. cruzi* habían reportado la expresión de un transcrito de 0.9 kb en dicho parásito (Araya *et al.* 2008), resultado que está de acuerdo con los hallazgos de este trabajo.

La posterior cuantificación relativa de los transcritos mostró que no existe una diferencia estadísticamente significativa del número de copias de los mismos entre especies, pese a una leve tendencia de mayor expresión en el parásito patógeno *T. cruzi*. La evaluación de la expresión de la proteína CnB corroboró una expresión similar en ambas especies, lo que podría relacionarse con el hecho de que la calcineurina es una proteína ampliamente conservada a lo largo de la escala evolutiva, con una identidad del 40-47% con la misma proteína en otros eucariotas (Montenegro *et al.* 2013) y cumple funciones en un amplio número de procesos celulares, principalmente vías de transducción dependientes de calcio y por lo tanto su expresión podría ser requerida de manera constante en los organismos que la poseen (Rusnak & Mertz 2000). A este respecto, también es importante anotar que los mecanismos de regulación de la expresión génica en tripanosomátidos operan a nivel post-transcripcional y post-traducciona, de manera que los niveles de expresión de los transcritos y proteína respectivos, no siempre corresponden (Clayton & Shapira 2007; Cohen-Freue *et al.* 2007).

El análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína CnB de *T. rangeli* Tre mostró que posee un 76% de identidad con la misma secuencia en *T. cruzi* 058PUJ. De manera interesante, a diferencia de la proteína CnB de este último, en *T. rangeli* Tre la predicción de dominios de unión a calcio de tipo EF-Hand permitió la identificación de los cuatro típicos de esta subunidad regulatoria en eucariotas (Rusnak & Mertz 2000; Stie & Fox 2008). Sin embargo, los posibles residuos que participan en la coordinación de calcio en cada dominio (primero, tercero, quinto, séptimo, noveno, y un aminoácido ácido invariante en el residuo 12), sólo cumplen con el patrón esperado en tres de los

cuatro dominios, lo cual es soportado por reportes previos de que las proteínas CnB de tripanosomátidos no suelen ser conservadas en el primer dominio tipo EF-hand (Moreno *et al.* 2007). Esta predicción, junto con el modelo tridimensional de buena calidad construido y que mostró una alta conservación con respecto a la calcineurina humana (AP ID: 2CT9), bovina (AP ID 1TCO) y de rata (AP ID: 2BEC), sugiere que la actividad regulatoria mediada por calcio de CnB se conserva en *T. rangeli*.

Por otro lado, llama la atención la ausencia de la señal de miristoilación al N-terminal de la proteína en *T. rangeli*, presente en *T. cruzi* y otros tripanosomátidos, y aunque el papel de esta modificación post-traducciona en CnB no ha sido totalmente elucidado (Rusnak & Mertz 2000), se reporta que se requiere para el cumplimiento de la función de proteínas unidas a membrana y citosólicas implicadas en la regulación celular y / o la transducción de señales (Maurer-Stroh *et al.* 2002). De hecho, esta modificación de anclaje de lípidos aumenta el carácter lipofílico y la estabilización de la proteína, facilitando la interacción con proteínas de membrana o dominios de proteínas hidrofóbicas (Price *et al.* 2003).

Por último, la localización sub-celular de CnB en ambas especies fue citoplasmática, lo que sumado a la alta conservación a nivel de secuencia de nucleótidos y aminoácidos entre ambas especies, sugiere no sólo que la actividad enzimática serina-treonina fosfatasa se conserva, sino que las funciones biológicas en las cuales la proteína participa pueden ser similares para ambos parásitos.

A nivel de función endógena de la proteína en tripanosomátidos, se reconoce que (CnB) juega un papel regulatorio dependiente de gradientes de calcio, sobre la unidad catalítica de la Calcineurina: CnA (Moreno *et al.* 2007; Araya *et al.* 2008). Teniendo en cuenta que la CsA tiene un efecto inhibitorio sobre la replicación *in vitro* de *T. cruzi* epimastigotes (Bua *et al.* 2004) y agentes quelantes como el BAPTA inhiben el crecimiento de promastigotes de *L. major* (Naderer *et al.* 2011), es posible plantear la hipótesis de que el proteína CnB en *T. rangeli* podrían ser necesarias para el crecimiento del epimastigote.

Recientemente, se ha reportado que la activación de la calcineurina de *T. cruzi* mediante la interacción con un complejo ciclofilina-péptido lítico, desencadena una cascada que lleva a la activación bioenergética del parásito y al aumento de ATP intracelular, lo que permitió establecer que esta proteína es importante en vías de adaptación al medio ambiente circundante y en condiciones de estrés como la invasión celular en el hospedero mamífero o la respuesta al choque térmico en el mismo, entre otras (Araya *et al.* 2008; Naderer *et al.* 2011; Kulkarni *et al.* 2013). Considerando el ciclo de vida complejo que tienen ambas especies de tripanosoma y los diferentes escenarios en los cuales estos podrían requerir una respuesta adaptativa que condicionaría su supervivencia, se hipotetiza que la participación de la calcineurina en el ciclo de vida de ambos parásitos podría darse en diferentes puntos y futuros experimentos deberían realizarse con el fin de elucidar dicha actividad.

8. CONCLUSIÓN

- Las proteínas NTR tipo I y CnB, importantes en el proceso de invasión celular de *T. cruzi*, se expresan en el parásito no patógeno *T. rangeli*. Se encontró un patrón de localización sub-celular diferente para la NTR tipo I que podría sugerir una diferencia a nivel de función endógena con respecto a *Trypanosoma cruzi*.

9. RECOMENDACIONES

- Realizar ensayos que permitan una aproximación a la función endógena de las proteínas en *T. rangeli* y en *T. cruzi*.
- Profundizar en la búsqueda y selección de genes normalizadores adicionales a *hgprt* para la cuantificación relativa de transcritos en *T. cruzi* y *T. rangeli*.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Ajioka J. & Swindle J. (1996) The calmodulin-ubiquitin (CUB) genes of *Trypanosoma cruzi* are essential for parasite viability. *Mol Biochem Parasitol* **78**, 217-25.
- Andrade S. & Malgahaes J. (1997) Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology *Rev Soc Bras Med Trop* **30**, 27-35.
- Anez-Rojas N., Garcia-Lugo P., Crisante G., Rojas A. & Anez N. (2006) Isolation, purification and characterization of GPI-anchored membrane proteins from *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* **97**, 140-5.
- Anez-Rojas N., Peralta A., Crisante G., Rojas A., Anez N., Ramirez J.L. & Chiurillo M.A. (2005) *Trypanosoma rangeli* expresses a gene of the group II trans-sialidase superfamily. *Mol Biochem Parasitol* **142**, 133-6.
- Araya J.E., Cornejo A., Orrego P.R., Cordero E.M., Cortez M., Olivares H., Neira I., Sagua H., da Silveira J.F., Yoshida N. & Gonzalez J. (2008) Calcineurin B of the human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* is involved in cell invasion. *Microbes Infect* **10**, 892-900.
- Arnold K., Kiefer F., Kopp J., Battey J.N., Podvinec M., Westbrook J.D., Berman H.M., Bordoli L. & Schwede T. (2009) The Protein Model Portal. *J Struct Funct Genomics* **10**, 1-8.
- Aslett M., Aurrecochea C., Berriman M., Brestelli J., Brunk B.P., Carrington M., Depledge D.P., Fischer S., Gajria B., Gao X., Gardner M.J., Gingle A., Grant G., Harb O.S., Heiges M., Hertz-Fowler C., Houston R., Innamorato F., Iodice J., Kissinger J.C., Kraemer E., Li W., Logan F.J., Miller J.A., Mitra S., Myler P.J., Nayak V., Pennington C., Phan I., Pinney D.F., Ramasamy G., Rogers M.B., Roos D.S., Ross C., Sivam D., Smith D.F., Srinivasamoorthy G., Stoeckert C.J., Jr., Subramanian S., Thibodeau R., Tivey A., Treatman C., Velarde G. & Wang H. (2010) TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. *Nucleic Acids Res* **38**, D457-62.
- Atwood J.A., 3rd, Weatherly D.B., Minning T.A., Bundy B., Cavola C., Opperdoes F.R., Orlando R. & Tarleton R.L. (2005) The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science* **309**, 473-6.
- Azambuja P. & Garcia E.S. (2005) *Trypanosoma rangeli* interactions within the vector *Rhodnius prolixus*: a mini review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **100**, 567-72.
- Bannai H., Tamada Y., Maruyama O., Nakai K. & Miyano S. (2002) Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. *Bioinformatics* **18**, 298-305.
- Barnabe C., Brisse S. & Tibayrenc M. (2000) Population structure and genetic typing of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: a multilocus enzyme electrophoresis approach. *Parasitology* **120 (Pt 5)**, 513-26.
- Barrio A.B., Van Voorhis W.C. & Basombrio M.A. (2007) *Trypanosoma cruzi*: attenuation of virulence and protective immunogenicity after monoallelic disruption of the cub gene. *Exp Parasitol* **117**, 382-9.
- Barton N., Briggs D., Eisen J., Goldstein D. & Patel N. (2007) Species and speciation. In: *Evolution* (ed. by Press CSHL), pp. 619-56, New York, USA.

- Bayer Santos E., Marques Sincero T.C., Hermes Stoco P., Steindel M. & Grisard E.C. (2006) Trends on *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* research. *Acta biológica venezuelica* **26**, 35-47.
- Bayer-Santos E., Aguilar-Bonavides C., Rodrigues S.P., Cordero E.M., Marques A.F., Varela-Ramirez A., Choi H., Yoshida N., da Silveira J.F. & Almeida I.C. (2013) Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* secretome: characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins. *J Proteome Res* **12**, 883-97.
- Bayona J.C., Nakayasu E.S., Laverriere M., Aguilar C., Sobreira T.J., Choi H., Nesvizhskii A.I., Almeida I.C., Cazzulo J.J. & Alvarez V.E. (2011) SUMOylation pathway in *Trypanosoma cruzi*: functional characterization and proteomic analysis of target proteins. *Mol Cell Proteomics* **10**, M110 007369.
- Berg J., Tymoczko J. & L.L.S. (2002) *Biochemistry 5th edition*. WH Freeman, New York.
- Bontempi E.J., Garcia G.A., Buschiazzo A., Henriksson J., Pravia C.A., Ruiz A.M., Pettersson U. & Pszeny V. (2000) The tyrosine aminotransferase from *Trypanosoma rangeli*: sequence and genomic characterization. *FEMS Microbiol Lett* **189**, 253-7.
- Bordoli L., Kiefer F., Arnold K., Benkert P., Battey J. & Schwede T. (2009) Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nat Protoc* **4**, 1-13.
- Brandt U. (2006) Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I). *Annu Rev Biochem* **75**, 69-92.
- Bryant C., Hubbard L. & McElroy W.D. (1991) Cloning, nucleotide sequence, and expression of the nitroreductase gene from *Enterobacter cloacae*. *J Biol Chem* **266**, 4126-30.
- Bryant D.W., McCalla D.R., Leeksma M. & Laneville P. (1981) Type I nitroreductases of *Escherichia coli*. *Can J Microbiol* **27**, 81-6.
- Bua J., Ruiz A.M., Potenza M. & Fichera L.E. (2004) In vitro anti-parasitic activity of Cyclosporin A analogs on *Trypanosoma cruzi*. *Bioorg Med Chem Lett* **14**, 4633-7.
- Burleigh B.A. & Woolsey A.M. (2002) Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cell Microbiol* **4**, 701-11.
- Caradonna K.L. & Burleigh B.A. (2011) Mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Adv Parasitol* **76**, 33-61.
- Claros M.G. & Vincens P. (1996) Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem* **241**, 779-86.
- Clayton C. & Shapira M. (2007) Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Mol Biochem Parasitol* **156**, 93-101.
- Cohen-Freue G., Holzer T.R., Forney J.D. & McMaster W.R. (2007) Global gene expression in *Leishmania*. *Int J Parasitol* **37**, 1077-86.
- Coura J.R. & Borges-Pereira J. (2010) Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop* **115**, 5-13.
- Cristodero M., Seebeck T. & Schneider A. (2010) Mitochondrial translation is essential in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol* **78**, 757-69.
- Cuba Cuba A. (1998) [Review of the biologic and diagnostic aspects of *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli*]. *Rev Soc Bras Med Trop* **31**, 207-20.

- Cuervo C., Lopez M.C. & Puerta C. (2006) The *Trypanosoma rangeli* histone H2A gene sequence serves as a differential marker for KP1 strains. *Infect Genet Evol* **6**, 401-9.
- Cuervo C., Thomas M.C., Lopez M.C. & Puerta C.J. (2013) Sequence polymorphism in the *Trypanosoma rangeli* HSP70 coding genes allows typing of the parasite KP1(+) and KP1(-) groups. *Exp Parasitol* **133**, 447-53.
- Cuervo P., Domont G.B. & De Jesus J.B. (2010) Proteomics of trypanosomatids of human medical importance. *J Proteomics* **73**, 845-67.
- Cyert M.S., Kunisawa R., Kaim D. & Thorner J. (1991) Yeast has homologs (CNA1 and CNA2 gene products) of mammalian calcineurin, a calmodulin-regulated phosphoprotein phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7376-80.
- D' Alessandro A. & Saravia N.G. (1992) *Parasitic Protozoa*. Academic Press, San Diego.
- de Souza W., de Carvalho T.M. & Barrias E.S. (2010) Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *Int J Cell Biol* **2010**.
- Deschamps P., Lara E., Marande W., Lopez-Garcia P., Ekelund F. & Moreira D. (2011) Phylogenomic analysis of kinetoplastids supports that trypanosomatids arose from within bodonids. *Mol Biol Evol* **28**, 53-8.
- Diez H., Thomas M.C., Uruena C.P., Santander S.P., Cuervo C.L., Lopez M.C. & Puerta C.J. (2005) Molecular characterization of the kinetoplastid membrane protein-11 genes from the parasite *Trypanosoma rangeli*. *Parasitology* **130**, 643-51.
- Eck R. & Dayhoff M. (1966) *Atlas of Protein Sequence and Structure*, Silver Spring, Maryland.
- Eger-Mangrich I., de Oliveira M.A., Grisard E.C., De Souza W. & Steindel M. (2001) Interaction of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 with different cell lines in vitro. *Parasitol Res* **87**, 505-9.
- El-Sayed N.M., Myler P.J., Blandin G., Berriman M., Crabtree J., Aggarwal G., Caler E., Renauld H., Worthey E.A., Hertz-Fowler C., Ghedin E., Peacock C., Bartholomeu D.C., Haas B.J., Tran A.N., Wortman J.R., Alsmark U.C., Angiuoli S., Anupama A., Badger J., Bringaud F., Cadag E., Carlton J.M., Cerqueira G.C., Creasy T., Delcher A.L., Djikeng A., Embley T.M., Hauser C., Ivens A.C., Kummerfeld S.K., Pereira-Leal J.B., Nilsson D., Peterson J., Salzberg S.L., Shallom J., Silva J.C., Sundaram J., Westenberger S., White O., Melville S.E., Donelson J.E., Andersson B., Stuart K.D. & Hall N. (2005) Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science* **309**, 404-9.
- Fernandes O., Santos S.S., Cupolillo E., Mendonca B., Derre R., Junqueira A.C., Santos L.C., Sturm N.R., Naiff R.D., Barret T.V., Campbell D.A. & Coura J.R. (2001) A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Brazilian Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **95**, 97-9.
- Franzen O., Ochaya S., Sherwood E., Lewis M.D., Llewellyn M.S., Miles M.A. & Andersson B. (2011) Shotgun sequencing analysis of *Trypanosoma cruzi* I Sylvio X10/1 and comparison with *T. cruzi* VI CL Brener. *PLoS Negl Trop Dis* **5**, e984.
- Freitas L.M., dos Santos S.L., Rodrigues-Luiz G.F., Mendes T.A., Rodrigues T.S., Gazzinelli R.T., Teixeira S.M., Fujiwara R.T. & Bartholomeu D.C. (2011) Genomic analyses, gene expression and antigenic profile of the trans-sialidase

- superfamily of *Trypanosoma cruzi* reveal an undetected level of complexity. *PLoS One* **6**, e25914.
- Garcia E.S., Castro D.P., Figueiredo M.B. & Azambuja P. (2012) Parasite-mediated interactions within the insect vector: *Trypanosoma rangeli* strategies. *Parasit Vectors* **5**, 105.
- Garcia E.S., Castro D.P., Figueiredo M.B., Genta F.A. & Azambuja P. (2009) *Trypanosoma rangeli*: a new perspective for studying the modulation of immune reactions of *Rhodnius prolixus*. *Parasit Vectors* **2**, 33.
- Garcia E.S., Gonzalez M.S., de Azambuja P., Baralle F.E., Fraidenaich D., Torres H.N. & Flawia M.M. (1995) Induction of *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis in the gut of the hematophagous insect vector, *Rhodnius prolixus*, by hemoglobin and peptides carrying alpha D-globin sequences. *Exp Parasitol* **81**, 255-61.
- Garcia E.S., Mello C.B., Azambuja P. & Ribeiro J.M. (1994) *Rhodnius prolixus*: salivary antihemostatic components decrease with *Trypanosoma rangeli* infection. *Exp Parasitol* **78**, 287-93.
- Gomes S.A., Fonseca de Souza A.L., Silva B.A., Kiffer-Moreira T., Santos-Mallet J.R., Santos A.L. & Meyer-Fernandes J.R. (2006) *Trypanosoma rangeli*: Differential expression of cell surface polypeptides and ecto-phosphatase activity in short and long epimastigote forms. *Exp Parasitol* **112**, 253-62.
- Goringer H.U. (2012) 'Gestalt,' composition and function of the *Trypanosoma brucei* editosome. *Annu Rev Microbiol* **66**, 65-82.
- Grisard E.C., Campbell D.A. & Romanha A.J. (1999a) Mini-exon gene sequence polymorphism among *Trypanosoma rangeli* strains isolated from distinct geographical regions. *Parasitology* **118 (Pt 4)**, 375-82.
- Grisard E.C., Steindel M., Guarneri A.A., Eger-Mangrich I., Campbell D.A. & Romanha A.J. (1999b) Characterization of *Trypanosoma rangeli* strains isolated in Central and South America: an overview. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **94**, 203-9.
- Grisard E.C., Stoco P.H., Wagner G., Sincero T.C., Rotava G., Rodrigues J.B., Snoeijer C.Q., Koerich L.B., Sperandio M.M., Bayer-Santos E., Fragoso S.P., Goldenberg S., Triana O., Vallejo G.A., Tyler K.M., Davila A.M. & Steindel M. (2010) Transcriptomic analyses of the avirulent protozoan parasite *Trypanosoma rangeli*. *Mol Biochem Parasitol* **174**, 18-25.
- Guhl F. (2007) Chagas disease in Andean countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **102 Suppl 1**, 29-38.
- Guhl F., Jaramillo C., Carranza J.C. & Vallejo G.A. (2002) Molecular characterization and diagnosis of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli*. *Arch Med Res* **33**, 362-70.
- Guhl F. & Ramirez J.D. (2013) Retrospective molecular integrated epidemiology of Chagas disease in Colombia. *Infect Genet Evol* **20**, 148-54.
- Guhl F. & Vallejo G.A. (2003) *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920: an updated review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **98**, 435-42.
- Hajduk S. & Ochsenreiter T. (2010) RNA editing in kinetoplastids. *RNA Biol* **7**, 229-36.
- Hall B.S., Bot C. & Wilkinson S.R. (2011) Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. *J Biol Chem* **286**, 13088-95.

