



Universidad de Granada

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**Análisis global de**

**la familia multigénica MASP (*Mucin Associated  
Surface Proteins*) de *Trypanosoma cruzi*.**

LUIS MIGUEL DE PABLOS TORRÓ

TESIS DOCTORAL

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Luis Miguel de Pablos Torró  
D.L.: GR 3524-2010  
ISBN: 978-84-693-5229-8



Universidad de Granada

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**Análisis global de la familia multigénica MASP  
(*MucinAssociated Surface Proteins*) de  
*Trypanosoma cruzi*.**

Memoria presentada por el linceiado  
Luis Miguel de Pablos Torró para optar  
al grado de Doctor en Biología.

DIRECTOR:

Dr. Antonio Osuna Carrillo de Albornoz

Granada, 2010

Parte de los resultados de esta memoria han sido presentados en los congresos:

- V Congreso de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (SEM-TSI). Tenerife (España), 2006.
- I International Symposium: "Molecular Immunology of Protozoan Infections". Buenos Aires (Argentina), 2007.
- X Congreso Ibérico de Parasitología (CIP 10). Madrid (España), 2007.
- I Simposio Internacional Centenario de la Enfermedad de Chagas (1909-2009). Coquimbo (Chile), 2009.
- II Jornadas Bienales de Jóvenes Investigadores en Proteómica. Córdoba (España), 2010.
- VII Congreso de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (SEM-TSI). Salamanca (España), 2010.

Y registrados en la siguiente patente:

- "Uso de la proteína MASP52 para el diagnóstico, el tratamiento y la prevención de la enfermedad de Chagas". Luis Miguel de Pablos Torró, Antonio Osuna Carrillo, Gloria Maribel González González. **P200901403**. Universidad de Granada. España. 2009

La presente memoria de tesis ha sido financiada gracias a los proyectos de investigación:

- "Evaluación Mediante Estudio de la respuesta Inmune a antígenos Secretados, de la eficacia del tratamiento de la Enfermedad de Chagas crónica; correlación de dicha con la determinación de la parasitemia mediante PCR". AECI A/3045/05
- "Utilidad de antígenos excretados y secretados en la evaluación de la eficacia del tratamiento de la enfermedad de Chagas Crónica en seguimiento prolongado. Correlación con parámetros parasitológicos, inmunológicos y clínicos". A/5782/06.

Las becas obtenidas para la asistencia a congresos y cursos durante el periodo formativo predoctoral, ha sido financiadas por la Sociedad Española de Parasitología (SEP), The European Federation of Parasitologists (EFP), Howard Huges Medical Institute (HHMI) y de The Wellcome Trust Organization.

	Página
A. INTRODUCCIÓN.....	9
A.1. Tripanosomiasis Americana o Enfermedad de Chagas.....	10
A.1.1. Generalidades.....	10
A.1.2. Epidemiología.....	10
A.1.3. Ciclo de vida.....	12
A.1.4. Patología de la Enfermedad de Chagas.....	14
A.1.5. Características estructurales de <i>T. cruzi</i> .....	15
A.2. Respuesta humoral y Diagnóstico serológico de la Enfermedad de Chagas.....	19
A.2.1. Respuesta humoral en <i>T. cruzi</i> .....	19
A.2.2. Diagnóstico serológico en <i>T. cruzi</i> .....	22
A.2.3. Respuesta humoral y mapeo de epítomos B en regiones no repetidas y repetidas en tándem de antígenos de <i>T. cruzi</i> .....	25
A.3. Filogenia, Genómica y Biología Molecular de <i>T. cruzi</i> .....	29
A.3.1. Variabilidad genética y estructura de poblaciones de <i>T. cruzi</i> .....	29
A.3.2. Genoma: <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	32
A.3.3. Control de la expresión génica en tripanosomátidos.....	35
A.4. Pseudogenes.....	38
A.4.1. Generalidades.....	38
A.4.2. Pseudogenes: expresión y funcionalidad.....	40
A.4.3. Pseudogenes y <i>T. cruzi</i> .....	42
A.5. Entrada e invasión celular por <i>T. cruzi</i> .....	46
A.5.1. Generalidades.....	46
A.5.2. Depósitos de Calcio, despolimerización de actina, movimiento lisosomal y cascadas de señalización celulares.....	48
A.5.3. Célula hospedadora: Matriz extracelular y Receptores celulares.....	51
A.5.3.1. Rafts de membrana.....	51
A.5.3.2. Receptores de bradikininas.....	53
A.5.3.3. Receptores de transialidasas: citoqueratina 18, laminina y receptor para factor de crecimiento neuronal.....	54
A.5.3.4. Galectina 3.....	56
A.5.3.5. Trombospondina.....	56
A.5.4. Invasión celular: Moléculas de <i>T. cruzi</i> implicadas.....	57

A.5.4.1. Cruzipaína.....	57.
A.5.4.2. gp35/50, gp82 y gp 90.....	59
A.5.5. Familias multigénicas e infectividad.....	60
A.5.5.1. Mucinas.....	60
A.5.5.2. Transialidasas.....	64
A.5.5.3. DGF-1 (Disperser Gene Family-1).....	67
A.5.5.4. MASP (Mucin Associated Surface Proteins).....	68
B. OBJETIVES.....	71
C. MATERIAL Y MÉTODOS.....	74
C.1. Materiales.....	75
C.1.1. Líneas Celulares.....	75
C.1.1.1. Parásitos.....	75
C.1.1.2. Bacterias empleadas en la clonación y transformación.....	76
C.1.1.3. Células Vero.....	76
C.1.2. Medios de cultivo.....	76
C.1.3. Soluciones y tampones para técnicas moleculares.....	79
C.1.4. Soluciones y tampones para el manejo de proteínas.....	79
C.1.5. Soluciones y tampones para técnicas inmunológicas.....	81
C.1.6. Bases de datos y herramientas bioinformáticas.....	83
C.1.7. Vectores.....	85
C.1.8. Oligonucleótidos.....	85
C.1.9. Péptidos sintéticos.....	87
C.2. Métodos:.....	88
C.2.1. Cultivo y manejo de <i>T. cruzi</i> e infección de células sincronizadas.....	88
C.2.2. Cultivo y manejo de <i>E. coli</i> .....	92
C.2.3. Técnicas de Biología Molecular y manipulación de DNA y RNA.....	93
C.2.4. Técnicas de clonación.....	100
C.2.5. Técnicas para el estudio de proteínas.....	101
C.2.6. Técnicas inmunológicas.....	108
D. RESULTADOS.....	118
D.1. ANÁLISIS PROTEÓMICO DE PROTEÍNAS MASP Y CARACTERIZACIÓN DE LA MASP52.....	119
D.1.1. Purificación del medio de interacción por cromatografía de afinidad.....	119

D.1.2. Secuenciación de aminoácidos de la fracción purificada y del MI.....	120
D.1.3. Análisis predictivo de motivos estructurales de la MASP5 y MASP52.....	121
D.1.3.1. Análisis de la secuencia aminoacídica de la MASP5.....	121
D.1.3.2. Análisis de la secuencia aminoacídica de la MASP52.....	122
D.1.4. Expresión proteica y RTqPCR de la MASP52.....	123
D.1.5. Localización de la MASP52 mediante Microscopía Láser Confocal en los distintos estadios de <i>T. cruzi</i> .....	127.
D.1.6. Localización de la MASP52 en los diferentes estadios de <i>T. cruzi</i> mediante Inmunocitoquímica.....	129
D.1.7. Endocitosis de la MASP52 adsorbida a bentonita por células Vero no fagocíticas.....	132
D.1.8. Efectos del antisuero frente a la MASP52 en la invasión celular por parte de formas tripomastigotas metacíclicas.....	133
D.2. ANÁLISIS DE LA ARQUITECTURA GENÓMICA DE LOS GENES MASP.....	135
D.2.1. Búsqueda bioinformática de motivos repetidos en secuencias MASP del genoma de <i>T.</i> <i>cruzi</i> .....	135
D.2.2. Análisis de los extremos 5' y 3' conservados de la familia MASP.....	135
D.2.3. Estudios de la hipervariabilidad de secuencia de la familia MASP en distintas cepas de <i>T. cruzi</i> a partir del gen MASP52.....	137
D.3. Clonación, análisis de (pseudo)genes MASP y expresión de la familia MASP en distintos estadios y cepas de <i>T. cruzi</i> .....	143
D.3.1. Estrategia de clonación de (pseudo)genes MASP de fase tripomastigote metacíclico..	143
D.3.2. Clonación de (pseudo)genes MASP del estadio tripomastigote metacíclico en la cepa PAN4.....	144
D.3.3. Clonación de (pseudo)genes MASP del estadio tripomastigote metacíclico en la cepa CL- Brenner.....	146
D.3.4. Clonación de (pseudo)genes MASP del estadio tripomastigote metacíclico en la cepa Maracay.....	150
D.3.5. Análisis de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de los (pseudo)genes MASP.....	154
D.3.6. Análisis Diferencial de las secuencias de genes de y pseudogenes MASP.....	155
D.3.7. Análisis de la presencia de secuencias TcTREZO en los (pseudo)genes MASP.....	162

..

D.3.8. RTqPCR de la familia MASP en los estadios epimastigote, tripomastigote metacíclico, tripomastigote derivado de cultivo celular y amastigote.....	165
D.3.9. Ciclo intracelular de <i>T. cruzi</i> y expresión de (pseudo)genes MASP. Clonación de las MASP96GL.....	167
D.3.10. Medida de la expresión de la familia MASP durante el ciclo intracelular mediante inmunofluorescencia.....	169
D.3.11. Creación de híbridos RNA-RNA estables por el pseudogen MASP2ΨICL.....	173
D.4. Mapeo de epítomos B y respuesta humoral frente al extremo C-terminal conservado de las proteínas MASP.....	176
E. DISCUSIÓN.....	181
E.1. Clonación y análisis de las secuencias de (pseudo)genes MASP de distintas cepas de <i>T. cruzi</i> .....	182
E.2. Arquitectura genómica y diversidad genética de la familia MASP entre distintas cepas de <i>T. cruzi</i> .....	187
E.3. Retrotransposición como mecanismo formador de (pseudo)genes MASP.....	190
E.4. Pseudogenes MASP: expresión y funcionalidad.....	191
E.5. Expresión de la familia MASP en distintas fases y cepas de <i>T. cruzi</i> .....	195
E.6. Detección proteómica de proteínas MASP y caracterización de la MASP52.....	200
E.7. Respuesta humoral y mapeo de epítomos B frente al extremo C-terminal conservado de las MASP.....	205
F. CONCLUSIONS.....	211
G. BIBLIOGRAFÍA.....	215

# A.INTRODUCCIÓN

## 1.Tripanosomiasis Americana o Enfermedad de Chagas

## 1.1 Generalidades

El agente causal de la enfermedad de Chagas es el protozoo parásito *Trypanosoma cruzi* perteneciente al Orden Kinetoplástida, Familia Trypanosomatidae, Genero *Trypanosoma*, y dentro del género, al grupo denominado Stercolaria, tripanosomátidos que se desarrollan en el intestino y las formas infectantes en el tercio posterior del mismo saliendo con las heces del insecto.

Esta enfermedad, fue descubierta en 1909 por el Dr. Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas, transmitiéndose al hombre a través de las heces liberadas por triatomíneos hematófagos pertenecientes al Orden Hemiptera, familia Reduviidae como: *Rhodinus prolixus*, *Triatoma infestans* o *Panstrongylus megistus* entre otras especies de insectos. El reservorio natural lo constituyen los armadillos, marsupiales, zarigüeyas (*Didelphis sp*), roedores, murciélagos y primates silvestres, además de mamíferos domésticos como perros, gatos, ratas o cobayas.

Originalmente, la tripanosomiasis americana debió ser una enfermedad endozoonótica manteniéndose el ciclo a través de animales salvajes, transformándose, en una enfermedad antropozoonótica, al invadir el hombre los ecotópos salvajes y ocupar el espacio físico perteneciente a estos mediante su acción deforestadora construyendo viviendas en dichos lugares, donde los triatomíneos han podido adaptarse fácilmente (Coura, 2007).

## 1.2. Epidemiología

La enfermedad de Chagas se distribuye desde el norte de Méjico y Sudamérica, hasta Argentina y Chile en el sur, afectando a un total de 21 países (WHO, (2002, Coura *et al.*, 2009). Se estiman en unos 16-18 millones el número de personas infectadas, dando lugar a un numero de nuevos casos que oscila entre las 50.000 a 200.000 nuevas infecciones al año (WHO, 2002, Tarleton *et al.*, 2007). Por su impacto sobre la productividad en el trabajo, incapacitación prematura y muerte, la enfermedad de Chagas conlleva a la perdida por discapacidad de 670,000 personas por año

Eliminado: ¶

(Tarleton *et al.*, 2007). Los mecanismos de transmisión de la enfermedad son los siguientes (Coura, 2007):

- **Principales Mecanismos:**
  - Vectores (triatominos)
  - Transfusiones sanguíneas
  - Oral (alimentos contaminados)
  - A través de la placenta o el canal del parto
- **Mecanismos Secundarios:**
  - Accidentes de laboratorio
  - Manipulación de animals infectados
  - Transplante de órganos
  - Sexualmente (Heridas, esperma o fluidos menstruales)

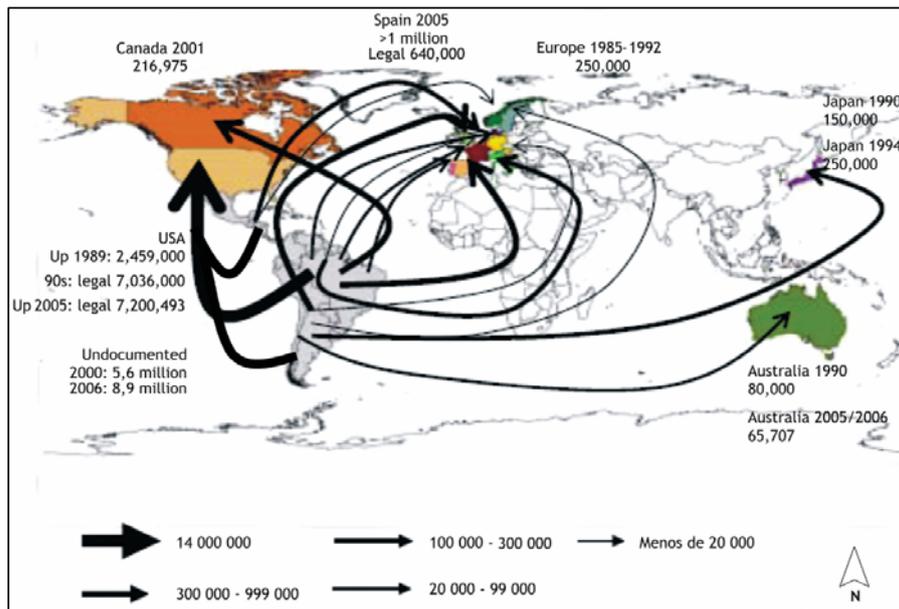


**Figura 1.1.** Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas. Zonas endémicas en gris y antroponóticas en blanco. (Coura *et al.*, 2009)

Tradicionalmente confinada a Latino América, la enfermedad de Chagas actualmente se encuentra en expansión como consecuencia de los procesos migratorios y globalización de la población mundial ocurrida en las últimas décadas (Figura 1.2), siendo necesaria la implantación de pruebas

diagnosticas en bancos de sangre y centros de salud en aquellos países con una alta tasa de población inmigrante proveniente de zonas endémicas.

Las tasas de infección en dicha población oscila entre el 16 por 1000 en Australia, 9 por 1000 en Canadá, 8 a 50 por 1000 en USA y 25 por 1000 en España (Schmunis, 2007). Siendo la población boliviana, la que mayores tasas de infección presenta en España, con serología positiva al parásito de hasta un 10.2% de esta población y de hasta un 65% en los pacientes ya infectados (Piron *et al.*, 2008, Muñoz *et al.*, 2009).



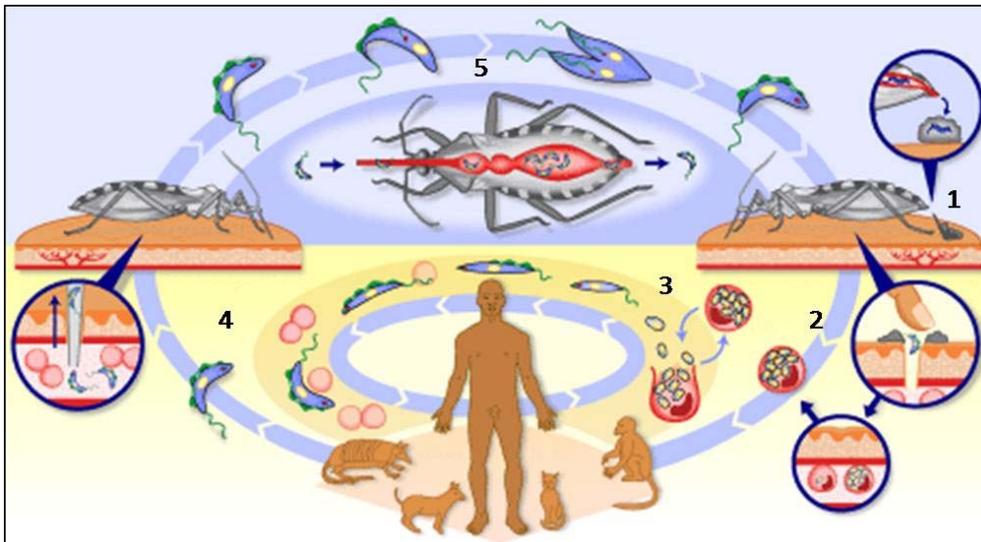
**Figura 1.2.** Flujo de Inmigración proveniente de América Latina, obtenido del Centro Latino Americano y Caribeño de Demografía. (Schmunis, 2007).

### 1.3. Ciclo de Vida

El ciclo de vida de *T. cruzi* es uno de los más complejos entre los miembros pertenecientes al Orden Kinetoplástida, describiéndose hasta cuatro formas básicas propias de éste parásito conocidas como: epimastigote, tripomastigote metacíclico, tripomastigote sanguíneo y amastigote (De Souza, 2002).

Como se observa en la Figura 1.3, el ciclo se inicia cuando el triatomino infectado, succiona sangre del mamífero y libera con sus heces trypomastigotes metacíclicos cerca del sitio de la picadura. Los trypomastigotes

penetran en el hospedador a través de la herida o a través de las mucosas. Dentro del hospedador, los trypomastigotes metacíclicos invaden las células nucleadas cerca del lugar de la inoculación, donde se diferencian a amastigotes intracelulares. Los amastigotes se multiplican por fisión binaria y cuando ocupan el citoplasma celular, se diferencian en trypomastigotes, que se liberan a los espacios intercelulares, la linfa y a la circulación sanguínea como trypomastigotes sanguíneos. Contrario a lo que sucede con *Trypanosoma brucei* donde los trypomastigotes si son capaces de dividirse, los trypomastigotes de *T. cruzi* no lo son, necesitando invadir nuevas células nucleadas y completar un nuevo ciclo intracelular para dividirse como amastigotes. Estos trypomastigotes infectan células de una gran variedad de tejidos incluyendo macrófagos y células de Intestino, sistema nervioso central, músculo liso o tejido adiposo (Stuart *et al.*, 2008).



**Figura 1.3.** Ciclo biológico de *T. cruzi*. A través de las heces del insecto vector, los trypomastigotes metacíclicos se liberan e invaden células que rodean al sitio de infección (1), diferenciándose y multiplicándose como amastigotes (2). Los trypomastigotes sanguíneos son liberados al torrente sanguíneo pudiendo encontrar nuevos lugares de infección (3) y/o pudiendo ser de nuevo ingeridos por el Triatomo intermediario (4). En el estómago del insecto, los trypomastigotes sanguíneos se diferencian a epimastigotes y estos dan lugar a los Trypomastigotes metacíclicos ya en el intestino terminal, ampolla rectar y tubos de Malpigi cerrando el ciclo al liberarse éstos a través de las heces del insecto vector (5) (Stuart *et al.*, 2008). Imagen tomada del TDR (The Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, OMS).

Se han descrito dos tipos morfológicos de tripomastigotes sanguíneos, una forma delgada o “slender”, con un núcleo alargado y flagelo relativamente pequeño y otra rechoncha o “stumpy”, con un núcleo oval y un flagelo más largo (De Souza, 2002). Al parecer, los trypomastigotes “stumpy” serían los encargados de cerrar el ciclo en el hospedador intermediario, mientras que las formas “slender” se encargarían de penetrar en nuevas células del hospedador vertebrado. Los trypomastigotes ingeridos por el insecto vector se transformarían de nuevo en epimastigotes que se multiplican por fisión binaria uniéndose a las paredes del intestino. En el intestino terminal y el recto algunos de los epimastigotes se diferenciarán a trypomastigotes metacíclicos, los cuales se liberan por las heces cerrando así el ciclo biológico del parásito (Figura 1.3).

#### 1.4. Patología de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas se presenta en dos formas:

- -Fase inicial o fase aguda.
- -Fase crónica, con formas cardíacas o digestivas (megasíndromes).

El desarrollo y curso de la enfermedad, va a depender del inóculo inicial, aproximadamente de 50-1500 parásitos por defecación normal de un triatomino son suficientes para infectar una persona en condiciones naturales, así como de las posibles reinfecciones. Otros factores son: las características biológicas de las cepas y clones infectantes, así como la respuesta inmune humoral y celular del hospedador (Coura, 2007). En la mayoría de casos la fase aguda da lugar a fiebre, malestares, agrandamiento del hígado, bazo y en algunos casos de transmisión por el vector, con signos de inflamación de la piel (chagoma) o de la mucosa ocular (signo de Romaña) que tan solo se detecta en un 1-2% aproximadamente de los casos contraídos por la picadura y defecación del insecto (Coura, 2007).

Las lesiones de la fase aguda se caracterizan por reacciones inflamatorias, con la presencia de granulomas localizados en el músculo o tejido cardíaco. En algunos casos, existe hiperplasia reticular en ganglios linfáticos y en otros casos se acompaña de una miocarditis aguda, habiendo

destrucción de neuronas cardíacas y del plexo mientérico, lesión que se continúa en la fase crónica de la enfermedad (2002).

Al menos un 40% de los pacientes que se encuentran en la fase crónica, se mantienen asintomáticos, denominándose esta, como fase indeterminada de la enfermedad de Chagas (Moncayo *et al.*, 2009). Como parte de la patología cardíaca de esta fase, existe una extensa fibrosis miocárdica, destrucción de sistemas conductores de los haces de Purkinje y gran reducción en el número de neuronas cardíacas. Es frecuente encontrar hipertrofia de las fibras miocárdicas y dilatación de las cavidades cardíacas, observándose la aparición de aneurismas y trombos de sangre internos (Marin-Neto *et al.*, 2007).

La forma digestiva de la enfermedad, por su parte, da lugar a la destrucción de gran número de neuronas de los plexos mientéricos (particularmente esófago y colon), lo cual conlleva a una dilatación de estos órganos con la aparición de síndromes como megaesófago, megacolon, mega colédoco y de otras vísceras tales como la vejiga, uréter y/o vesícula biliar (Coura, 2007).

### **1.5. Características estructurales de *T. cruzi***

La superficie celular de *T. cruzi* se compone de la membrana celular, la bicapa lipídica, típica de cualquier membrana biológica, y una serie de componentes azucarados asociados a la membrana hacia el medio extracelular, formando el glicocálix del parásito. Este glicocálix se compone de poliazucars (glicolipidos) y glicoproteínas unidas a GPI que recubren la parte externa superficial del parásito.

Mediante técnicas de criofractura se observa que esta membrana no es homogénea, existiendo al menos tres macrodominios: el existente en el cuerpo celular, el flagelo y la bolsa paraflagelar. Unido a la superficie más interna, se encuentra una capa formada por microtúbulos subpeliculares (Souza, 2009). Aunque existen en otras células, no se conoce una unión así de fuerte como la existente entre los microtúbulos subpeliculares y la membrana plasmática como la que existe en los kinetoplastos (De Souza, 2002). Además de conectarse a la membrana, estos microtúbulos se han encontrado asociados con el retículo

endoplasmático y algunas veces asociados a las rutas de absorción endocítica (Souza, 2008).

El 85% de la ruta endocítica ocurre a través del citostoma, una estructura redondeada, rodeada por microtúbulos subpeliculares, que se invagina profundamente. El resto de la vía endocítica ocurre en la bolsa flagelar. Una vez unidas a una de estas dos estructuras las macromoléculas se internalizan rápidamente y aparecen pequeñas vesículas endocíticas emergiendo de esas regiones. Estas vesículas endocíticas poseen un pH ácido, sugiriéndose que puedan corresponder con los endosomas tempranos (Souza, 2009). Proveniente del aparato de Golgi se acumula en las vesículas de la ruta endocítica el enzima denominado cruzipaina, cisteín-proteasa mayoritaria de *T. cruzi*. Esta proteína también se localiza en los orgánulos denominados como “reservosomas”, donde las macromoléculas que el parásito ingiere del exterior (Souza, 2008). Los reservosomas se encuentran en número variable tanto en cantidad como en morfología, siendo más electrodensos que el citoplasma que los rodea. Estos orgánulos se sabe que existen en la fase epimastigote, desapareciendo en el momento que ocurre la metaciclogénesis, y volviéndose a visualizar en la fase trypomastigote metacíclico. Están formados por proteínas e inclusiones lipídicas, creándose como parte del sistema endosomal, su nombre deriva de su función “como reserva de partículas”, durante el proceso endocítico del parásito y actuando de manera semejante a como lo haría un lisosoma (Cunha-e-Silva *et al.*, 2006).

La vía secretora, por su parte, se forma por el Retículo Endoplasmático, el Aparato de Golgi y un sistema de vesículas liberadas desde este último, que rodea a la bolsa paraflagelar y se liberarán a través de esta. El flagelo de estos parásitos se sitúa en la base del cuerpo basal, cerca de la invaginación que forma la bolsa paraflagelar. El flagelo se compone de la estructura típica de nueve tripletes de microtúbulos periféricos y un par de microtúbulos centrales. Ligado al inicio de éste flagelo existe una estructura conocida como el cuerpo paraflagelar formado por numerosos filamentos unidos al axonema. El cuerpo paraflagelar se forma por un gran número de proteínas, siendo mayoritarias las conocidas como la “Paraflagelar rod proteins 1 y 2”, las cuales son altamente antigénicas (De Souza, 2002). La longitud del flagelo varía según el estadio pudiendo poseer desde 20 µm en el caso de los trypomastigotes o reducirse a

Eliminado: ¶

1  $\mu\text{m}$  en los amastigotes intracelulares. La base del flagelo se localiza proximo al cuerpo basal, y por tanto del comienzo del flagelo, existiendo estructuras filamentosas que unen dicho cuerpo basal con el kinetosoma. Como se observa en la figura, en el caso de *T. cruzi*, el flagelo emerge lateralmente, creando un movimiento aparente en el cuerpo del parásito, dando la sensación de membrana ondulante (De Souza, 2002).

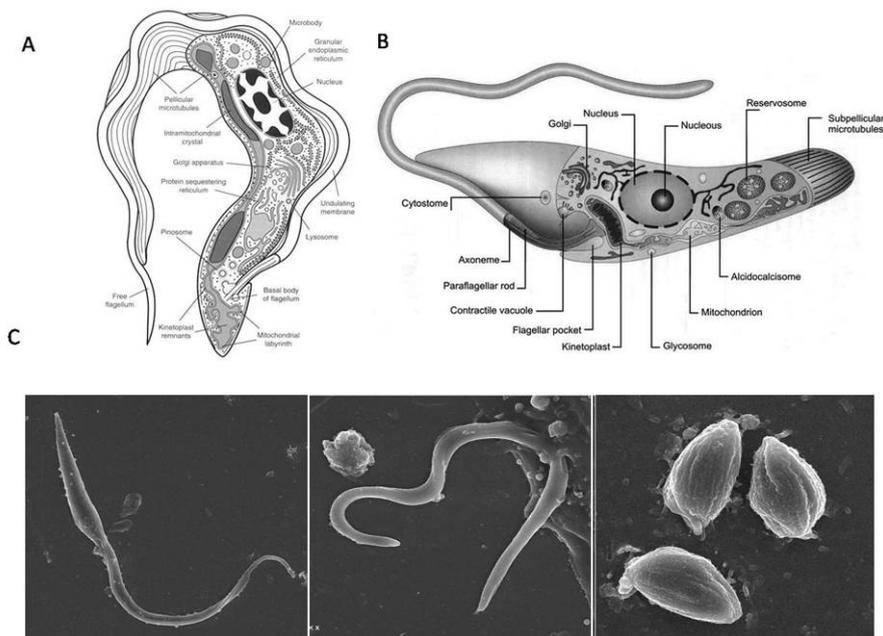
La mayor parte de la ruta glucolítica que posee el parásito, ocurre en un orgánulo único denominado Glicosoma (Opperdoes, 1990). Estas estructuras se asemejan a los peroxisomas de células de mamíferos y se rodean de una membrana (Figura 1.4).. Como ocurre en los peroxisomas, los glicosomas poseen catalasas y oxidasas productoras de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , además de poseer las enzimas glicolíticas, contiendo enzimas pertenecientes a rutas metabólicas como el metabolismo de los peróxidos, oxidación de ácidos grasos, síntesis de fosfolípidos, fijación de  $\text{CO}_2$ , ruta "Salvage" de las purinas o biosíntesis *de novo* de pirimidinas (De Souza, 2002).

Otro orgánulo típico de estos parásitos son los "acidocalcisomas"(de Souza *et al.*, 2000), estructuras esféricas compuestas de una membrana que contiene material electrodenso en su interior preferentemente situadas en la periferia del parásito (Figura 1.4).. No todas las fases tienen la misma cantidad de estos orgánulos, siendo la fase amastigote la que más posee. Estos orgánulos ácidos poseen una gran cantidad de elementos como P,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , Na and Zn así como de PPI en su interior, que actúan como reserva de energía, Las formas del parasito poseen en su membrana diferentes tipos de bombas de transporte y homeostasis iónica, del tipo  $\text{H}^+$ -ATPasa,  $\text{Ca}^{2+} - \text{H}^+$  ATPasa traslocadoras y bombas vacuolares transportadoras de pirofosfato ( $\text{V-H}^{2+}$ -PPasa) (de Souza *et al.*, 2000). Se sugiere que los acidocalcisomas también pudieran actuar como depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  para ser usados durante ciertos momentos del ciclo de vida del parásito, como osmoregulador, regulando el pH citoplasmático así como almacén de energía debido a su alto contenido en PPI (de Souza *et al.*, 2000).

*T. cruzi*, así como los otros protozoos pertenecientes al orden Kinetoplástida se caracterizan por poseer un largo flagelo y una estructura conocida como Kinetoplasto. El Kinetoplasto, bajo Microscopía electrónica, se

observa como una estructura electrodensa variando su forma y organización estructural dependiendo del estadio del ciclo de vida del parásito (Figura 1.4).

El Kinetoplasto, lo forma un ensanchamiento de la mitocondria en el extremo proximo a la raíz flagelar y se compone de DNA denominado como DNA-Kinetoplastídico o DNA-K y se encuentra organizado en maxi y minicírculos (Souza, 2009). Existen varios cientos de minicírculos que varían en su tamaño entre 0.5 a 2.5 Kb y unas pocas docenas de maxicírculos. Estas estructuras codifican RNAs guías que modifican los transcritos de los maxicírculos mediante una inserción o delección extensiva de urilidato, proceso conocido como “RNA editing” mitocondrial (Stuart *et al.*, 2005). Los maxicírculos son estructural y funcionalmente análogos al DNA mitocondrial de eucariotas superiores, codificando rRNA y subunidades de los complejos de la cadena transportadora de electrones (Souza, 2008). Estos orgánulos se replican aproximadamente en sincronía con la fase S de la célula, requiriendo enzimas del tipo de la Topoisomerasas de tipo II, DNA polimerasas, proteínas de unión a secuencias de minicírculos universales, primasas y ribonucleasas



(Souza, 2008)

**Figura 1.4.** Morfología de *T. cruzi*. (A) Características morfológicas y orgánulos correspondientes a la fase tripomastigote. (B) Características morfológicas y orgánulos correspondientes a la fase epimastigote (Souza, 2008). (C) Imágenes de microscopía electrónica de barrido de la fase epimastigote, trypomastigote metacíclico y amastigote., fotografías realizadas por nuestro grupo en el Centro de Instrumentación Científica de la UGR.

## 2. Respuesta humoral y Diagnóstico serológico de la Enfermedad de Chagas

### 2.1. Respuesta humoral en *T. cruzi*

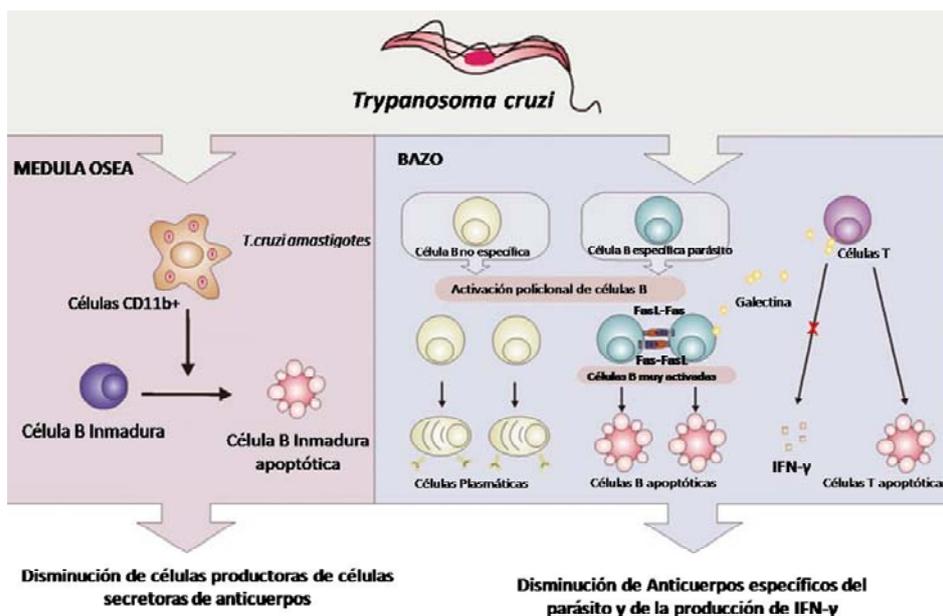
Como ya se ha comentado, dentro de la respuesta generada a la infección, existen dos etapas, la fase aguda con una mortalidad del 5%, sucediéndose en 3-8 semanas tras la infección y la etapa crónica o indeterminada donde en el 30% de los casos se contrae una sintomatología asociada a la enfermedad (Kirchhoff, 1993).

La cinética y los patrones isotípicos de la hipergammaglobulinemia asociada a esta enfermedad, ha sido estudiada en diferentes modelos de ratón y en casos humanos. La respuesta elevada de inmunoglobulinas aparece el día 14 postinfección, incrementándose hasta el día 28 y persistiendo durante la fase crónica (a partir de 60 días), predominando sobre todo el isotipo IgG2a (incrementándose hasta 10 veces su nivel), e incrementándose las IgM, IgG1, IgG3 e IgG2b (Spinella *et al.*, 1992, Rowland *et al.*, 1992). La respuesta más específica frente a *T. cruzi* sucede aproximadamente 2 semanas postinfección cuando la parasitemia aparece como más elevada, siendo máxima después de 4 semanas de infección y manteniéndose durante un largo tiempo durante prácticamente toda la fase crónica (Rowland *et al.*, 1992).

En el caso de *T. cruzi*, la respuesta policlonal ejercida por los linfocitos B es uno de los mecanismos principales para explicar la desregulación de la respuesta inmune durante la fase aguda, siendo posiblemente un factor muy importante para el establecimiento del parásito durante la fase crónica (Minoprio *et al.*, 1989, Grauert *et al.*, 1993). Esta activación policlonal es un mecanismo de defensa, creando una respuesta de anticuerpos frente a un gran número de antígenos y epítopos del parásito.

Sin embargo, a pesar del gran número de anticuerpos, este mecanismo puede ser utilizado por los patógenos para escapar de la respuesta inmune mediante una disminución de los anticuerpos específicos frente a moléculas vitales para el patógeno, aumentando así el número de anticuerpos irrelevantes o incluso ejerciendo un efecto deletéreo en el organismo, ejerciendo reacciones de tipo autoinmune durante las fases crónicas de las infecciones (Acosta Rodríguez *et al.*, 2007). La infección por *T. cruzi*, induce una marcada pérdida de células B inmaduras en la médula ósea (MO), comprometiendo a las células recientemente emigradas en la periferia. Esta pérdida, se asocia a un aumento de la apoptosis de las células B en un mecanismo dependiente del aumento de expresión del ligando Fas/FasL el cual promueve la apoptosis de la célula en que se activa (Figura 2.1), sobre todo en células B IgG<sup>+</sup> específicas para el parásito, no sufriendo éste proceso las células autoreactivas (Zuniga *et al.*, 2002); (Acosta Rodríguez *et al.*, 2007).

Durante la infección por Chagas se sabe también, que las células B poseen papeles adicionales en la regulación de células T, que forman parte de la respuesta inmune celular a este parásito. Las células B activadas que expresan altos niveles de MHC II (Complejo Mayor de Histocompatibilidad II) y moléculas activadoras de células T, que permiten la presentación de antígenos a las células T, contribuyen al mantenimiento y a la homeostasis inmunológica de la inmunidad mediada por células T. Las células B activadas son activas secretoras de Galectina 3, disparando la apoptosis de células T y disminuyendo por consecuencia la secreción de IFN- $\gamma$  (Figura 2.1).



**Figura 2.1.** La infección por *T. cruzi* afecta a las células B a diferentes niveles de maduración. Esquema de los eventos que suceden en el bazo y médula ósea (Acosta Rodriguez *et al.*, 2007)

Se ha descrito que la galectina es capaz de regular a las células CD4+CD25+ (T reguladoras Treg) (Garin *et al.*, 2007) suprimiendo la administración de esta la inflamación crónica desviándose la respuesta inmune hacia un tipo de respuesta Th2 (Santucci *et al.*, 2003), poseyendo este mecanismo de evasión de la respuesta inmune celular una gran importancia para el establecimiento de la fase crónica de la enfermedad, (Zuniga *et al.*, 2001).

Las funciones biológicas de las inmunoglobulinas IgG pueden ser diversas, controlándose la producción de las diversas subclases de isotipos de IgG por diferentes clases de citoquinas. Por tanto, el cambio de isotipos de Ig, en general, se debe a una respuesta dirigida por las citoquinas asociadas a Th1 o Th2 (Kawano *et al.*, 1994, Briere *et al.*, 1994). Por ejemplo, un elevado nivel IFN- $\gamma$  se sabe que da lugar a un cambio de isotipo a IgG2, inhibiendo la producción de IgG3, IgG1, IgG2b e IgE (Snapper *et al.*, 1987).

Funciones como la de unión al complemento, mediante la subclase de inmunoglobulina IgG1 (o anticuerpos líticos), es abolida por *T. cruzi* mediante proteínas que el parásito lleva ancladas a su membrana. La unión de los anticuerpos a una proteína de 160 kDa o "Proteína reguladora de complemento" hace que se inhiba el componente C3b y su actividad convertasa. En dicha inhibición del complemento también juega un papel la Calreticulina, uniendo la porción de la C1q, e inhibiendo al complejo de unión a membrana (Aguilar *et al.*, 2005, Norris *et al.*, 1991)

El hecho de la existencia de reactividad de los anticuerpos generados durante la enfermedad de Chagas con tejidos del hospedador, ha sido ampliamente estudiado (Kierszenbaum, 2003, Tarleton, 2003). Existen anticuerpos generados por la proteína B13 del parásito, que reconocen mediante reactividad cruzada a la cadena pesada de la miosina cardíaca, sugiriéndose un posible papel de estos anticuerpos en la cardiomiopatía chagásica (Kierszenbaum, 2003). Otros autoanticuerpos descritos son los que

reconocen a la proteína Cha humana o los generados frente a la propia Calreticulina A de *T. cruzi* que poseen una alta homología con la Calreticulina humana o de ratón, dando lugar a reacciones cruzadas visualizadas en cortes de corazón de animales infectados (Ribeiro *et al.*, 2009, Cunha-Neto *et al.*, 1995, Girones *et al.*, 2001).

Sin embargo el ejemplo mejor descrito sobre la implicación de proteínas del parásito en la cardiomiopatía chagásica es el papel de la proteína ribosomal TcP2 $\beta$  descrita por el grupo del Dr. M.J. Levin. Estas proteínas contienen un epítipo en su extremo C-terminal llamado R13, el cual posee semejanzas con otro motivo en el segundo loop extracelular del receptor  $\beta_1$  adrenérgico ( $\beta_1$ -AR) (Smulski *et al.*, 2006, Labovsky *et al.*, 2007). Estudios utilizando muestras de pacientes con enfermedad de Chagas cardíaca demuestran una correlación entre la presencia de los anticuerpos y la incidencia de arritmias ventriculares, así como manifiestas alteraciones electrocardiográficas en ratones híper inmunizados con TcP2 $\beta$  (Lopez Bergami *et al.*, 1997).

## 2.2. Diagnóstico serológico en *T. cruzi*

La necesidad de nuevas pruebas diagnósticas ha llevado a la inclusión en los últimos años de nuevos marcadores moleculares derivados de diferentes moléculas de *T. cruzi* capaces de reaccionar con anticuerpos de individuos que cursan tanto infecciones crónicas como agudas. Los métodos diagnósticos para determinar la presencia de *T. cruzi* en pacientes son variados, entre otros, técnicas basadas en la "Polymerase chain reaction (PCR)"; "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)"; inmunofluorescencia indirecta (IFI) o ensayos de hemoaglutinación indirecta (HAI), son las herramientas de rutina en los laboratorios clínicos. Actualmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS), recomienda el uso de dos test en paralelo, y cuya sensibilidad sea de al menos un 98% (1991). El diagnóstico serológico, es una de las técnicas de rutina utilizadas tanto en diagnóstico clínico como en el practicado en los bancos de sangre, utilizando la respuesta humoral creada frente a diferentes antígenos previamente definidos y caracterizados en los laboratorios de investigación.

Existen actualmente varios tipos de kits o sistemas diagnósticos con diversos antígenos para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas:

- Homogenados del parásito.

Este tipo de test son los menos costosos de realizar, necesitándose únicamente homogeneizar una muestra de parásitos previamente cultivados. El ORTHO *T. cruzi* ELISA Test System, se encuentra actualmente aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) y utiliza extractos de lisados totales del parásito, lo cual incrementa la sensibilidad del test, incluso cuando los niveles de anticuerpos son muy bajos, si bien disminuye la especificidad, ya que se aumenta la posibilidad de reacciones cruzadas entre *T. cruzi* y *Leishmania spp* (Tobler *et al.*, 2007).

- Trypomastigote Excreted-Secreted Antigens (TESA).

Este tipo de test denominado como TESA-blot, utiliza los antígenos excretado-secretados por las formas trypomastigotas sanguíneas. Este test se relaciona principalmente por la presencia de antígenos de fase aguda (SAPA) y una banda de 150-160 kDa relacionada con la fase crónica de la enfermedad. Este test presenta alta especificidad y sensibilidad sin reactividad en enfermos con leishmaniasis visceral o infectados por *Trypanosoma rangeli*. Es capaz de resolver el 95% de casos dudosos, proponiéndose como test confirmatorio (Umezawa *et al.*, 1996).

- Mezclas de antígenos recombinantes.

Como resultado del rastreo de librerías de expresión realizadas con cDNA o DNA genómico utilizando suero de pacientes chagásicos o animales infectados con *T. cruzi* se han aislado detectado antígenos recombinantes que han sido utilizados en diferentes ensayos inmunológicos como se resume en la tabla 1. Estas proteínas contienen motivos repetitivos como es el caso de los antígenos FRA, Ag1, JL7 y H49 o bien no repetitivos como la proteína P ribosomal JL5, la proteínas flagelares que ligan  $Ca^{2+}$  de 24 kDa (FCaBP, 1F8, Tc-24, Tc-28), A13, Tc-40, proteínas de choque térmico, proteínas asociadas a la membrana del flagelo (FL-160, CEA, CRP) y la ubiquitina (da Silveira *et al.*, 2001). Estas proteínas han ofrecido altos niveles de sensibilidad, desde el 100% como el caso de la mezcla de los antígenos CRA+FRA, al 90% de las hsp78 y FCaBP y con especificidades del 98.3% de las mezclas primeras al 92.3% de los segundas. El antígeno de estas ultima mezcla, produce alguna reacción cruzada con sueros de enfermos con leishmaniosis (da Silveira *et al.*, 2001).

Se han realizado pruebas de Inmunodots, de 5 Ags recombinantes en tiras de nitrocelulosa, junto con un control de IgG humana dando buenos resultados a pesar de encontrarse algunos falsos positivos (Pastini *et al.*, 1994).

La pérdida de sensibilidad y especificidad de alguno de los kits pudiera deberse a que las mezclas antigénicas al ser absorbidas sobre una superficie y espacio físico determinado, pudiera ocultar los epítomos a los anticuerpos de la muestra (da Silveira *et al.*, 2001).

- Péptidos sintéticos.

Los péptidos sintéticos derivados de secuencias repetitivas de antígenos de *T. cruzi* han sido bien estudiados, caracterizándose el epítomo exacto en el antígeno, donde los anticuerpos reaccionan. Este tipo de ensayo puede presentar limitaciones debido a que algunos péptidos sintéticos no pueden imitar a los epítomos inmunodominantes de los antígenos nativos, sobre todo en el caso de epítomos conformacionales (da Silveira *et al.*, 2001). En este caso las mezclas con diferentes epítomos, son necesarias para incrementar la sensibilidad de la reacción, dando lugar a lo que se denomina como antígenos multiepítómicos. Estas construcciones pueden minimizar los problemas de competición entre diferentes péptidos por la fase sólida como en el caso de las construcciones utilizando TcD, TcE y PEP-2 (99.6% sensibilidad y 99.3% de especificidad) o las que utilizan a los anteriores en combinación con TcLo 1.2 (100% sensibilidad) (Houghton *et al.*, 2000).

**Tabla 1.** Desarrollo de ensayos serológicos usando diferentes antígenos recombinantes o péptidos sintéticos (da Silveira *et al.*, 2001).

Antígenos	Ensayo	Tipo Ag.	Sensibilidad(%)	Especificidad(%)
CRA+FRA	ELISA	Prot. de fusión	100-98.3	100
Ag1+Ag2+Ag30+SAPA	Inmunodot	Prot. de fusión	99.6	100
FCaBP+hsp70	ELISA	Prot. de fusión	97.0	92.3
CRA+FRA+Tc24+SAPA+MAP+TcD+Ag39	Inmunocromatografía	Prot.fusión +Péptidos sintéticos	100	99.3
TcD+PEP-2	ELISA	Péptidos sintéticos	99.7	99.0
TcD+Ag2+TcE	Inmunoensayo con partículas en gel	Péptidos sintéticos	96.8	94.6
Multiepítomo TcD+TcE+PEP-2	ELISA	Péptido sintético	99.6	99.3

			linear		
<b>Multipéptido TcD+TcE+PEP-2+TcLo</b>	ELISA		Péptido sintético	100	ND
<b>1.2</b>			ramificado		
<b>Multipéptido TcD+TcE+PEP-2+TcLo</b>	ELISA		Péptido sintético	100	ND
<b>1.2</b>			linear		
<b>Multipéptido TcD+TcE+PEP-2+TcLo</b>	ELISA		Proteína de fusión	100	96.6
<b>1.2</b>			linear		

Abreviaturas: CRA, cytoplasmic repetitive antigen; FCaBP, flagellar Ca<sup>2+</sup>-binding protein; FRA, flagellar repetitive antigen; hsp70, heat shock protein of 70 kDa; SAPA, shed acute-phase antigen; ND, no-determinado

### 2.3. Respuesta humoral y mapeo de epítomos B en regiones no repetidas y repetidas en tándem de antígenos de *T. cruzi*

La alta concentración de anticuerpos frente a un antígeno concreto puede ser debido a la existencia de genes que codifican proteínas con dominios repetidos en tándem (RT). Los cuales se definen por poseer una o más copias de un patrón aminoacídico, o a antígenos con dominios repetidos (DR), característicos de familias multigénicas (Goto *et al.*, 2008).

Estos dominios TR, se encuentran en regiones altamente conservados intra-específica, y la alta exposición de estos al sistema inmune, induce la existencia de anticuerpos específicos frente a ellos en el suero de los enfermos infectados, poseyendo los anticuerpos una gran afinidad por los epítomos situados en los TR (da Silveira *et al.*, 2001). La inmunodominancia ejercida por estos motivos, da lugar a una gran exposición de estos epítomos basándose en su ratio o razón molar y/o su organización bidimensional particular (Schofield, 1991). Esta inmunodominancia es responsable de la respuesta de los Linfocitos B a parásitos como *Plasmodium falciparum* (Anders *et al.*, 1986, Calvo-Calle *et al.*, 2006), *Leishmania infantum* (Goto *et al.*, Goto *et al.*, 2007) o *Trypanosoma cruzi* (Goto *et al.*, 2008, Frasch, 1994, Alvarez *et al.*, 2001).

Existen varias estrategias para definir epítomos B dentro de la secuencia, de cara al descubrimiento de epítomos B en antígenos, utilizando sueros humanos o de animales infectados con *T. cruzi*.

Tres han sido las maneras de estudiar la región de unión entre un antígeno y un anticuerpo. La primera son las librerías de péptidos solapantes, normalmente entre 2-3 aminoácidos y de 10 a 15 residuos de longitud. Otra

estrategia es la utilización de la técnica denominada “phage-display” para realizar librerías combinatorias de péptidos existentes en la cubierta de un bacteriófago, lo que permite la identificación de secuencias reactivas (mimotopos) que imitan epítomos tanto secuenciales o discontinuos (conformacionales). Y por último, la técnica de SPOT, la cual permite realizar ensayos con múltiples péptidos ligados a una membrana, revelándose como “dots” o puntos cuando existe una interacción antígeno-anticuerpo (Pitcovsky *et al.*, 2001). Como respuesta a antígenos de *T. cruzi* se han encontrado epítomos B tanto en secuencias no repetitivas, como en secuencias repetitivas.