- Hall B.S., Meredith E.L. & Wilkinson S.R. (2012) Targeting the substrate preference of a type I nitroreductase to develop antitrypanosomal quinone-based prodrugs. *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 5821-30.
- Hotez P.J., Fenwick A., Savioli L. & Molyneux D.H. (2009) Rescuing the bottom billion through control of neglected tropical diseases. *Lancet* **373**, 1570-5.
- Humphrey W., Dalke A. & Schulten K. (1996) VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* **14**, 33-8, 27-8.
- Kota P., Ding F., Ramachandran S. & Dokholyan N.V. (2011) Gaia: automated quality assessment of protein structure models. *Bioinformatics* **27**, 2209-15.
- Krissinel E. & Henrick K. (2004) Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**, 2256-68.
- Kulkarni M.M., Karafova A., Kamysz W., Schenkman S., Pelle R. & McGwire B.S. (2013) Secreted trypanosome cyclophilin inactivates lytic insect defense peptides and induces parasite calcineurin activation and infectivity. *J Biol Chem* **288**, 8772-84.
- Laskowski R.A. (2009) PDBsum new things. *Nucleic Acids Res* **37**, D355-9.
- Laskowski R.A., Chistyakov V.V. & Thornton J.M. (2005) PDBsum more: new summaries and analyses of the known 3D structures of proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res* **33**, D266-8.
- Leonard G., Soanes D.M. & Stevens J.R. (2011) Resolving the question of trypanosome monophyly: a comparative genomics approach using whole genome data sets with low taxon sampling. *Infect Genet Evol* **11**, 955-9.
- Letunic I., Doerks T. & Bork P. (2012) SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Res* **40**, D302-5.
- Maia Da Silva F., Junqueira A.C., Campaner M., Rodrigues A.C., Crisante G., Ramirez L.E., Caballero Z.C., Monteiro F.A., Coura J.R., Anez N. & Teixeira M.M. (2007) Comparative phylogeography of *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vectors. *Mol Ecol* **16**, 3361-73.
- Maia da Silva F., Marcili A., Lima L., Cavazzana M., Jr., Ortiz P.A., Campaner M., Takeda G.F., Paiva F., Nunes V.L., Camargo E.P. & Teixeira M.M. (2009) *Trypanosoma rangeli* isolates of bats from Central Brazil: genotyping and phylogenetic analysis enable description of a new lineage using spliced-leader gene sequences. *Acta Trop* **109**, 199-207.
- Maia da Silva F., Rodrigues A.C., Campaner M., Takata C.S., Brigido M.C., Junqueira A.C., Coura J.R., Takeda G.F., Shaw J.J. & Teixeira M.M. (2004) Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma rangeli* and allied species from human, monkeys and other sylvatic mammals of the Brazilian Amazon disclosed a new group and a species-specific marker. *Parasitology* **128**, 283-94.
- Manning-Cela R., Cortes A., Gonzalez-Rey E., Van Voorhis W.C., Swindle J. & Gonzalez A. (2001) LYT1 protein is required for efficient in vitro infection by *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* **69**, 3916-23.
- Marchler-Bauer A., Lu S., Anderson J.B., Chitsaz F., Derbyshire M.K., DeWeese-Scott C., Fong J.H., Geer L.Y., Geer R.C., Gonzales N.R., Gwadz M., Hurwitz D.I., Jackson J.D., Ke Z., Lanczycki C.J., Lu F., Marchler G.H., Mullokandov M., Omelchenko

- M.V., Robertson C.L., Song J.S., Thanki N., Yamashita R.A., Zhang D., Zhang N., Zheng C. & Bryant S.H. (2011) CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res* **39**, D225-9.
- Martinez-Calvillo S., Vizuet-de-Rueda J.C., Florencio-Martinez L.E., Manning-Cela R.G. & Figueroa-Angulo E.E. (2010) Gene expression in trypanosomatid parasites. *J Biomed Biotechnol* **2010**, 525241.
- Maurer-Stroh S., Eisenhaber B. & Eisenhaber F. (2002) N-terminal N-myristoylation of proteins: refinement of the sequence motif and its taxon-specific differences. *J Mol Biol* **317**, 523-40.
- McGuffin L.J. & Roche D.B. (2010) Rapid model quality assessment for protein structure predictions using the comparison of multiple models without structural alignments. *Bioinformatics* **26**, 182-8.
- Medina-Acosta E., Franco A.M., Jansen A.M., Sampol M., Neves N., Pontes-de-Carvalho L., Grimaldi Junior G. & Nussenzweig V. (1994) Trans-sialidase and sialidase activities discriminate between morphologically indistinguishable trypanosomatids. *Eur J Biochem* **225**, 333-9.
- Mejia A.M., Hall B.S., Taylor M.C., Gomez-Palacio A., Wilkinson S.R., Triana-Chavez O. & Kelly J.M. (2012) Benzimidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi* is a readily acquired trait that can arise independently in a single population. *J Infect Dis* **206**, 220-8.
- Mejia-Jaramillo A.M., Fernandez G.J., Palacio L. & Triana-Chavez O. (2011) Gene expression study using real-time PCR identifies an NTR gene as a major marker of resistance to benznidazole in *Trypanosoma cruzi*. *Parasit Vectors* **4**, 169.
- Miles M.A. & Cibulskis R.E. (1986) Zymodeme characterization of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today* **2**, 94-7.
- Miletti L.C., Koerich L.B., Pacheco L.K., Steindel M. & Stambuk B.U. (2006) Characterization of D-glucose transport in *Trypanosoma rangeli*. *Parasitology* **133**, 721-7.
- Minning T.A., Weatherly D.B., Atwood J., 3rd, Orlando R. & Tarleton R.L. (2009) The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics* **10**, 370.
- Montenegro M., Cardenas C., Cuervo C., Bernal C., Grisard E.C., Thomas M.C., Lopez M.C. & Puerta C.J. (2013) Molecular characterization of calcineurin B from the non-virulent *Trypanosoma rangeli* kinetoplastid indicates high gene conservation. *Mol Biol Rep* **40**, 4901-12.
- Moreno V.R., Aguero F., Tekiel V. & Sanchez D.O. (2007) The Calcineurin A homologue from *Trypanosoma cruzi* lacks two important regulatory domains. *Acta Trop* **101**, 80-9.
- Muller J., Schildknecht P. & Muller N. (2013) Metabolism of nitro drugs metronidazole and nitazoxanide in *Giardia lamblia*: characterization of a novel nitroreductase (GlnR2). *J Antimicrob Chemother* **68**, 1781-9.
- Murta S.M., Krieger M.A., Montenegro L.R., Campos F.F., Probst C.M., Avila A.R., Muto N.H., de Oliveira R.C., Nunes L.R., Nirde P., Bruna-Romero O., Goldenberg S. & Romanha A.J. (2006) Deletion of copies of the gene encoding old yellow enzyme (TcOYE), a NAD(P)H flavin oxidoreductase, associates with in vitro

- induced benzimidazole resistance in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* **146**, 151-62.
- Naderer T., Dandash O. & McConville M.J. (2011) Calcineurin is required for *Leishmania major* stress response pathways and for virulence in the mammalian host. *Mol Microbiol* **80**, 471-80.
- Nei M. & Kumar S. (2000) *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, Oxford ; New York.
- Neres J., Bryce R.A. & Douglas K.T. (2008) Rational drug design in parasitology: transalidase as a case study for Chagas disease. *Drug Discov Today* **13**, 110-7.
- Nillius D., Muller J. & Muller N. (2011) Nitroreductase (GlnR1) increases susceptibility of *Giardia lamblia* and *Escherichia coli* to nitro drugs. *J Antimicrob Chemother* **66**, 1029-35.
- Nocua P., Gomez C., Cuervo C. & Puerta C. (2009) Cl gene cluster encoding several small nucleolar RNAs: a comparison amongst trypanosomatids. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **104**, 473-80.
- Noireau F., Diosque P. & Jansen A.M. (2009) *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. *Vet Res* **40**, 26.
- Odom A., Muir S., Lim E., Toffaletti D.L., Perfect J. & Heitman J. (1997) Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *EMBO J* **16**, 2576-89.
- Osorio L., Rios I., Gutierrez B. & Gonzalez J. (2012) Virulence factors of *Trypanosoma cruzi*: who is who? *Microbes Infect* **14**, 1390-402.
- Pal D., Banerjee S., Cui J., Schwartz A., Ghosh S.K. & Samuelson J. (2009) *Giardia*, *Entamoeba*, and *Trichomonas* enzymes activate metronidazole (nitroreductases) and inactivate metronidazole (nitroimidazole reductases). *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 458-64.
- Parkinson G.N., Skelly J.V. & Neidle S. (2000) Crystal structure of FMN-dependent nitroreductase from *Escherichia coli* B: a prodrug-activating enzyme. *J Med Chem* **43**, 3624-31.
- Pavia P.X., Thomas M.C., Lopez M.C. & Puerta C.J. (2012) Molecular characterization of the short interspersed repetitive element SIRE in the six discrete typing units (DTUs) of *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol* **132**, 144-50.
- Pearson W.R. (1990) Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods Enzymol* **183**, 63-98.
- Perez Brandan C., Padilla A.M., Xu D., Tarleton R.L. & Basombrio M.A. (2011) Knockout of the dhfr-ts gene in *Trypanosoma cruzi* generates attenuated parasites able to confer protection against a virulent challenge. *PLoS Negl Trop Dis* **5**, e1418.
- Perez C.J., Lymbery A.J. & Thompson R.C. (2014) Chagas disease: the challenge of polyparasitism? *Trends Parasitol* **30**, 176-82.
- Peterson F.J., Mason R.P., Hovsepian J. & Holtzman J.L. (1979) Oxygen-sensitive and -insensitive nitroreduction by *Escherichia coli* and rat hepatic microsomes. *J Biol Chem* **254**, 4009-14.
- Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C. & Ferrin T.E. (2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **25**, 1605-12.

- Plochocka-Zulinska D., Rasmussen G. & Rasmussen C. (1995) Regulation of calcineurin gene expression in *Schizosaccharomyces pombe*. Dependence on the ste11 transcription factor. *J Biol Chem* **270**, 24794-9.
- Price H.P., Menon M.R., Panethymitaki C., Goulding D., McKean P.G. & Smith D.F. (2003) Myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase, an essential enzyme and potential drug target in kinetoplastid parasites. *J Biol Chem* **278**, 7206-14.
- Prieto I., Hervas-Stubbs S., Garcia-Granero M., Berasain C., Riezu-Boj J.I., Lasarte J.J., Sarobe P., Prieto J. & Borrás-Cuesta F. (1995) Simple strategy to induce antibodies of distinct specificity: application to the mapping of gp120 and inhibition of HIV-1 infectivity. *Eur J Immunol* **25**, 877-83.
- Prokisch H., Yarden O., Dieminger M., Tropschug M. & Barthelmess I.B. (1997) Impairment of calcineurin function in *Neurospora crassa* reveals its essential role in hyphal growth, morphology and maintenance of the apical Ca²⁺ gradient. *Mol Gen Genet* **256**, 104-14.
- Puerta C., Cuervo P., Thomas M.C. & Lopez M.C. (2000) Molecular characterization of the histone H2A gene from the parasite *Trypanosoma rangeli*. *Parasitol Res* **86**, 916-22.
- Puerta C.J., Sincero T.C., Stoco P.H., Cuervo C. & Grisard E.C. (2009) Comparative analysis of *Trypanosoma rangeli* histone H2A gene intergenic region with distinct intraspecific lineage markers. *Vector Borne Zoonotic Dis* **9**, 449-56.
- Pulido X.C., Perez G. & Vallejo G.A. (2008) Preliminary characterization of a *Rhodnius prolixus* hemolymph trypanolytic protein, this being a determinant of *Trypanosoma rangeli* KP1(+) and KP1(-) subpopulations' vectorial ability. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **103**, 172-9.
- Punta M., Coggill P.C., Eberhardt R.Y., Mistry J., Tate J., Boursnell C., Pang N., Forslund K., Ceric G., Clements J., Heger A., Holm L., Sonnhammer E.L., Eddy S.R., Bateman A. & Finn R.D. (2012) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* **40**, D290-301.
- Ramachandran S., Kota P., Ding F. & Dokholyan N.V. (2011) Automated minimization of steric clashes in protein structures. *Proteins* **79**, 261-70.
- Rassi A., Jr., Rassi A. & Marin-Neto J.A. (2010) Chagas disease. *Lancet* **375**, 1388-402.
- Ribeiro J.M., Schneider M., Isaias T., Jurberg J., Galvao C. & Guimaraes J.A. (1998) Role of salivary antihemostatic components in blood feeding by triatomine bugs (Heteroptera). *J Med Entomol* **35**, 599-610.
- Roy A., Kucukural A. & Zhang Y. (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* **5**, 725-38.
- Rusnak F. & Mertz P. (2000) Calcineurin: form and function. *Physiol Rev* **80**, 1483-521.
- Saitou N. & Nei M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406-25.
- Sambrook J., Russell D.W. & Sambrook J. (2006) *The condensed protocols from Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanger F., Nicklen S. & Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-7.
- Sibley L.D. (2011) Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. *Immunol Rev* **240**, 72-91.

- Sigrist C.J., de Castro E., Cerutti L., Cuche B.A., Hulo N., Bridge A., Bougueleret L. & Xenarios I. (2013) New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Res* **41**, D344-7.
- Souto R.P., Fernandes O., Macedo A.M., Campbell D.A. & Zingales B. (1996) DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* **83**, 141-52.
- Steinbach W.J., Reedy J.L., Cramer R.A., Jr., Perfect J.R. & Heitman J. (2007) Harnessing calcineurin as a novel anti-infective agent against invasive fungal infections. *Nat Rev Microbiol* **5**, 418-30.
- Steindel M., Dias Neto E., de Menezes C.L., Romanha A.J. & Simpson A.J. (1993) Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. *Mol Biochem Parasitol* **60**, 71-9.
- Steindel M., Dias Neto E., Pinto C.J., Grisard E.C., Menezes C.L., Murta S.M., Simpson A.J. & Romanha A.J. (1994) Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and isoenzyme analysis of *Trypanosoma rangeli* strains. *J Eukaryot Microbiol* **41**, 261-7.
- Stevens J.R., Teixeira M.M., Bingle L.E. & Gibson W.C. (1999) The taxonomic position and evolutionary relationships of *Trypanosoma rangeli*. *Int J Parasitol* **29**, 749-57.
- Stie J. & Fox D. (2008) Calcineurin regulation in fungi and beyond. *Eukaryot Cell* **7**, 177-86.
- Subramaniam S. (1998) The Biology Workbench--a seamless database and analysis environment for the biologist. *Proteins* **32**, 1-2.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. & Kumar S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**, 2731-9.
- Tanowitz H.B., Machado F.S., Jelicks L.A., Shirani J., de Carvalho A.C., Spray D.C., Factor S.M., Kirchhoff L.V. & Weiss L.M. (2009) Perspectives on *Trypanosoma cruzi*-induced heart disease (Chagas disease). *Prog Cardiovasc Dis* **51**, 524-39.
- Teixeira A.R., Nascimento R.J. & Sturm N.R. (2006) Evolution and pathology in chagas disease--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **101**, 463-91.
- Tejera E. (1920) Un nouveau Flagelle de *Rhodnius prolixus*, *Trypanosoma* ou *Crithidia rangeli* n. sp. . *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique Paris* **13** 527-30.
- Tibayrenc M. (1998) Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *Int J Parasitol* **28**, 85-104.
- Urdaneta-Morales S. & Tejero F. (1986) *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920. Intracellular amastigote stages of reproduction in white mice. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **28**, 166-9.
- Urrea D.A., Carranza J.C., Cuba C.A., Gurgel-Goncalves R., Guhl F., Schofield C.J., Triana O. & Vallejo G.A. (2005) Molecular characterisation of *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius ecuadoriensis* in Peru, *R. colombiensis* in Colombia and *R. pallescens* in Panama, supports a co-evolutionary association between parasites and vectors. *Infect Genet Evol* **5**, 123-9.
- Urrea D.A., Guhl F., Herrera C.P., Falla A., Carranza J.C., Cuba-Cuba C., Triana-Chavez O., Grisard E.C. & Vallejo G.A. (2011) Sequence analysis of the spliced-leader

- intergenic region (SL-IR) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) of *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius ecuadoriensis*, *R. colombiensis*, *R. pallescens* and *R. prolixus* suggests a degree of co-evolution between parasites and vectors. *Acta Trop* **120**, 59-66.
- Vallejo G.A., Guhl F., Carranza J.C., Lozano L.E., Sanchez J.L., Jaramillo J.C., Gualtero D., Castaneda N., Silva J.C. & Steindel M. (2002) kDNA markers define two major *Trypanosoma rangeli* lineages in Latin-America. *Acta Trop* **81**, 77-82.
- Vallejo G.A., Guhl F., Carranza J.C., Moreno J., Triana O. & Grisard E.C. (2003) Parity between kinetoplast DNA and mini-exon gene sequences supports either clonal evolution or speciation in *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius colombiensis*, *R. pallescens* and *R. prolixus* in Colombia. *Infect Genet Evol* **3**, 39-45.
- Vallejo G.A., Guhl F. & Schaub G.A. (2009) Triatominae-*Trypanosoma cruzi*/*T. rangeli*: Vector-parasite interactions. *Acta Trop* **110**, 137-47.
- Voak A.A., Gobalakrishnapillai V., Seifert K., Balczó E., Hu L., Hall B.S. & Wilkinson S.R. (2013) An essential type I nitroreductase from *Leishmania major* can be used to activate leishmanicidal prodrugs. *J Biol Chem* **288**, 28466-76.
- Wagner G., Eiko Yamanaka L., Moura H., Denardin Luckemeyer D., Schindwein A.D., Hermes Stoco P., Bunselmeyer Ferreira H., Robert Barr J., Steindel M. & Grisard E.C. (2013) The *Trypanosoma rangeli* trypomastigote surfaceome reveals novel proteins and targets for specific diagnosis. *J Proteomics* **82**, 52-63.
- Watanabe M., Nishino T., Takio K., Sofuni T. & Nohmi T. (1998) Purification and characterization of wild-type and mutant "classical" nitroreductases of *Salmonella typhimurium*. L33R mutation greatly diminishes binding of FMN to the nitroreductase of *S. typhimurium*. *J Biol Chem* **273**, 23922-8.
- Whiteway J., Koziarz P., Veall J., Sandhu N., Kumar P., Hoecher B. & Lambert I.B. (1998) Oxygen-insensitive nitroreductases: analysis of the roles of nfsA and nfsB in development of resistance to 5-nitrofurantoin derivatives in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **180**, 5529-39.
- Wiederstein M. & Sippl M.J. (2007) ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res* **35**, W407-10.
- Wilkinson S.R., Taylor M.C., Horn D., Kelly J.M. & Cheeseman I. (2008) A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 5022-7.
- Wyllie S., Patterson S. & Fairlamb A.H. (2013) Assessing the essentiality of *Leishmania donovani* nitroreductase and its role in nitro drug activation. *Antimicrob Agents Chemother* **57**, 901-6.
- Wyllie S., Patterson S., Stojanovski L., Simeons F.R., Norval S., Kime R., Read K.D. & Fairlamb A.H. (2012) The anti-trypanosome drug fexinidazole shows potential for treating visceral leishmaniasis. *Science Translational Medicine* **4**, 119re1.
- Yagi T. (1991) Bacterial NADH-quinone oxidoreductases. *J Bioenerg Biomembr* **23**, 211-25.
- Zenno S., Koike H., Kumar A.N., Jayaraman R., Tanokura M. & Saigo K. (1996a) Biochemical characterization of NfsA, the *Escherichia coli* major nitroreductase

- exhibiting a high amino acid sequence homology to Frp, a *Vibrio harveyi* flavin oxidoreductase. *J Bacteriol* **178**, 4508-14.
- Zenno S., Koike H., Tanokura M. & Saigo K. (1996b) Gene cloning, purification, and characterization of NfsB, a minor oxygen-insensitive nitroreductase from *Escherichia coli*, similar in biochemical properties to FRase I, the major flavin reductase in *Vibrio fischeri*. *J Biochem* **120**, 736-44.
- Zhang Y. (2008) I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* **9**, 40.
- Zingales B., Andrade S.G., Briones M.R., Campbell D.A., Chiari E., Fernandes O., Guhl F., Lages-Silva E., Macedo A.M., Machado C.R., Miles M.A., Romanha A.J., Sturm N.R., Tibayrenc M., Schijman A.G. & Second Satellite M. (2009) A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **104**, 1051-4.

11. ANEXOS

11.1 Amplificación, clonación y secuenciación genes *ntr* y *cnb* de *T. rangeli* Choachí y SC-58

11.1.1 *ntr*

Se presentan las condiciones de reacción y perfil térmico para la amplificación del gen en ambas cepas.