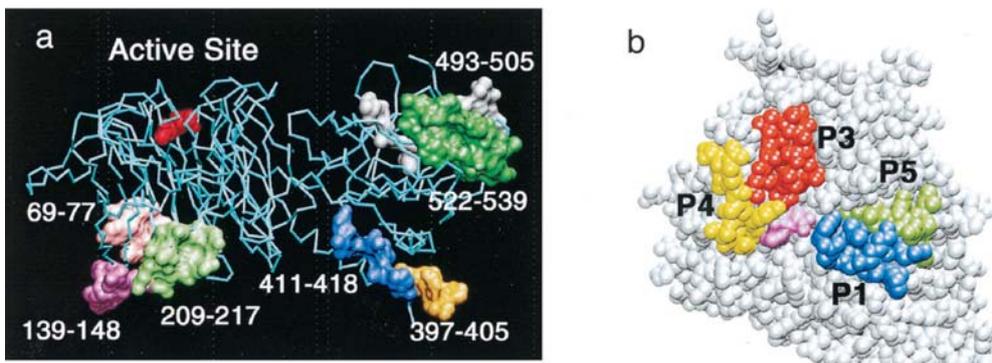
- Epítomos B de secuencias no repetitivas.

Un ejemplo de este tipo de epítomos la representa el antígeno Tc40, una proteína con homología con diferentes ribonucleoproteínas o Proteínas de unión a RNA de *T. cruzi* sugiriendo la existencia de reacciones cruzadas intermoleculares en antígenos del parásito. Dentro de esta proteína, se ha caracterizado un epítomo en su región central con secuencia PAKAAAPPAA, que reacciona con el 89.8% de los sueros de chagásicos crónicos ensayados (Lesenechal *et al.*, 2005). De hecho, sueros de pacientes crónicos cardíopatas reaccionan con el extremo C-terminal de las proteínas P ribosomales denominadas como P013 (EDDDDDFGMGALF) y R13 (EEEDDDMGFGLFD) correspondientes con las proteínas ribosomales del parásito P0 (TcP0) y P2b (TcP2b) (Lopez Bergami *et al.*, 2001). Dichas proteínas muestran una clara relación con la patogenia de la enfermedad, ya que estos mismos epítomos generan autoanticuerpos miméticos con antígenos del hospedador (Lopez Bergami *et al.*, 2001).

Otro antígeno con epítomos que no posee secuencias repetidas en su secuencia es el “Trypomastigote Small Surface Antigen” (TSSA), perteneciente al grupo TcMUC III de las mucinas. Procede de un gen dimórfico, con dos alelos distribuidos y diferenciados presente en las diferentes cepas ensayadas de *T. cruzi* (Di Noia *et al.*, 2002). Dentro de este antígeno se caracterizaron epítomos B, mediante la técnica de SPOT, encontrándose un epítomo mayoritario en la región central con secuencia KPATGEAPSQ el cual que se comportó como independiente de especie, así como otros epítomos minoritarios dependientes de especie, con secuencia TSSTPPSGTEN que

reaccionan solo con sueros humanos (Di Noia *et al.*, 2002) . Mediante ELISA se confirmó que el antígeno TSSA tenía una alta respuesta en sueros de pacientes chagásicos, reaccionando con 175 de los 201 (87%) de sueros potencialmente chagásicos, y con un 100% de los sueros chagásicos confirmados (Di Noia *et al.*, 2002) .

Además de poseer secuencias RT en el extremo C-terminal, las Transialidasas (TS) poseen epítomos reactivos no repetidos en la región catalítica de éstas. Estas regiones fueron analizadas mediante la técnica de SPOT y por librerías de fagos, encontrándose que 5 de estos fagos (B13, B23, B25, R14 y R23) reaccionaban con varios péptidos (péptido 1439, 1443 y 1441) de las TS como se muestra en la figura siguiente (Pitcovsky *et al.*, 2001). Sorprendentemente todos los sueros eran reactivos con el péptido 1441, sugiriéndose que existan secuencias dentro de la Transialidasa que se asemejan molecularmente a los fagos dando una reactividad cruzada para dicho epítomo. Este resultado se confirmó utilizando sueros de diferentes



especies los cuales también daban reacciones cruzadas, lo que sugiere que sea un mecanismo para evadir la fuerte respuesta humoral ofreciendo dianas poco definidas al sistema inmune (Pitcovsky *et al.*, 2001). En el mismo estudio también se demostró que la respuesta inmune generada era incapaz de neutralizar la actividad enzimática de la TS, manteniendo, este factor de virulencia, sus características mediante las reacciones cruzadas con los epítomos encontrados (Pitcovsky *et al.*, 2001)

**Figura 2.2.** Dos visiones de la estructura tridimensional de la TS en donde se señalan los epítomos reactivos tras el rastreo de los péptidos contenidos en una librería de fagos (Pitcovsky *et al.*, 2001)

- Epítomos B con secuencias repetidas en tándem o dominios repetidos.

Varios de los antígenos con mayor respuesta inmune a la infección poseen este tipo de secuencias, las cuales, como dijimos anteriormente, aumentan la exposición de estos al sistema inmune.

En estudios realizados buscando regiones RT en los genomas de diferentes patógenos bacterianos y parasitarios, así como en humanos, se comprobó que el número de genes que contienen RT en *T. cruzi* es sensiblemente menor que en otros parásitos (1.82% del total de genes) mientras que en *P. falciparum* o *T. gondii* lo poseen el 24.61 y el 5.70%, respectivamente, no siendo estos valores sensiblemente diferente a los valores encontrados en *E. histolytica*, *C. albicans*, *M. tuberculosis* o *H. sapiens* (Goto et al., 2008). En trypanosomátidos, así como en la familia apicomplexa prevalen las secuencias RT en aquellos genes de gran longitud (10.000 pb aproximadamente), Algunas de las proteínas con RT encontradas en algunos organismos, poseen funciones conocidas, entre ellas encontramos las proteínas como motivos de “fingers Zn proteína” que se unen típicamente a DNA, componiendo el 2% del proteoma de *Homo sapiens* (Goto et al., 2008).

Dentro de las secuencias de proteínas con RT encontradas en *T. cruzi* existen aproximadamente un 45% de ellas que poseen un péptido señal y un 53% con dominios transmembrana, pudiendo por tanto considerarse como proteínas de membrana con dominios que se encuentran en la superficie externa del parásito. Estas proteínas corresponden con las tres grandes familias de genes de *T. cruzi* : Transialidasas (TS), mucinas y Mucine Associate Surface Proteins (MASPs) (Goto et al., 2008)

Uno de los ejemplos como epítomo mejor conocido, es el denominado como “Shed Acute Phase Antigen” (SAPA), que se presenta en el extremo C terminal de las TS (Cazzulo et al., 1992). El SAPA esta constituido por una RT de 12 aminoácidos (DSSAHSTPSTPA), que entre otras funciones, incrementa la vida media de estas proteínas en la sangre y se asocia a la inducción de anticuerpos neutralizantes. Al poseer repeticiones en su secuencia, el enzima puede evadir a los anticuerpos neutralizantes, pudiendo así ejercer un efecto inmunomodulador, constituyendo estos epítomos una estrategia adaptativa para

que este factor de virulencia se mantenga estable (Pitcovsky *et al.*, 2002, Buscaglia *et al.*, 1999).

El hecho de considerarse un epítipo B a estas regiones de SAPA, puede deberse a que estas regiones poseen una conformación secundaria y terciaria muy ligera, pudiendo resultar de ello, un epítipo conformacional blanco de Anticuerpos (Cazzulo *et al.*, 1992).

Este epítipo SAPA, se define como un antígeno de fase aguda con una rápida inducción de IgM y de IgG capaz de inducir altos títulos de estas inmunoglobulinas en los sueros en esta fase inicial de la enfermedad, y disminuyendo el reconocimiento, hasta en un 40%, en la fase crónica (Cazzulo *et al.*, 1992). Mediante el uso de sueros de enfermos chagásicos, se ha podido determinar la existencia de secuencias de proteínas humanas que reaccionan con anticuerpos generados durante el desarrollo de la enfermedad. Con el uso de librerías de péptidos solapantes se definió un epítipo de una proteína humana denominada Cha, como describimos anteriormente, (la cual comparte homología con SAPA), sugiriéndose que la gran concentración de anticuerpos frente a SAPA hace desarrollar un mimetismo molecular Cha, pudiendo ser responsable de algunas de las patologías autoinmunes propias de la enfermedad de Chagas (Girones *et al.*, 2001)

Otros antígenos que con secuencias RT son los antígenos citoplasmáticos CRA (Cytoplasmatic Repetitive Antigen) y flagelar FRA (Flagellar Repetitive Antigen) (Lafaille *et al.*, 1989). El gen del primero contiene 23 copias de un segmento repetido de 42 pb y el segundo 14 copias de 204 pb. Estos dos antígenos probablemente posean sus epítipos en estas regiones RT pudiendo obtenerse hasta un 100% de sensibilidad y especificidad en ensayos de ELISA desarrollados con sueros de enfermos crónicos (Krieger *et al.*, 1992)

### **3. Filogenia, Genómica y Biología Molecular de *T. cruzi***

#### **3.1 Variabilidad genética y estructura de poblaciones de *T. cruzi***

Diferentes estudios biológicos, bioquímicos y moleculares han demostrado que *T. cruzi* es un taxón muy heterogéneo, conteniendo numerosos polimorfismos genéticos y proteicos cuando se comparan los aislados de campo y de laboratorio (Macedo *et al.*, 2004, Pena *et al.*, 2009, Buscaglia *et al.*, 2003). Estas variaciones intra-específicas dan lugar a un evidente desequilibrio de unión, lo que indica la existencia de una estructura clonal de las poblaciones de este parásito (Tibayrenc *et al.*, 1986, Buscaglia *et al.*, 2003), y que sumado a las evidencias de que ocurre de intercambio genético entre parásitos contribuye a la compleja estructura de estas poblaciones (Sturm *et al.*, 2009).

Son diversas las técnicas que han demostrado esta variabilidad genética en las poblaciones de *T. cruzi*. Los zymodemas o análisis de variantes electroforéticas de enzimas celulares (isoenzimas) clasificaron las diversas cepas dentro de tres grupos isoenzimáticos o zymodemas Z1, Z2 y Z3. Otras técnicas basadas en polimorfismos de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP), análisis de DNA polimórfico y amplificado al azar (RAPD), PCR de baja estringencia singular de primers específicos (LSSP-PCR), polimorfismo de mini exones, polimorfismos de rDNA o análisis de microsatélites han tratado de correlacionar los datos bioquímicos con los datos de variabilidad en las secuencias (Macedo *et al.*, 2004).

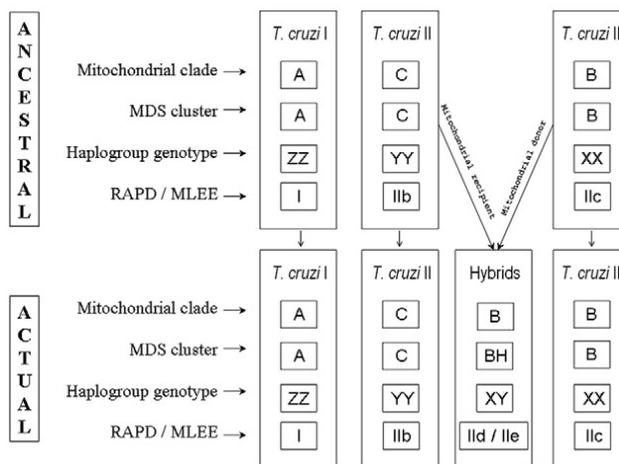
Todos los datos obtenidos mediante las técnicas anteriores, llevaron a proponer en una reunión en 1999 en Fiocruz (Brasil) a clasificar la filogenia de *T. cruzi* en dos principales linajes llamados *T. cruzi* I y *T. cruzi* II (Zingales *et al.*, 1999). *T. cruzi* I se caracteriza por poseer el zymodema Z1, 24SarDNA y miniexones del grupo 2 mientras que *T. cruzi* II se caracteriza por poseer el zymodema Z2, 24SarDNA y mini exones del grupo 1 (Zingales *et al.*, 1999).

Mediante el uso de isoenzimas y la técnica de RAPD, el grupo de Brisse y colaboradores, clasificó *T. cruzi* en Unidades Discretas de Tificación (DTUs) I y II. La DTU II esta a su vez subdividida dentro de cinco sub-linajes (desde la DTU IIa a la DTU IIe), como resultado del análisis de la diversidad genética mediante microsatélites y otros marcadores genómicos (Brisse *et al.*, 2000, Brisse *et al.*, 2001). Sin embargo, esta clasificación ha sido nuevamente remodelada proponiéndose hasta un total de 6 DTUs. Los DTUs I y II corresponden a los anteriormente clasificados, correspondiendo los DTUs III, IV, V y VI a cepas en su mayor parte híbridas ((Zingales *et al.*, 2009)

agregándose recientemente diferentes haplotipos al DTU I clasificados como Tc I a–d analizado mediante polimorfismos de la región intergénica del “spliced líder” SL-IR de genes (Falla *et al.*, 2009)

Según algunos autores los altos niveles de desequilibrio de unión que ocurren entre los genes nucleares pueden dejar de existir mediante el uso de marcadores mitocondriales, donde no ocurre fusión mitocondrial, ni el intercambio genético que se observa en el núcleo (Pena *et al.*, 2009). Como observamos en la Figura 3.1, los grupos obtenidos tras el análisis de los genes COII, citocromo b y nicotidamin adenin dinucleótido deshidrogenasa mitocondriales, hacen que se asocien las cepas en los grupos mitocondriales A, B y C, los cuales se correlacionan con microsatélites de cinco repeticiones CA nucleares, que agrupa las cepas en MDS (Multidimensional scaling) tipo A, B y C, y que combinado con los datos obtenidos mediante el análisis de polimorfismos del gen 24S $\alpha$  rRNA, da lugar a los haplogrupos X, Y y Z, representándose hasta tres linajes (TcI, TcII y TcIII) (de Freitas *et al.*, 2006).

A pesar de existir una clara dicotomía en estos resultados, algunas de las cepas no se pueden agrupar en ninguno de estos linajes principales. Existen linajes no clasificados correspondientes al zymodema Z3, caracterizados como rDNA grupo 1/2, grupo mitocondrial BH, Grupo MDS B, Haplogrupo XY y IId/Ile (de Freitas *et al.*, 2006, Souto *et al.*, 1996, Stolf *et al.*, 2003), que siguen sin encuadrarse claramente en la clasificación como Tc-I o Tc-II, tratándose en muchos casos de cepas híbridas entre los linajes Tc-II y Tc-III como se observa en la Figura 3.1.(de Freitas *et al.*, 2006).



**Figura 3.1.** Diagrama propuesto para la evolución de las cepas de *Trypanosoma cruzi*. (de Freitas *et al.*, 2006).

Basándose en el modelo anterior, los genomas ancestrales *T. cruzi* I, II y III existieron en el pasado, sugiriéndose que los sublinajes II y III tuvieron nichos ecológicos solapados, y por tanto facilitando las condiciones necesarias para la hibridación, si bien existen cepas aisladas que todavía no se clasifican dentro de estos linajes, dando lugar a un escenario muy complejo en la historia de la evolución de éste parásito (Pena *et al.*, 2009). Según el estudio llevado a cabo por el grupo de Briones y colaboradores, los dos principales linajes (TcI y TcII) podrían considerarse como dos especies, siendo dos linajes monofiléticos diferentes durante mucho tiempo, poseyendo características epidemiológicas y ecológicas particulares (Briones *et al.*, 1999). Los ciclos selváticos (Tc-I) y humano (Tc-II), pueden ser consecuencia de la diversidad genética del patógeno y de su adaptación a los sistemas inmunes de sus hospedadores. Estos linajes permanecieron separados durante la insulación de Sudamérica hace unos 100-38 millones de años, favoreciendo su especiación críptica. Debido a ello, Tc-I se asociaba a Sudamérica, relacionándose con la fauna nativa, mientras que Tc-II se asocia con los mamíferos placentarios de Norteamérica. Como consecuencia de la unión entre continentes, los roedores y primates durante el Oligoceno y la fauna de mayor tamaño durante el Plioceno hace 5 millones de años, dieron como consecuencia que el linaje Tc-II se mezclara y se dispersara por Sudamérica. De manera inversa los parásitos tipo Tc-I se diseminaron por Norteamérica gracias a la irradiación de los hospedadores marsupiales por este continente (Briones *et al.*, 1999).

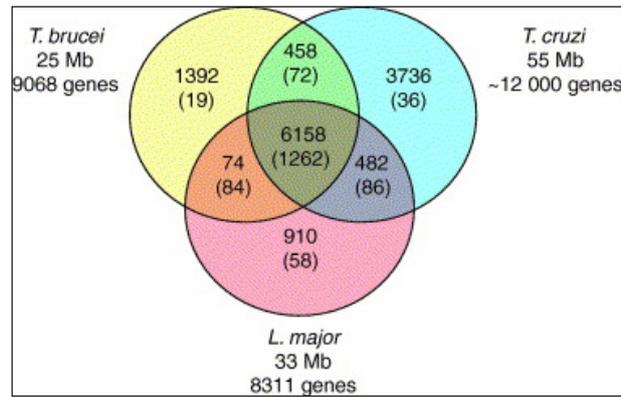
Basándose en estos datos no existe un consenso generalizado sobre cual es la clasificación exacta de estos parásitos, pudiendo variar en un futuro mediante la obtención de nuevas cepas y nuevos estudios de campo.

### **3.2. Genoma: *Trypanosoma cruzi***

El proyecto genoma de *T. cruzi* se enmarca dentro de una gran iniciativa denominada como “Trytrips” en el cual se secuenciaron conjuntamente los

genomas de *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma cruzi* (Kissinger, 2006). La iniciativa de secuenciar el genoma de *T. cruzi* surgió en una serie de reuniones celebradas en Brasil, Argentina y Reino Unido en 1993, 1994 y 1997, siendo la cepa CL-Brener la escogida para su secuenciación, publicándose su borrador finalmente en el año 2005 (El-Sayed *et al.*, 2005a). Previa a su elección como la cepa a secuenciar, se identificó el cariotipo molecular de la cepa CL-Brener, determinándose su composición alélica híbrida, derivada de los subgrupos filogenéticos IIb y IIc y caracterizándose dentro del subgrupo IIe (Cano *et al.*, 1995). El genoma de dicha cepa se obtuvo por la técnica de “Whole Genome Shotgun” (WGS) ensamblándose un total de 8740 contigs, correspondiendo a 55 Mb (genoma haploide), y calculándose el genoma diploide en aproximadamente 106.4-110.7 Mb (El-Sayed *et al.*, 2005a). En base al análisis del haplotipo se calculó en 12000 los genes que componen el genoma, de los que un 50.8% se les pudo asignar función, poseyendo aproximadamente la mitad de alelos del haplotipo IIb y la otra mitad al IIc, dado sus características híbridas (El-Sayed *et al.*, 2005a). Al menos un 50% del genoma se compone de secuencias repetitivas, comprendiendo grandes familias multigénicas de genes, retrotrasposones y secuencias subteloméricas (El-Sayed *et al.*, 2005a). *T. cruzi* es por tanto, la especie de Kinetoplástido secuenciada con mayor extensión en Megabases (55 Mb por 33 Mb en *Leishmania major* y 25 Mb en *Trypanosoma brucei*) y número de genes (12000 por 8311 en *Leishmania major* y 9068 en *Trypanosoma brucei*) (El-Sayed *et al.*, 2005b). Como se observa en la figura 3.2, los análisis comparativos muestran un total de 6158 “clusters” de genes ortólogos codificadores para proteínas (COGs) entre los tres genomas, poseyendo *T. cruzi* una identidad ligeramente mayor con respecto a los ortólogos encontrados en *L. major* (El-Sayed *et al.*, 2005b, Kissinger, 2006).

Aunque divergieron hace 200-500 millones de años aproximadamente, estos tres kinetoplástidos muestran en sus genomas una larga escala de sintenia, permaneciendo en el mismo contexto genómico un 68 y 75% de los genes de *T. brucei* y *L. major*. Aunque la existencia y la frecuencia de recombinación sexual es objeto de controversia (Gibson *et al.*, 1999), la baja frecuencia de esta favorece que esta sintenia se mantenga, ya que así se limitan las posibilidades de cambios durante la meiosis (El-Sayed *et al.*, 2005b).



**Figura 3.2.** Distribución de genes ortólogos (COGs) entre los tres kinetoplastidos (El-Sayed *et al.*, 2005b).

La sintenia entre estos genomas se puede romper en lugares concretos, ofreciendo un escenario donde los genes y secuencias especie-específicos proliferan. *L. major* posee regiones no sinténicas relativamente cortas en longitud en localizaciones internas en los cromosomas, correspondientes a series de genes en tándem codificadores de proteínas y RNA (El-Sayed *et al.*, 2005b). *T. brucei* contiene largos bloques de genes no sinténicos en los telómeros de todos los cromosomas, conteniendo largos arrays de “pseudogenes” VSG y ESAGs, así como un largo número de retroelementos y genes RHS (El-Sayed *et al.*, 2005b).

Las regiones subtelméricas de *T. cruzi* también pierden la sintenia consistiendo en “arrays” entrelazados de la superfamilia Transialidasa (TS), DGF-1, (pseudo)genes RHS, así como retroelementos pertenecientes a la familia de retroelementos vestigiales interpuestos (VIPER), pequeños elementos repetitivos entrecruzados (SIRE), retrotransposones non-LTR L1Tc no autónomos (NARTc) y/o retroelementos tipo DIRE (El-Sayed *et al.*, 2005a). Otra característica de *T. cruzi* es la presencia de grandes “islas” no sinténicas (+ de 600 kb) de genes codificadores para proteínas de superficie (Tabla...) como TS, mucinas, Mucin-Associated Surface Proteins (MASP) y peptidasas gp63 todas ellas con retrotransposones y genes RHS insertados (El-Sayed *et al.*, 2005b).

**Tabla 3.1.** Familias multigénicas de *T. cruzi*, los pseudogenes correspondientes a cada una se indican entre paréntesis. (El-Sayed *et al.*, 2005b)

Producto génico	Miembros	Ortólogos Trytrip
Transialidasas (TS)	1430(693)	<i>T. brucei</i>
MASP	1377(433)	No
Mucinas	863 (201)	No
Retrotransposon hot spot proteins (RHS)	752 (557)	<i>T. brucei</i>
Dispersed family protein 1 (DGF-1)	565 (136)	No
Proteasasa gp63	425 (251)	<i>T. brucei</i> + <i>L. major</i>

Sin embargo, el borrador del genoma de *T. cruzi* presenta problemas en su anotación (regiones solapadas o no-ensambladas) debido a su naturaleza repetitiva. La anotación genómica se basa solo en “contigs” mayores de 5 kb o “contigs” pertenecientes a fragmentos mayores de 5 kb del ensamblaje genómico. Muchos más “contigs” aparecen ensamblados, pero muchos están demasiado fragmentados para considerarse en la anotación genómica. Se estima que el 18 % de las secuencias codificadoras de proteínas y pseudogenes poseen un total de 14 copias o más, generándose unas 20000 nuevas variantes para el genoma haploide de *T. cruzi* (Arner et al., 2007). Los dos haplotipos que constituyen la cepa CL-Brener conocidos como Esmeraldo y no Esmeraldo, complican el estudio del genoma, ya que cada cromosoma se compone de dos homólogos entre sí. El genoma *T. cruzi*, se ha reconstruido casi en su totalidad, y se compone de 41 pares de cromosomas homólogos que varían entre 74 Kb a 2.4 Mb, si bien existen regiones repetidas en los telómeros de los cromosomas, no secuenciadas correctamente, dado que colapsan el ensamblamiento de las secuencias (Weatherly et al., 2009). La correcta descripción y localización de las secuencias dentro de los cromosoma es de gran ayuda si se desea generar estudios a nivel de genes, como el empleo de Knockouts, o estudios comparativos entre cromosomas en las distintas cepas de *T. cruzi* (Weatherly et al., 2009)

### 3.3. Control de la expresión génica en tripanosomátidos

La organización genética y las secuencias génicas de trypanosomátidos contienen numerosas peculiaridades que sitúan a estos organismos en el “borde genético” entre los organismos eucariotas y procariotas. Estos comparten características con procariotas (genes sin intrones, transcripción policistrónica), eucariotas (pre-mRNA splicing), y otras características particulares inherentes a esta familia (genes codificadores para proteínas sin promotores) (Donelson *et al.*, 1999).

Como consecuencia de las diferencias entre los distintos ciclos de vida, los trypanosomátidos divergen en morfología, composición de su superficie y por tanto de su expresión génica. Esta familia de parásitos poseen características distintivas de otras células eucariotas como son el procesamiento policistrónico de su RNA, el Trans-splicing del pre-mRNA, la edición del RNA mitocondrial y la transcripción de genes codificantes para proteínas por la RNA pol I.

En eucariotas, por lo general, los genes codificantes para proteínas se codifican como pre-mRNA monocistrónicos que se procesan a RNAm maduro a través del mecanismo de “*cis*-splicing”, además de ser la RNA pol II la encargada de transcribir estos genes, encargándose la RNA pol I de la transcripción de los genes ribosomales. Hasta la fecha, el *trans*-splicing solo se ha descrito en la familia Trypanosomatidae, en *Euglena* y en diferentes especies de nematodos y trematodos (Donelson *et al.*, 1990).

La rotura de los mRNA policistrónicos en RNA maduros monocistrónicos ocurre en el núcleo celular. La adición del “cap” en el extremo 5’ y la cola de poy(A) en el extremo 3’ de cada mRNA es esencial. No existe en trypanosomátidos una secuencia señal consenso para la poliadenización, y el “cap” posee una única estructura altamente metilada. De hecho, el “cap” 5’ es parte de un miniexón (o “spliced leader, SL”) que se ensambla al mRNA en una reacción de trans esterificación conocida como *trans*-splicing (LeBowitz *et al.*, 1993).

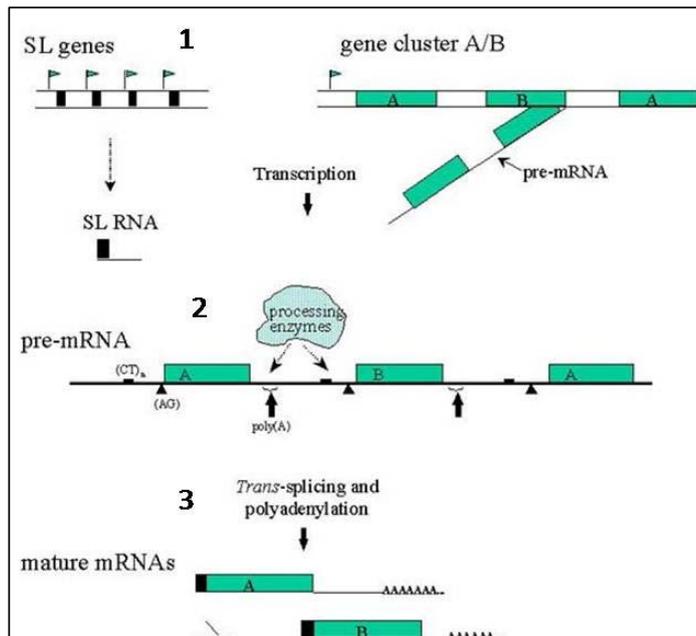
Estudios recientes han probado que la adición del “cap” y la cola de poli-A, no son mecanismos independientes sino que forman parte de un mecanismo de corte y empalme que ocurre concomitantemente o inmediatamente antes de la transcripción. Al no haber una secuencia señal de poliadenilación clara, se ha asumido que para que ocurra una poliadenilación debe haber una distancia fija entre el sitio aceptor de “splicing” y el lugar de poliadenilación, mostrando

en estudios de mutantes delecionados que las regiones intergénicas poseen una importancia clave para el *trans*-splicing y la poliadenilación en *T. brucei* (LeBowitz *et al.*, 1993, Schurch *et al.*, 1994).

Otra peculiaridad, es que mientras genes como son los de familias superficie de *T. brucei* como las VSG o PARP poseen operones fuertes (lo cual permite la creación de vectores de expresión), en *T. cruzi* y algunas especies de *Leishmania* se pueden expresar genes exógenos sin la presencia de promotores (Teixeira, 1998).

Las conocidas como agrupaciones de genes direccionales (DGCs), son característicos de estos trypanosomátidos, existiendo una fuerte presión selectiva para mantener el orden génico y mantener los DGCs intactos a pesar de las divergencias entre los genes. La frecuente correlación entre los bloques de sintenia conservados y los largos DGCs característicos de los Trityps reflejan las peculiaridades del procesamiento del RNA (El-Sayed *et al.*, 2005b). Se piensa que la transcripción de los genes codificadores para proteínas se inicia solo en unos cuantos lugares en cada cromosoma, sugiriéndose que pueda existir una presión selectiva dentro de los grupos de genes policistrónicos aguas abajo de dichos lugares en contra de la rotura de dicha sintenia

*et al.*,



(El-Sayed 2005b).

**Figura 3.3.** Proceso general de síntesis de rNAm en trypanosomátidos. Los genes organizados en “tandem” repetidos (dos copias del gen A y dos del gen B). En otra localización cromosómica existen cientos de repeticiones que codifican Spliced leaders SL-RNAs. En algunos casos, un único promotor está presente aguas arriba del primer gen en el cluster, mientras que en el cluster SL cada repetición lleva consigo un promotor transcripcional (pequeñas banderas) (1). Después de la transcripción, el pre-rNAm se procesa por *trans-splicing* y poliadenilación, las cuales requieren señales presentes en las regiones intergénicas: una secuencia rica en polipirimidinas o (CT)<sub>n</sub>, la adición del sitio para el spliced leader o AG (cabezas de flecha) (2). Los rNAm maduros, los cuales consisten en la región codificante y un 5'UTR (Untranslated Region), la región SL, 3'UTR y una cola de poli, (A) se representan al final de la figura (3). (Teixeira, 1998).

Debido a que los genes codificadores de proteínas de trypanosomátidos poseen largas unidades policistrónicas, los mecanismos de control de la expresión génica actúan a niveles post-transcripcionales. Tras la publicación de los genomas de Kinetoplastidos, se manifiesta la pérdida de una regulación diferencial de la RNA pol II de los distintos genes, así como en algunos casos la pérdida de regiones consenso promotoras para la RNA pol II. Por eso, el procesamiento y estabilización del mRNA, es crucial para la expresión de genes en estos organismos (Teixeira, 1998)

## 4. Pseudogenes

### 4.1 Generalidades

Los pseudogenes se definen como copias “defectuosas” de genes funcionales, exhibiendo características degenerativas como codones de stop prematuros y mutaciones que alteran el marco original de lectura previniendo así su expresión. Estas características conllevan “a priori”, a que estos productos transcritos no poseen la capacidad de traducirse a proteína. El número de pseudogenes en los distintos genomas analizados muestran una variabilidad significativamente mayor que la de los propios genes, no guardando una proporción exacta ni con el tamaño del genoma, ni con el número total de genes. A pesar de que se clasifican habitualmente en base a

los datos de secuencia, como secuencias de DNA basura no sujetas a presión selectiva, existen en la actualidad estudios que afirman que algunos son transcripcionalmente y funcionalmente activos, relacionándose con la regulación de la expresión génica y como generadores de la diversidad genética (Hirotsume *et al.*, 2003, Balakirev *et al.*, 2003, Guo *et al.*, 2009). En la actualidad existen datos que sostienen que existe una evolución activa de los pseudogenes, permitiéndose una “degeneración” de las secuencias pseudogenicas debido a que juegan un papel importante en el genoma de un organismo. Los pseudogenes pueden hacer perder ciertas funciones específicas, reteniendo otras e incluso adquiriendo otras nuevas que no son reconocibles con facilidad, así como la posibilidad de que los propios pseudogenes “nazcan” funcionalmente activos o no, o que regresen a su anterior estado como gen con capacidad de volver a traducirse a proteína, considerándolos, no solo como genes muertos, sino como genes potenciales, y revelando que el “pseudogenoma” es un ente extremadamente útil para los organismos (Balakirev *et al.*, 2003, Gerstein *et al.*, 2006).

Como se observa en la figura 4.1, existen dos tipos de pseudogenes, pseudogenes procesados y no procesados que describimos a continuación.

- Pseudogenes no procesados.

Estos normalmente se encuentran en el mismo cromosoma dentro de clusters de secuencias con similitudes funcionales. Normalmente se originan mediante mecanismos de duplicación génica, aunque también pueden ser generados por mecanismos inusuales de entrecruzamiento. Por tanto, este tipo de pseudogenes se sitúan adyacentes a sus genes parálogos funcionales y siguen poseyendo intrones (D'Errico *et al.*, 2004, Sasidharan *et al.*, 2008). Dependiendo del número de mutaciones acumuladas durante el tiempo de evolución, un pseudogén duplicado puede seguir transcribiéndose e incluso adquiriendo nuevas funciones, fijándose dentro de una población. También puede darse el caso contrario como ocurre con el gen de la ribonucleasa bovina seminal que permaneció en forma de pseudogén por aproximadamente 20 millones de años, “reactivándose” el gen a partir de pseudogenes duplicados, y volviendo a expresarse su producto proteico. (Trabesinger-Ruef *et al.*, 1996). Por tanto, los pseudogenes duplicados pueden ser considerados como un reservorio de diversidad (D'Errico *et al.*, 2004).

- Pseudogenes Procesados.

Este tipo de pseudogenes son generados mediante un proceso en tres etapas. La primera consiste en una síntesis de RNA desde el molde de DNA. En la segunda etapa (en el caso de genes con intrones), el primer transcrito se libera de los intrones, produciendo un mRNA maduro. La última etapa, el mRNA actúa como molde en un proceso de retrotransposición, produciendo una secuencia de DNA de doble hélice la cual se inserta en otro cromosoma (D'Errico *et al.*, 2004, Sasidharan *et al.*, 2008). Los pseudogenes procesados pierden su región reguladora aguas arriba de su secuencia (perdiendo su capacidad de expresión), terminando en la región 3´terminal o cola de poli-A, flanqueada por repeticiones directas.

La nueva localización, inadecuada para la expresión, hace que dichos genes procesados sean “muertos desde su aparición” (D'Errico *et al.*, 2004). Debido a la ubicuidad de la retrotranscripción, los genomas de numerosas especies son “bombardeos” por numerosas copias de secuencias retrotranscritas, siendo muchas de ellas, no funcionales a medida que se van insertando en el genoma. La generación de copias defectivas a partir de un locus funcional y su diseminación a lo largo del genoma, se ha comparado a un volcán en erupción, denominándose este proceso como “Modo Vesubiano de evolución”(Leder, 1982).

#### 4.2. Pseudogenes: Expresión y funcionalidad

A pesar de que la definición original, implicaba que los pseudogenes se encontraban “silenciados”, esto es, ausencia de transcripción para ellos, se han encontrado numerosos transcritos codificados a partir de pseudogenes en diversos tipos de organismos, como es el caso de los pseudogenes humanos  $\Psi$  *P450c21A*,  $\Psi$  *Gapdh*,  $\Psi$  *TOP1*,  $\Psi$  *DRD5-1* o  $\Psi$  *GS* (Bristow *et al.*, 1993, (Arcari *et al.*, 1984, Arner *et al.*, 2007, Azuaje *et al.*, 2007, Baida *et al.*, 2006, Barrias *et al.*, 2007) *et al.*, 1984, Zhou *et al.*, 1992, Mighell *et al.*, 2000, Chakrabarti *et al.*, 1995),  $\Psi$  *Gapdh* de ratón (Tso *et al.*, 1985),  $\Psi$  *TGG3* en *Arabidopsis thaliana* (Zhang *et al.*, 1997), y en protozoos el ejemplo mas claro es el pseudogén de la proteína de unión a eritrocitos  $\Psi$  *EBA165* de

*Plasmodium falciparum* (Triglia et al., 2001). Al menos un 5-20% de los pseudogenes humanos se muestran evidencias de transcripción (Yano et al., 2004, Zheng et al., 2005), identificándose un total de 10679 pseudomensajeros de RNA en una biblioteca de más de 100.000 cDNAs de ratón, representando aproximadamente el 10% del transcriptoma de ratón (Frith et al., 2006).

Las tasas de inserciones/delecciones (Indels) que se pensaba, evolucionaban de forma neutra en las secuencias pseudogénicas, al no estar sometidas a ningún tipo de presión selectiva y constituir parte del “DNA basura” de un genoma, mutan de una manera relativamente mas lenta debido a que deben jugar funcionalmente algún papel importante (Gerstein et al., 2006). Esta característica, se ha comprobado en el caso concreto de  $\Psi$  *Adh* de *Drosophila teissieri*, así, el nivel de evolución en los exones de  $\Psi$  *Adh* de sus regiones intergencias es cercano al valor de un gen, por el uso de codones mantenidos en varias especies y por la relación  $d_s/d_N$  (substituciones silenciosas/reemplazadoras). De esta manera, el pseudogen  $\Psi$  *Adh* pudiera estar sujeto a una presión selectiva (Sullivan et al., 1994). Esta misma característica se encuentra también en el bajo nivel de polimorfismos dentro de los genes  $\Psi$  *Lcp* o *Pglym 87* (Balakirev et al., 2003).

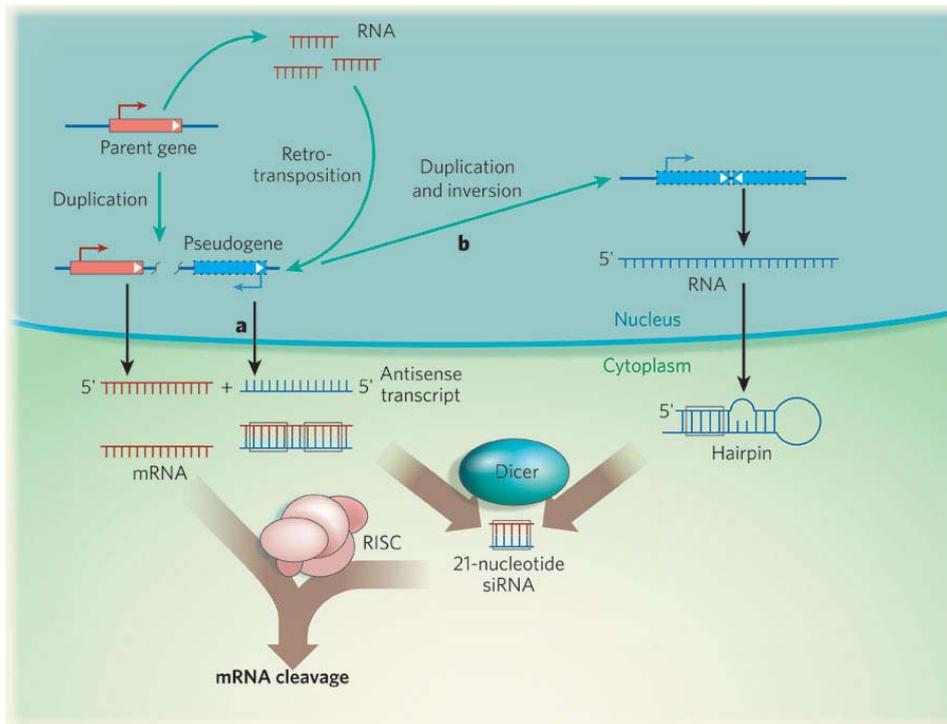
La importancia biológica y funcional de los transcritos provenientes de pseudogenes proviene del hecho de que puedan tener un papel muy importante en regulación génica, siendo una fuente de pequeños RNAs reguladores (Guo et al., 2009). Estos RNAs contienen secuencias invertidas, complementarias a las de transcritos de genes, formando pequeños dúplex RNA-RNA, siendo posiblemente este, un mecanismo seleccionado positivamente y muy ventajoso (Balakirev et al., 2003). Un ejemplo de funcionalidad, como regulador indirecto de la expresión génica, es el representado por el pseudogen *Makorin 1-p1*. Este pseudogén, se insertó en líneas de ratones mutantes, causando fenotipos con riñones policisticos y deformidades en los huesos (Hirotsune et al., 2003). Estos autores, encontraron que *Makorin 1-p1*, poseía efectos funcionales reguladores necesarios para la expresión del gen de *Makorin 1*, bien porque compite por la unión de las enzimas degradadoras de RNA (RNAsas) o por represores

transcripcionales, aumentando la estabilidad del mRNA transcrito por *Makorin 1* (Hirotsune *et al.*, 2003).

La funcionalidad como reguladores directos de la expresión génica, ha sido también demostrada para el caso del pseudogén de la oxido nítrico sintasa (pseudo-NOS) del gasterópodo *Lymnaea stagnalis* (Korneev *et al.*, 1999). Este pseudogén, incluye una región antisentido con una significativa homología con respecto al transcrito del gen de la NOS. Ambos genes se coexpresan en los ganglios cerebrales, inhibiéndose la traducción a proteína del RNA codificado por la NOS neuronal debido al dúplex gen-pseudogén de 145 pb formado (Korneev *et al.*, 1999). La funcionalidad de los pseudogenes como pequeños RNA interferentes se representa en la Figura 4.1.

A nivel de genoma, se sabe que el número de endo-siRNAs generados a partir de pseudogenes es muy elevado. Como resultado del análisis del genoma del arroz (*Oryza sativa*), se puede predecir, bioinformáticamente, que existen un total de 145 pseudogenes con esa capacidad, sugiriéndose además, que estos pequeños RNAs se puedan producir únicamente bajo condiciones o estadios concretos (Guo *et al.*, 2009).

Las secuencias correspondientes a pseudogenes dentro de un genoma o Pseudogenoma, son muy importantes en genética evolutiva, debido a que en ausencia de selección, las diferentes tipos de mutaciones en los pseudogenes tienen las mismas probabilidades de fijación. Al analizar los genomas del ratón (*Mus musculus*) y el de humano (semejantes en número de Megabases), el primero posee casi la mitad que el segundo (D'Errico *et al.*, 2004), desconociéndose en la actualidad el motivo por el que existen diferente número de pseudogenes entre especies.



**Figura 4.1.** Mecanismo de producción de pequeños RNAs interferentes (endo-siRNAs). a) generación de pseudogenes no procesados y procesados. b) generación de los endo-siRNA pueden invertirse a partir del gen parental. La transcripción de los RNA parental y del pseudogén puede dar lugar plegamientos en forma de horquilla, siendo parte de la molécula complementaria a la otra. La endorribonucleasa Dicer procesa los mRNA, manteniéndose el RNA de cadena doble, y degradando el complejo de moléculas RISC el mRNA transcrito de los genes. (Sasidharan *et al.*, 2008)

Eliminado: ¶

### 4.3. Pseudogenes y *T. cruzi*

A parte de datos meramente descriptivos sobre el número y la existencia de estos, no existe en la actualidad mucha información acerca de la expresión y funcionalidad de los pseudogenes en *T. cruzi*. El número de pseudogenes de que se compone el genoma de la cepa CI-Bener, es aproximadamente el 16% del tamaño con respecto al número total de genes de este, poseyendo una proporción considerablemente grande si la comparamos a la de otros organismos estudiados (Tabla 4.1.).

**Tabla 4.1.** Ocurrencia de pseudogenes dentro del genoma de diversas especies eucariotas (modificado de D'Errico *et al.*, 2004).

Organismo	Tamaño Genoma	Nº de genes	Nº Pseudogenes	%Gen-Pseudogen
<i>C. elegans</i>	100Mb	20.598	104	0,5%
<i>D. melanogaster</i>	128Mb	13.525	34	0.25%
<i>M. musculus</i>	2.6Gb	26.762	5,000	18.38%
<i>H. sapiens</i>	2.8Gb	23.531	8,000	33.41%
<i>T. cruzi</i>	106.4-110.7Mb	22.570	3,590	15.9%

Las proteínas de los patógenos involucradas en la interacción con el hospedador sufren una evolución muy rápida al estar expuestas al sistema inmune y diversos tipos de stress (Azuaje *et al.*, 2007). Estas proteínas se pueden caracterizar mediante la comparación entre las mutaciones sinónimas por sitio sinónimo (dS) y el número de mutaciones no sinónimas por sitio no sinónimo (dN). Al calcular los dN mediante comparaciones en parejas para todos los COGs de los TriTryps, se mostró que existía una relación 1:1:1 de ortólogos entre genomas (o 1:1:2 en los casos donde ambos alelos de *T. cruzi* estuvieran presentes) obteniéndose una idea de la rapidez en que las secuencias proteicas divergían entre especies (El-Sayed *et al.*, 2005b). La categorización de estos genes mediante ontología génica para procesos biológicos, mostró como aquellos que no tenían una función asignada poseían los mayores valores de dN, sugiriendo que estos, están sujetos a una presión selectiva, acumulando mutaciones activamente o bien que se someten a una evolución neutra permitiendo una deriva de las secuencias. Los genes con estas características son específicos de trypanosomátidos relacionados con procesos únicos (incluyendo la interacción con su hospedador) o genes altamente variables que eluden su anotación en el genoma por homología (El-Sayed *et al.*, 2005b).

La amplia mayoría de los pseudogenes presentes en *T. cruzi*, se encuentran asociados con las familias multigénicas correspondientes a TS (693), MASP (433), Mucinas (201), Retrotrasposon “hot spot RHS proteins” (557), “Dispersed gene family protein 1” (DGF-1) (136), y la proteasa de

Eliminado: ¶

superficie gp63 (251) (El-Sayed *et al.*, 2005a). La presencia de estos pseudogenes contribuye al aumento del repertorio genético del parásito mediante recombinación, los cuales además pueden ser transcritos, en parte por la naturaleza policistrónica de la transcripción (Graham, 1995), como es el caso de los arrays en tándem de pseudogenes de la familia de mucinas de *T. cruzi* (Allen *et al.*, 2001). La diversidad antigénica es otro de los motivos por el cual los pseudogenes se mantienen y forman parte de estas familias. Por ejemplo, la familia de proteínas variable de superficie (VSGs) de *T. brucei*, crea mediante conversión segmental y activación de sus lugares de expresión, un mosaico de genes VSGs a partir de pseudogenes VSGs, los cuales se ensamblan de diferentes maneras durante el curso de la misma infección (Taylor *et al.*, 2006).

Recientemente se ha analizado bioinformáticamente las tasas de mutación mediante sucesos de recombinación homóloga como fuente de variación antigénica en las familias multigénicas Transialidasas y DGF-1 de *T. cruzi*. El papel de los pseudogenes se ha estudiado en la generación de variabilidad genética mediante fenómenos de conversión genética en los que duplicaciones parciales de los pseudogenes o la inserción de subsecuencias de un donador silenciado. Habiéndose comprobado dentro de los genes variables de la familia DGF-1, y no encontrándose diferencias en el caso de las Transialidasas (Azuaje *et al.*, 2007).

Mediante modelos de mutaciones en múltiples puntos a lo largo de 1000 generaciones entre de miembros de esta familia, se ha comprobado que existe un momento en el cual el modelo de conversión génica propuesto mediante pseudogenes, tiene un nivel de variación de secuencias mayor que el modelo en el que se excluyen a los pseudogenes como generadores de variabilidad (si bien los resultados presentados por los autores, no sean estadísticamente significativos) pudiendo ser parte del motivo de porqué son tan variables estas familias (Azuaje *et al.*, 2007).

Como hemos comentado anteriormente, la retrotransposición es un mecanismo generador de pseudogenes. Los retrotrasposones, son elementos ubicuos que transponen a través de un intermediario de RNA, prediciendo el modelo actual en que un elemento codificador de una endonucleasa da lugar a la rotura en la diana del DNA, generando un lugar 3'hidroxil libre que sirve

como cebador para la transcripción reversa del elemento de RNA que se moviliza. La síntesis de la cadena complementaria de la nueva copia de DNA del retrotrasposón da lugar por el elemento que codifica, para una retrotranscriptasa (RT). La segunda rotura en la otra cadena de DNA, se lleva a cabo por el mismo elemento codificador de la endonucleasa, unos cuantos pares de bases aguas abajo de la primera, generando otro cebador para la retrotranscripción de la segunda cadena. Los retrotransposones se flanquean por tanto por dos repeticiones o lugares diana de la duplicación, que corresponde con la secuencia situada entre los dos lugares de rotura (Bringaud *et al.*, 2009). Aproximadamente el 5% del genoma de *T. cruzi* se compone de elementos génicos transponibles, siendo el trypanosomátido con mayor número de estos elementos (Tabla 4.2) (El-Sayed *et al.*, 2005a). Existen dos tipos de retrotransposones; los elementos con largas repeticiones terminales (LTRs), similares en estructura y retrotransposición a los virus, y elementos que pierden esas repeticiones llamados non-LTR retrotransposones, los cuales poseen un mecanismo más sencillo de retrotransposición (Bringaud *et al.*, 2006). Muchos de estos retrotrasposones no poseen localizaciones exactas dentro de los cromosomas, distribuyéndose al azar aunque insertados aguas debajo de motivos muy conservados, como los elementos L1Tc (Bringaud *et al.*, 2009).

Otros elementos llamados “no autónomos”, se denominan así, por utilizar la maquinaria aportada por los L1Tc, al estar precedidos por los mismos motivos conservados, como es el caso de los NARTc (Bringaud *et al.*, 2009). Otros elementos se sitúan en el genoma de *T. cruzi*, en islas no sintéticas como es el caso de los elementos TcTREZO, que poseen lugares específicos de inserción (Souza *et al.*, 2007). Estos elementos, poseen un motivo de 68 pb 5'adyacentes muy conservadas y 250 pb 3' adyacentes, los cuales se han encontrado asociados a 852 copias de genes de la familia MASP, insertándose en muchos de los pseudogenes MASP, lo que sugiere que éstos elementos suponen un “hot spot” o punto caliente de recombinación homóloga, lo que prueba que no se distribuyen al azar a lo largo del genoma de *T. cruzi* y por tanto constituyen una fuente de creación de pseudogenes familia-específicos (Souza *et al.*, 2007).

**Tabla 3.2.** Número de copias por de retrotrasposones en los genomas TriTryps (El-Sayed *et al.*, 2005a).

Retrotrasposones LTR	Tb	Tc	Lm
VIPER	26	275	0
SIRE	10	480	0

Retrotrasposones Non-LTR	Tb	Tc	Lm
SLACs	4	0	1
CZAR	0	8	0
<i>Ingi</i>	115	0	0
RIME	86	0	0
L1Tc	0	320	0
NARTc	0	133	0
DIRE	73	257	52

## 5. Entrada en Invasión Celular por *T. cruzi*

### 5.1. Generalidades

A diferencia de otros patógenos intracelulares, *T. cruzi* parece que no penetra en la célula por un proceso de fagocitosis dependiente exclusivamente de actina (Osuna *et al.*, 1993, Andrews, 1995). Los estudios morfológicos muestran que los parásitos contactan con la membrana de la célula con el flagelo libre, se curvan sobre si mismos e inician la invasión por su extremo posterior, donde se sitúa la bolsa flagelar, iniciando una invaginación en la membrana de la célula hospedadora y dando lugar a una vacuola parasitófora. Durante dicho proceso, varios autores han encontrado la formación de extensiones pseudopoliars y proyecciones de la membrana de la célula hospedadora en el punto de contacto con la membrana celular (Schenkman *et al.*, 1992, Mortara *et al.*, 2005) , si bien la vacuola parasitófora (VP) de corto tiempo de vida va a formarse con el concurso de lisosomas reclutados por la célula en el punto de entrada (Burleigh *et al.*, 2002) y una vez el parásito

establecido en el citoplasma celular, parece existir una inhibición de la fusión lisosomal (Osuna *et al.*, 1994, Osuna *et al.*, 1986).