Tabla 30A Condiciones de la mezcla de reacción

Reactivo	Concentración final
Buffer	1X
Cloruro de magnesio	1,5 mM
dNTPs	200 μ M
NTR-FW	20 pmol
NTR-RW	20 pmol
Taq polimerasa (Roche)	0,052 U/ μ l
ADN	125 ng
Volumen final	25 μl
Fragmento esperado de 935 pb	

Tabla 30B Programa de la PCR

	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Denaturación inicial	95 °C	5 min	1
Denaturación	95 °C	1 min	35
Anillaje	50 °C	1 min	
Extensión	72 °C	1 min	
Extensión final	72 °C	8 min	1

Los productos de 890 pb fueron clonados y enviados a secuenciación. Las figuras 86-89 muestran las secuencias obtenidas.

```

1 GAGAAATGGC ATAAAAAGAG GCCTGTGGGA CTCTGTGCAG TCGTACTGGC GCTGGAAGCA
61 GTCAAACGTC GCCGCGGCGG TCGTCCGCGG CAGGAAGAAT GGGGGCCGCG GTGAGGCGGG
121 GTTGGGGCAC GGGAACGGGC CCACGTCCAC TTTTTTTTCCC TCTCTGATAT CATCCTCGTC
181 GCCGTTGGAT GCGGTGAAAG GCGTTGTGCG CGACCGTCGC AGTTGCAGGC GCTTTGACCC
241 AACACGGCCA GTTGACTTTG ACGTGCTGAA CGATATTCTC GCCCTGACGG TGCGGGCTCC
301 CACATCTCTG AACCTGCAGC CGTGGGTGGC TGTCGTGGTG TCGGAGGAGG AGCAGCGAGC
361 GGCACCTCTG CATGCGGCGC TGAGTCAGCC GCAGCCTCGC GACGCACCGG TGACAATTGT
421 GTTTGCCGGT GACATGGAGC CGGAGCGCAA TGCCCCGGCG GCACTGGAGC ATGGCCTTGA
481 GAGTGGCTAC TTGCACCCAA TGTATGGCGC AAACATCTG CGCAACACGT ACTATCTACT
541 TCACGGTGGC CCAGTAGAAT CCATCTCGCA CATTAACTCT TCCTGTCTG CGTGGTATAG
601 CAAGGCCACG GGCCACCCGC TGCTGTCCGT TCCGACAACC AAGCAGGGGT ATGCGTGGAA
661 GCAGGCGATG ATACCGGTGA CGACATTTCT GTACCTTGCC ACTGCGGCGG GGTGGTACAC
721 GAGCATTCTT GAGGGGTTG ACGAGGCGCA AGTGAAGCAG ATTGTAGGGC TACCGCCACG
781 TTTACTGTG CCGGTGATTA TGTGCGTTGG ATACGCGCGG AAGGACGGGT TTCACTCTGT
841 GCGCAGCCCA CGCTTGACA CGCGGCACTT GGTTCGGTGG GAAAGTTTT

```

Figura 86. Secuencia de nucleótidos del gen *ntr* de *T. rangeli* Choachí (Genbank: KC797656). Los números a la izquierda indican la posición de los nucleótidos en la secuencia.

```

1 RNGIKRGLWD SVQSYWRWKQ SNVAAAVVRG RKNNGRGEAG LGHGNGPTST FFPSLISSSS
61 PLDAVKGVVR DRRSCRRFDP TRPVDFDVLN DILALTVRAP TSLNLQPWVA VVCEEEQRA
121 ALSHAALSQP QPRDAPVTIV FAGDMEPERN APAALEHGLE SGYLHPMYGA NYLRNTYYLL
181 HGGPVESISH IKSFLSAWYS KATGHPLLSV PTTKQGYAWK QAMIPVTTFL YLATAAGFDT
241 SILEGFDEAQ VKQIVGLPPR FTVPVIMCVG YAAKDGFSV RSPRFDTRHL VRWGKF

```

Figura 87. Secuencia de aminoácidos de la proteína NTR de *T. rangeli* Choachí (Genbank: KC797656). Los números a la izquierda indican la posición de los aminoácidos en la secuencia.

```

1 GAGAAATGGC ATAAAAAGAG GCCTGTGGGA CTCTGTGCAG TCGTACTGGC GCTGGAAGCA
61 GTCAAACGTC GCCGCGGCGG TCGTCCGCGG CAGGAAGAAT GGGGGCCGCG GTGAGGCGGG
121 GTTGGGGCAC GGGAACGGGC CCACGTCCAC TTTTTTTTCCC TCTCTGATAT CATCCTCGTC
181 GCCGTTGGAT GCGGTGAAAG GCGTTGTGCG CGACCGTCGC AGTTGCAGGC GCTTTGACCC
241 AACACGGCCA GTTGACTTTG ACGTGCTGAA CGATATTCTC GCCCTGACGG TGCGGGCTCC
301 CACATCTCTG AACCTGCAGC CGTGGGTGGC TGTCGTGGTG TCGGAGGAGG AGCAGCGAGC
361 GGCACCTCTG CATGCGGCGC TGAGTCAGCC GCAGCCTCGC GACGCACCGG TGACAATTGT
421 GTTTGCCGGT GACATGGAGC CGGAGCGCAA TGCCCCGGCG GCACTGGAGC ATGGCCTTGA
481 GAGTGGCTAC TTGCACCCAA TGTATGGCGC AAACATCTG CGCAACACGT ACTATCTACT
541 TCACGGTGGC CCAGTAGAAT CCATCTCGCA CATTAACTCT TCCTGTCTG CGTGGTATAG
601 CAAGGCCACG GGCCACCCGC TGCTGTCCGT TCCGACAACC AAGCAGGGGT ATGCGTGGAA
661 GCAGGCGATG ATACCGGTGA CGACATTTCT GTACCTTGCC ACTGCGGCGG GGTGGTACAC
721 GAGCATTCTT GAGGGGTTG ACGAGGCGCA AGTGAAGCAG ATTGTAGGGC TACCGCCACG
781 TTTACTGTG CCGGTGATTA TGTGCGTTGG ATACGCGCGG AAGGACGGGT TTCACTCTGT
841 GCGCAGCCCA CGCTTGACA CGCGGCACTT GGTTCGGTGG GAAAGTTTT

```

Figura 88. Secuencia de nucleótidos del gen *ntr* de *T. rangeli* SC-58. Los números a la izquierda indican la posición de los nucleótidos en la secuencia.

1	RNGIKRGLWD	SVQSYWRWKQ	SNVAAAVVRG	RKNGGRGEAG	LGHGNGPTST	FFPSLISSSS
61	PLDAVKGVVR	DRRSCRRFDP	TRPVDFDVLN	DILALTVRAP	TSLNLQPWVA	VVVCREEQRA
121	ALSHAALSQP	QPRDAPVTIV	FAGDMEPERN	APAALHGLE	SGYLHPMYGA	NYLRNTYYLL
181	HGGPVESISH	IKSFLSAWYS	KATGHPLLSV	PTTKQGYAWK	QAMIPVTFL	YLATAAGFDT
241	SILEGFDEAQ	VKQIVGLPPR	FTVPVIMCVG	YAAKDFHVS	RSPRFDTRHL	VRWGKF

Figura 89. Secuencia de aminoácidos de la proteína NTR de *T. rangeli* SC-58. Los números a la izquierda indican la posición de los aminoácidos en la secuencia.

11.1.2 *cnb*

Se presentan las condiciones de reacción y perfil térmico para la amplificación del gen en ambas cepas.

Tabla 31A Condiciones de la mezcla de reacción con Taq correctora

Reactivo	Concentración final
Buffer y cloruro de magnesio	1X
dNTPs	200 µM
CaNB-ATG	20 pmol
CaNB-TAG	20 pmol
Taq polimerasa (Expand High fidelity PCR system de Roche)	0,052 U/µl
ADN	250 ng
Volumen final	25 µl
Fragmento esperado: 531 pb	

Tabla 32B. Programa de la PCR

	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Denaturación inicial	95 °C	5 min	1
Denaturación	95 °C	1 min	35
Anillaje	58 °C	45 s	
Extensión	72 °C	45 s	
Extensión final	72 °C	5 min	1

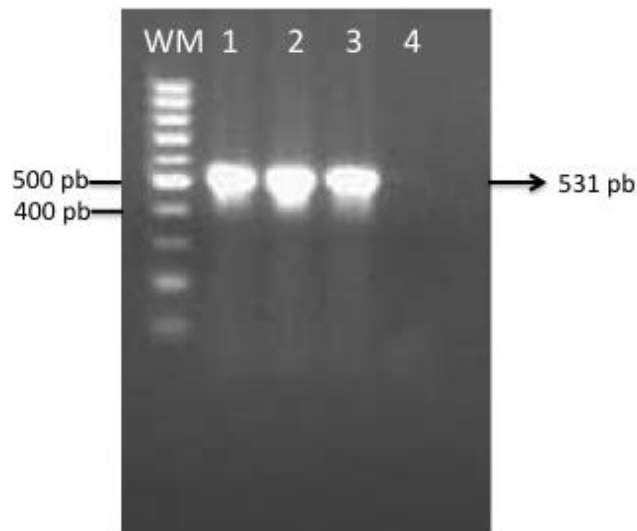


Figura 90. PCR del ADN de *T. rangeli* usando los iniciadores *CaNB-ATG/CaNB-TAG*. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Control positivo de la PCR: ADN de *T. rangeli* cepa Tre 15 µl de reacción (1), ADN de *T. rangeli* cepa Choachí (2); ADN de *T. rangeli* cepa SC58 (3); control de reacción con agua destilada (4). Se usó 1Kb plus (Invitrogen) como marcador de peso molecular (MW), cuyos pesos se indican a la derecha (pb).

Los productos de 531 pb fueron clonados y enviados a secuenciación. Las figuras 91-94 muestran las secuencias obtenidas.

```

1 ATGGATAACA GACCTGGACT CACTCCGGAA AAAATTCGGG AGTTGAAGGA GACAACGGTG
61 CTTTCTGAGG CGCAGATTCT TCGACTTCAT CAACGATTCA TGTTGCTTGA CCAGGCTGGT
121 CAAGGAGCTA TAACGGCAGA GGCGTTCAGT TCTATTGCCT CTGTGGCCTC AAACCCTCTC
181 CTAGGCCGCA TATTGGCGGT ATTGGATACA GCTGGTGATG GAAAAATTGA TTTTACGGAG
241 TTTGCAAAGA CGCTGGCCAT TTTTCCCCA CAGGCCGACA AGCTGGAGAA GCTGCGTTTT
301 ACCTACAAGA TGTACGACTT TGATGGCGAC GGCAAGATCA GCAACAGGGA CCTCTTTGAA
361 ACCCTGAAAA TCATGGTGGG AACAAACCTA ACGGAGGTTC AGTTGCAGCA GATTGTTGAC
421 AAAACATTCA TTGAGGTGGA TCTGGACCGT GACGGGTATA TTACATTTGA TGAATTTGAG
481 AAGTTAACAT TTTTGAACAA TTTTGGTGAT CGTCTCAACC TTTTCTTTTA G

```

Figura 91. Secuencia de nucleótidos del gen *cnb* de *T. rangeli* Choachí (Genbank: JX519575). Los números a la izquierda indican la posición de los nucleótidos en la secuencia.

```

1 MDNRPGLTPE KIRELKETTV LSEAQILRLH QRFMLLDQAG QGAITAEAFS SIASVASNPL
61 LGRILAVLDT AGDGKIDFTE FAKTLAIFSP QADKLEKLR F TYKMYDFDGD GKISNRDLFE
121 TLKIMVGTNL TEVQLQQIVD KTFIEVDLDR DGYITFDEFE KLTFLNNFGD RLNLFF

```

Figura 92. Secuencia de aminoácidos de la proteína CnB de *T. rangeli* Choachí (Genbank: AGE15431). Los números a la izquierda indican la posición de los aminoácidos en la secuencia.

```

1 ATGGATAACA GACCTGGACT CACTCCGGAA AAAATTCGGG AGTTGAAGGA GGCAACGGTG
61 CTTTCTGAGG CGCAGATTCT TCGACTTCAT CAACGATTCA TGTGCTTGA CCAGGCTGGT
121 CAAGGAGCTA TAACGGCAGA GGCGTTCAGT TCTATTGCCT CTGTGGCCTC AAACCCTCTC
181 CTAGGCCGCA TATTGGCGGT ATTGGATACA ACTGGTGATG GAAAAATTGA TTTTACGGAG
241 TTTGCAAAGA CGCTGGCCAT TTTTTCCCA CAGGCTGACA AGCTGGAGAA GCTGCGTTTT
301 ACCTACAAGA TGTACGACTT TGATGGCGAC GGCAAGATCA GCAACAAGGA CCTCTTTGAA
361 ACCCTGAAAA TCATGGTGGG AACAAACCTA ACGGAGGTTC AGTTGCAGCA GATTGTTGAC
421 AAAACATTCA TTGAGGTGGA TCTGGACCGT GACGGGTATA TTACATTTGA TGAATTTGAG
481 AAGTTGACAT TTTTGAACAA TTTTGGTGAT CGTCTCAACC TTTTCTTTTA G

```

Figura 93. Secuencia de nucleótidos del gen *cnb* de *T. rangeli* SC-58. Los números a la izquierda indican la posición de los nucleótidos en la secuencia.

```

1 MDNRPGLTPE KIRELKEATV LSEAQILRLH QRFMLLDQAG QGAITAEAFS SIASVASNPL
61 LGRILAVLDT TGDGKIDFTE FAKTLAIFSP QADKLEKLR F TYKMYDFDGD GKISNKDLFE
121 TLKIMVGTNL TEVQLQQIVD KTFIEVDLDR DGYITFDEFE KLTFLNNFGD RLNLFF

```

Figura 94. Secuencia de aminoácidos de la proteína CnB de *T. rangeli* Choachí SC-58. Los números a la izquierda indican la posición de los aminoácidos en la secuencia.

11.2 Secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las proteínas NTR tipo I y CnB reportadas para varias especies de tripanosomátidos

Se presenta la información relacionada a las secuencias reportadas para otros tripanosomátidos de los genes codificantes y las proteínas NTR tipo I y CnB en GenBank, GeneDB y TriTrypDB.

Tabla 33. Genes *ntr* reportados para varias especies de tripanosomátidos en las bases de datos GenBank, GeneDB y TriTrypDB

Especie	Código de la Secuencia	Descripción de la secuencia y procedencia	Tamaño de la región codificante	Localización
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Tc00.1047053506791.70	Nitroreductase partial mRNA Cepa CL non Esmeraldo like	942 pb	Cromosoma 28
	Tc00.1047053510611.60	Nitroreductase partial mRNA Cepa CL Esmeraldo like	939 pb	Cromosoma 28
	JF410861.1	Nitroreductase (NTR) gene, partial cds Aislado 058PUJ**	938 pb	ND
	ND	Cepa Sylvio X10/1 (Contig 4261)	945 pb	ND
	ND	Clon Jrcl.4 (Contig 44)	945 pb	ND
	scf7180000307541	Cepa Esmeraldo	945 pb	ND
<i>Trypanosoma rangeli</i>	ND	Cepa Tre**	890 pb	ND
	ND	Cepa Choachí**	890 pb	ND
	ND	Cepa SC58	890 pb	ND
<i>Trypanosoma brucei</i>	Tb927.7.7230	Nitroreductase (NTR) Cepa TREU927	963 pb	Cromosoma 7
	Tb427.07.7230	Nitroreductase (NTR) Cepa Lister 427	963 pb	Cromosoma 7
<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>	Tbg972.7.8530	Nitroreductase, putative, NADH dehydrogenase, putative Cepa DAL 972	963 pb	Cromosoma 7
<i>Trypanosoma congolense</i>	TcIL3000.0.00440	Unspecified product Cepa IL3000	855 pb	ND
<i>Trypanosoma vivax</i>	TvY486_0706850	Nitroreductase, putative,NADH dehydrogenase, putative Cepa Y486	942 pb	Cromosoma 7
<i>L. braziliensis</i>	LbrM.05.0650	Nitroreductase like-protein	888 pb	Cromosoma 5
<i>L. major</i>	LmjF.05.0660	Nitroreductase like-protein Cepa Friedlin	972 pb	Cromosoma 5

<i>L.mexicana mexicana</i>	LmxM.05.0660	Nitroreductase like-protein	948 pb	Cromosoma 5
<i>L.infantum</i>	LinJ.05.0660	Nitroreductase like-protein Cepa JPCM5	972	Cromosoma 5

****Secuencias obtenidas durante el curso de este proyecto; ND: Datos no disponibles**

Tabla 34. Proteína Nitroreductasa tipo I (NTR) reportada para varias especies de tripanosomátidos en las bases de datos GenBank, GeneDB y TriTrypDB

Especie	Código de la secuencia	Descripción de la secuencia y procedencia	Tamaño (aa)	Peso Molecular (kDa)
<i>Trypanosoma cruzi</i>	XP_812226.1	Nitroreductase Cepa CL Brener non Esmeraldo	313	34,747
	XP_810645.1	Nitroreductase Cepa CL Brener Esmeraldo	312	34,734
	AEM23728.1	Nitroreductase Aislado 058PUJ*	312	34,466**
	ND	Cepa Sylvio X10/1	314	34,783**
	ND	Clon Jrcl.4	314	34,783**
	ND	Cepa Esmeraldo	314	34,922**
<i>Trypanosoma rangeli</i>	ND	Cepa Tre*	296	32,456**
	ND	Cepa Choachí*	296	32,7
	ND	Cepa SC58*	296	32,7
<i>Trypanosoma brucei</i>	Tb927.7.7230	Nitroreductase (NTR) Cepa TREU927	320	35,523
	Tb427.07.7230	Nitroreductase (NTR) Cepa Lister 427	320	35,523
<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>	CBH13002.1	Nitroreductase, putative,NADH dehydrogenase, putative Cepa DAL 972	320	35,511
<i>Trypanosoma congolense</i>	CCD13725.1	Unnamed protein product Cepa IL3000	284	30,952
<i>Trypanosoma vivax</i>	TvY486_0706850	Nitroreductase, putative,NADH dehydrogenase, putative Cepa Y486	313	34,769
<i>L.braziliensis</i>	XP_001561879.1	Nitroreductase like- protein	295	31,840
<i>L. major</i>	XP_001687543.1	Nitroreductase like- protein Cepa Friedlin	323	34,673
<i>L.mexicana mexicana</i>	CBZ23423.1	Nitroreductase like- protein	315	34,020
<i>L.infantum</i>	XP_001463029.1	Nitroreductase like- protein Cepa JPCM5	323	34,591

ND: No disponible en la base de datos de NCBI; ***Secuencias obtenidas durante el curso de este proyecto**; ** Peso molecular estimado mediante la herramienta Gene runner.