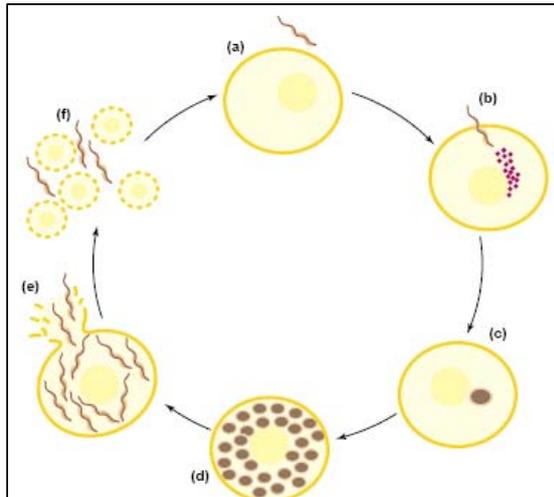
Debido al alto número de señales en cascada y proteínas que interaccionan en el momento de la invasión, se ha demostrado que *T. cruzi* invade con mayor éxito células que se encuentren en fase S del ciclo celular, período durante el cual la célula hospedadora expresa en mayor nivel los componentes necesarios para el reconocimiento, unión y entrada del parásito, así como poseer un adecuado potencial de membrana (Osuna *et al.*, 1984). La capacidad de invasión de este parásito es elevadísima, infectando tanto células fagocíticas como no fagocíticas. Únicamente las células carentes de núcleo son refractarias a la invasión por las formas infectantes del parásito (Osuna *et al.*, 1983).

Esta variabilidad en los tipos celulares que infecta, viene determinado por el amplio repertorio de proteínas de superficie y en definitiva por su complejo genoma (Burleigh *et al.*, 2002). La capacidad invasiva del parásito también viene dada por el linaje y por el tipo de cepa (Mortara *et al.*, 2005). Básicamente, el proceso de entrada celular se compone de las siguientes fases:

En primer lugar, el trypomastigote induce una serie de señales durante el anclaje a la célula que disparan la liberación de calcio en la célula lo cual va a servir para que se atraigan lisosomas al punto de unión célula-parásito, (Osuna *et al.*, 1984, Osuna *et al.*, 1990) fusionándose con la membrana plasmática y creando una vacuola parasitófora que englobará al parásito (Figura 5.1) (Osuna *et al.*, 1993, Tan *et al.*, 2002). La vacuola endocítica con pH bajo, induce a la diferenciación del trypomastigote a la forma amastigote (Burleigh *et al.*, 2002), reduciéndose el tamaño del flagelo del parásito, en un proceso que dura unas 12 horas. Pasadas 24-48, horas las formas amastigotas se comienzan dividir por fisión binaria, requiriendo el proceso de citoquinesis, unos 25 minutos para completarse (Figura 5.1) (De Souza, 2002). Pasadas 72 - 96 horas, el citoplasma de las células hospedadoras se muestra repleto de amastigotes, que irán transformándose gradualmente en trypomastigotes. Al final del ciclo intracelular los parásitos alojados en el citoplasma a modo de "nidos" iniciaran la liberación desde la célula al medio externo, siendo claramente visible el movimiento individualizado de las nuevas formas trypomastigotas que en unos

minutos saldrán a los espacios intercelulares y espacio extracelular (Figura 5.1). Los nuevos trypomastigotes contactarán con nuevas células dando lugar a una nueva

(Burleigh *et al.*, 2002, Souza, 2002,



infección.  
*al.*, 2002, De  
Tan *et al.*, 2002)

**Figura 5.1.** Ciclo de replicación intracelular de *T. cruzi* en el hospedador vertebrado, a las pocas horas tras la invasión (b), tras 12 h (c), 72 h (d), 96 h (e) y tras su liberación (f). (Tan *et al.*, 2002).

## 5.2. Depósitos de Calcio, despolimerización de actina, movimiento lisosomal y cascadas de señalización celulares

El proceso de internalización del parásito en la célula hospedadora conlleva a una serie de cambios fisiológicos en la célula hospedadora necesarios para el establecimiento y multiplicación en el citoplasma celular. Durante el proceso de entrada, el parásito, induce un aumento de Calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) libre como consecuencia de la liberación del catión desde los depósitos intracelulares como el retículo endoplasmático, la mitocondria y el núcleo (Scharfstein *et al.*, 2000, Moreno *et al.*, 1994, Tardieux *et al.*, 1994, Caler *et al.*, 2000, Osuna *et al.*, 1990). La salida de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplasmático, depende de diversas señales que induce el parásito y que activan al enzima Fosfolipasa C (PLC) de la célula hospedadora que hace aumentar los niveles de  $\text{IP}_3$  dentro de ella. Entre estas señales propias del parásito, se ha demostrado la participación

activa de la Oligopeptidasa B (OB) y la Cruzipaína (CZ). La OB citosólica actúa sobre un precursor del parásito que actúa como agonista de  $Ca^{2+}$ , lo que se demuestra mediante anticuerpos frente a la molécula y mediante trypomastigotes deficientes *opb* *-/-* (Caler *et al.*, 1998). La CZ por su parte, se secreta y rompe Kininógeno de alto peso molecular para generar Kininas de corto tiempo de vida, las cuales se unen a receptores de la Bradikinina para estimular la salida de  $Ca^{2+}$  dependiente de  $IP_3$  (Scharfstein *et al.*, 2000). Por otra parte se ha demostrado la capacidad de estimular la salida  $Ca^{2+}$  en la célula hospedadora de otras moléculas del parásito como la gp82 o las Proteínas ricas en Serina-Alanina-Prolina (SAP) (Baida *et al.*, 2006, Ruiz *et al.*, 1998).

Una vez conseguida la liberación de Calcio de las reservas celulares, los cambios en el potencial de membrana de la célula y en la movilidad del citoesqueleto (despolimerización del esqueleto cortical de actina), hace que se impida la entrada de nuevos parásitos, mecanismo parecido al de otros sistemas biológicos como el de la impermeabilización del oocito fecundado a nuevos espermatozoides (Osuna *et al.*, 1986, Osuna *et al.*, 1990). La penetración por los Trypomastigotes, se inicia por la inducción de una invaginación localizada en el sitio de infección (Osuna *et al.*, 1990) a la vez que se recluyen lisosomas procedentes del citoplasma celular al punto de interacción (Andrews, 1995). En ese momento, la membrana plasmática de la célula hospedadora se invagina y se fusiona a la vez con los lisosomas reclutados (vía I: entrada dependiente de lisosomas) o bien se forma una vacuola a partir de la membrana plasmática, que madurará mediante endosomas tempranos a la que posteriormente se unirá a los lisosomas (vía II: entrada independiente de lisosomas), la duración del proceso total se estima en aproximadamente 60 minutos (Woolsey *et al.*, 2004).

Experimentos con marcadores específicos para observar las diferentes maneras de entrada del parásito, revelaron que un 20-30% de los trypomastigotes recién internalizados se asocian con lisosomas, mientras que el 50% se contienen dentro de invaginaciones de la propia membrana plasmática celular (Woolsey *et al.*, 2003). El resto de los parásitos, es decir entre un 20 al 30% se rodean con vacuolas que contienen el marcador temprano de los endosomas EEA1 (Woolsey *et al.*, 2003). Aunque penetren

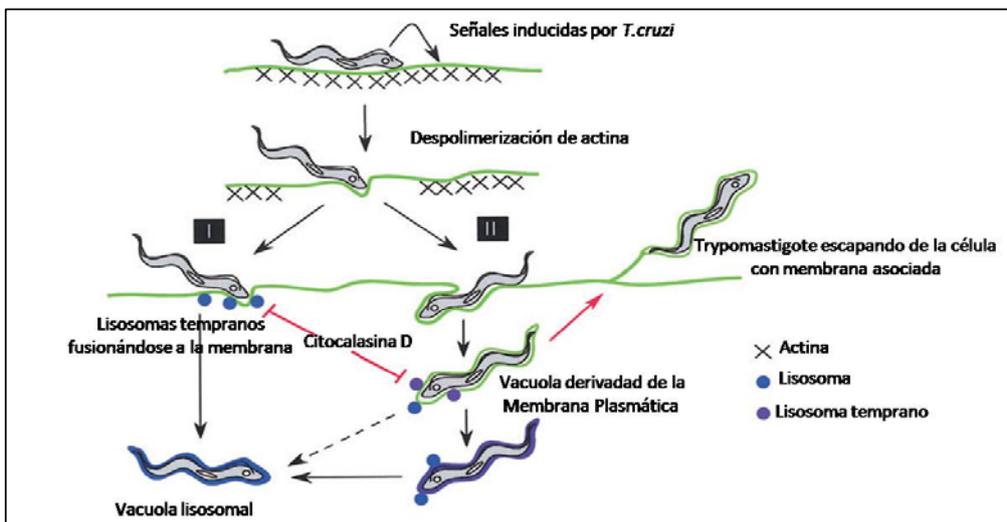
por distintas vías, todos los parásitos, inclusive los internalizados por la vía independiente, necesitarán fusionarse con lisosomas de la célula hospedadora y entre el 60 y el 90% se asociarán con marcadores lisosomales (Woolsey *et al.*, 2003). Moléculas como la Citocalasina D o la Latrunculina B, que inhiben la despolimerización o repolimerización de la actina, son capaces de por una parte inhibir el proceso de entrada de *T. cruzi* en la célula y estimular la vía de entrada independiente de los lisosomas, si bien una larga exposición a la Citocalasina D, induce al final del ciclo intracelular la salida del parásito ya que *T. cruzi* necesitará lisosomas para progresar dentro de la vacuola parasitofora (Woolsey *et al.*, 2004, Osuna *et al.*, 1984).

Al penetrar en la célula, la dinámica normal de los microtúbulos de la célula hospedadora se ve alterada en dirección a la sinapsis célula-parásito, asociándose las moléculas de  $\alpha$  y  $\gamma$ -tubulina con la vacuola parasitofora (VP) recién formada (Tyler *et al.*, 2005). La distribución de estas moléculas esta relacionada con la despolimerización de los microtúbulos en la cara citoplasmática de la membrana plasmática, y lentamente también en las membranas de los lisosomas reclutados, ocurriendo la invaginación en la VP del parásito. No esta claro como ocurre y evoluciona la invaginación, pero la concentración de productos lipídicos de PI3-Kinasas y receptores de proteínas G en la sinapsis creada sugiere la concentración de "Rafts lipídicos" (excavaciones presentes en la cara externa de la membrana relacionadas con las caveolas, formadas por colesterol y esfingolípidos y cuya función es concentrar y segregar proteínas) en dicho lugar, como se describirá más adelante (Woolsey *et al.*, 2003, Tyler *et al.*, 2005). El reclutamiento dependiente de Rafts, sirve como mecanismo para la rápida concentración de tubulinas, así como para el inicio de procesos de señalización celular (Tyler *et al.*, 2005).

El proceso de entrada en la célula hospedadora, despolimerización de los microtúbulos de actina y el reclutamiento de lisosomas, depende de fenómenos de señalización celular por parte de la célula hospedadora. Las proteínas tipo PI-3 Kinasas son importantes para muchos procesos celulares (reestructuración de citoesqueleto, tráfico de membrana o fusión de endosomas). Tanto proteínas de este tipo y Akt (tipo serin Threonin/kinasa) se fosforilan como respuesta a la invasión, como ocurre en otros patógenos cuya entrada es dependiente de actina (Burleigh *et al.*, 2002). Este proceso se

demuestra tras el tratamiento con wortmanina que inhibe la actividad de estas proteínas y disminuye la infección de las células por *T. cruzi* (Todorov *et al.*, 2000). Por otra parte, proteínas de tipo Rho- GTPasa, que actúan regulando actividades moduladas por actina, están también implicadas en el proceso de invasión. La actividad de estas proteínas se ve parcialmente inhibida tan solo a los 5 minutos de la infección (Woolsey *et al.*, 2004). Estos cambios en estados de fosforilación y actividad de proteínas celulares, conllevan cambios a nivel génico y transcripcional, pudiendo ser responsables de parte de los cambios sufridos en el citoesqueleto de la célula hospedadora. El proceso de fosforilación no solo ocurre en las proteínas celulares sino que productos de excrección/secrección del parásito se fosforilan en el proceso de infección, pudiendo estos compuestos ser parte activa de los procesos de activación de las cascadas celulares en las células infectadas (Mott *et al.*, 2009).

Eliminado:



**Figura 5.2.** Modelo integrado de la invasión de *T. cruzi* en células no-fagocíticas. La unión del parásito conlleva a la despolimerización del esqueleto cortical de actina y dos vías de entrada del parásito independiente o dependiente de lisosomas. La citocalasina D es capaz de inhibir la entrada mediante la disrupción de los microfilamentos de actina. Las dos vías convergen finalmente en un compartimento formado por la membrana lisosomal rodeando al parásito (Woolsey *et al.*, 2004).

### 5.3. Célula hospedadora: Matriz extracelular y receptores celulares

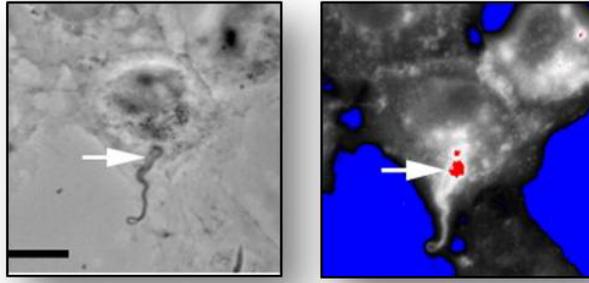
### 5.3.1. Rafts de membrana

Los Rafts de membrana son pequeñas y dinámicas regiones de la membrana ricas en colesterol y esfingolípidos, pero también en proteínas ancladas a glicofosfatidilinositol (GPI), proteínas de la familia Src (Tirosin Kinasas proto-oncogénicas), subunidades  $\alpha$  de proteínas G heterotriméricas, o proteínas palmitoladas o miristoladas asociadas a colesterol como las flotilinas (Van der Goot, FG y cols, 2001). Estos Rafts, especialmente los conocidos como "Rafts lipídicos", pueden tener un importante papel en el proceso de interacción entre un patógeno y su célula hospedadora (Duncan *et al.*, 2004). La participación de estas regiones en la invasión y citopatogenicidad en células ha sido descrita en diversos parásitos como *Entamoeba histolytica* (Mittal *et al.*, 2008), *Plasmodium falciparum* (Murphy *et al.*, 2007), *Leishmania donovani* (Pucadyil *et al.*, 2004), y *Leishmania chagasi* (Rodríguez *et al.*, 2006).

Estudios recientes, han demostrado que el tratamiento de células Vero, Hela o macrófagos murinos con metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD) (heptasacárido cíclico que se une a colesterol eliminándolo de la membrana), inhibe en niveles superiores al 70% la entrada de trypomastigotes metacíclicos de *Trypanosoma cruzi* en su célula hospedadora (Barrias *et al.*, 2007, Fernández MC y cols, 2007). Además, el tratamiento de las células con la subunidad  $\beta$  de la toxina colérica, molécula que se une eficazmente a GM1 (Gangliósido GM1, marcador específico de Rafts de membrana), también da lugar a una reducción significativa de la entrada del parásito (Barrias *et al.*, 2007, Fernandes *et al.*, 2007). Estos mismos autores, han observado que en la formación de la vacuola parasitófora, se reclutan dichos Rafts, existiendo en dicha estructura, un enriquecimiento de GM1 (Barrias *et al.*, 2007), con marcadores específicos de los Rafts, como flotilina-1 o caveolina-1 que colocalizaron en el punto de interacción célula-parásito y en la vacuola parasitófora, (Barrias *et al.*, 2007, Fernandes *et al.*, 2007).

Estos hallazgos indican que *T. cruzi* utiliza estos dominios específicos de membrana para interactuar y penetrar en las células hospedadoras con éxito.

Eliminado: ,



**Figura 5.3.** Marcaje con filipina fluorescente que se une eficientemente a colesterol. La flecha indica el punto de entrada del parásito en la célula donde se acumula colesterol (rojo) (Fernandes *et al.*, 2007).

### 5.3.2. Receptores de bradikinas

El término “kinina” se refiere a un grupo pequeño de metabolitos vasoactivos estructuralmente relacionados con el nonapeptido bradiquina (BK), el cual se libera de un motivo interno de kininógenos de alto (HK) o bajo peso (LK) molecular, que en el contexto de infecciones microbianas pueden ser liberados por las cistein proteasas de algunos parásitos, como son las cruzipainas expresadas por *Trypanosoma cruzi* (Del Nery *et al.*, 1997, Lima *et al.*, 2002, Scharfstein *et al.*, 2000). La Cruzipaina (CZ) es la mayor una cistein proteasa de *T. cruzi*, perdiendo los tripomastigotes metaciclícos la capacidad de invadir células una vez desactivada la capacidad enzimática de dicha proteína (Meirelles *et al.*, 1992). La CZ es capaz de romper eficientemente los flancos de un motivo interno de kininas, que son capaces de unirse a un amplio rango de células y en concreto a receptores de proteína G heterotriméricos; Receptores B2 de bradikinas ( $B_2R$ ), se expresan constitutivamente en las células cardiovasculares (Burleigh *et al.*, 2002, Villalta *et al.*, 2009, Scharfstein *et al.*, 2000). Esta activación de los  $B_2R$  trae consigo un aumento de  $IP_3$  y consecuentemente de  $Ca^{2+}$  en la célula hospedadora (Burleigh *et al.*, 2002). Estudios realizados aportan además que la generación de péptidos kinina, es consecuencia de interacciones cooperativas entre CZ, HK y proteoglicanos como el heparán sulfato, molécula ya descrita en la entrada (Herrera *et al.*, 1994) y que estimularía la liberación de kininas y la activación de receptores

cercanos de bradikinina (Lima *et al.*, 2002). Tanto las células CHO transfectadas con B<sub>2</sub>R (CHO- B<sub>2</sub>R) y posteriormente infectadas, como tratadas con Cruzipaina provocan un aumento de Ca<sup>2+</sup> citosólico mediado por IP<sub>3</sub> (Scharfstein *et al.*, 2000), siendo bloqueada la invasión mediante anticuerpos monoclonales contra BK de las células CHO- B<sub>2</sub>R, si bien mantienen un nivel basal de infección propio de este tipo de células CHO. El hecho de que inhibidores solubles e hidrofílicos de CZ fallan a la hora de prevenir la entrada del parásito, puede ser debido a que la reacción de liberación de kininas ocurra en áreas formadas por la yuxtaposición de la membrana plasmática de la célula hospedadora y del parásito. Estas CZ difundirían al espacio intercelular desde la Bolsa Paraflagelar dando lugar a un microambiente donde no se vería inactivada por los inhibidores solubles de CZ ensayados (Villalta *et al.*, 2009).

### **5.3.3. Receptores Transialidasa: Citoqueratina 18, Laminina y Receptor para Factor de Crecimiento Neuronal**

La familia transialidasa (TS) comprende a una larga familia de proteínas que se componen de un extenso número de miembros presentes en *T. cruzi*, como se describe más adelante. El grupo de proteínas denominado como Tc-85 ha sido bien caracterizado, se conocen algunas de sus características así como los receptores con que se unen actuando así como ligandos del parásito en la membrana de la célula (Burleigh *et al.*, 2002).

Una de las características de esta familia es poseer una región en el extremo carboxi terminal con secuencia muy conservada y conocido como dominio FLY (VTVXNVFLYNR) cuyo receptor en células LLC-MK<sub>2</sub> es citoqueratina 18 (CK18), presente en la superficie de dichas células (Magdesian *et al.*, 2001). Este dominio no solo está presente en los trypomastigotes sino que también existe en una proteína abundante en la superficie de los amastigotes denominada como Proteína de Superficie de Amastigote -2 (ASP-2) (Low *et al.*, 1997). Las citoqueratinas son las proteínas estructurales más importantes de las células epiteliales. La CK18 de la familia de citoqueratinas ácidas tipo 1, es una proteína expresada en el epitelio interno del citoplasma celular, exhibiendo junto a la citoqueratina 8 (CK8) características de resistencia a estrés y apoptosis (Gilbert *et al.*, 2004).

Estudios recientes utilizando RNA<sub>i</sub> han demostrado que la CK18 en células Hela transfectadas con CK RNA<sub>i</sub>, no inhiben la entrada del trypomastigote, pero si inhiben eficazmente la replicación de los amastigotes intracelulares, sugiriendo que esta proteína tiene un papel muy importante en la fase intracelular del ciclo pero no en el de los trypomastigotes y sugiriendo además que su actuación como ligando en la entrada del parásito no es crucial (Claser *et al.*, 2008), aunque según otros autores esta interacción, pudiera explicar que el parásito pueda atravesar la mucosa epitelial o el epitelio del trofoblasto (explicando el paso transplacentario en la transmisión del Chagas Congénito) (Magdesian *et al.*, 2001).

Otro ligando descrito de TS son las lamininas. Estas, son componentes de la matriz extracelular de las láminas basales, estructuras laminares de la matriz extracelular y que actúan como interfase entre las células de los tejidos epiteliales, musculares y nerviosos en los sitios en que ellas se asocian al tejido conjuntivo (Leblond *et al.*, 1989). Las uniones musculares y neuromusculares son sitios preferidos donde *T. cruzi* induce lesiones. Cuando el parásito deja el torrente sanguíneo, probablemente se adhiere a células endoteliales interaccionando con el entorno conectivo extracelular. Por tanto, la presencia de un receptor de laminina en el parásito es muy importante durante esta etapa de la infección (Giordano *et al.*, 1999)). Esta capacidad de unión de *T. cruzi* fue descrita, mediante el uso de anticuerpos Anti-laminina que inhibían entre un 65-72% la entrada del parásito (Giordano *et al.*, 1999), determinándose que el ligando en el parásito eran TS tanto de tipo gp83 como del tipo Tc85, uniéndose estas moléculas a las células del miocardio, fibroblastos y macrófagos (Giordano *et al.*, 1994, Giordano *et al.*, 1999, Villalta *et al.*, 2001). El papel de los ligandos también ha sido demostrada mediante el uso del RNA<sub>i</sub>, siendo inhibida la entrada de *T. cruzi* en el 85% de las células Hela donde la expresión de  $\gamma$ -Laminina 1 estaba bloqueada por el RNA<sub>i</sub> en un 60% (Nde *et al.*, 2006).

Una de las acciones mas interesantes de las TS, es la de actuar como un factor neurotrófico derivado del parásito (PDNF) uniéndose a receptores Trk de las células nerviosas (Chuenkova *et al.*, 2004, de Melo-Jorge *et al.*, 2007). Esta molécula posee un dominio lectina en el residuo 425 a 445 (Chuenkova *et al.*, 2005), uniéndose al receptor TrkA del factor de crecimiento nervioso (FCN)

activándolo e incrementando la autofosforilación de dicho receptor, activando las vías “prosupervivencia” fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3K) y protein kinasa mitógeno activadas (MAPK/Erk), así como el factor de transcripción CREB ((Chuenkova *et al.*, 2000). TrkA es un miembro de la familia Trk de receptores tirosin kinasa, que también incluyen a los receptores TrkB y TrkC. La señal Trk ayuda a mediar la diferenciación, supervivencia y regeneración de células tanto del Sistema Nervioso Central como Periférico (Huang *et al.*, 2003). Recientemente se ha descrito también la interacción de PDNF, con los receptores TrkC promoviendo la supervivencia de células neuronales y células de Schwann (Weinkauff *et al.*, 2009). Estos datos conducen a pensar que *T. cruzi* se une a los receptores Trk para aumentar la supervivencia de las células nerviosas y estimular los mecanismos de reparación (normalmente asociados a moléculas neurotróficas), pudiendo persistir de esta manera en el sistema nervioso de manera crónica (Weinkauff *et al.*, 2009, Chuenkova *et al.*, 2005).

De estos resultados, se deduce que las TS son moléculas multiadhesivas que se unen a distintos receptores localizados en la superficie celular o a componentes de la matriz extracelular, para la invasión de múltiples tipos celulares por parte de *T. cruzi*.

#### 5.3.4. Galectina 3

Esta proteína pertenece a la familia de lectinas ligadoras de  $\beta$ -galactosido que interacciona con otras proteínas que contienen residuos polilactosamina como la laminina (Kasai *et al.*, 1996). La Galectina 3 es uno de los reguladores principales de inflamación, crecimiento celular, señalización, quimiotaxis, interacciones célula-matriz celular, progresión de tumores y metastasis (Ochieng *et al.*, 2004), se une a *T. cruzi* por medio de glicoconjugados presentes en la superficie del parásito.

Esta proteína interacciona por una parte con laminina y por otra parte con proteínas de superficie del parásito de 45 kDa (mucina), 32 y 30 kDa (Moody *et al.*, 2000). La galectina 3 aumenta la adhesividad de trypomastigotes a células de músculo liso de la arteria coronaria (CASM), preincubándolos con dicha proteína, células transfectadas con el gen de la Galectina 3 antisentido reducen la adherencia de los trypomastigotes a dichas células (Kleshchenko *et*

*al.*, 2004). *T. cruzi* podría aprovechar la expresión mas elevada (hasta 300 veces) de este receptor durante el curso de una infección, para ligarse a las células, poniendo de manifiesto, los experimentos con células CASM, donde la galectina 3 de la superficie de dichas células es una de las causas de la cardiomiopatía desarrollada por pacientes afectados de Chagas (Kleshchenko *et al.*, 2004).