Tabla 35. Genes *CnB* reportados para varias especies de tripanosomátidos en las bases de datos GenBank, GeneDB y TriTrypDB

Espece	Código de la Secuencia	Descripción de la secuencia y procedencia	Tamaño de la región codificante	Localización
<i>Trypanosoma cruzi</i>	EF375622	Calcineurin B subunit (CnB). Ceba CL.	531 pb	Cromosomas de 2,3 y 1,8 Mb*
	AJ878873	Protein phosphatase 2B, regulatory subunit (CnB gene). Ceba CL.	531 pb	ND
	AY570505	Protein phosphatase 2B regulatory subunit. Ceba G	531 pb	Cromosomas de 1,18 y 1,03 Mb*
	Tc00.104705350686 9.50	Calcineurin B subunit, putative Ceba CL Brener Esmeraldo-like	531 pb	Cromosoma 10
	Tc00.104705351051 9.60	Calcineurin B subunit, putative CL Brener non- Esmeraldo-like	531 pb	
	JN638994	Aislado 058PUJ**	531 pb	ND
	ND	Sylvio X10/1 (Contig 1013)	531 pb	ND
	ND	JRcl4 (Contig 9)	531 pb	ND
	scf7180000308132	Esmeraldo	531 pb	ND
<i>Trypanosoma rangeli</i>	JQ691947	Ceba Tre (Clon 1)**	531 pb	ND
	JQ691948	Ceba Tre (Clon 5)**	531 pb	ND
	JX519575	Ceba Choachi**	531 pb	ND
	ND	Ceba SC58	531 pb	ND
<i>Trypanosoma brucei</i>	Tb927.10.370	calcineurin B subunit cepa TREU927	540 pb	Cromosoma 10
	Tb427.10.370	calcineurin B subunit, putative Lister cepa 427	540 pb	
<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>	Tbg972.10.300	calcineurin B subunit, putative	540 pb	
<i>Trypanosoma congolense</i>	TcIL3000.10.230	Unspecified product	531 pb	
<i>Trypanosoma vivax</i>	TvY486_1000310	calcineurin B subunit, putative	540 pb	
<i>L. braziliensis</i>	LbrM21_V2.1920	calcineurin B subunit, putative	528 pb	Cromosoma 21
<i>L. major</i>	LmjF21.1630	calcineurin B subunit, putative. Ceba Friedlin.	528 pb	

<i>L.mexicana mexicana</i>	LmxM21.1630	calcineurin B subunit, putative	528 pb	
<i>L.infantum</i>	LinJ21_V3.1990	calcineurin B subunit, putative. Clon JPCM5	528 pb	

****Secuencias obtenidas durante el curso de este proyecto** *Referencia de datos obtenidos experimentalmente; ND: Datos no disponibles

Tabla 36. Proteínas relacionadas a Calcineurina reportadas para varias especies de tripanosomátidos en las bases de datos GenBank, GeneDB y TriTrypDB

Especie	Código de la secuencia	Descripción de la secuencia y procedencia	Tamaño (aa)	Peso Molecular (kDa)
<i>Trypanosoma cruzi</i>	ABO14295.1	Calcineurin B subunit Cepa CL	176	19***
	CAI48025.1	Protein phosphatase 2B, regulatory subunit Cepa CL	176	19,46**
	AAU10598	Protein phosphatase 2B regulatory subunit Cepa G	176	19***
	XP_808544.1	Calcineurin B subunit Cepa CL Brener Esmeraldo-like	176	19,43
	XP_812709	Calcineurin B subunit CL Brener non- Esmeraldo-like	176	19,45
	JN638994.1	Aislado 058PUJ*	176	19, 46**
	ND	Cepa Sylvio X10/1 (Contig 1013)	176	19, 496**
	ND	Clon JRcl4 (Contig 9)	176	19, 496**
	ND	Cepa Esmeraldo	176	19,437**
<i>Trypanosoma rangeli</i>	JQ691947.1	Cepa Tre (Clon 1)*	176	19,896**
	JQ691948.1	Cepa Tre (Clon 5)*	176	19,82**
	ND	Cepa Choachí*	176	19,955**
	ND	Cepa SC58	176	19,927**
<i>Trypanosoma brucei</i>	XP_822297.1	Calcineurin B subunit Cepa TREU927	179	19,873
	Tb427.10.370	Calcineurin B subunit, putative Cepa Lister 427	179	19, 871
<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>	CBH14949.1	Calcineurin B subunit, putative	179	19,87
<i>Trypanosoma congolense</i>	CCC93264.1	Unnamed protein product	176	19,703
<i>Trypanosoma vivax</i>	CCC50977.1	Putative calcineurin B subunit Cepa Y486	179	19,799

<i>Leishmania braziliensis</i>	CAM38972.1	Putative Calcineurin B subunit	175	19,746
<i>Leishmania major</i>	CAJ05036	Calcineurin B subunit, putative. Cepa Friedlin	175	19,66
<i>Leishmania mexicana mexicana</i>	LmxM21.1630	Calcineurin B subunit, putative	175	19,766
<i>Leishmania infantum</i>	CAM67880.1	Calcineurin B subunit, putative Clon JPCM5	175	19,64

***Secuencias obtenidas durante el curso de este proyecto ;** ND: No disponible en la base de datos de NCBI;** Peso molecular estimado mediante la herramienta Gene runner; ***Referencia de datos obtenidos experimentalmente.

11.3 Prueba PCR convencional de iniciadores diseñados para qPCR

11.3.1 ntr

Para asegurar que los iniciadores amplificaban el fragmento esperado y eran específicos se realizó una puesta a punto inicial en PCR convencional (Figura 95)

Tabla 37A. Condiciones de las mezclas de reacción

Reactivo	Concentración final
Buffer	1X
Cloruro de magnesio	1,5 mM
dNTPs	200 μ M
NTRTcTr/288Fw	20 pmol
NTRTcTr/417Rw	20 pmol
Taq DNA polimerasa	0,05 U/ μ l
DNAc	1 μ l
Volumen final	25 μl

Fragmento esperado: 131 o 130 pb

Tabla 37B Programa de las PCR

	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Denaturación inicial	95 °C	5 min	1
Denaturación	95 °C	1 min	35
Anillaje	64 °C	45 s	
Extensión	72 °C	1 min	
Extensión final	72 °C	8 min	1

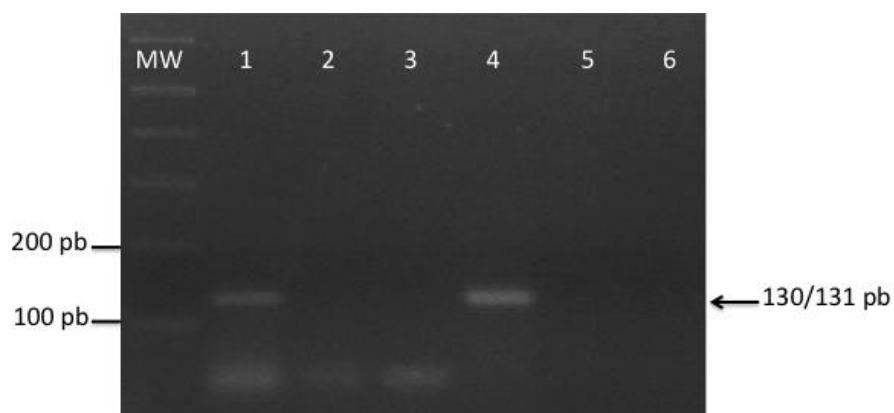


Figura 95. PCR del ADNc de *T. cruzi* 058PUJ y *T. rangeli* Tre usando los iniciadores NTRTc288Fw y NTRTc417Rw para *T. cruzi* 058PUJ y qNTRTre/620Fw y qNTRTre/750Rw para *T. rangeli* Tre. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio conteniendo 25 μ l del producto de amplificación. ADNc del aislado 058PUJ de *T. cruzi* (1); ADNc de la cepa Tre de *T. rangeli* (2); Control negativo de la Transcripción reversa RT (3) Control negativo de la PCR (4). Se usó 1Kb plus (Invitrogen) como marcador de peso molecular (MW).

11.3.2 *cnb*

Para asegurar que los iniciadores amplificaban el fragmento esperado y eran específicos se realizó una puesta a punto inicial en PCR convencional (Figura 96)

Tabla 38A. Condiciones de las mezclas de reacción

Reactivo	Concentración final
Buffer	1X
Cloruro de magnesio	1,5 mM
dNTPs	200 μ M
CnBTc/Tr323Fw	20 pmol
CnBTc/Tr469Rw	20 pmol
Taq DNA polimerasa	0,05 U/ μ l
DNAc	1 μ l
Volumen final	25 μl
Fragmento esperado: 147 pb	

Tabla 38B. Programa de las PCR

	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Denaturación inicial	95 °C	5 min	1
Denaturación	95 °C	1 min	35
Anillaje	60 °C	45 s	
Extensión	72 °C	1 min	
Extensión final	72 °C	8 min	1

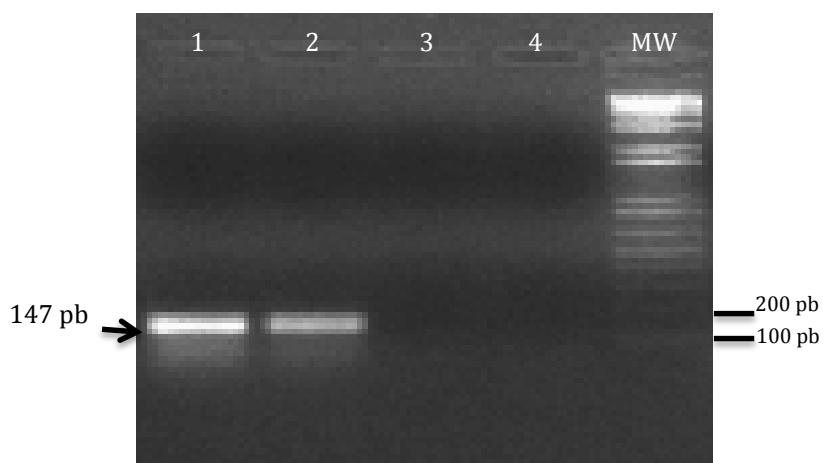


Figura 96. PCR a partir de ADNc de *T. cruzi* 058PUJ y *T. rangeli* Tre usando los iniciadores CnBTc/Tr323Fw y CnBTc/Tr469Rw. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio conteniendo 25 μ l del producto de amplificación. ADNc del aislado 058PUJ de *T. cruzi* (1); ADNc de la cepa Tre de *T. rangeli* (2); Control negativo de la Transcripción reversa RT (3) Control negativo de la PCR (4). Se usó 1Kb plus (Invitrogen) como marcador de peso molecular (MW).

11.4 Evaluación de relaciones filogenéticas en tripanosomátidos mediante el método Neighbor Joining.

11.4.1 ntr

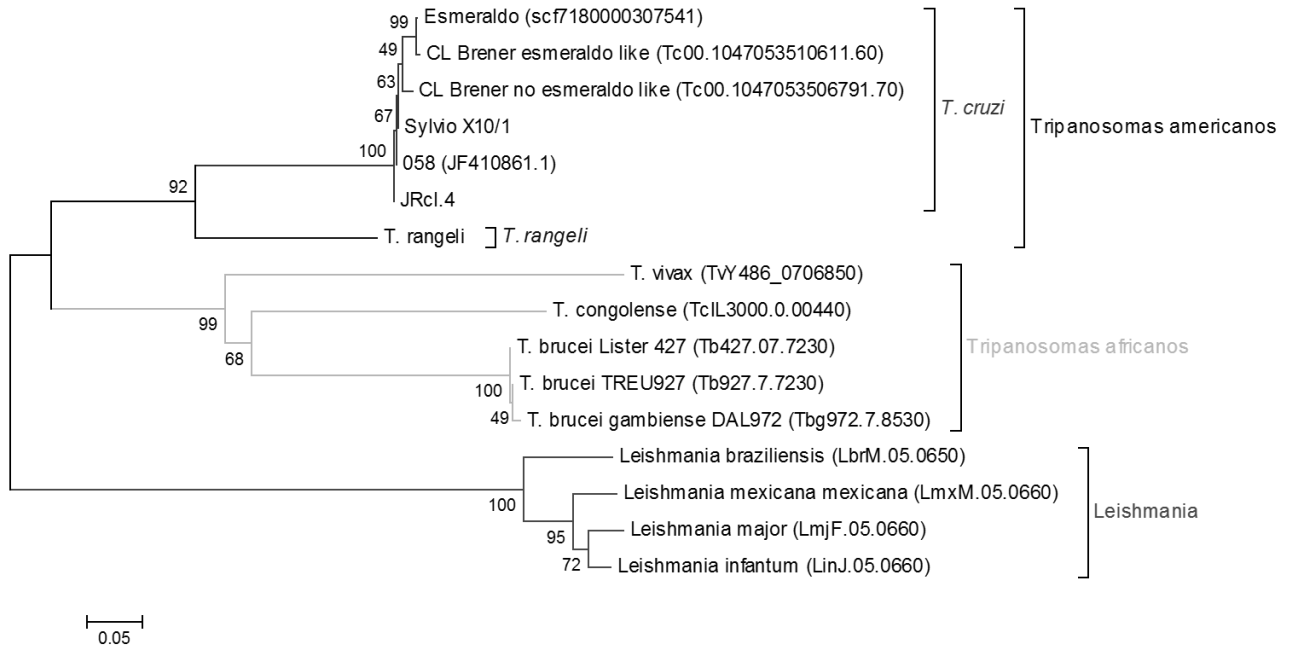


Figura 97. Análisis filogenético por el método de NJ a nivel de la secuencia de nucleótidos del gen *ntr* entre tripanosomas y Leishmanias. Los códigos de acceso están señalados en cada una de las secuencias.

11.4.2 *cnb*

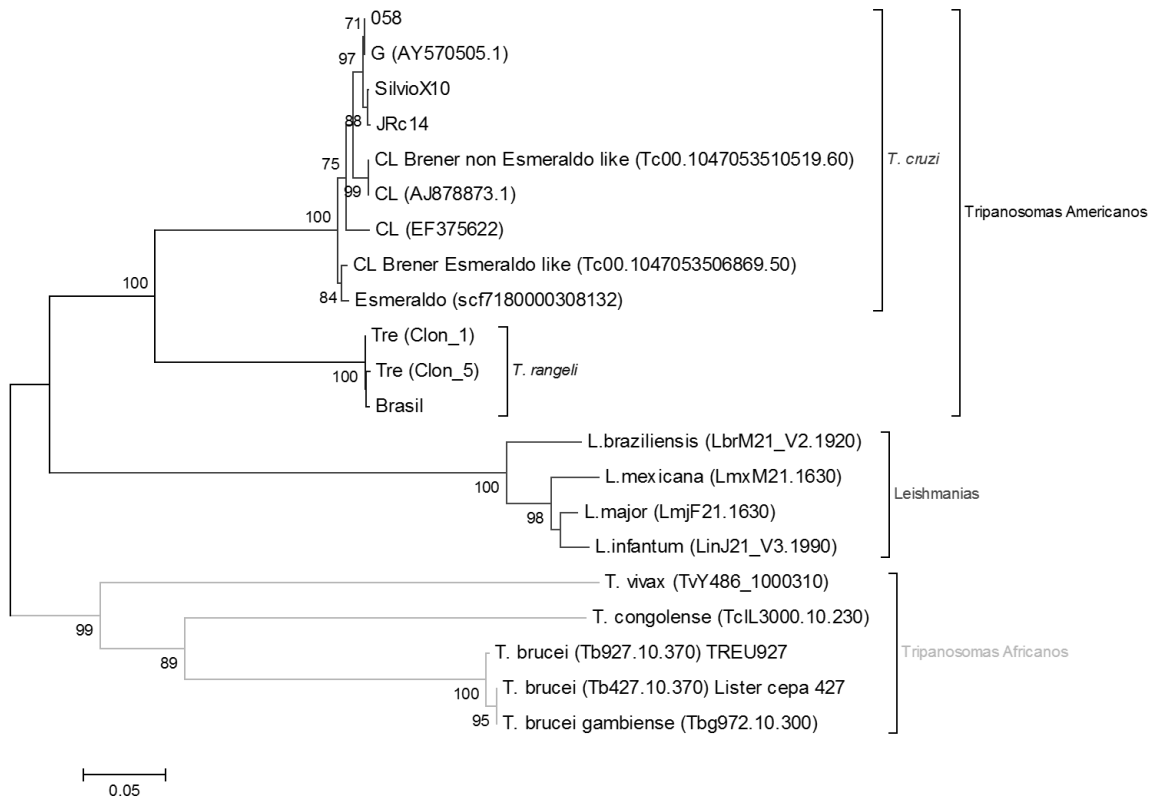


Figura 98. Análisis filogenético por el método de NJ a nivel de la secuencia de nucleótidos del gen *cnb* entre tripanosomas y Leishmanias. Los códigos de acceso están señalados en cada una.

11.5 Resultados del procesamiento muestras qPCR

Primera réplica

Verificación de ADNc sintetizados y tratados con ADNasa

Se muestran las curvas de amplificación correspondientes a la amplificación del transcrito *cnb* como control en la figura 99:

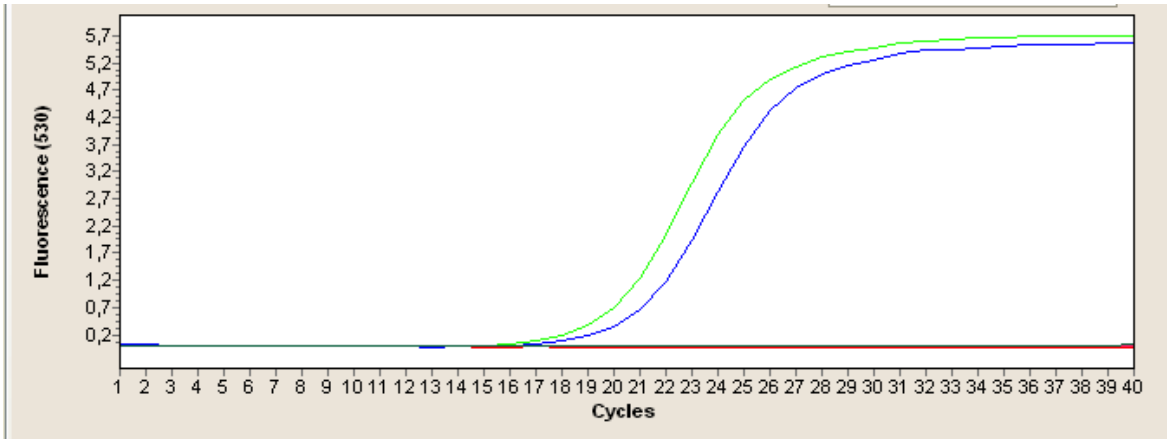


Figura 99. Curvas de amplificación del transcrito de *cnb* como control de ADNc sintetizados y tratados. En azul se muestra el ADNc sintetizado para *T. cruzi* y en verde el ADNc sintetizado para *T. rangeli*, los controles: Control de reacción de RT, Control gris, control de reacción de la PCR y controles sin transcriptasa no mostraron amplificación.

La curva melting de cada producto permitió observar el pico característico a 86°C de *T. cruzi* (azul) y de *T. rangeli* a 84,6°C (verde). Los controles no mostraron pico alguno. Por lo tanto el ADNc fue apto para su uso en los experimentos.

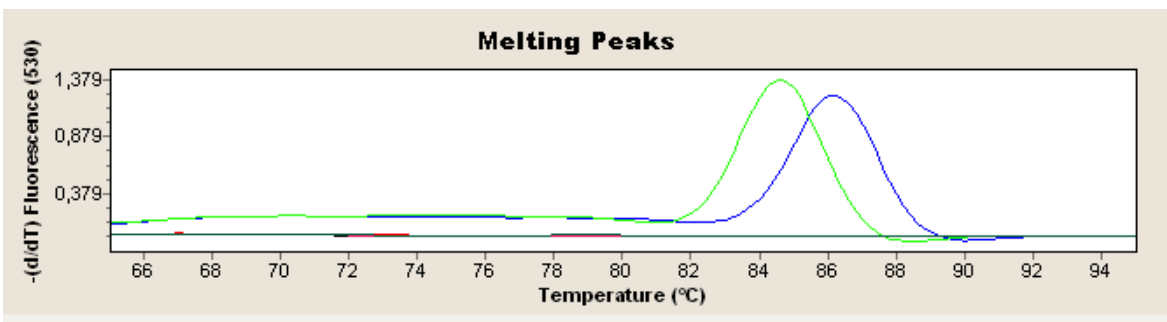


Figura 100. Curvas melting del transcrito de *cnb* como control de ADNc sintetizados y tratados. En azul se muestra el ADNc sintetizado *T. cruzi* y en verde el ADNc sintetizado para *T. rangeli*, los

controles Control de reacción de RT, Control gris, control de reacción de la PCR y controles sin transcriptasa no mostraron amplificación.

Amplificación de cada transcrito en primera réplica biológica

Se realizó el montaje de ADNc de cada parásito por triplicado incluyendo controles grises y de reacción.

ntf

- *ntf T. rangeli*

Curva de amplificación: se observa amplificación en el triplicado de ADNc del parásito.