### 5.3.5. Trombospondina

Existen cinco formas de trombospondina (TSP) divididas en varios grupos, conteniendo varios dominios dentro de la misma molécula. La Trombospondina se expresa en muchos tipos celulares, en especial en las células del músculo liso y células endoteliales, siendo uno de los componentes de la matriz extracelular (Chen *et al.*, 2000).

La TSP-1 se une específicamente a receptores de superficie, citoquinas, Proteasas, y factores de crecimiento, así como a proteínas estructurales como colágeno, fibronectina y lamininas (Chen *et al.*, 2000). El tratamiento con RNA<sub>i</sub> para TSA-1 en células CASM, reduce significativamente la infección por *T. cruzi* de dichas células, lo que muestra que estas proteínas están involucradas en el proceso de entrada en la célula (Simmons *et al.*, 2006). Además se ha demostrado que los niveles de transcritos para TSA-1 en células infectadas aumentan al evaluarse por RTqPCR los niveles de su mRNA, lo cual indica la necesidad de este receptor para unirse a la célula y generar los daños típicos de la patología por *T. cruzi* (Simmons *et al.*, 2006).

## 5.4. Invasión celular: Moléculas de *T. cruzi* implicadas

### 5.4.1. Cruzipaína

La Cruzipaína (CZ) (Cruzaín o Gp57/51) de *T. cruzi* pertenece a la familia de las Papain-like cisteín Proteasas, una pequeña familia de isoformas muy relacionadas entre sí. La cruzipaína es una proteína presente en las diferentes fases de vida del parásito, aunque con una regulación diferencial a lo largo de éstas, y codificada por genes polimórficos organizados en tándem (Campetella *et al.*, 1992, Lima *et al.*, 1994). Los mRNA de cruzipaína codifican isoformas

Eliminado: ¶

con un alto grado de identidad en el estadio epimastigote (>95% de identidad), mientras que en trypomastigotes y amastigotes la expresión de los genes de la cruzipaina es mucho más divergente (Lima *et al.*, 1994). Si bien la función exacta de esta proteína se desconoce aún, se localiza en reservosomas de los epimastigotes y orgánulos lisosomales de los amastigotes, además de en la superficie de amastigotes intracelulares, con lo que su función podría ser degradar proteínas adquiridas del exterior tanto en el insecto vector como en el hospedador definitivo (McKerrow *et al.*, 2009, Souto-Padron *et al.*, 1990).

Las sustituciones entre aminoácidos no conservados en estas proteínas influirán sobre las diferentes propiedades catalíticas de estas enzimas, difiriendo en la especificidad de sustrato y la susceptibilidad a la inhibición por inhibidores sintéticos o naturales de las cisteín proteasas, dotando a *T. cruzi* de una amplia variedad de enzimas proteolíticas activas para un amplio rango de hospedadores (Lima *et al.*, 2001, Monteiro *et al.*, 2001).

Se han llevado a cabo estudios acerca de la especificidad de la CZ, indicando que esta es capaz incluso de hidrolizar pequeños péptidos cromogénicos pero necesitando de la presencia de residuos Arg o Lys en la posición P1 y al menos un segundo residuo (P2) de Arg, Leu, Phe o Val en posiciones determinadas dentro del centro catalítico de la CZ (Eakin *et al.*, 1992, Cazzulo *et al.*, 1992).

Una característica funcional descrita para estas enzimas es la capacidad de activar la cascada de kininas por los trypomastigotes de *T. cruzi*, activando a las proteínas G heterotriméricas, e incrementando la susceptibilidad a la invasión por parte de los parásitos como se ha explicado con anterioridad.

Otra propiedad de esta enzima es la de poder romper diferentes subtipos de IgG generando fragmentos de las inmunoglobulinas inactivándola tanto en su función de unión como efectora, Interfiriendo así con la respuesta inmune humoral, pudiendo ser éste, entre otros, uno de los posibles mecanismos de evasión de la respuesta inmune (Berasain *et al.*, 2003).

La CZ se sintetiza como precursores inactivos, los péptidos poseen un péptido señal (prodominio) y un dominio que se retiene en la proteína madura con la actividad catalítica del enzima (Reis *et al.*, 2007). Además, existe una porción muy conservada en el extremo C- terminal de 130 aa de función desconocida y que no es esencial para la función de la enzima. Este extremo

C-terminal se sabe que posee propiedades antigénicas tanto cuando se enfrenta a sueros de enfermos chagásicos crónicos como frente a sueros de conejos infectados con *T. cruzi* (Cazzulo *et al.*, 1992).

Diversas funciones pueden ser atribuidas al prodominio presente en los precursores (proenzimas) de la CZ: (a) inhibición del enzima a través de la interacción con su sitio activo; (b) plegamiento y (c) señal para que la CZ sea captada por el sistema endosomal-lisosomal de la célula (Reis *et al.*, 2007).

Esta proteína puede ser considerada como un posible blanco farmacológico con inhibidores que puedan inactivarla, para ello es importante saber, que el enzima puede actuar en dos microambientes diferentes de pH (pH: 5.5 dentro de lisosomas y pH: 7.4 en la superficie de amastigote en la célula hospedadora) (McKerrow *et al.*, 2009).

#### 5.4.2. Gp35/50, Gp82 y Gp90

La gp82 es una glicoproteína dependiente de estadio que se encuentra el parásito, y es expresada preferencialmente en la fase tripomastigote metacíclica (Araya *et al.*, 1994). Esta proteína se codifica por una familia multigénica cuyos miembros se distribuyen en diversos cromosomas, y que presenta un 40-56% de identidad a nivel de aminoácidos entre los miembros gp82 y los pertenecientes a los de la familia gp85/Transialidasa, compartiendo motivos con esta como la caja Asp (SxDxGxTW), el motivo subterminal (VTVxNVFLYNR) y una secuencia de unión a GPI (Araya *et al.*, 1994). En la cepa CL, altamente infectiva, la gp82 es capaz de promover la invasión mediante una cascada de señales bidireccional, dando lugar a la movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular tanto en el parásito como en la célula. Además, la unión de la gp82 en las células diana induce una disrupción dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  de los microfilamentos de actina proceso necesario para la entrada del parásito en la célula (Ruiz *et al.*, 1998, Ferreira *et al.*, 2006). La gp82 también es capaz de unirse a las mucinas gástricas, lo cual es crucial en el primer paso para la invasión de la mucosa del epitelio gástrico (Staquicini *et al.*). Las cepas poco invasivas como la G utilizan sin embargo de manera preferencial glicoproteínas de tipo gp 35/50. Esta molécula del parásito también se une mediante receptores de la célula, posee una respuesta bidireccional de  $\text{Ca}^{2+}$  pero a un

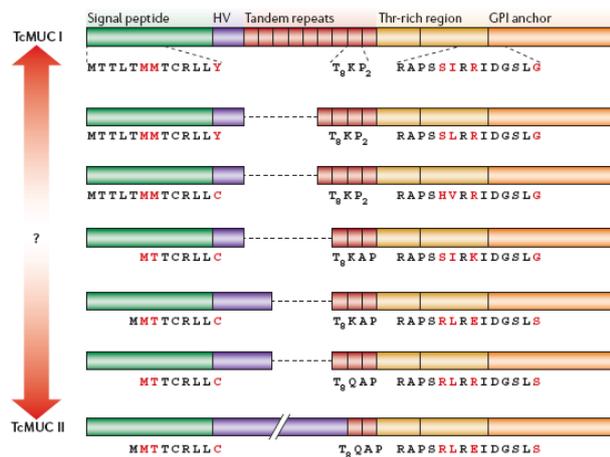
nivel menor que la gp82. En este caso, las señales en cascada inducidas en el parásito son mediadas a través de AMPc (Yoshida, 2006). Por su parte, las moléculas gp90 son moléculas que se caracterizan por ser reguladores negativos de la entrada del parásito en la célula, no incrementándose el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  bidireccional en respuesta a esta molécula como ocurre en la gp82 o gp35/50. Trypomastigotes metacíclicos transfectados con el gen antisentido de la gp90 incrementan la infectividad del parásito, disminuyendo cuando estos genes no están bloqueados (Malaga *et al.*, 2001).

## 5.5. Familias multigénicas e infectividad

### 5.5.1. Mucinas

La capa externa de *T. cruzi* en sus diferentes estadios, esta cubierta por mucinas, denominadas como TcMUC. Las mucinas son los componentes expresados en mayor número en la superficie de *T. cruzi* ( $\sim 2 \times 10^6$  copias por parásito), siendo una de las familias génicas con mayor expansión en el genoma del parásito (863 genes) (El-Sayed *et al.*, 2005a, Acosta-Serrano *et al.*, 2001). Estas proteínas, poseen dos funciones principales: proveer al parásito de protección contra el vector y/o mecanismos defensivos del hospedador y asegurar el anclaje y la invasión en células y tejidos específicos (Buscaglia *et al.*, 2006). Las mucinas poseen azúcares O- glicosilados que representan hasta un 60% del peso total de la glicoproteína, se anclan a la cubierta lipídica externa de la membrana plasmática mediante uniones Glicofosfatidilinositol (GPI) (Buscaglia *et al.*, 2006).

Todos los genes TcMUC codifican proteínas que contienen un péptido señal, sitios para unión a GPI y una región central altamente hipervariable (HV). Dicha región, contienen un núcleo polipeptídico que abarca 50-200 aminoácidos, rico en residuos Serina/Treonina



**Figura 5.4.** Evolución de la familia de genes TcMUC. Los aminoácidos variables dentro de estas secuencias se ofrecen en rojo. HV, región hipervariable, Thr-rich; región rica en treonina. (Buscaglia *et al.*, 2006).

(Ser/Thr) y con sitios de unión para residuos *N*-acetilglucosamina (GlcNAc). Mas del 25% de los genes que codifican para esta familia en el genoma son pseudogenes no funcionales, acumulando estos, al igual que los genes funcionales el mayor número de mutaciones en el dominio central hipervariable (Campo *et al.*, 2006). La región central se puede agrupar en unidades repetitivas o no, cuyas estructuras consenso son T<sub>(6-8)</sub>KP<sub>(1-2)</sub> (Familia I), y KNT<sub>7</sub>ST<sub>3</sub>S(S/K)AP y DQT<sub>17-20</sub>NAPAKDT5-7NAPK (familia III; también llamadas subfamilias L y S). Alternativamente, algunos productos génicos no se organizan como secuencias repetidas en la región central, pero son ricos en Residuos Thr, Ser y Pro (familia II) (Di Noia *et al.*, 2002). La presencia de esos residuos en las TcMUC II son dianas para la O-glicosilación y consecuentemente potenciales sitios aceptores de ácido siálico, lo cual puede explicar que las mucinas de los fases del parásito propios de mamíferos posean una mayor glicosilación y mayor tamaño que las expresadas por las formas existentes en el insecto (Acosta A, 1994). Las características fundamentales de los diferentes grupos de mucinas se expresan en la Tabla 5.1 (Buscaglia *et al.*, 2006).

Una de las características principales de esta familia es la de formar la cubierta protectora alrededor de la superficie del parásito que le hace resistente al ataque de proteasas y glicosidasas, lo cual, es de vital importancia para sobrevivir al ataque de enzimas digestivas durante el desarrollo y crecimiento

del parásito en el insecto vector. En este momento los residuos de ácido siálico (AS) de las mucinas no poseen una especial importancia biológica, dado que en el intestino del insecto se eliminan de la superficie del parásito.

Por el contrario, la sialidación de las mucinas en las fases de desarrollo de *T. cruzi* en el mamífero confiere una protección activa frente al sistema inmune humoral del hospedador. Aunque no se conoce del todo la composición de los O- oligosacáridos de las mucinas, se sabe que las mucinas de estadios del hospedador mamífero exponen epítomos terminales de Gal( $\alpha$ 1,3)Gal, los cuales son una de las principales dianas del sistema inmune humoral durante la infección por el parásito (Almeida *et al.*, 1994). Sin embargo, la carga negativa que confieren los residuos de AS adquiridos por la activa acción de las TS, neutralizan la lisis independiente de complemento que se inducirían por los anticuerpos anti- $\alpha$  galactosil y permiten evadir dicho ataque a los parásitos (Acosta-Serrano *et al.*, 2001). Muchos de los genes TcMUC II están unidos en el genoma a los genes de TS, y dada la transcripción policistrónica típica de los tripanosomátidos, esta unión puede explicar la expresión coordinada de los genes TS y TcMUC, funcionalmente ligados al menos, en la superficie de los tripomastigotes sanguíneos (Campo *et al.*, 2006).

Eliminado:

Tradicionalmente, las mucinas se encuentran divididas en dos grandes grupos de genes conocidos como TcMUC I y TcMUC II, si bien se han descubierto recientemente otras variantes como son las "*T. cruzi* Small Mucin-Like Gene Family" (TcSMUG).

Las TcsMUG contienen una variabilidad interna mucho menor que las otras dos familias, lo cual puede explicarse por su expresión durante los estadios correspondientes al ciclo biológico en el insecto vector, donde quedan libres de la presión del sistema inmune adaptativo (Buscaglia *et al.*, 2006). Dentro de la familia TcMUC también se encuadran las proteínas denominadas como TSSA, que se expresan en la fase trypomastigote.

Eliminado:

Los productos génicos de las TSSA tienen la característica de permitir diferenciar los dos mayores grupos filogenéticos de *T. cruzi* (Di Noia *et al.*, 2002, Buscaglia *et al.*, 2006).

Por otra parte, la región HV de estas proteínas, confiere un mosaico de variantes que se expresan simultáneamente en un mismo parásito y son reconocidas por el suero de los hospedadores infectados. Lo que puede dar

lugar a una anergia de la respuesta de las células CD4+ potencialmente protectora (Pollevick *et al.*, 2000). Además, las mucinas son capaces de inducir la síntesis de citoquinas proinflamatorias: IL-12, TNF y NO por parte de los macrófagos. Los motivos de unión GPI de estas moléculas son los responsables de esta propiedad al unirse específicamente a los receptores “Toll-like receptor 2” (TLR2) de la superficie de los macrófagos, si bien, otros TLRs pudieran igualmente estar implicados (Almeida *et al.*, 2001).

Otra característica que puede conferir la región HV, es la de proporcionar ligandos de unión para el parásito para multitud de tipos celulares. El tratamiento con anticuerpos monoclonales frente a mucinas es capaz de inhibir la entrada de *T. cruzi* (Schenkman *et al.*, 1991), si bien es posible que el auténtico papel de estas mucinas en la entrada sea el de cooperar con otras moléculas como las TS, durante las fases infectivas para el hospedador mamífero, ya que es en las fases trypomastigotes y amastigotes donde existen una mayor expresión de las TS (Acosta-Serrano *et al.*, 2001).

**Tabla 5.1.** Características Estructurales de las diferentes familias de mucinas en *Trypanosoma cruzi*. A (amastigote), E (epimastigote), T (trypomastigote). Adaptado de Buscaglia *et al.*, 2006.

FAMILIA	GRUPO	HOSPEDADOR	ESTADIO	CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES
TcMUC	TcMUCI	Mamífero	A>T	2-10 repeticiones T <sub>(6-8)</sub> KP <sub>(1-2)</sub> O-Glicosiladas. Pequeña región N-terminal Hipervariable (HV). Región C-terminal rica en Thr. Productos de 60-200kDa
	TcMUCII	Mamífero	T>A	1-2 repeticiones T8KAP/T8QAP, larga región variable N-proximal. Región C-terminal rica en Thr. Productos de 60-200kDa
	TSSA(TcMUCIII)	Mamífero	T	No repeticiones. Productos de 20 kDa.
TcSMUG				residuos Thr O- stencia regiones ps de 35-50 Kda. NT7ST3S (S/K) AP. ies variables.

Eliminado: ¶

**Figura 5.5.** Variabilidad y actividad biológica de las mucinas de superficie durante el ciclo de vida de *T. cruzi*. Las funciones de las diferentes regiones son: Región variable: evasión inmune y adhesión, núcleo: O-glicosilación e inmunogenicidad, azúcares: protección, adhesión e inmunogenicidad, unión GPI: anclaje e inmunomodulación (Buscaglia *et al.*, 2006).

### 5.5.2. Transialidasas

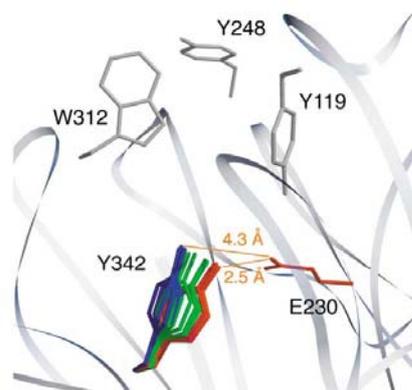
Las TS, son proteínas unidas a motivos GPI presentes también en la superficie de *Trypanosoma cruzi* aunque también aparecen en la superficie de *Trypanosoma brucei* y cuya función principal consiste en transferir residuos de ácido siálico (AS) desde los glicoconjugados de la célula hospedadora y unirlos a los residuos  $\beta$ -Gal de las mucinas del parásito, dado que el parásito no es capaz de sintetizarlos de novo (Figura 5.7) (Buscaglia *et al.*, 2006).

La familia TcTS contiene 1430 genes que codifican para proteínas de esta familia y con pesos moleculares que oscilan entre 60 a más de 200 kDa *T. cruzi* contiene junto a estos genes, 693 pseudogenes y representa la mayor expansión génica ocurrida en los genomas de los kinetoplastidos secuenciados (El-Sayed *et al.*, 2005a). Muchos de estos (pseudo)genes se encuentran cerca de las regiones teloméricas, lo cual implica que parte de la expansión de esta familia génica, se deba a la localización cromosómica (Kim *et al.*, 2005).

La gran expansión de esta familia se piensa que es debida a la gran presión del sistema inmune humoral y celular a que se exponen las TS. La expresión de estos genes, se debe en parte a la regulación de la estabilidad de los mRNA y al control de la eficiencia de transcripción por parte de regiones 3'UTR de los transcritos de la familia TS. Estas regiones podrían hacer que la eficiencia a la hora de la expresión fuera diferente entre los distintos estadios, siendo mayor la expresión en las formas trypomastigotes derivadas de células

(Jager *et al.*, 2008). Solo 12 de todos los genes de la familia que codifican para TS enzimáticamente activas y 725 para TS inactivas (El-Sayed *et al.*, 2005a).

Muchas de las TS activas (aunque no todas), contienen un dominio carboxiterminal constituido por 12 repeticiones en tandem de la secuencia consenso DSSAHGTPSTPV conocido como SAPA (shed acute phase antigen) el cual es altamente antigénico como se comentó con anterioridad (Cazzulo *et al.*, 1992). La diferencia entre los miembros activos e inactivos reside en una mutación en el residuo Tyr342 esencial para llevar a cabo la reacción de catálisis. Los motivos que catalizan la actividad enzimática de la proteína se sitúan en el extremo *N*-proximal de ella (Cazzulo *et al.*, 1992). La unión del AS da lugar a un cambio conformacional en la enzima que facilita la unión mediante la reorientación del residuo Tyr119 activando el enzima mediante el reposicionamiento de los residuos Tyr342/Leu36 (Figura 5.6)(Buschiazzo *et al.*, 2002). La eficiencia en la actividad enzimática transglicosidasa puede deberse a que las TS son una evolución de una hidrolasa trypanosomátida ancestral (Buschiazzo *et al.*, 2002).



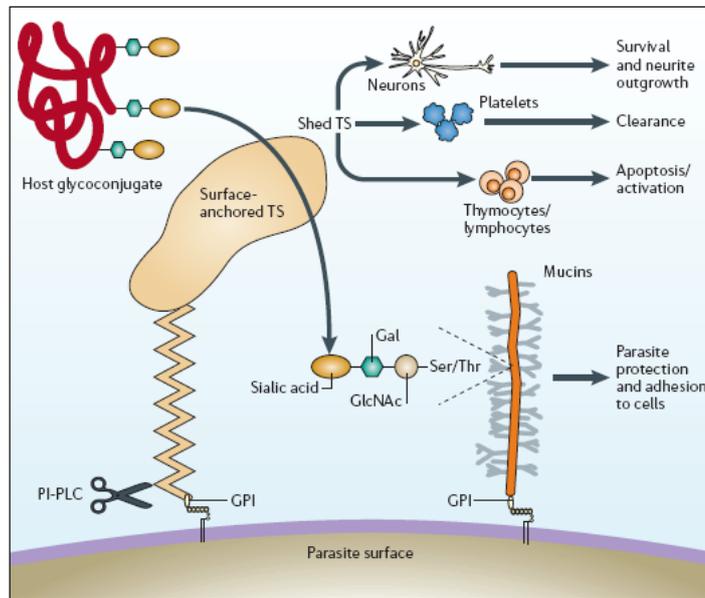
**Figura 5.6.** Reposicionamiento del residuo Tyr342 en el estado ligado (azul, rojo) o no ligado (verde). También se indica la distancia mínima y máxima al residuo Glu230 en los diferentes estados conformacionales.

Además de transferir residuos de AS al parásito otra de las funciones comprobadas de estas glicoproteínas es la de unirse a receptores de la membrana de la célula hospedadora, estabilizando la unión célula hospedadora-parásito, como veremos con mas detalle posteriormente. La capacidad de unirse a receptores de CK18 le confiere el dominio conservado VTVxNVxLYNR, conocido como dominio FLY, el cual lo poseen 371 del total de

los genes que componen la familia (El-Sayed *et al.*, 2005a, Magdesian *et al.*, 2001). Otro receptor al que son capaces de unirse son las lamininas, las cuales se unen a un epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal Mo H1A10 presente en el subgrupo gp85/transialidasa, de esta familia (Giordano *et al.*, 1999). La importancia de esta proteína en el proceso de interacción ha sido ampliamente demostrada mediante el uso de Acs específicos frente epítopos sializados, aceptores de AS o al domino catalítico de las TS, reduciendo la infección en la célula hospedadora (Schenkman *et al.*, 1991, Ming *et al.*, 1993, Franchin *et al.*, 1997, Villalta *et al.*, 2001).

Aunque esta enzima esta ligada a la membrana mediante residuos GPI, también se libera a la sangre mediante la acción de una Fosfatidil Inositol Fosfolipasa C que actúa sobre los residuos GPI de la TS. La liberación del enzima altera su perfil de sialización superficial, dando lugar a múltiples actividades biológicas. Estas TS liberadas remueven residuos de ácido siálico de la superficie de las plaquetas, causando trombocitopenia en la fase aguda de la enfermedad (Figura 5.7). Una simple inyección intravenosa del enzima en ratones reduce el recuento de plaquetas en un 50% (Tribulatti *et al.*, 2005). Las TS también inducen apoptosis en el bazo, timo y ganglios periféricos, siendo capaces también de prevenir la apoptosis de células T (Leguizamon *et al.*, 1999, Mucci *et al.*, 2002, Todeschini *et al.*, 2002). Por último, recientemente se ha descrito que estas moléculas son capaces de promover la supervivencia y crecimiento neuronal uniéndose a receptores TrK, como anteriormente describíamos (Weinkauff *et al.*, 2009, Chuenkova *et al.*, 2001, Chuenkova *et al.*, 2004, Chuenkova *et al.*, 2005).

Debido a la necesidad del parásito de obtener ácido siálico desde los glicoconjugados del hospedador, la ausencia de alternativas de esta ruta en el parásito y las diversas actividades biológicas del enzima durante la patogénesis de la enfermedad de Chagas, hacen de esta enzima sea también una buena candidata para el diseño de fármacos específicos frente al parásito.



**Figura 5.7.** Efectos biológicos de la actividad TS. Sialización de residuos Galactosamina de Mucinas del parásito mediada por TS de superficie. Acción de la Fosfatidilinositol-fosfolipasa C, liberación de la TS a la circulación y actividades biológicas de la TS (Buscaglia *et al.*, 2006)

### 5.5.3 DGF-1 (Dispersed Gene Family-1)

Esta es la quinta familia de genes con mayor número de miembros representados en el genoma de *T. cruzi*, componiéndose por 565 genes y 136 pseudogenes (El-Sayed *et al.*, 2005a). Muchos de los miembros de ésta familia se localizan en regiones cromosómicas subteloméricas, donde se puede favorecer la variabilidad existente en sus secuencias (Kawashita *et al.*, 2009, Kim *et al.*, 2005).

La genealogía de esta familia indica que esta se puede dividir en al menos tres grupos, existiendo fenómenos de duplicación génica, recombinación e hibridación que estimularían la generación de diversidad en términos de conversión génica (Kawashita *et al.*, 2009). Considerando la presencia de los dominios EGF (Factores de crecimiento epidermal) y tripéptidos RGD (Arginina-Glicina-Aspartato) en los genes DGF-1, se piensa que pudieran poseer funciones como las integrinas (Kawashita *et al.*, 2009). Este tipo de proteínas se han identificado mediante aproximaciones proteómicas de los trypomastigotes, mostrándose como proteínas N-glicosiladas (Atwood *et al.*, 2006). Anticuerpos (DGF-1.2) dirigidos frente a una región de estas proteínas

las localizan en el citosol de los parásitos, siendo más abundantes en los amastigotes que en los trypomastigotes o epimastigotes. (Lander *et al.*). La localización de la proteína varía durante la diferenciación de trypomastigote a amastigote, donde se localiza finalmente ligada agrupada y en contacto con la parte interna de la membrana plasmática. Igualmente, un miembro de ésta familia se ha localizado en el medio de cultivo, observándose también posibles fragmentaciones de la DGF-1.2 en el medio de cultivo (Lander *et al.*).

Mediante estudios bioinformáticos en diversas familias de genes del genoma de *T. cruzi* y en modelos de mutaciones en múltiples puntos a lo largo de 1000 generaciones, se sabe que esta familia ha sufrido una serie de mutaciones puntuales y posee las mayores tasas de variabilidad en sus secuencias (Azuaje *et al.*, 2007). Los eventos de conversión génica entre miembros de esta familia, hace pensar que los pseudogenes pertenecientes a esta familia sean la fuente de generación de la diversidad en sus secuencias, maximizando sus variaciones a nivel aminoacídico mediante conversión génica a nivel nucleotídico (Azuaje *et al.*, 2007).

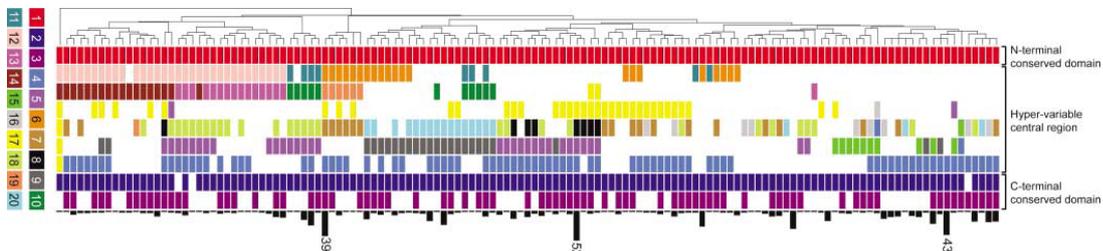
#### **5.5.4. MASP (Mucin Associated Surface Proteins)**

Esta familia de genes y proteínas fue descrita por primera vez a raíz del estudio y secuenciación del genoma de *T. cruzi* y debe su nombre por situarse sus miembros entre grandes agrupaciones de genes correspondientes a las Transialidasas y mucinas, en concreto aguas debajo de los miembros de la TcMUC II, a los cuales se asemejan aunque no en su secuencia pero si en su estructura (El-Sayed *et al.*, 2005a, Bartholomeu *et al.*, 2009). Como se observa en la figura 5.8, los miembros de esta familia se caracterizan por poseer dos dominos N- y C- terminal altamente conservados, así como un péptido señal y un sitio de unión a GPI. La zona central de estas proteínas es altamente variable tanto en longitud, como en secuencia, conteniendo al menos 20 motivos repetitivos entre los miembros de esta familia (Bartholomeu *et al.*, 2009).

Según los datos anotados en el genoma de *T. cruzi*, la familia MASP se compone 1377 genes y 433 pseudogenes distribuidos en “arrays” de hasta

600Kb, aunque posiblemente el número total sea mayor, debido al colapso que sufren las anotaciones en el genoma cuando se secuencian familias con motivos repetitivos, como ya mencionamos con anterioridad (Arner *et al.*, 2007).

Una característica peculiar es la de formar quimeras, conteniendo los motivos *N*- o *C*- terminales conservados con dominos *N*- o *C*- terminales de las mucinas o *C*- terminales de las TS (El-Sayed *et al.*, 2005a). La distribución de estas proteínas entre otras familias de genes correspondientes a proteínas de superficie posiblemente contribuya a mantener la diversidad genética, evitando la homogenización de las secuencias de los genes *masp* (Bartholomeu *et al.*, 2009).



**Figura 5.8.** Representación esquemática de la estructura y variabilidad de las regiones *N*- y *C*-terminal y región central hipervariable de la familia MASP utilizando el algoritmo MEME 3.0. (El-Sayed *et al.*, 2005a)

Aunque no en todos los casos, muchos de los genes MASP, así como otras familias de proteínas de superficie, se localizan en lugares internos de los cromosomas, en bloques donde se rompe la sintonía con respecto a otros trypanosomatidos como *L. major* o *T. brucei*. Las proteínas *vsg* de *T. brucei* se asocian también a los telómeros como mecanismo generador de variabilidad,

pero en el caso de las MASP esto no ocurre, siendo otros mecanismos los que generan la variabilidad antigénica de estas proteínas en el parásito (Bartholomeu *et al.*, 2009). Algunos de sus miembros de estas proteínas se unen a GPI y además son capaces de liberarse al medio de cultivo.

Las regiones no transcritas o UTRs (Untranslated Regions) de esta familia de genes se encuentran especialmente conservadas, lo que sugiere que esta conservación sean lugares para la recombinación, situándose otro de los motivos para la misma dentro de la región hipervariable, si bien no existe un lugar con una identidad de secuencia mínima en esta región. Por otra parte se conoce que uno de los lugares implicados en la regulación de la expresión génica en trypanosomátidos se encuentra dentro de las regiones no codificantes de los genes las cuales pueden modular la estabilidad y la eficiencia de la transcripción (Bartholomeu *et al.*, 2009, D'Orso *et al.*, 2001, Nozaki *et al.*, 1995).

Las proteínas MASP poseen lugares para N- y O- glicosilación, sufriendo extensas modificaciones postraduccionales, lo que puede ser el motivo por el cual, las aproximaciones proteómicas no hayan descrito aún muchos miembros de esta familia, aunque es posible que la expresión proteica, en función del número de genes que compone esta familia, sea mucho menor a lo esperado (Atwood *et al.*, 2005). Se han descrito 14 miembros pertenecientes a esta familia expresándose en algunos casos simultáneamente tanto en trypomastigotes como en amastigotes, y epimastigote. Poseen modificaciones postraduccionales y glicosilarse con residuos O- o N- glicosilados (Atwood *et al.*, 2006). Si bien han sido encontradas en la membrana de los trypomastigotes, son capaces de secretarse al medio en algunos casos (Bartholomeu *et al.*, 2009).

Aunque no se sabe el papel exacto de esta familia en la biología de *T. cruzi*, la hipervariabilidad en sus secuencias puede ser importante de cara a proporcionar una fuente de variabilidad antigénica, al situarse en la membrana del parásito. Como se ha comentado con anterioridad la gran expansión de las familias de proteínas de superficie en este parásito puede deberse a la mayor complejidad en su ciclo que el que poseen los otros Kinetoplástidos. La necesidad de establecer contacto un gran número de receptores de superficie en las diversas células que son capaces de invadir, los diferentes ambientes

tanto extra como intracelular con las diversas adaptaciones bioquímicas y filológicas que el ciclo biológico de *T. cruzi* conlleva, hace que este organismo esté adaptado a diversas situaciones de stress lo que deriva en una ampliación del número de moléculas en superficie capaces de interactuar y “relacionarse” con el medio externo que rodea a este protozoo pudiendo ser los miembros de la familia multigénica MASP uno de los encargados de llevar a cabo este proceso.

Eliminado: ¶

## B. OBJECTIVES

*Trypanosoma cruzi* is the kinetoplastid with the most complex life cycle of the protozoa comprising the family Trypanosomatidae, with diverse stages through which it passes (epimastigote, metacyclic trypomastigote, blood trypomastigote, and amastigote), both in the insect vector as well as in its definitive host, and it is also the only trypanosome of obligate intracellular phase to multiply in the vertebrate host in the amastigote form.

With the sequencing of the *T. cruzi* genome, it is now known that the expansion of this parasite is the largest within the kinetoplasts sequenced to date, both for its total size as for the number of genes found. The genome is composed of a great number of multigene families, which perhaps play an important role both in the invasion mechanisms of the diverse cell types which are attacked by this parasite, as well as for generating mechanisms for evading and surviving the immune response.

The multigene family MASP (Mucin Associated Surface Proteins), unique to *T. cruzi*, has recently been described based on the genome sequencing, constituting 1377 genes, of which 433 are pseudogenes. This family of genes and proteins possess a hypervariability in the central region of the sequences, constituting an ample array of resources for the development of *T. cruzi* during its life cycle. Because the discovery of the MASP family is relatively recent, there are few data available on its possible function in the parasite.

Based on this, the following objectives have been laid out to delve deeper into the study and characterisation of the MASP gene family of *T. cruzi*:

1. To study the level of gDNA of the conserved 5' and 3' regions as well as the hypervariability of the sequence of the MASP in different strains of *T. cruzi*, as well as in other kinetoplastid species.
2. To examine the expression of the MASP family at different stages in different strains of *T. cruzi*.
3. To clone and analyse the sequences of the MASP (pseudo) genes expressed at the metacyclic trypomastigote and amastigote stages in the PAN4, CI-Brener, and Maracay strains.

4. To analyse the functionality and basic characteristics of the pseudogenes expressed by different *T. cruzi* strains.
5. To characterize the MASP excreted protein, which we call MASP52, at the different stages of *T. cruzi* and to determine the involvement of this protein in the invasion and infectivity of the parasite.
6. To map the B epitopes and determine the humoral response against a battery of overlapping peptides of the C-terminal end of the MASP proteins against the sera of chronic Chagas patients (cardiopath and non-cardiopath), acute by natural vectorial transmission, acute by oral infection, and congenital.

## C. MATERIAL Y MÉTODOS

## C.1 MATERIALES

Eliminado: ¶

### 1.1. Líneas Celulares

#### 1.1.1. Parásitos.

Las cepas de tripanosomátidos usadas en este trabajo han sido las cepas: Maracay, PAN4 y la cepa CL, para el caso de *Trypanosoma cruzi* ; cepa Pepita González clon 2 Arraiján para *Trypanosoma rangeli* ; cepa Friedlin para *Leishmania major* y una cepa de *Blastocrithidia spp.* Todas las cepas han sido mantenidas por cultivo o por criopreservación desde su llegada a nuestro laboratorio.

#### ***Trypanosoma cruzi* :**

- **Cepa Maracay:** Cepa aislada de un caso clínico en el Instituto de Malariología y Sanidad Ambiental de Maracay (Venezuela) y donada por el Dr. Zozaya en 1979.
- **Cepa PAN4:** Cepa aislada de un paciente varón de 32 años residente en el Distrito de Arraiján, comunidad de Burunga (Panamá) en 2006 y donada a nuestro laboratorio en 2006 por la Dra A.Ying de la Universidad de Panamá.
- **Cepa CL :** Cepa de referencia obtenida del insecto vector *Triatoma infestans*, en Rio Grande do Sul, Encruzilhada, en el Sur de Brasil en 1963 (Brener *et al.*, 1963).

#### ***Trypanosoma rangeli:***

- **Cepa Pepita González clon 2 Arraiján 90/09/27.** Donada a nuestro laboratorio el 22 de Diciembre del 2009 por el Dr. Octavio Sousa (Dpto

de Microbiología, Universidad de Panamá) con Código internacional: M/HOM/PA/90/P6 CI-2.

***Leishmania major:***

- **Cepa Friedlin.** Código Internacional: MHOM/IL/81/Friedlin

***Blastocrithidia spp:***

- Cepa aislada en 1996 y donada por el Dr. Octavio Sousa (Dpto de Microbiología, Universidad de Panamá) en el 2008.

**1.1.2. Bacterias empleadas en la clonación y transformación**

***Escherichia coli:***

- **Cepa JM109:** *recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17 (rK-,mK+),relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacIqZΔM15]* .

**1.1.3. Células Vero:**

- Células obtenidas del Servicio de Líneas Celulares del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada (CIC) con Código Internacional: ECACC 84113001

**1.2. Medios de Cultivo**

Todos los medios de cultivos tanto para para *T. cruzi* como para Células Vero se prepararon en ambiente estéril (cámara de flujo laminar vertical, Glatt), siendo esterilizados por filtración bajo presión positiva a través de filtros estériles Millex-GP de 0.22 μM (Millipore).

### 1.2.1 Medio de cultivo para *T. cruzi*

- **Medio MTL (preparación para 1000 ml):** El cultivo de las formas epimastigotas de *T. cruzi* se realizó en Medio Líquido Tripanosoma (LTM) (Ruiz-Perez *et al.*, 1986). El medio se compone de 9.91 g de Sales para Solución de HANKS (HBSS) (Sigma), 0.350 g de Carbonato Sódico, 5 g de Lactoalbúmina Hidrolizada, 0.1 g de Extracto de levadura, 0.2 g de Hemoglobina humana o bovina, 0.056 g de Penicilina, 0.1 g de Estreptomicina y 0.048 g de Kanamicina. El medio se ajusta a pH: 7.2 y se suplementa con 10% de SBF (Suero Bovino Fetal), previamente inactivado a 56 °C durante 30 minutos.
- **Medio Grace Modificado (100ml):** Este medio fue preparado de acuerdo a la metodología previamente publicada por Osuna *et al.*, 1979 y Osuna *et al.*, 1990. El medio se compone de 0.250 g de Hemoglobina y 5.2 g de Grace's Insect Medium (Sigma) y 100 mEq/l final de CINA obtenido de la acidificación del medio con CLH y posterior neutralización con NaOH como se describe a continuación. La solución fue filtrada a la que se le añadió un 10% de SBFI. Tras añadir el suero bajamos el pH de la solución a 1.5 con HCl 1M y neutralizamos con NaOH 1M hasta un pH final de 5.8 Por último, se vuelve a filtrar para eliminar los precipitados formados durante el proceso de variación de pH y se esteriliza.

### 1.2.2. Medio de cultivo para células Vero:

- **Medio DMEM** (para 1000 ml): Con la composición de 9.53 g de Medio de Eagle en polvo de aminoácidos Esenciales (MEM), 2.2 g de Carbonato Sódico, 4 g de Hepes, 0.056 g de Penicilina, 0.1 g de Estreptomicina, 0.048 g de Kanamicina. El medio se ajusta a pH: 7.2 y se completa con un 10% de SBF (Suero Bovino Fetal), previamente inactivado a 56°C durante 30 minutos.
- **Medio de Congelación:** 70% Medio de cultivo (MEM o MTL), 20 % SBFI, 10% DMSO.

### 1.2.3. Medios de cultivo para *E.coli*

#### Medios generales:

- **Medio LB líquido:** 1g Tryptona, 0.5g Levadura, 1g NaCl en 100 ml de agua destilada. Se esteriliza por autoclavado a (121 °C durante 20 min).
- **Medio LB-Agar:** 2 gramos de Agar en 100ml de Medio LB líquido. Se esteriliza por autoclavado a (121 °C durante 20 min).
- **Medio Congelación bacteriana:** 15% Glicerol en LB líquido.
- **Antibióticos para LB (100ml):**
  - Ampicilina( 100 µg/ml): 100 µl (100mg/ml)
  - Kanamicina (25 µg/ml) : ) 100 µl (25mg/ml)
  - IPTG (0.5mM): 500µl (35g mg/ml (1M))
  - X-Gal (100 µg/ml): 100 µl (100mg/ml)

#### Soluciones para preparación de Células Competentes y transformación bacteriana:

**Medio TYM:** 2% Tryptosa, 0.5% Extracto de levadura, 0.1% NaCl 0.01% MgCl<sub>2</sub>. Se esteriliza por autoclavado a (121 °C durante 20 min).

**Medio TFB1:** Acetato de potasio 30mM, MnCl<sub>2</sub> 50mM, KCl 100mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM. Se esteriliza por filtración.

**Medio TFB2:** Na MOPS 10mM, CaCl<sub>2</sub> 75mM, 15% Glicerol, pH:7 .

Se esteriliza por filtración

**Medio SOC (100ml):** 2 g Tryptosa, 0.5g de extracto de levadura, 1ml 1M NaCl, 0.25 ml 1M KCl Se esteriliza por autoclavado a (121 °C durante 20 min). al que se añade 1ml 2M Mg<sup>2+</sup>, 1ml 2M Glucosa agregandole 2M Mg<sup>2+</sup>: 20.33g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 24.65g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, Se ajusta a pH:7. El conjunto se esteriliza por filtración.

### 1.3 Soluciones y Tampones para Técnicas moleculares

### 1.3.1. Soluciones para Extracción de DNA mediante el método Fenol/Cloroformo/Isoamílico:

- **Tampón de lisis:** 10mM Tris-HCl, 100mM EDTA, 0.5 % SDS, pH:8.
- **Tampón TE:** 10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH:8
- **Acetato Sódico** 3M pH:5.2
- **Etanol 70%:** 47.75 ml agua desionizada, 100 ml etanol 100%

### 1.3.2. Soluciones para electroforesis de DNA en geles de agarosa:

- Tampón TAE 10X:** 0.4 M Tris, 20 mM EDTA, 11.14 ml Ácido acético, pH: 8.2
- **Tampón de corrido:** TAE 1X (diluir 10 veces TAE 10X con agua bidestilada).
- **Agarosa:** 1-2% en Tampón TAE 1X según el tamaño de los fragmentos a analizar
- **Proteinasa K:** Stock a concentración final de 100 µg/ml.

## 1.4 Soluciones y Tampones para el manejo de proteínas

### 1.4.1. Soluciones para extracción de proteínas totales de *T. cruzi*

- Tampón de lisis:** PBS 20mM, 0.25mM Sacarosa, 1mM EDTA, 0.145mM KCl, 1mM DTT a pH: 7.4 suplementado con 1 pastilla de cóctel inhibidor de proteasas cada 25 ml (Roche Molecular Biochemicals).

Eliminado: ¶

### 1.4.2. Soluciones para la obtención de membranas y fracciones de membrana

- **Tampón EDTA-Tripsina:** 0.1 g EDTA, 0.5 Tripsina en 200 ml de PBS, pH: 7.2
- **Tampón Hipotónico:** 10 mM Tris-HCl, 2mM EDTA, 1mM DTT, pH: 8.

### 1.4.3. Soluciones para la obtención de las fracciones de membrana de *T. cruzi*

- **Tampón A:** 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2% Triton X-114 pH 7.4, conteniendo cocktail inhibidor de proteasas (Roche).
- **Tampón B:** 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.06% Triton X-114, pH 7.4, conteniendo cocktail inhibidor de proteasas (Roche).

### 1.4.4. Soluciones para electroforesis de proteínas en geles de poliacríamida:

- **Tampón de corrido:** 0.05M Tris, 0.384 M Glicina, 0.01% SDS.
- **Solución A (Tampón del gel concentrador):** Tris-HCl 0.5M, 0.4% SDS, pH: 6.8.
- **Solución B (Tampón del gel separador):** Tris-HCl 1.5m, 0.4% SDS pH: 8.8.
- **Tampón de la muestra:** 100 mM de Tris/HCl, 1 mM de EDTA, 2.5 %SDS, 5%  
 $\beta$  - mercaptoetanol, 0.01% azul de bromofenol %, Glicerol 10%(v/v) pH: 8.0.

### 1.4.5. Soluciones para la Tinción con Nitrato de Plata

- **Solución Fijadora:** solución al 20% de Ácido tricloro acético en agua (v/v)
- **Solución Activadora:** 8.3% glutaraldehído en agua, preparado al 25% y mezclando, 1 parte de esta solución con 2 partes de agua.
- **Lavado:** Agua Desionizada o destilada.
- **Solución de Teñido:** 0.25%(v/v) de Nitrato de Plata para los geles SDS-PAGE.

- **Solución de Desarrollo:** solución reductora del 0.015% de formaldehído en 2.5% de carbonato sódico, preparado a 12.5%(v/v) en agua. Para 100 ml de solución se utiliza 2.5 grm de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y 40  $\mu\text{l}$  de Formaldehído.
- **Solución de Parada:** 5% de ácido acético en agua (v/v).

#### 1.4.6. Soluciones para Secuenciación de Aminoácidos

- **Tampón TA:** Trifluoroacetic acid 0.1% Acetonitrilo 33% en Agua Bidestilada

#### 1.4.7. Soluciones para Cromatografía de Afinidad Agarosa-Germen de trigo:

- **Tampón de lavado:** 0.1M Fosfato sódico, 0.2M NaCl
- **Tampón de elución:** 0.5 M N-acetilglucosamina en tampón de lavado.
- **Tampón de almacenado:** 0.1M Fosfato sódico, 0.2M NaCl + 0.02% Azida sódica.
- **Tampón Glicina-HCl:** 0.1M, pH: 4.75

### 1.5. Soluciones y Tampones para Técnicas Inmunológicas

#### 1.5.1. Soluciones y Tampones para ELISA:

- **Tampón fosfato salino (PBS):** 10mM  $\text{Na HPO}_4$ , 10mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH: 7.2
- **Tampón de lavado:** Tween 0.3% en PBS.
- **Tampón de bloqueo:** Tween 0.1% en PBS, Leche en polvo 2%.
- **Tampón Carbonato:** Carbonato sódico 0.1 M, Bicarbonato sódico 0.1 M, pH: 9.3.
- **Tampón citrato:** 0.1M Acido Cítrico , 0.1 M Citrato sódico, pH: 5.
- **Solución sustrato peroxidasa:** 12.5 ml Tampón citrato, 12.5 ml Agua desionizada y una pastilla de OPD (O-fenil diaminobenzidina)(Sigma).
- **Solución de parada:** HCl 3M

### 1.5.2. Soluciones para la realización del Western-blot

- **Tampón de transferencia:** 25mM Tris, 192 mM Glicina, Metanol 20%, pH:8.3
- **Rojo Ponceau:** 0.5% Rojo Ponceau, 1% Acido acético en agua bidestilada.
- **Tampón de bloqueo:** Tween 0.1% en PBS, Leche en polvo 2%.
- **Tampón de lavado:** Tween 0.3% en PBS
- **Substrato de la peroxidasa:** 10 mg de DAB (3-3'Diaminobencidina Tetrahydroclorhídrica) en 10 ml de tampón Tris-HCl pH 7.2.

### 1.5.3. Soluciones para Inmunocitoquímica:

- **Tampón fijación de Inmunocitoquímica:** 0.5%Glutaraldehido, 4% paraformaldehido tampón cacodilato de sodio 0.1 M (pH 7.4).
- **Tampón Glicina:** Glicina 0.02M en PBS.
- **Tampón de Bloqueo:** 1% Albúmina de Suero Bovino (Sigma) en PBS. Todos los tampones fueron esterilizados en filtros de 0,22µm (Sartorius).

### 1.5.4. Soluciones para Microscopía Láser con Focal:

- **Tampón de fijación de Inmunofluorescencia:** Formaldehido al 2% PBS (0.2grm de paraformaldehido en 10ml de PBS, →calentar a 50°C hasta que se disuelva y vortear)
- **Tampón de Permeabilización:** 0.1% Triton X-100 en PBS.
- **Tampón de lavado:** Tris-HCl 0.1M pH: 7.4.
- **Tampón de Bloqueo:** 1% Albúmina de Suero Bovino (Sigma) en PBS.
- **Colorante de Contraste:** Azul de Evans 0.01% en Tampón de bloqueo.
- Los tampones de lavado, bloqueo y de contraste fueron esterilizados en filtros de 0,22µm (Sartorius).

## 1.6. Bases de Datos y herramientas Bioinformáticas

### 1.6.1. NCBI, The National Center for Biotechnology Information:

Base de datos general creada por la librería nacional de Medicina del gobierno de Estados Unidos, en la que se incluyen numerosos recursos sobre biomedicina y biotecnología, tanto para búsquedas bibliográficas, como para el análisis de genes y proteínas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

### 1.6.2. TryTRYpDB, the kinetoplastid genome resource:

Base de datos que integra genómica y genómica funcional de patógenos de la familia *Trypanosomatidae*. Esta base de datos es una colaboración entre EuPathDB, GeneDB y el Seattle Biomedical Research Institute (SBRI). (<http://TriTrypDB.org>)

### 1.6.3. Servidor de herramientas proteómicas ExPASy (Expert Protein Analysis System):

Servidor proteómico ExPASy del Instituto Suizo de Bioinformática en el cual se engloba software para al análisis de secuencias de aminoácidos y estructura de proteínas. (<http://www.expasy.ch/tools/>)

Dentro este servidor utilizamos los siguientes programas:

- **Scanprosite:** Este programa realiza una búsqueda de patrones o motivos estructurales en las bases de datos de proteínas de PROSITE y Uniprot.
- **SignalP:** Programa para predecir el péptido señal de una secuencia dada, así como los potenciales sitios de corte para dichos péptidos.
- **Tmpred:** Programa para predecir hélices transmembrana en una secuencia dada, así como la posible orientación en la membrana de una proteína.
- **ProtScale:** Analiza los parámetros físico-químicos de hidrofobicidad de una secuencia, así como otras características conformacionales.
- **Big-PI-Predictor:** Programa para predecir lugares de unión a GPI en una secuencia aminoacídica.

### 1.6.3. EMBOSS (“The European Molecular Biology Open Software Suite”):

EMBOSS es un paquete de software de todo tipo de herramientas para biología molecular. (<http://emboss.bioinformatics.nl/>)

Dentro de este paquete usamos los siguientes programas:

- **Transeq:** Programa para traducir secuencias de nucleótidos en aminoácidos en los diferentes marcos de lectura generados a partir de una secuencia dada
- **Antigenic:** Programa para predecir sitios potencialmente antigénicos de una secuencia peptídica usando el método de Kolaskar y Tongaonkar. Análisis experimentales revelan que los residuos de Cisteína, Leucina y Valina, si existen en la superficie de una proteína, pertenecen con alta probabilidad a lugares antigénicos de la proteína.

#### 1.6.4. MEME Suite (Multiple Em for Motif Elicitation):

- **MEME:** Programa que permite analizar una secuencia de DNA o de aminoácidos, para obtener motivos repetidos en dichas secuencias, así como una descripción gráfica de éste.