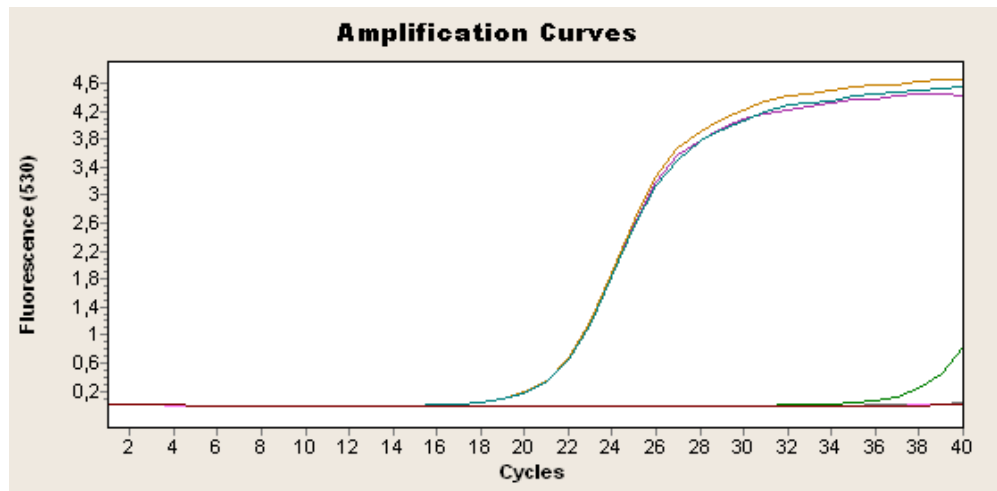


Figura 101. Curvas de amplificación del transcrito de *ntf* de *T. rangeli* (Réplica 1). Se muestra la amplificación de los triplicados del parásito.

Curva melting: se observa amplificación específica a 88°C para *T. rangeli*

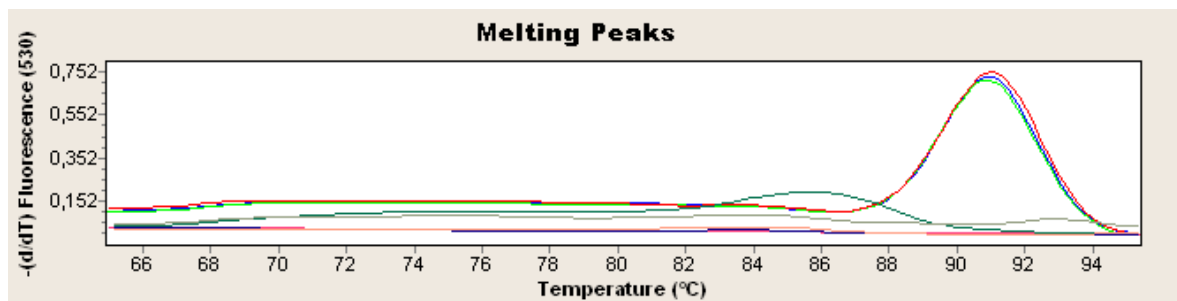


Figura 102. Curva melting de los amplicones del transcrito de *ntr* de *T. rangeli* (Réplica 1). Se muestra la especificidad de la amplificación y picos correspondientes a dímeros en controles.

La tabla 39 resume los datos de Ct, número de copias de transcrito con base en la curva estándar generada para el gen (figura 56) y Tm de cada muestra procesada en la réplica 1 del transcrito *ntr* de *T. rangeli*:

Tabla 39. Datos obtenidos en réplica 1 para transcrito de *ntr* de *T. rangeli*

Muestra	Ct	Número de copias de transcrito	Tm producto (°C)
<i>T. rangeli</i>	20,25	2,28E+04	88,27
<i>T. rangeli</i>	20,10	2,53E+04	88,22
<i>T. rangeli</i>	21,01	2,29E+04	88,06
Control gris	-	-	-
Control gris	-	-	-
Control gris	-	-	-
Control blanco	-	-	-
Control blanco	-	-	-
Control blanco	-	-	-

- *ntr T. cruzi*

Curva de amplificación: se observa amplificación en el triplicado de ADNc del parásito

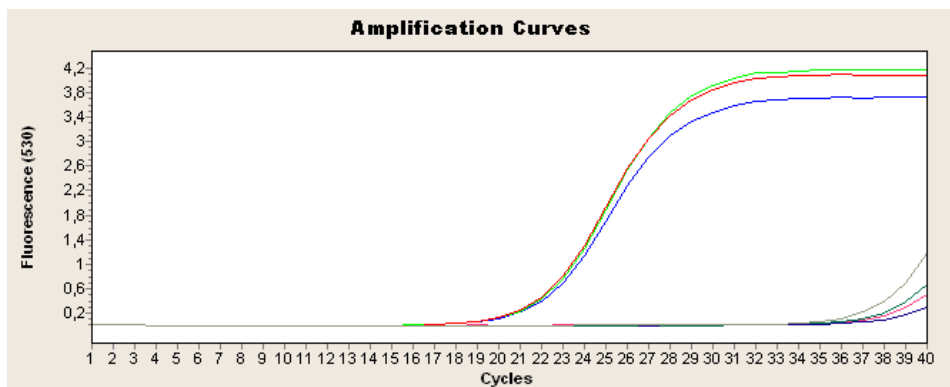


Figura 103. Curvas de amplificación del transcrito de *ntr* de *T. cruzi* (Réplica 1). Se muestra la amplificación de los triplicados del parásito y amplificaciones inespecíficas en controles.

Curva melting: se observa amplificación específica de *T. cruzi* a 90°C:

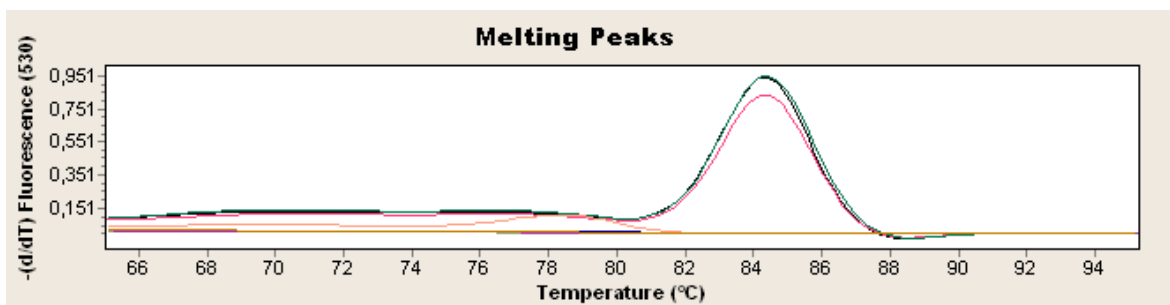


Figura 104. Curva melting de los amplicones del transcrito de *ntr* de *T. cruzi* (Réplica 1). Se muestra la especificidad de la amplificación representada en un solo pico y ausencia en los controles.

La tabla 40 resume los datos de Ct, número de copias de transcrito con base en la curva estándar generada para el gen (Figura 57) y Tm de cada muestra procesada en la réplica 1 del transcrito *ntr* de *T. cruzi*:

Tabla 40. Datos obtenidos en réplica 1 para transcrito de *ntr* de *T. cruzi*

Muestra	Ct	Número de copias de transcrito	Tm producto (°C)
<i>T. cruzi</i>	20,80	5,29E+04	91,10
<i>T. cruzi</i>	20,86	5,62E+04	91,17
<i>T. cruzi</i>	20,73	6,00E+04	91,28
Control gris	>35	-	86,61
Control gris	>35	-	85,00
Control gris	-	-	-
Control blanco	>35	-	84,81
Control blanco	>35	-	86,64
Control blanco	>35	-	86,57

cnb

Curva de amplificación: Ya que para el gen *cnb* se utiliza un juego de iniciadores compartido, se muestran los resultados para ambos genes, con un solo set de controles grises y blancos que no amplificaron en la figura 105.

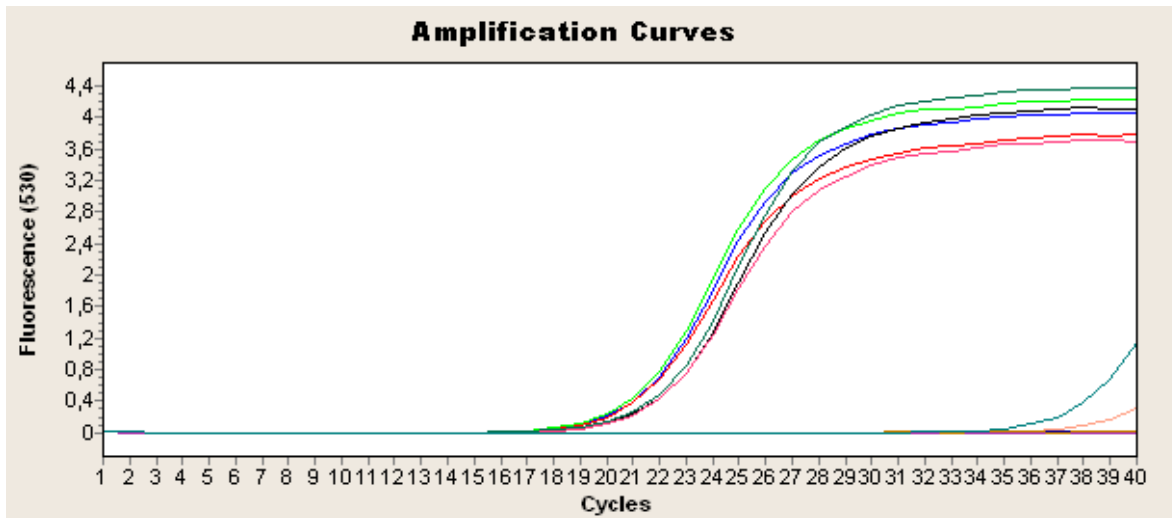


Figura 105. Curvas de amplificación del transcrito de *cnb* de *T. cruzi* y *T. rangeli* (Réplica 1). Se muestra la amplificación de los triplicados de cada parásito y la amplificación tardía correspondiente a dímeros de iniciadores.

En la figura 106 se muestra que los productos son específicos para cada especie. Teniendo en cuenta las temperaturas de fusión de *T. cruzi* (85,8°C) y *T. rangeli* (84,6°C) en las curvas melting.

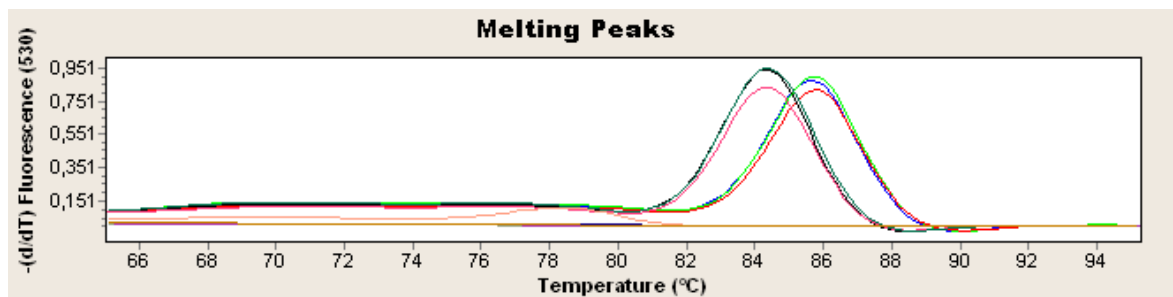


Figura 106. Curva melting de los amplicones del transcrito de *cnb* de *T. cruzi* y *T. rangeli* (Réplica 1). Se muestra la especificidad de la amplificación representada en diferentes T_m de amplificación.

La tabla 41 resume los datos de C_t , número de copias de transcrito con base en la curva estándar generada para cada gen (Figuras 58 y 59) y T_m de cada muestra procesada en la réplica 1 del transcrito *cnb* de *T. cruzi* y *T. rangeli*:

Tabla 41. Datos obtenidos en réplica 1 para transcrito de *cnb* de *T. cruzi* y *T. rangeli*

Muestra	Ct	Número de copias de transcrito	Tm producto (°C)
<i>T. cruzi</i>	19,80	7,10E+05	85,79
<i>T. cruzi</i>	19,75	7,34E+05	85,87
<i>T. cruzi</i>	19,75	7,34E+05	85,90
<i>T. rangeli</i>	20,74	3,40E+05	84,45
<i>T. rangeli</i>	20,57	3,57E+05	84,47
<i>T. rangeli</i>	20,67	3,35E+05	84,51
Control gris	>35	-	79,33
Control gris	-	-	-
Control gris	>35	-	78,85
Control blanco	-	-	-
Control blanco	-	-	-
Control blanco	>35	-	78,87

hgprt

- *hgprt T. rangeli*

Curva de amplificación: se observa amplificación en el triplicado de ADNc del parásito y en los controles en ciclos tardíos.

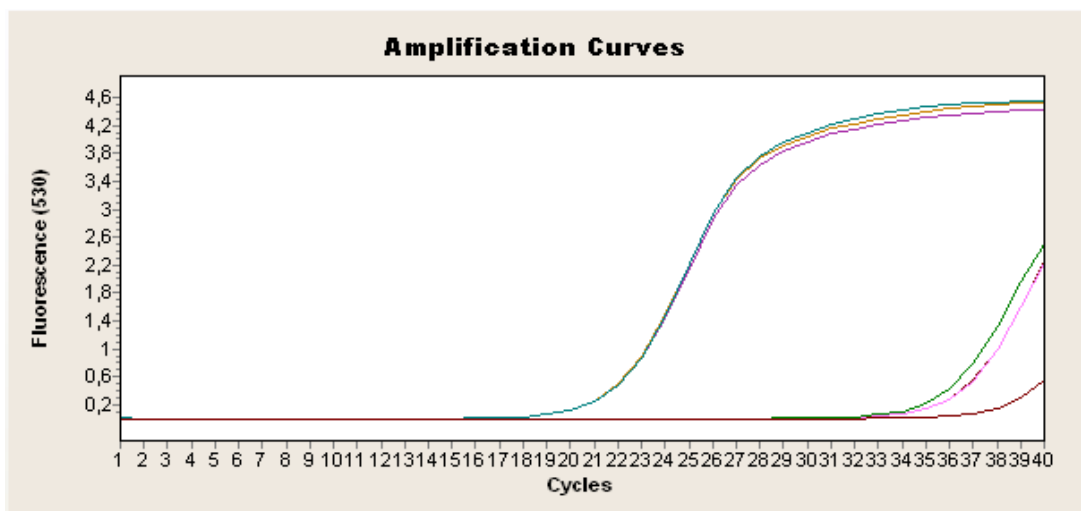


Figura 107. Curvas de amplificación del transcrito de *hgprt* de *T. rangeli* (Réplica 1). Se muestra la amplificación de los triplicados del parásito y amplificaciones tardías en controles correspondientes a dímeros de iniciadores.

Curva melting: En la figura 108, se muestra amplificación específica en *T. rangeli* (88°C) y picos inespecíficos en controles de reacción, debido a dímeros de iniciadores.

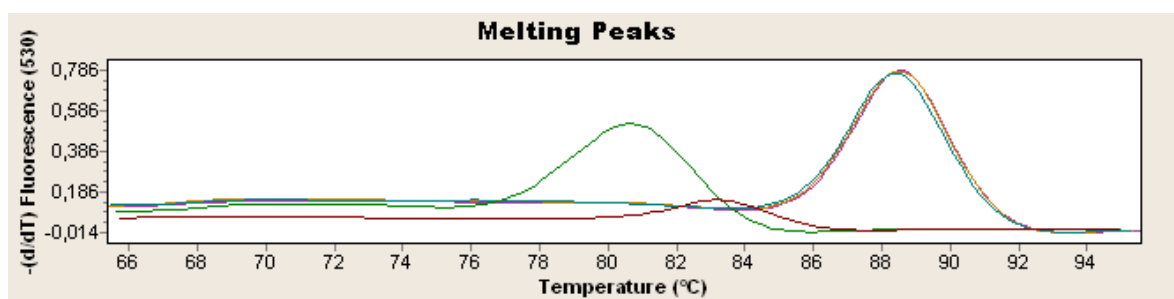


Figura 108. Curva melting de los amplicones del transcrito de *hgprt* de *T. rangeli* (Réplica 1). Se muestra la especificidad de la amplificación y dímeros de iniciadores.

La tabla 42 resume los datos de Ct, número de copias de transcrito con base en la curva estándar generada para el gen (Figura 60) y Tm de cada muestra procesada en la réplica 1 del transcrito *hgprt* de *T. rangeli*.

Tabla 42. Datos obtenidos en réplica 1 para transcrito de *hgprt* de *T. rangeli*

Muestra	Ct	Número de copias de transcrito	Tm producto (°C)
<i>T. rangeli</i>	20,60	1,06E+05	88,70
<i>T. rangeli</i>	20,56	1,09E+05	88,68
<i>T. rangeli</i>	20,62	1,04E+05	88,59
Control gris	>35	-	80,96
Control gris	>35	-	81,48
Control gris	>35	-	81,01
Control blanco	>35	-	80,93
Control blanco	>35	-	81,43
Control blanco	>35	-	81,57

- *hgprt T. cruzi*

Curva de amplificación: se observa amplificación en el triplicado de ADNc del parásito.

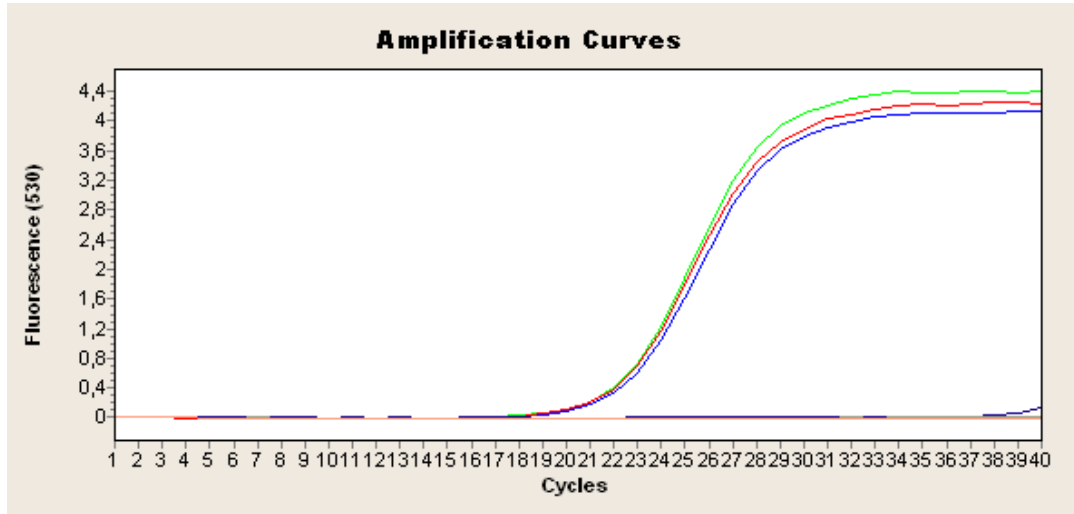


Figura 109. Curvas de amplificación del transcrito de *hgprt* de *T. cruzi* (Réplica 1). Se muestra la amplificación de los triplicados del parásito y la ausencia del amplicón en controles.

Curva melting: Se muestra el amplicón específico de *T. cruzi* 86,9 °C en la figura 73.

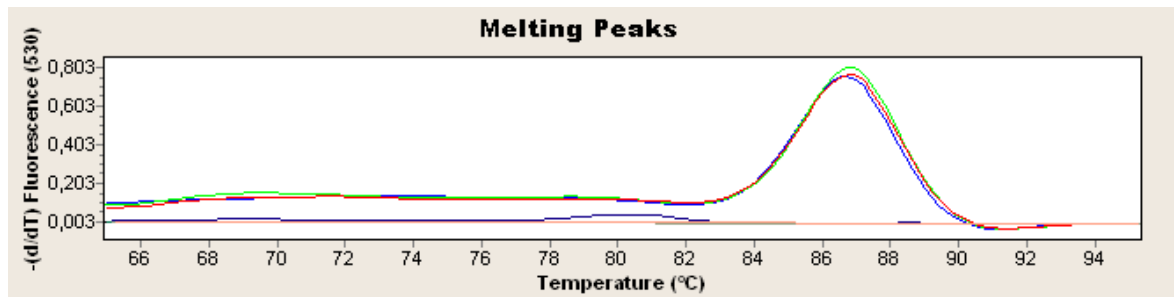


Figura 110. Curva melting de los amplicones del transcrito de *hgprt* de *T. cruzi* (Réplica 1). Se muestra la especificidad de la amplificación representada en un solo pico y ausencia en los controles.

La tabla 43 resume los datos de Ct, número de copias de transcrito con base en la curva estándar generada para el gen *hgprt* de *T. cruzi* 058PUJ (Figura 61) y Tm de cada muestra procesada en la réplica 1 del transcrito *hgprt* de *T. cruzi*.

Tabla 43. Datos obtenidos en réplica 1 para transcrito de *hgprt* de *T. cruzi*

Muestra	Ct	Número de copias de transcrito	Tm producto (°C)
<i>T. cruzi</i>	21,22	1,47E+05	86,86
<i>T. cruzi</i>	21,05	1,64E+05	86,98
<i>T. cruzi</i>	21,01	1,68E+05	86,95
Control gris	-	-	-
Control gris	>35	-	77,29
Control gris	-	-	-
Control blanco	>35	-	80,63
Control blanco	-	-	-
Control blanco	-	-	-

Segunda réplica

Verificación de ADNc sintetizados y tratados con ADNasa

Se muestran las curvas de amplificación correspondientes a la amplificación del transcrito *cnb* como control en la figura 111:

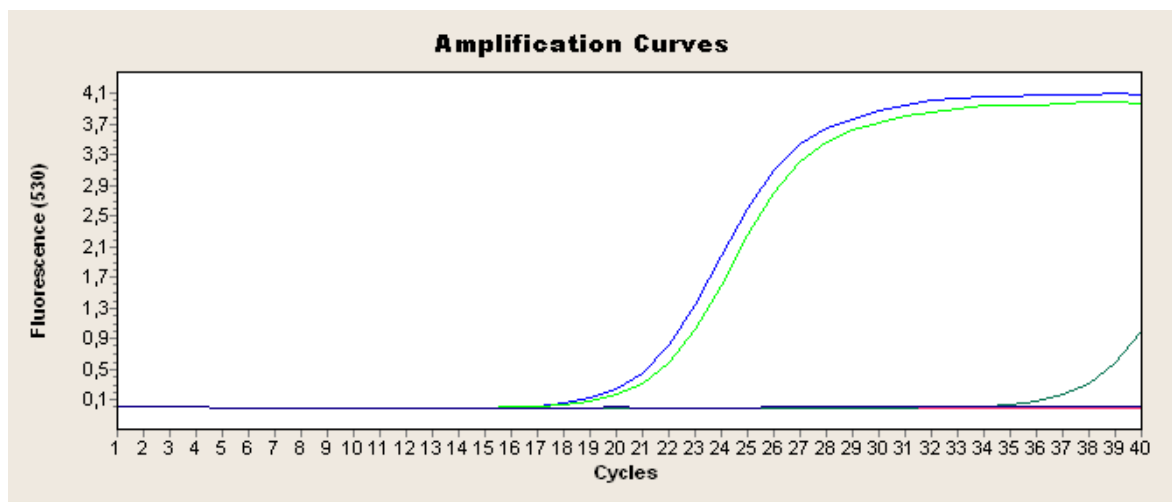


Figura 111. Curvas de amplificación del transcrito de *cnb* como control de ADNc sintetizados y tratados para segunda réplica. En azul se muestra el ADNc sintetizado de *T. cruzi* y en verde el ADNc sintetizado para *T. rangeli*, los controles: Control de reacción de RT, Control gris, control de reacción de la PCR y controles sin transcriptasa no mostraron amplificación. Excepto un control de reacción (verde oscuro) que presentó amplificación tardía.

La curva melting se presenta en la figura 112 y para cada producto permitió observar el pico característico a 86°C de *T. cruzi* (azul) y de *T. rangeli* a 84,6°C (verde). Uno de los controles de reacción mostró un pico de amplificación inespecífico correspondiente a dímeros de iniciadores.

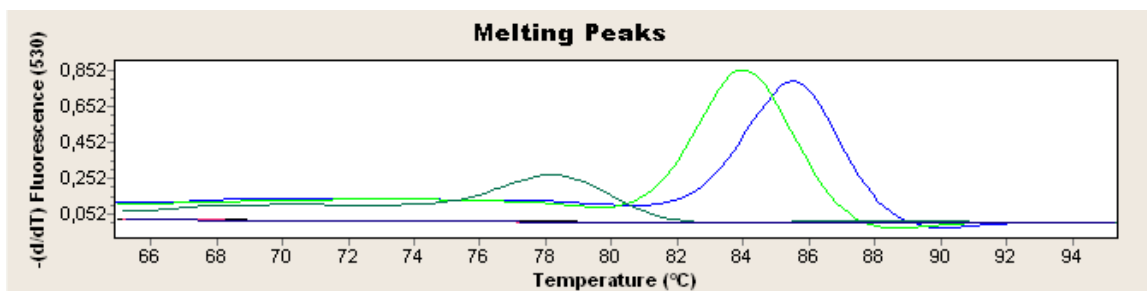


Figura 112. Curvas melting del transcrito de *cnb* como control de ADNc sintetizados y tratados.

En azul se muestra un control positivo para *T. cruzi* y en verde el ADNc sintetizado para *T. rangeli*, los controles: Control de reacción de RT, Control gris, control de reacción de la PCR y controles sin transcriptasa no mostraron amplificación. Excepto un control negativo (verde oscuro) que mostró un amplicón con Tm característica de dímeros de iniciadores.

El ADNc fue apto para su uso en los experimentos.

6.4.3.2.2 Amplificación de cada transcrito en segunda réplica biológica

Se realizó el montaje de ADNc de cada parásito por triplicado incluyendo controles grises y de reacción.

ntr

- *ntr T. rangeli*

Curva de amplificación: se observa amplificación únicamente en el triplicado de ADNc del parásito (Figura 113).

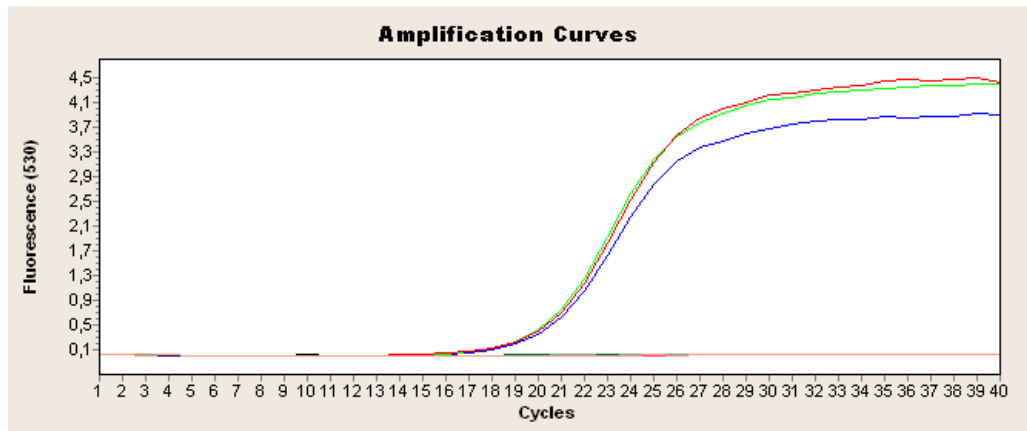


Figura 113. Curvas de amplificación del transcrito de *ntr* de *T. rangeli* (Réplica 2). Se muestra la amplificación de los triplicados del parásito.

Curva melting: se observa amplificación específica a 88°C para *T. rangeli* (Figura 114)

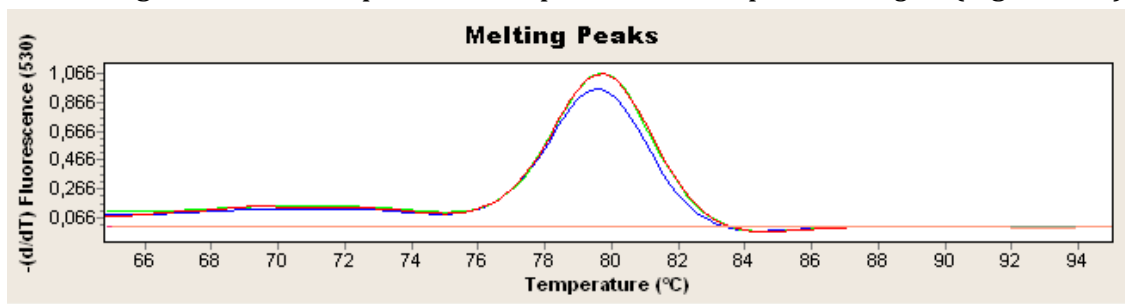


Figura 114. Curva melting de los amplicones del transcrito de *ntr* de *T. rangeli* (Réplica 2). Se muestra la especificidad de la amplificación en *T. rangeli*.

La tabla 44 resume los datos de Ct, número de copias de transcrito con base en la curva estándar generada para el gen (Figura 56) y Tm de cada muestra procesada en la réplica 2 del transcrito *ntr* de *T. rangeli*:

Tabla 44. Datos obtenidos en réplica 2 para transcrito de *ntr* de *T. rangeli*

Muestra	Ct	Número de copias de transcrito	Tm producto (°C)
<i>T. rangeli</i>	19,91	2,93E+04	88,09
<i>T. rangeli</i>	19,97	2,80E+04	88,23
<i>T. rangeli</i>	19,74	3,00E+04	88,31
Control gris	-	-	-
Control gris	-	-	-
Control gris	-	-	-
Control blanco	-	-	-

Control blanco	-	-	-
Control blanco		-	-

- *ntr T. cruzi*

Curva de amplificación: se observa amplificación en el triplicado de ADNc del parásito y amplificación tardía en un control gris (negro) y uno de reacción (piel) (Figura 115).

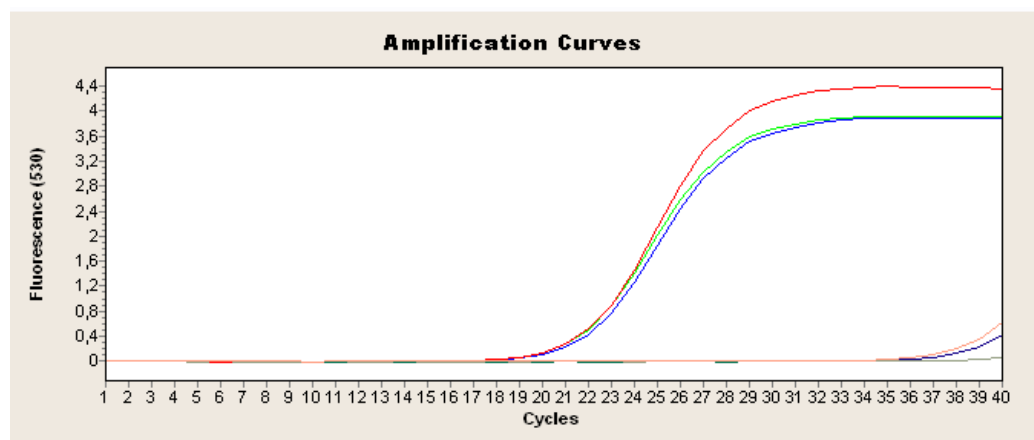


Figura 115. Curvas de amplificación del transcrito de *ntr* de *T. cruzi* (Réplica 2). Se muestra la amplificación de los triplicados del parásito y amplificación tardía e inespecífica en algunos controles.

Curva melting: se observa amplificación específica de *T. cruzi* a 90°C en la figura 116.

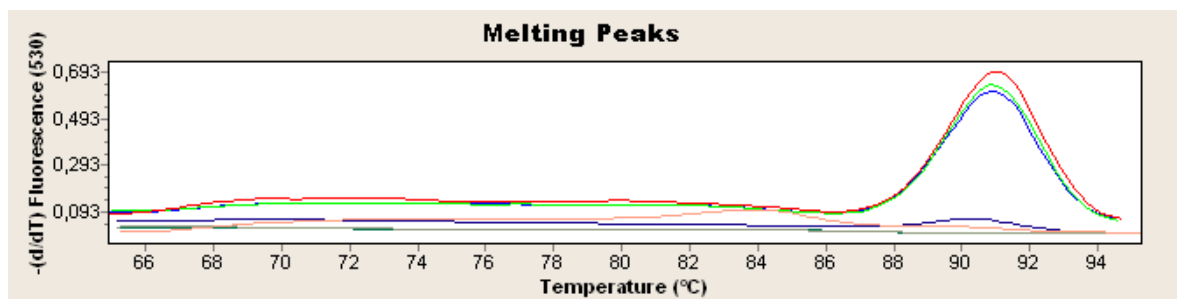


Figura 116. Curva melting de los amplicones del transcrito de *ntr* de *T. cruzi* (Réplica 2). Se muestra la especificidad de la amplificación en muestras con ADNc y amplificación inespecífica correspondiente a dímeros de iniciadores.

La tabla 45 resume los datos de Ct, número de copias de transcrito con base en la curva estándar generada para el gen (Figura 57) y Tm de cada muestra procesada en la réplica 2 del transcrito *ntr* de *T. cruzi*:

Tabla 45. Datos obtenidos en réplica 2 para transcrito de *ntr* de *T. cruzi*

Muestra	Ct	Número de copias de transcrito	Tm producto (°C)
<i>T. cruzi</i>	20,70	6,32E+04	91,18
<i>T. cruzi</i>	20,48	7,48E+04	91,18
<i>T. cruzi</i>	20,66	6,53E+04	91,25
Control gris	>35	-	84,56
Control gris	>35	-	86,28
Control gris	>35	-	69,51
Control blanco	-	-	-
Control blanco	-	-	-
Control blanco	>35	-	87,96

Cnb

Curva de amplificación: se muestran los resultados para ambos genes, con un solo set de controles grises y blancos que no amplificaron en la figura 117.

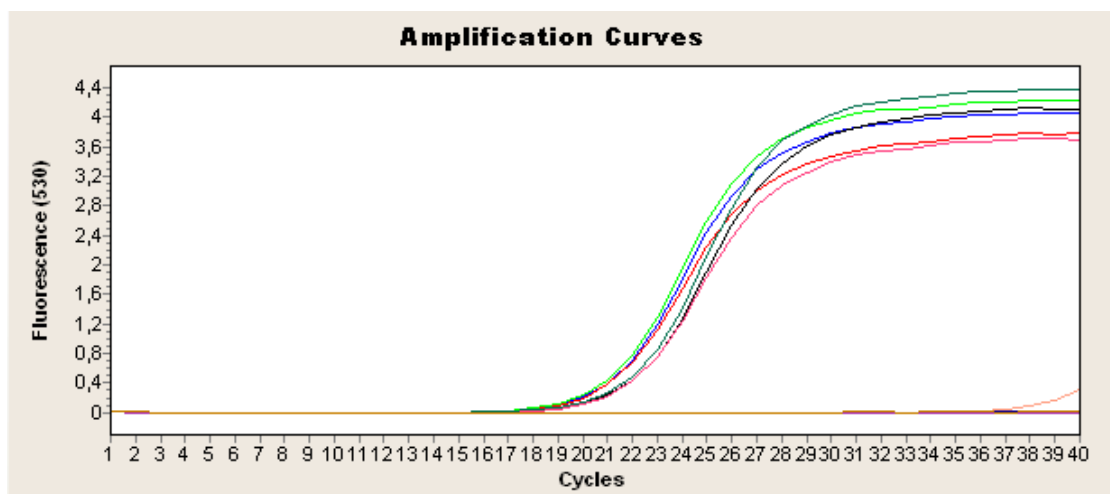


Figura 117. Curvas de amplificación del transcrito de *cnb* de *T. cruzi* y *T. rangeli* (Réplica 2). Se muestra la amplificación de los triplicados de cada parásito y la amplificación tardía e inespecífica en controles.

Curva melting: En la figura 118 se muestra que los productos son específicos para cada especie. *T. cruzi* (85,8°C) y *T. rangeli* (84,6°C).

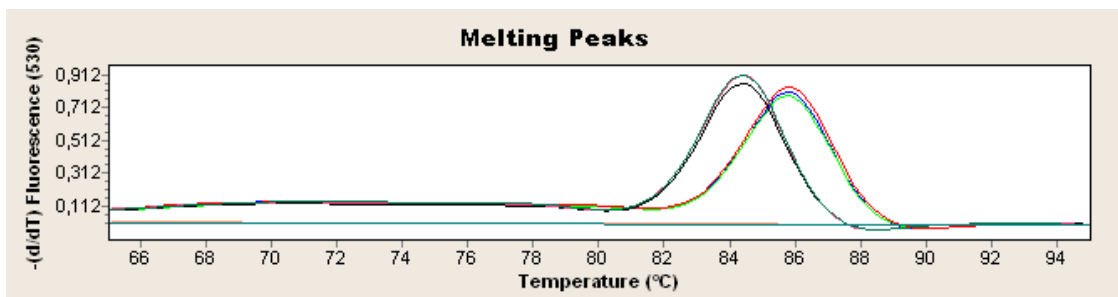


Figura 118. Curva melting de los amplicones del transcrito de *cnb* de *T. cruzi* y *T. rangeli* (Réplica 2). Se muestra la especificidad de la amplificación representada en diferentes Tm de amplificación para cada parásito.

La tabla 46 resume los datos de Ct, número de copias de transcrito con base en la curva estándar generada para cada gen (Figuras 58 y 59) y Tm de cada muestra procesada en la réplica 2 del transcrito *cnb* de *T. cruzi* y *T. rangeli*.

Tabla 46. Datos obtenidos en réplica 2 para transcrito de *cnb* de *T. cruzi* y *T. rangeli*

Muestra	Ct	Número de copias de transcrito	Tm producto (°C)
<i>T. cruzi</i>	19,70	7,55E+05	85,94
<i>T. cruzi</i>	19,67	7,71E+05	85,91
<i>T. cruzi</i>	19,70	7,57E+05	85,96
<i>T. rangeli</i>	20,54	3,64E+05	84,51
<i>T. rangeli</i>	20,70	3,30E+05	84,54
<i>T. rangeli</i>	20,79	3,11E+05	84,52
Control gris	-	-	-
Control gris	-	-	-
Control gris	-	-	-
Control blanco	31,05	-	79,08
Control blanco	31,65	-	78,95
Control blanco	-	-	-

hgprt

- *hgprt T. rangeli*

Curva de amplificación: se observa amplificación en el triplicado de ADNc del parásito y amplificación inespecífica y tardía en un control gris (Figura 119).

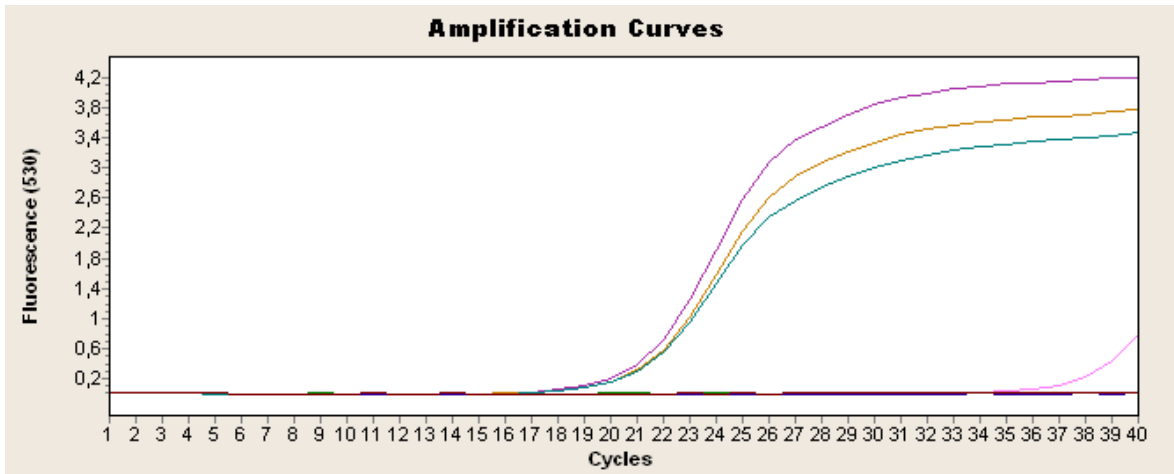


Figura 119. Curvas de amplificación del transcrito de *hgprt* de *T. rangeli* (Réplica 2). Se muestra la amplificación de los triplicados del parásito. Así mismo amplificación tardía en un control gris (rosado).

Curva melting: Se muestra amplificación específica en *T. rangeli* (88°C) y picos inespecíficos en un control gris, debido a dímeros de iniciadores (Figura 120).

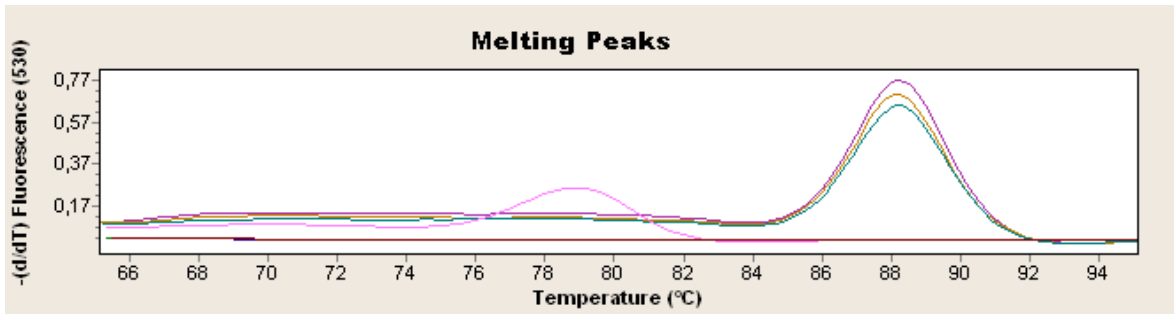


Figura 120. Curva melting de los amplicones del transcrito de *hgprt* de *T. rangeli* (Réplica 2). Se muestra la especificidad de la amplificación en *T. rangeli* y dímeros de iniciadores en el control gris que amplificó (rosado).

La tabla 47 resume los datos de Ct, número de copias de transcrito con base en la curva estándar generada para el gen (Figura 121) y Tm de cada muestra procesada en la réplica 2 del transcrito *hgprt* de *T. rangeli*:

Tabla 47. Datos obtenidos en réplica 2 para transcrito de *hgprt* de *T. rangeli*

Muestra	Ct	Número de copias de transcrito	Tm producto (°C)
<i>T. rangeli</i>	19,76	1,85E+05	88,38
<i>T. rangeli</i>	19,86	1,72E+05	88,30
<i>T. rangeli</i>	19,74	1,87E+05	88,35
Control gris	>35	-	80,66
Control gris	>35	-	80,84
Control gris	>35	-	79,20
Control blanco	-	-	-
Control blanco	-	-	-
Control blanco	>35	-	75,12

- *hgprt T. cruzi*

Curva de amplificación: se observa amplificación en el triplicado de ADNc del parásito y en un control gris en ciclos tardíos (Figura 85).

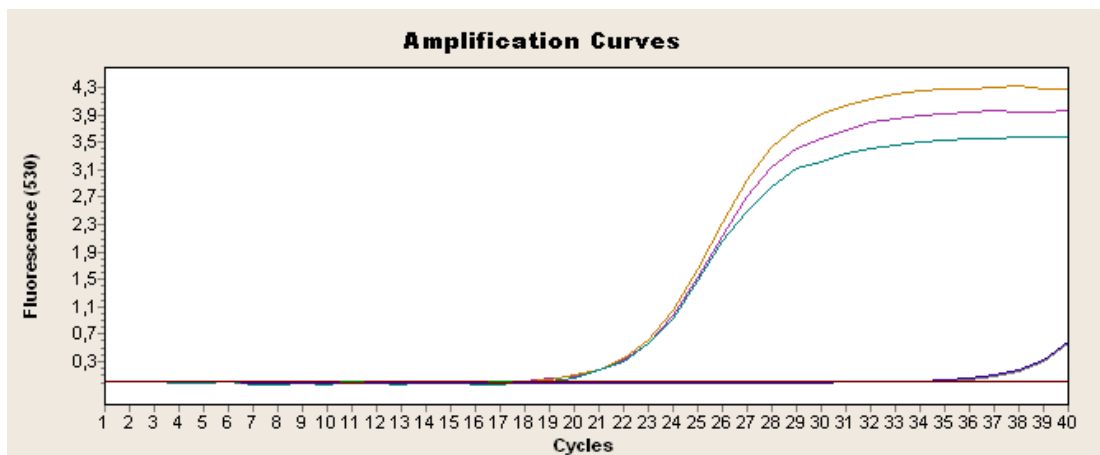


Figura 121. Curvas de amplificación del transcrito de *hgprt* de *T. cruzi* (Réplica 2). Se muestra la amplificación de los triplicados del parásito. Así mismo amplificación tardía en un control gris (azul oscuro).

Curva melting: Se muestra el amplicón específico de *T. cruzi* 86,9 °C y un pico inespecífico correspondiente a dímeros de iniciadores en un control gris (Figura 122).

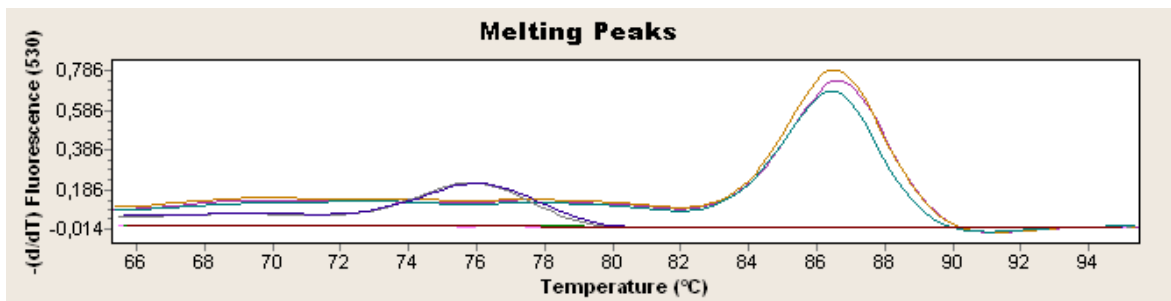


Figura 122. Curva melting de los amplicones del transcrito de *hgprt* de *T. cruzi* (Réplica 2). Se muestra la especificidad de la amplificación. Adicionalmente se muestra un pico correspondiente a dímeros de iniciadores.

La tabla 48 resume los datos de Ct, número de copias de transcrito con base en la curva estándar generada para el gen (Figura 61) y Tm de cada muestra procesada en la réplica 2 del transcrito *hgprt* de *T. cruzi*.

Tabla 48. Datos obtenidos en réplica 2 para transcrito de *hgprt* de *T. cruzi*

Muestra	Ct	Número de copias de transcrito	Tm producto (°C)
<i>T. cruzi</i>	21,24	1,45E+05	86,81
<i>T. cruzi</i>	21,28	1,42E+05	86,70
<i>T. cruzi</i>	21,00	1,69E+05	86,60
Control gris	>35	-	76,38
Control gris	>35	-	76,21
Control gris	-	-	-
Control blanco	-	-	-
Control blanco	>35	-	76,40
Control blanco	-	-	-

Tercera réplica

Verificación de ADNc sintetizados y tratados con ADNasa

Se muestran las curvas de amplificación correspondientes a la amplificación del transcrito *cnb* en la figura 123 así como la amplificación tardía de el control gris (rosado) y negativo (verde oscuro):

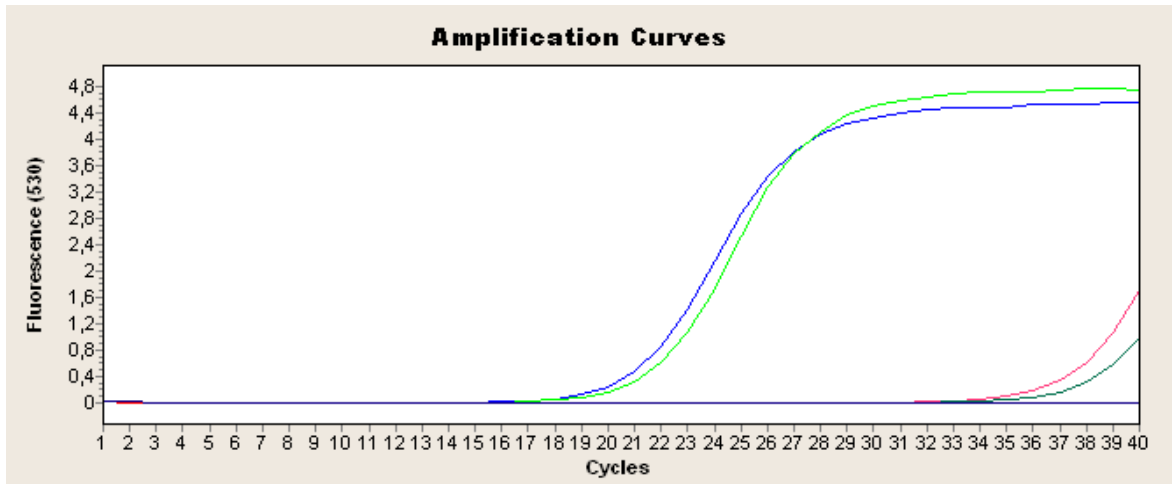


Figura 123. Curvas de amplificación del transcrito de *cnb* como control de ADNc sintetizados y tratados. En azul se muestra el ADNc sintetizado para *T. cruzi* y en verde el ADNc sintetizado para *T. rangeli*, los controles gris y negativo mostraron amplificación tardía y los controles sin transcriptasa y el CN de la RT no mostraron amplificación.

La curva melting se presenta en la figura 124 y para cada producto permitió observar el pico característico a 86°C de *T. cruzi* (azul) y de *T. rangeli* a 84,6°C (verde). Se muestra que los controles que amplificaron presentan picos inespecíficos correspondientes a dímeros de iniciadores. Por lo tanto el ADNc fue apto para su uso en los experimentos.

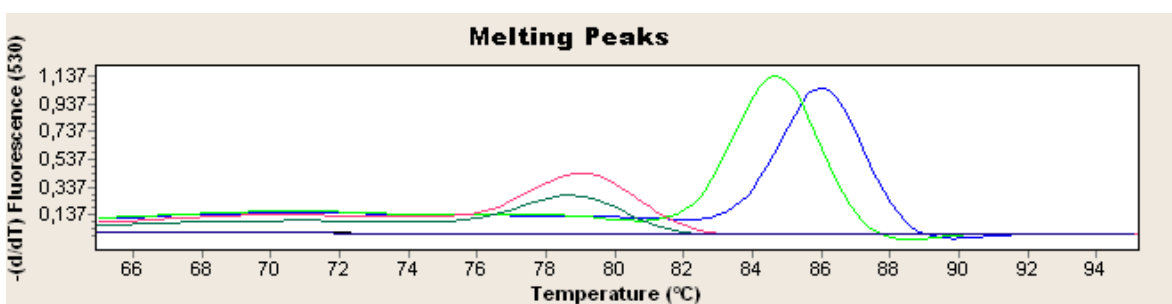


Figura 124. Curvas melting del transcrito de *cnb* como control de ADNc sintetizados y tratados. En azul se muestra el ADNc de *T. cruzi* y en verde el ADNc sintetizado para *T. rangeli*. Los controles: CN de RT, y controles sin transcriptasa no mostraron amplificación, excepto el control negativo (verde oscuro) y el control gris (rosado) que mostraron amplificación característica de dímeros de iniciadores.

Amplificación de cada transcrito en tercera réplica biológica

Se realizó el montaje de ADNc de cada parásito por triplicado incluyendo controles grises y de reacción.

ntr

- *ntr T. rangeli*

Curva de amplificación: se observa amplificación únicamente en el triplicado de ADNc del parásito (Figura 125).

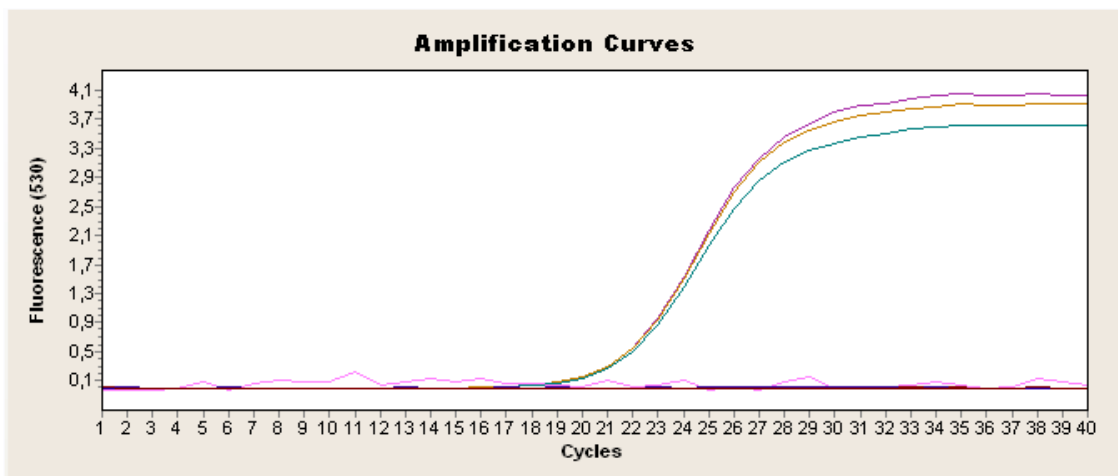


Figura 125. Curvas de amplificación del transcrito de *ntr* de *T. rangeli* (Réplica 3). Se muestra la amplificación de los triplicados del parásito.

Curva melting: En la figura 126, se observa amplificación específica a 88°C para *T. rangeli*.

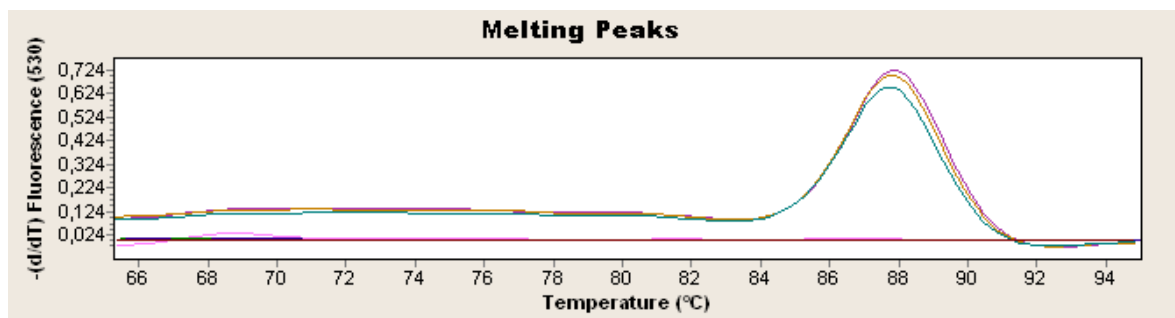


Figura 126. Curva melting de los amplicones del transcrito de *ntr* de *T. rangeli* (Réplica 3). Se muestra la especificidad de la amplificación.

La tabla 49 resume los datos de Ct, número de copias de transcrito con base en la curva estándar generada para el gen (Figura 56) y Tm de cada muestra procesada en la réplica 3 del transcrito *ntn* de *T. rangeli*:

Tabla 49. Datos obtenidos en réplica 3 para transcrito de *ntn* de *T. rangeli*

Muestra	Ct	Número de copias de transcrito	Tm producto (°C)
<i>T. rangeli</i>	20,24	2,29E+04	88,08
<i>T. rangeli</i>	20,24	2,29E+04	88,08
<i>T. rangeli</i>	20,20	2,36E+04	87,92
Control gris	-	-	-
Control gris	-	-	-
Control gris	-	-	-
Control blanco	-	-	-
Control blanco	-	-	-
Control blanco	-	-	-

- *ntn T. cruzi*

Curva de amplificación: En la figura 127 se observa amplificación en el triplicado de ADNc del parásito y en un control gris (verde oscuro) y un control negativo (gris) amplificaciones tardías.

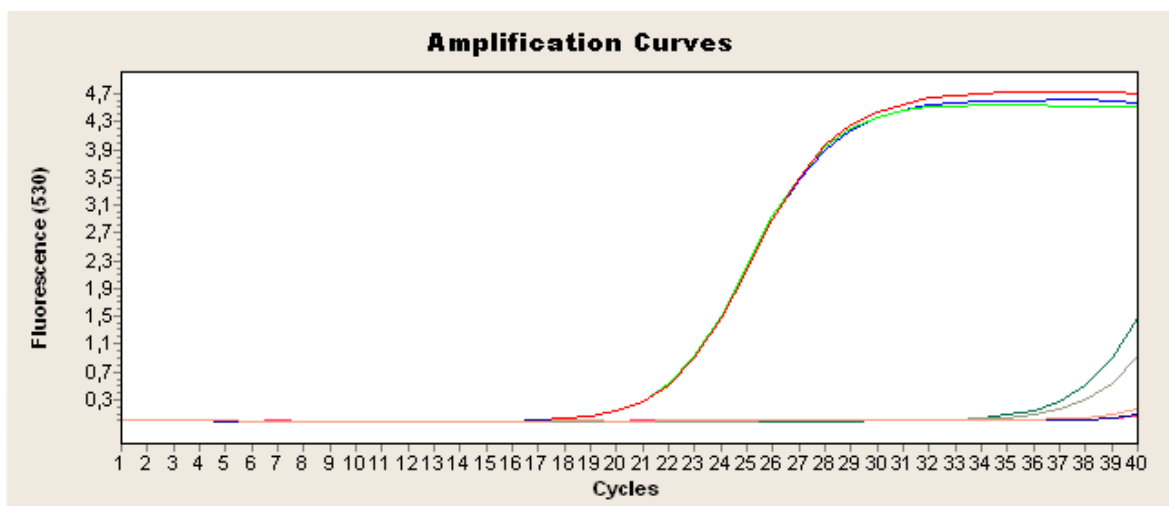


Figura 127. Curvas de amplificación del transcrito de *ntn* de *T. cruzi* (Réplica 3). Se muestra la amplificación de los triplicados del parásito. Así mismo las amplificaciones tardías en un control gris (verde oscuro) y un control negativo (gris).

Curva melting: En la figura 128 se observa amplificación específica de *T. cruzi* a 90°C y el pico de inespecificidad debido a dímeros de iniciadores en los controles que presentaron amplificación.

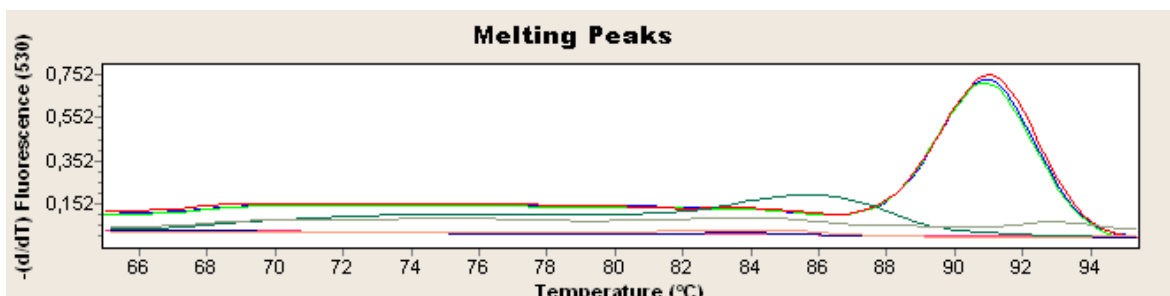


Figura 128. Curva melting de los amplicones del transcrito de *ntr* de *T. cruzi* (Réplica 3). Se muestra la especificidad de la amplificación representada en un solo pico y el pico correspondiente a dímeros de iniciadores en los controles que amplificaron.

La tabla 50 resume los datos de Ct, número de copias de transcrito con base en la curva estándar generada para el gen (Figura 57) y Tm de cada muestra procesada en la réplica 3 del transcrito *ntr* de *T. cruzi*.

Tabla 50. Datos obtenidos en réplica 3 para transcrito de *ntr* de *T. cruzi*

Muestra	Ct	Número de copias de transcrito	Tm producto (°C)
<i>T. cruzi</i>	20,70	6,20E+04	91,20
<i>T. cruzi</i>	20,48	6,30E+04	91,17
<i>T. cruzi</i>	20,66	5,94E+04	91,28
Control gris	-	-	-
Control gris	-	-	-
Control gris	>35	-	86,72
Control blanco	>35	-	69,12
Control blanco	-	-	-
Control blanco	>35	-	85,31

cnb

Curva de amplificación: En la figura 129 se muestran los resultados para ambos genes, con un solo set de controles grises y dos controles negativos blancos que no amplificaron, adicionalmente un control negativo (verde oscuro) que presentó amplificación tardía..

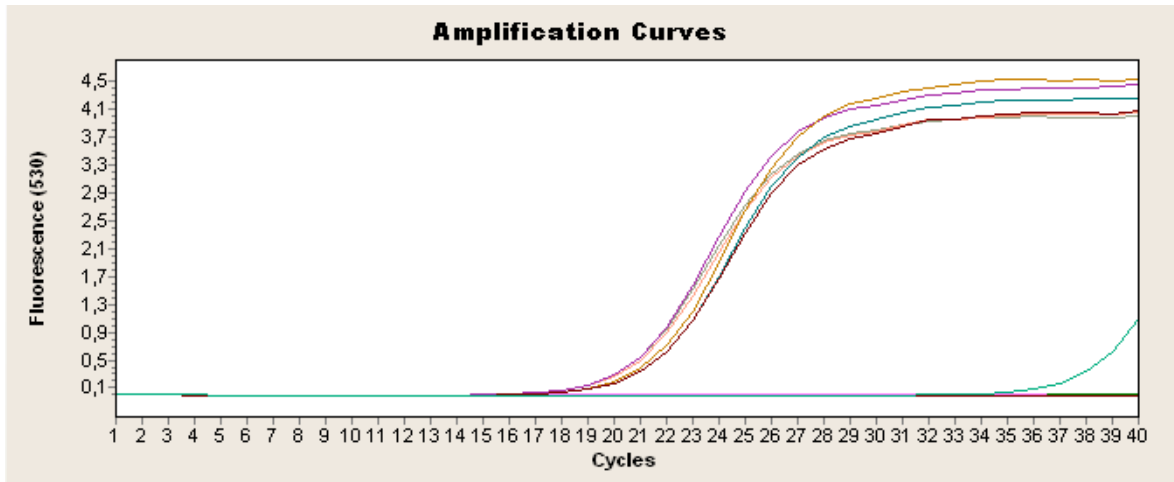


Figura 129. Curvas de amplificación del transcrito de *cnb* de *T. cruzi* y *T. rangeli* (Réplica 3). Se muestra la amplificación de los triplicados de cada parásito y la ausencia de amplificación en controles grises y dos negativos. Un tercer control negativo (verde oscuro) mostró amplificación tardía.

Curva melting: La figura 130 muestra que los productos son específicos para cada especie. *T. cruzi* (85,8°C) y *T. rangeli* (84,6°C). Así mismo, se muestra que el control negativo que amplificó (verde oscuro) corresponde a un amplicón inespecífico de dímeros de iniciadores.

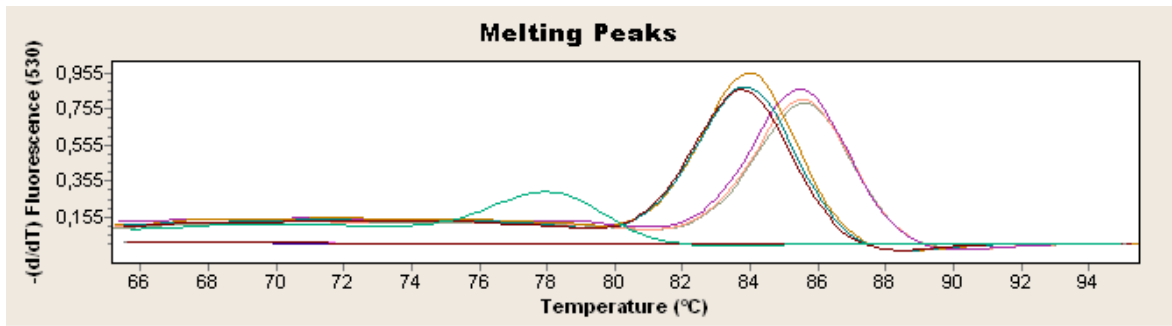


Figura 131. Curva melting de los amplicones del transcrito de *cnb* de *T. cruzi* y *T. rangeli* (Réplica 3). Se muestra la especificidad de la amplificación representada en diferentes T_m de amplificación. El control negativo (verde oscuro) muestra un amplicón característico de dímeros de iniciadores.

La tabla 51 resume los datos de C_t , número de copias de transcrito con base en la curva estándar generada para cada gen (figuras 58 y 59) y T_m de cada muestra procesada en la réplica 3 del transcrito *cnb* de *T. cruzi* y *T. rangeli*.

Tabla 51. Datos obtenidos en réplica 2 para transcrito de *cnb* de *T. cruzi* y *T. rangeli*

Muestra	Ct	Número de copias de transcrito	T_m producto (°C)
<i>T. cruzi</i>	19,29	7,55E+05	85,75
<i>T. cruzi</i>	19,49	7,71E+05	85,68
<i>T. cruzi</i>	19,48	7,57E+05	85,61
<i>T. rangeli</i>	20,05	3,64E+05	84,11
<i>T. rangeli</i>	20,15	3,30E+05	84,01
<i>T. rangeli</i>	20,06	3,11E+05	83,89
Control gris	-	-	-
Control gris	-	-	-
Control gris	>35	-	78,63
Control blanco	>35	-	74,40
Control blanco	-	-	-
Control blanco	>35	-	78,40

hgprt

- *hgprt T. rangeli*

Curva de amplificación: En la figura 132 se observa amplificación en el triplicado de ADNc del parásito y amplificación inespecífica y tardía en un control negativo (verde oscuro).

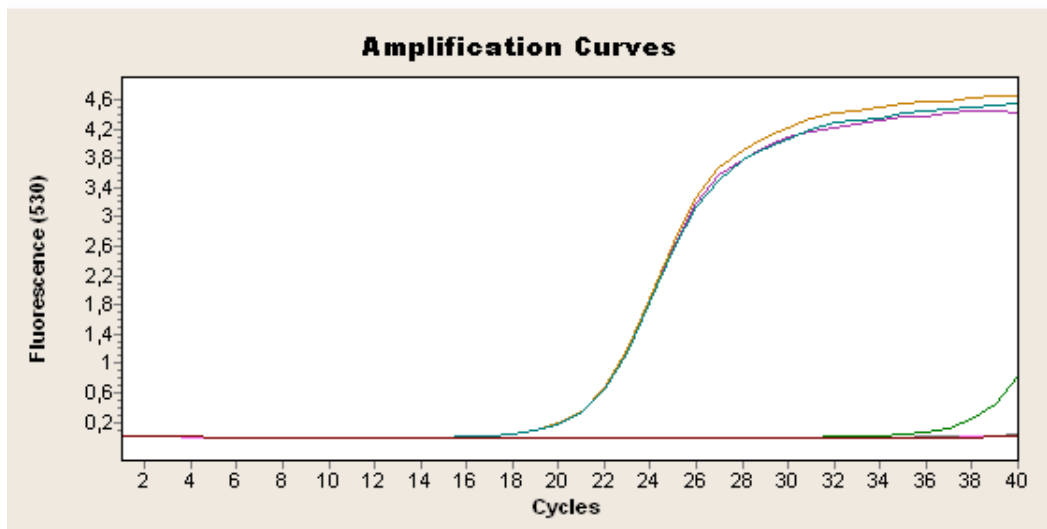


Figura 132. Curvas de amplificación del transcrito de *hgprt* de *T. rangeli* (Réplica 3). Se muestra la amplificación de los triplicados del parásito. Así mismo amplificación tardía en control negativo (verde oscuro).

Curva melting: La figura 133 muestra amplificación específica en *T. rangeli* (88°C) y un pico inespecífico en un control negativo (verde oscuro), debido a dímeros de iniciadores.

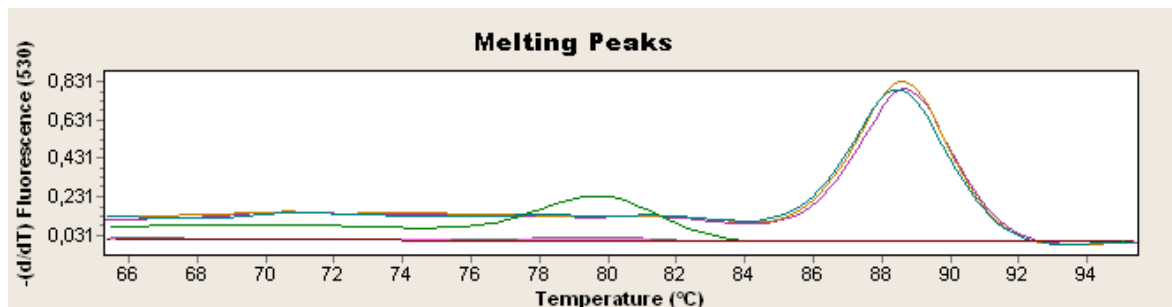


Figura 133. Curva melting de los amplicones del transcrito de *hgprt* de *T. rangeli* (Réplica 3). Se muestra la especificidad de la amplificación en *T. rangeli* y dímeros de iniciadores en el control negativo que amplificó (verde oscuro).

La tabla 52 resume los datos de Ct, número de copias de transcrito con base en la curva estándar generada para el gen (Figura 60) y Tm de cada muestra procesada en la réplica 3 del transcrito *hgprt* de *T. rangeli*:

Tabla 52. Datos obtenidos en réplica 3 para transcrito de *hgprt* de *T. rangeli*

Muestra	Ct	Número de copias de transcrito	Tm producto (°C)
<i>T. rangeli</i>	19,98	1,60E+05	88,84
<i>T. rangeli</i>	20,03	1,55E+05	88,75
<i>T. rangeli</i>	19,99	1,58E+05	88,63
Control gris	>35	-	81,04
Control gris	>35	-	79,95
Control gris	-	-	-
Control blanco	>35	-	80,04
Control blanco	>35	-	79,78
Control blanco	-	-	-

- *hgprt T. cruzi*

Curva de amplificación: en la figura 134 se observa amplificación en el triplicado de ADNc del parásito y en un control gris (negro) y negativo (piel) en ciclos tardíos.

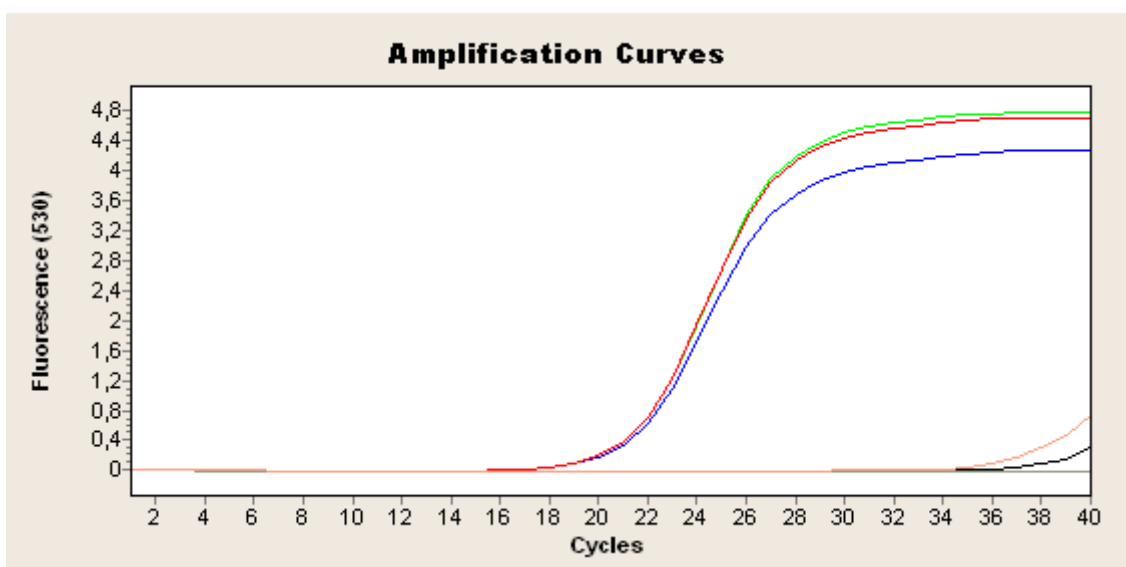


Figura 134. Curvas de amplificación del transcrito de *hgprt* de *T. cruzi* (Réplica 3). Se muestra la amplificación de los triplicados del parásito y de manera tardía en algunos controles.

Curva melting: La figura 135 muestra el amplicón específico de *T. cruzi* 86,9 °C y picos inespecíficos correspondientes a dímeros de iniciadores en un control gris (negro) y uno negativo (piel).

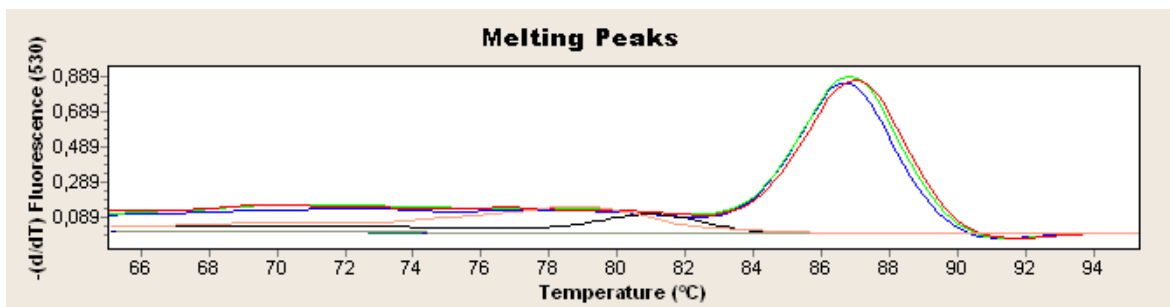


Figura 135. Curva melting de los amplicones del transcrito de *hgprt* de *T. cruzi* (Réplica 3). Se muestra la especificidad de la amplificación. Adicionalmente se muestran picos correspondientes a dímeros de iniciadores en controles que amplificaron.

La tabla 53 resume los datos de Ct, número de copias de transcrito con base en la curva estándar generada para cada gen y Tm de cada muestra procesada en la réplica 3 del transcrito *hgprt* de *T. cruzi*:

Tabla 53. Datos obtenidos en réplica 3 para transcrito de *hgprt* de *T. cruzi*

Muestra	Ct	Número de copias de transcrito	Tm producto (°C)
<i>T. cruzi</i>	21,24	1,45E+05	86,87
<i>T. cruzi</i>	21,28	1,42E+05	87,02
<i>T. cruzi</i>	21,00	1,69E+05	87,10
Control gris	>35	-	81,31
Control gris	>35	-	76,15
Control gris	-	-	-
Control blanco	-	-	-
Control blanco	.	-	-
Control blanco	>35	-	79,44

11.6 Proteínas recombinantes rTcNTR y rTrNTR

La región codificante completa de los genes *ntr* de *T. cruzi* 058PUJ y *T. rangeli* Tre fue clonada en el vector de expresión pQE30. Se realizó la inducción de la expresión y una posterior purificación utilizando resina de Níquel y gradiente de Imidazol (Castro *et al*, manuscrito en preparación). Se muestran fracciones puras de rTcNTR (Figura 136) y de rTrNTR (Figura 137).

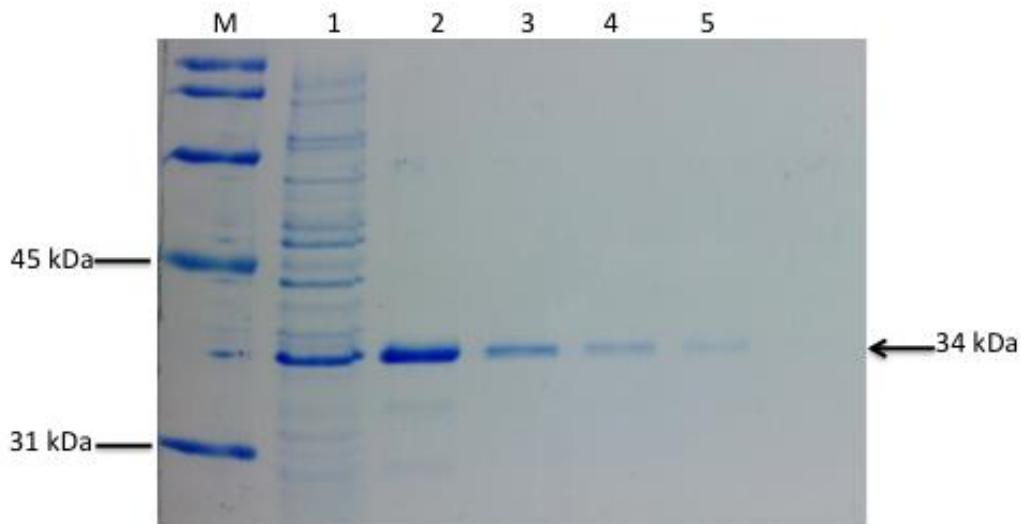


Figura 136. Purificación de rTcNTR por gradiente de Imidazol. Lisado de cultivo inducido (1); Eluciones (2-5).

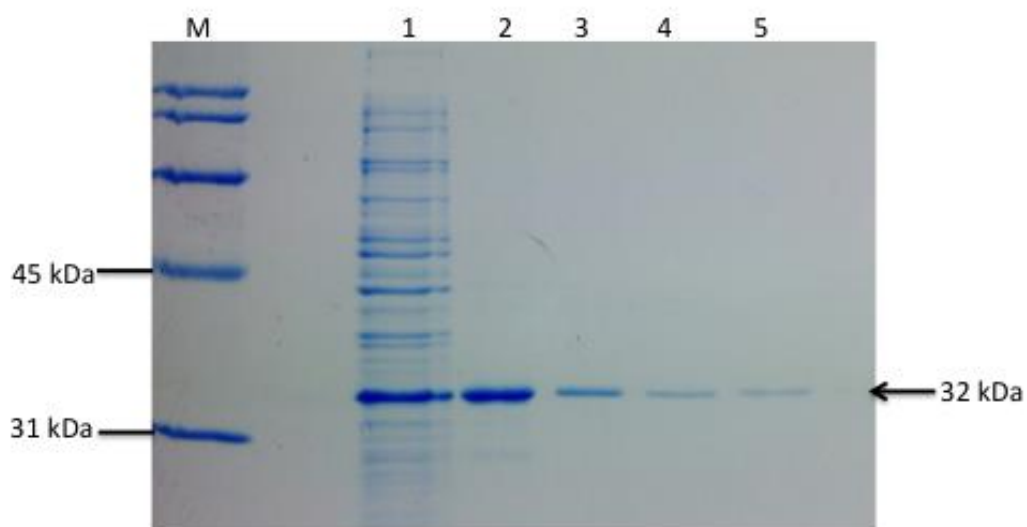


Figura 137. Purificación de rTrNTR por gradiente de Imidazol. Lisado de cultivo inducido (1); Eluciones (2-5).

11.7 Artículos científicos

11.6.1 Molecular characterization of calcineurin B from the non-virulent Trypanosoma rangeli kinetoplastid indicates high gene conservation.

Artículo publicado en **Molecular Biology Reports**

2013; Agosto 40 (8); Páginas 4901-4912

doi: 10.1007/s11033-013-2590-7

11.6.2 The type I nitroreductase homologous gene of Trypanosoma rangeli lacks the mitochondrial targeting signal and localizes at the cytoplasm

Artículo sometido a Parasites & Vectors.

11.8 Presentaciones en congresos

Evento	Año de presentación	Tipo de presentación	Título
XX Congreso Latinoamericano de Parasitología y XV Congreso Colombiano de Parasitología Y Medicina Tropical	2011	Cartel	Estudio <i>in silico</i> de los genes codificantes para la Subunidad B de la Calcineurina (CnB) y calmodulina-ubiquitina de tripanosomas
X congreso colombiano de enfermedades infecciosas (ACIN).	2011	Cartel	Identificación y caracterización de los genes codificantes para la Subunidad B de la Calcineurina (CnB) de <i>Trypanosoma</i>
I Jornada de Investigaciones del Grupo de Enfermedades infecciosas de la Pontificia Universidad Javeriana.	2012	Cartel	Identificación y caracterización de los genes codificantes para la Subunidad B de la Calcineurina (CnB) de <i>Trypanosoma rangeli</i>