#### 1.6.5. gcua 2.0 ( graphical color usage analyser):

Mediante este programa se interpreta gráficamente la frecuencia de uso de codones para cada aminoácido dentro de una secuencia dada en comparación con las frecuencia media de uso de esos mismos codones en un organismo determinado

#### 1.6.6. CLUSTALW:

Con este programa se realizaron los alineamientos múltiples de secuencia, con el que estudiamos la divergencia y/o analogía de las secuencias objeto de estudio

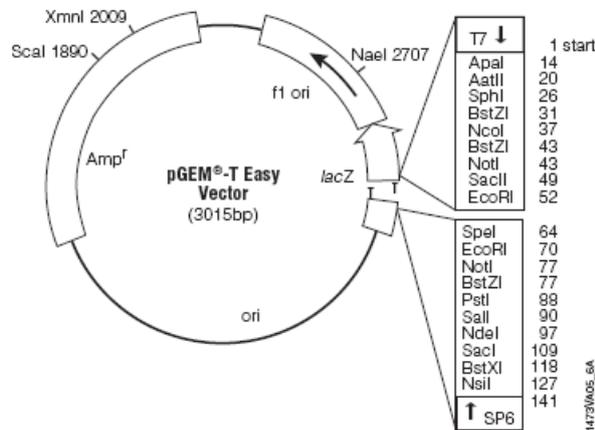
#### 1.6.7 Programas para la edición de secuencias:

- **GeneDoc:** Mediante este programa se editaron, ensamblaron y estudiaron todos los análisis "CLUSTAL" para la comparación múltiple de secuencias

-**DNAstrider**: Se utilizó este programa para realizar la traducción a aminoácidos de las secuencias nucleotídicas, así como para representar estas como codones para cada aminoácido.

## 1.7. Vectores

**1.6.1. PGEM<sup>®</sup>-T easy (Promega)**: Vector de clonación para productos de PCR. Este sistema incorpora Timidinas 3' adicionales en ambos extremos del vector, lo cual permite la ligación de productos de PCR generados por ciertas polimerasas termoestables, que añaden una desoxiadenosina en los extremos 3' de los fragmentos amplificados.



**Figura 1.1.** Mapa del vector PGEM<sup>®</sup>-T Easy, puntos de referencia de la secuencia y sitio de clonaje múltiple.

## 1.8. Oligonucleótidos

En la siguiente tabla se describen los cebadores empleados así como el objetivo de la amplificación llevada a cabo por dichos cebadores. Los nucleótidos subrayados y resaltados en **negrita** indican las dianas de las enzimas de restricción utilizadas para la clonación de los productos de PCR.

CEBADORES UTILIZADOS		
Nombre	Secuencia (5' → 3')	Objetivo
<b>MASP-N F</b>	ATGATGATGACTGGCCGTGT	Amplificación del extremo N-proximal- Región HV de la familia MASP
<b>MASP-N R</b>	AGCTGTTGCTTCTGCTGCTC	
<b>MASP-C F</b>	TGAAAAGCAGCAACACCAAC	Amplificación del extremo C-terminal- Región HV de la familia MASP
<b>MASP-C R</b>	CCACCACCGCAGTAGCAG	
<b>18S TC F</b>	CAAGCGGCTGGGTGGTTATTCCA	RTqPCR del gen ribosomal 18S
<b>18S TC R</b>	TTGAGGGAAGGCATGACACATGT	
<b>MASP 52 F</b>	<u>AAGGATCC</u> ATGGCGATGATGATGACTGGCCGTGTGC	Extremos 3'(F) y 5' (R) conservados para clonación de genes MASP
<b>MASP 2R</b>	<u>TAAAAAGCTT</u> CGCGGCCACCACCGCAGTAGCACACGC	
<b>MASP.220.F</b>	CCAGTTGCGAGATTGAAGGT	RTqPCR del gen MASP52
<b>MASP.220.R</b>	TGCAGATGCTTCAACTGCTG	
<b>T7</b>	TAATACGACTCACTATAGGG	Cebadores secuenciación del vector PGEM-T easy
<b>SP6</b>	TATTTAGGTGACACTATA	
<b>N-prox MASP F</b>	ATGGCGATGATGATGACTGG	Cebadores del extremo 3' MASP conservado
<b>N-prox MASP R</b>	AACCACACCAACAGCTCC	
<b>C-prox MASP F</b>	GGTCTCCCACACCACCTC	Cebadores del extremo 5' MASP conservado
<b>C-prox MASP R</b>	CCACCACCGCAGTAGCAG	
<b>C-term specific</b>	TCACGCGGCCACCACCGCAGCCGACGC	Cebador extremo 3' conservado para cDNA MASP

<b>P1</b>	GGCATCCCGAACAGTGATCC	Cebador RTPCR y PCR Dúplex RNA-RNA MASP2Ψ1CL
<b>P2</b>	CGAAGGAAACACCACTGA	Cebador PCR Dúplex RNA-RNA MASP2Ψ1CL
<b>P3</b>	GGCATCCCGAACAGTGATCC	Cebador PCR Dúplex RNA-RNA MASP2Ψ1CL
<b>P4</b>	ATGATGATGACTGGCCGTGT	Cebador PCR Dúplex RNA-RNA MASP2Ψ1CL

### 1.9. Péptidos Sintéticos

A continuación se describen tanto las secuencias de los distintos péptidos sintetizados, como las regiones donde se localizan dentro de las diferentes proteínas, como las aplicaciones de dichos péptidos para los diferentes ensayos.

PEPTIDOS SINTETICOS		
Nombre	Secuencia (Mer)	REGION y APLICACION
<b>AEE</b>	<b>AEEAAGKTTAAAEASAKAAEAA (22-Mer)</b>	Región Catal. MASP52 (IFI e ICQ)
<b>MAM</b>	<b>MAMMMTGRVLLVLCALCVLWSVAADG (25-Mer)</b>	Péptido señal MASP (IFI)
<b>c1</b>	<b>DGSTAVSHTTSPLLL (15-Mer)</b>	C-term MASP ( Mapeo epítomos B )
<b>c2</b>	<b>TAVSHTTSPLLLLLV (15-Mer)</b>	C-term MASP ( Mapeo epítomos B )
<b>c3</b>	<b>SHTTSPLLLLLVAC (15-Mer)</b>	C-term MASP ( Mapeo epítomos B )
<b>c4</b>	<b>TSPLLLLLLVACAAA (15-Mer)</b>	C-term MASP ( Mapeo epítomos B )
<b>c5</b>	<b>LLLLLVACAAAAAV (15-Mer)</b>	C-term MASP ( Mapeo epítomos B )
<b>c6</b>	<b>LLVVACAAAAVVAA (15-Mer)</b>	C-term MASP ( Mapeo epítomos B )
<b>c7</b>	<b>AVSHTTSPLLLLFFACAA (19-Mer)</b>	C-term MASP52 (Mapeo epítomos B)

## C.2. MÉTODOS

### 2.1 Cultivo y manejo de *T. cruzi*

Los medios de cultivo detallados a continuación, se prepararon en ambiente estéril (cámara de flujo laminar vertical, Glatt) por filtración a presión, mediante filtros estériles Sartorius (Sartolab 20) de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro.

#### 2.1.1. Cultivo “*in vitro*” de formas epimastigotas de *T. cruzi*

##### 2.1.1.1. Medio de cultivo bifásico

Este medio consiste en una fase sólida de medio NNN (Novy, Nicolle, Mc Neal) y una fase líquida formada por el medio MEM (Minimal Essential Medium), suplementado con un 20% de Suero Bovino Fetal (v/v) inactivado a 56 °C durante 30 min (SBFI), más una mezcla antibiótica y antimicótica. Los componentes del medio NNN (agar tripticasa, NaCl), a excepción de la sangre, se disuelven en agua bidestilada y se esterilizan en autoclave durante 20 min a 120 °C. La sangre de conejo se obtiene mediante punción de la vena marginal de la oreja, mediante un sistema “Vacutainer” con

EDTA disódico como anticoagulante e inactivada a 56 °C durante 30 min. Luego de esterilizado el medio se deja enfriar a 45 °C. Una vez alcanzada esta temperatura, se mezcla la sangre con los demás componentes del medio NNN, en una concentración del 10 % (v/v) y se reparte en tubos de ensayos de 15 ml de capacidad. Finalmente se deja enfriar y solidificar en forma de pico de flauta. El medio solidificado se incuba a 37 °C durante 48 horas para su respectivo control de esterilidad, además de permitir que afloren gotitas de líquido conteniendo derivados de la hemoglobina necesaria para el desarrollo del cultivo. Confirmada la ausencia de contaminación, se inocula en la superficie del medio parte de la suspensión de formas tripomastigotas sanguíneas obtenidas a partir de ratones infectados (apartado 2.1.5), y se adiciona igual volumen de medio MEM suplementado con SBF1 al 20% (v/v). Luego de 3 a 5 días de cultivo a 28 °C, las formas tripomastigotas se han diferenciado en formas epimastigotas, se procede a su resiembra cada 15 días en medios monofásicos para mantenimiento de la cepa y su cultivo en masa.

#### **2.1.1.2. Medio de cultivo monofásico**

Luego de los 7 días de cultivo en medios bifásicos, las formas epimastigotas en fase exponencial, son cultivadas en 10 ml de medio Líquido Tripanosoma (MTL) suplementado con un 10% v/v de SBF1 e incubado a 28 °C durante 10-15 días. El cultivo en masa de las formas epimastigotas de *T. cruzi* se realizó en el mismo medio incubándose a 27 °C en frascos Roux (Cellstar) de distintos volúmenes según los requerimientos de los diferentes experimentos.

Se realizaron resiembras periódica de  $1 \times 10^6$  / ml de epimastigotes a partir de los stocks de parásitos. Dichas resiembras se hicieron en el momento en que los cultivos alcanzaron la fase logarítmica tardía de crecimiento,  $1 \times 10^8$  flagelados/ml.

#### **2.1.1.3. Cultivo “*in vitro*” de formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi***

Para la obtención de la fase tripomastigote metacíclico, se siguió el procedimiento descrito previamente por Osuna *et al.*, 1979, mediante el cual,

se consigue una transformación de aproximadamente del 90% de la fase epimastigote a la fase trypomastigote metacíclica de *T. cruzi*. Las formas epimastigotas obtenidas en fase logarítmica de crecimiento, a partir de un medio bifásico o monofásico, fueron centrifugadas a 1000 x g durante 10 min y el botón resuspendido en medio Grace modificado, ajustando el número de flagelados a  $10 \times 10^6$  parásitos/ml. Los nuevos cultivos se incubaron en un volumen medio de 5 ml a 27 °C en posición horizontal, en frascos Roux (Cellstar) de 40ml de volumen. El máximo de transformación se obtuvo a los 9-12 días después del inicio del cultivo, determinándose la eficiencia de transformación mediante el recuento de los trypomastigotes metacíclicos en cámara hematocimétrica de Neubauer o tinción con solución de Giemsa al 10% (v/v) "in vivo" en un microscopio de contraste de fases. Para la realización de todos los experimentos posteriores, solo se utilizaron los cultivos con más de un 90% de transformación.

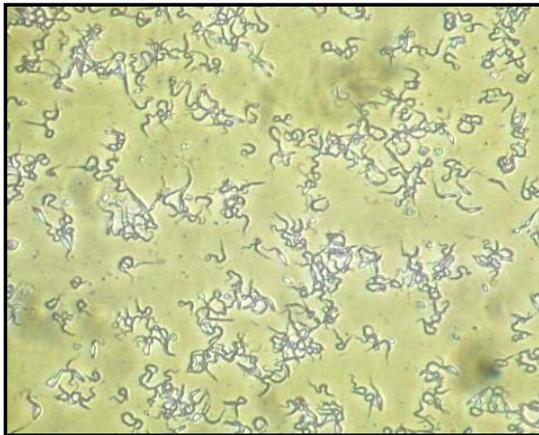


Figura 2.1.

cultivo con formas metacíclicas transformadas

Microfotografía de un

### 2.1.3. Criopreservación.

Se usó la criopresevación para el mantenimiento del material biológico (parásito o células eucariotas en cultivo. Para ello, cultivos en fase exponencial de crecimiento fueron centrifugados a 1000 x g durante 10 min. El botón obtenido fue resuspendido en 5 ml de Medio de congelación, alicuotándose 1ml de éste, en viales de congelación de polipropileno de 2 ml. A continuación se congelaron los parásitos de una manera progresiva a -80 °C en un tanque

contenedor de isopropílico (NALGENE® Cryo 1) durante 24h. Por último, el material biológico se almacenó en un tanque de nitrógeno líquido.

La descongelación del material criopreservado se realizó de una manera rápida mediante la incubación del vial de congelación en un baño a 37 °C siendo centrifugado a 1000 x g durante 5 min para retirar el medio de congelación, resuspendiéndose en el medio de cultivo habitual, iniciándose su crecimiento a 28 °C.

#### **2.1.4. Cultivo de células Vero**

Como medio de cultivo se utilizó el medio MEM suplementado con 10% de SBFI. El cultivo se inicia inoculando en frascos Roux (Cellstar) una suspensión de células Vero procedentes de un vial descongelado como se indicó anteriormente, e incubándose los cultivos a 37 °C en una atmósfera húmeda con el 5% de CO<sub>2</sub>.

Al cabo de unos días y cuando se ha formado la monocapa, se realizaron los subcultivos,—para lo cual se retira el medio de cultivo adicionándose, a la monocapa, una solución de EDTA-Tripsina. Tras un primer lavado con esta solución, y a fin de retirar los restos de medio, se efectúa un segundo lavado, dejándose únicamente una película de la misma que cubra las células. Los frascos fueron incubados en la estufa de cultivo, hasta que la monocapa se despegó. Una vez desprendida la monocapa, las células se lavan nuevamente con Medio de cultivo con suero a fin de neutralizar la acción tanto del EDTA como de la Trypsina, y el medio de cultivo con la suspensión celular se centrifuga a 600 x g durante 10 min. Las células se alicuotaron a razón de 10<sup>4</sup> células/ml y se distribuye en nuevos frascos con medio a fin de continuar el cultivo.

#### **2.1.5. Infección de células sincronizadas**

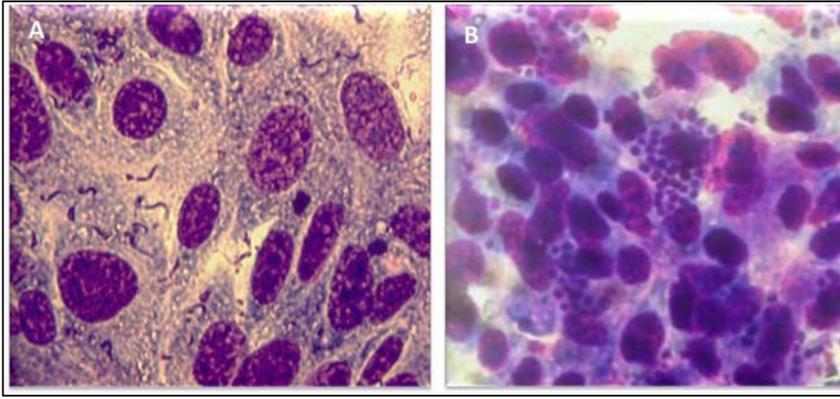
Cultivos de Células Vero con crecimiento semiconfluyente fueron sincronizados en su ciclo celular mediante tratamiento con Timidina 25mM durante 9 h según el método descrito por Osuna *et al.*, 1984 . a fin de hacer mas efectiva y sincrónica tanto la infección como la evolución de los parásitos.

Una vez transcurrido ese tiempo, las células se lavaron 3 veces en PBS y se infectaron con una suspensión de formas trypomastigotas metacíclicas, en medio de cultivo sin suero, utilizando una relación 5:1 parásito-célula.

Los parásitos y las células se incubaron en Medio MEM sin SBFI, a 37 °C en una atmósfera de 4.5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h para obtener el Medio de la Interacción (MI) parásito-célula. Para el resto de los experimentos, los cultivos celulares que estaban siendo infectados, se les retiró el medio a las 8 horas del inicio de la infección, se lavaron tres veces en PBS a 4 °C, tras lo que se añadió Medio MEM enriquecido con el 10% de SBFI atemperado a 37 °C.

En los experimentos que era necesario enriquecer el número de células infectadas sobre las no infectadas y consiguientemente, el número relativo de amastigotes se siguió la metodología descrita previamente (Osuna *et al.*, 1994). Para ello, los cultivos infectados se lavaron 5 veces con solución de Hank's, tratándose a continuación, con una solución de 3.8 µg/ml de Toxina diftérica (Sigma) diluida en medio MEM suplementado con SBFI durante 2 h. Pasado ese tiempo, se evaluó por microscopía la relación células parasitadas / no parasitadas, empleándose dichos cultivos para el aislamiento de sus proteínas o de los RNA totales. La relación células parasitadas/no parasitadas tras el tratamiento fué de un 90%, conteniendo un alto número de amastigotes en su interior.

Las formas tripomastigotes sanguíneas derivadas de cultivo celular, se obtuvieron recogiendo los sobrenadantes de células infectadas, de las cuales se estaban liberando las formas provenientes de la transformación de las formas amastigotas. Este proceso se llevo a cabo entre los 6 a 10 días postinfección.



**Figura 2.2.** Cultivos celulares infectados por las formas Trypomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*, 2 h (A) y 72 h (B) postinfección .

## 2.2 Cultivo y manejo de *E.coli*

### 2.2.1. Cultivo de *E.coli*

Los cultivos bacterianos se hicieron en medio LB líquido en agitación a 30 °C o 37 °C, según los requerimientos, en medio suplementado con los antibióticos de selección correspondientes. Igualmente las bacterias se cultivaron en placas Petri con medio LB Agar a 37 °C durante una noche con los antibióticos de selección correspondientes.

### 2.2.2. Preparación de bacterias *E.coli* competentes

Para la realización de este experimento, en primer lugar se incubó una resiembra de bacterias de la cepa JM109 en medio LB líquido a 30°C durante 12-14 h con agitación de 220 rpm. A continuación, se agregaron 4 ml del medio de cultivo conteniendo las JM109 a 100 ml de Medio TYM y se incubó durante 2-3h a 37 °C en agitación hasta alcanzar una densidad de bacterias por ml correspondiente a una Densidad Optica de 0.5 a 600nm. Una vez alcanzada dicha densidad, el medio líquido fue centrifugado a 3500 x g durante 5 min resuspendiéndose el botón de bacterias en 15-20 ml de medio TFB1, lo que se

incuba con hielo durante 15 min volviéndose nuevamente a centrifugar a 3500 x g a 4 °C durante 5 min. El botón fue diluido en 2 ml de medio TFB2 frío, enfriándose nuevamente en hielo durante 15 min y pasado ese tiempo, se distribuyen las bacterias competentes en alícuotas de 100 µl, congelándolas rápidamente a – 80 °C.

### **2.2.3. Criopreservación bacteriana**

Las bacterias seleccionadas, se sembraron en 3-5 ml de LB-Amp (medio LB mas ampicilina) cultivándolas a 37 °C en agitación durante toda la noche. A continuación, se hicieron alícuotas de 1 ml congelándolas en medio de cultivo LB con un 15% de Glicerol -80 °C hasta su posterior uso.

## **2.3 Técnicas de Biología Molecular y Manipulación de DNA y RNA**

### **2.3.1. Extracción de DNA genómico.**

Para purificar el DNA genómico (gDNA) de las distintas muestras de los parásitos, se utilizó el método del Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (Sambrook *et al.*, 1982). Para ello, partimos de un número de  $3.5 \times 10^8$  parásitos aproximadamente. Una vez lavados, se centrifuga a 1000 x g durante 10 min en PBS, se añadieron 400 µl de Tampón de Lisis al botón de los parásitos junto con 2.5 µl de Proteinasa K (100 µg/ml) y al objeto de homogenizar la muestra y disolver la proteinasa K el tubo fue invertido repetidas veces hasta eliminar los grumos. A continuación, las muestras fueron incubadas a 55 °C durante 2 horas, agregándose posteriormente 50 µl de RNasa A (100 µg/ml) que fue incubada durante 45 min a 37 °C. Una vez digerido el RNA y las proteínas de la muestra, se añadió una solución de fenol: cloroformo: isoamílico (FLUKA, biochemika) en proporción 1:1 (v/v) agitándose la muestra vigorosamente hasta tomar un aspecto lechoso, centrifugándose a 14500 x g durante 10 min. Una vez centrifugada y formadas las dos fases, se retiró la fase acuosa superior (donde se encuentra el DNA), añadiendo al volumen retirado, en relación 1/10 una solución de Acetato

Sódico 3M (40  $\mu$ l) y dos volúmenes de etanol absoluto (800 $\mu$ l). La mezcla se incubó un mínimo de 15 min en hielo (pudiéndose incubar a 4 °C durante toda la noche) para que el DNA precipite. Posteriormente, se centrifuga a 14500 x g durante 10 min y el botón se lava de nuevo con etanol al 70% centrifugándose nuevamente a 14500 x g 10 min.

Por último, los restos de etanol son evaporados, resuspendiendo el botón de DNA en 30  $\mu$ l de Agua MilliQ. La concentración y pureza del DNA obtenido se midió espectrofotométricamente mediante la relación de las mediadas de absorbancia a 280/260 y 230/260 utilizando el equipo Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific).

### **2.3.2. PCR (Polimerase Chain Reaction)**

Para llevar a cabo dicha reacción de amplificación como DNA molde (genómico o plasmídico), utilizamos concentraciones comprendidas entre 25 y 100 ng de DNA, 10 pmol de cada cebador, 2.0 mM de MgCl<sub>2</sub> (Dominion), 20 mM para cada uno de los dNTPs (Dominion), 2  $\mu$ l (para 20  $\mu$ l totales) de Buffer 10X (25 mM Tris-HCl pH: 9, 50mM KCl) para PCR (Dominion) y 1 U del enzima Taq Polimerasa (Dominion).

Las temperaturas de hibridación, así como la de extensión se ajustó en función de los cebadores utilizados y del producto a amplificar. La reacción de PCR se realizó en un equipo Termociclador C-1000<sup>®</sup> unido al módulo CFX96<sup>®</sup> para Real time de Bio-Rad.

### **2.3.3. Electroforesis de DNA en geles de Agarosa**

Mediante esta técnica se analizó la migración diferencial de moléculas de DNA en función del tamaño, al ser sometidas a un campo eléctrico a través de una matriz de agarosa. Las concentraciones de agarosa del gel variaron entre el 1-2 % según el tamaño de los fragmentos a amplificar. Para preparar la agarosa, así como para realizar la migración electroforética, se utilizó Tampón TAE 1X y 5  $\mu$ l de SYBR Green (10000X) (Invitrogen) por cada 50 ml de gel. Como marcadores de peso molecular se utilizó el HyperLadder I<sup>®</sup> de tamaños

comprendidos entre los 200 y 10000 pb (Bioline), y el DNA ladder de 50 a 1000 pb (MBL-Dominion) y el Kb Ladder de 250 hasta 12000 pb (Stratagene). Las muestras se corrieron a voltaje constante de 150 V durante 30 min en un sistema electroforético MAXI-VG (VWR) acoplado a una fuente de alimentación Power Pac<sup>®</sup>HV (Bio-Rad). El resultado se visualizó mediante un equipo transiluminador y fotodocumentador Benchtop 2UV<sup>®</sup> Transilluminator (UVP).

#### **2.3.4. Purificación de DNA a partir de productos de PCR y de geles de Agarosa**

Para la extracción de los productos amplificados de DNA se empleó la electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión (USBiological), como preparativo para la extracción de los productos amplificados a partir de una mezcla compleja de moléculas de DNA. Una vez realizada la electroforesis, recortamos las bandas de interés y extrajimos el DNA contenido en ella mediante calentamiento a 50 °C en el Tampón de solubilización del Kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen, Hilden, Germany) y posteriormente mediante purificación en columnas con membranas de sílica del mismo Kit.

En el caso de aquellas PCRs cuyo producto de amplificación fuera una única banda, se purificaron los amplicones generados utilizando el Kit Qiaquick PCR Purification (Qiagen, Hilden, Germany).

Una vez extraído el DNA, se midió su pureza mediante espectrofotometría y concentración como ya describimos anteriormente.

#### **2.3.5. Aislamiento de DNA plasmídico**

Para aislar el DNA plasmídico contenido en las bacterias transformadas, partimos de 3 ml de cultivo de bacterias, previamente sembradas en medio LB-Amp como antibiótico de resistencia e incubadas durante toda la noche a 30 °C en agitación de 220 rpm. Una vez crecidas las bacterias, estas se concentraron centrifugando las mismas a 14500 x g durante 30 seg, siguiéndose las

instrucciones proporcionadas en el kit Pure Yield<sup>®</sup> Plasmid Miniprep System (Promega) para el aislamiento plasmídico.

Una vez extraído el DNA, se midió su pureza y concentración como describimos anteriormente.

### 2.3.6. Secuenciación de DNA

La secuenciación del DNA se realizó en el Servicio de información genética (ING) del Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada así como en el servicio de secuenciación de ácidos nucleicos del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” (CSIC).

Para llevar a cabo la secuenciación se utilizaron entre 400-800 ng de molde en el caso de DNA plasmídico y entre 70-100 ng en el caso de productos de PCR. La concentración de cada cebador utilizado fue de 6.5 µg, utilizándose los dNTPs marcados con fluorescencia BigDye<sup>®</sup>, del kit BigDye<sup>®</sup> Terminator v 1.1 cyclesequencing (Applied Biosystems, CA, USA). Los equipos de secuenciación utilizados fueron el ABI 373 XL Stretch DNA sequencer (Applied Biosystems) y el termociclador PE 9600 de Perkin Elmer.

### 2.3.7. Aislamiento de RNA y RTPCR

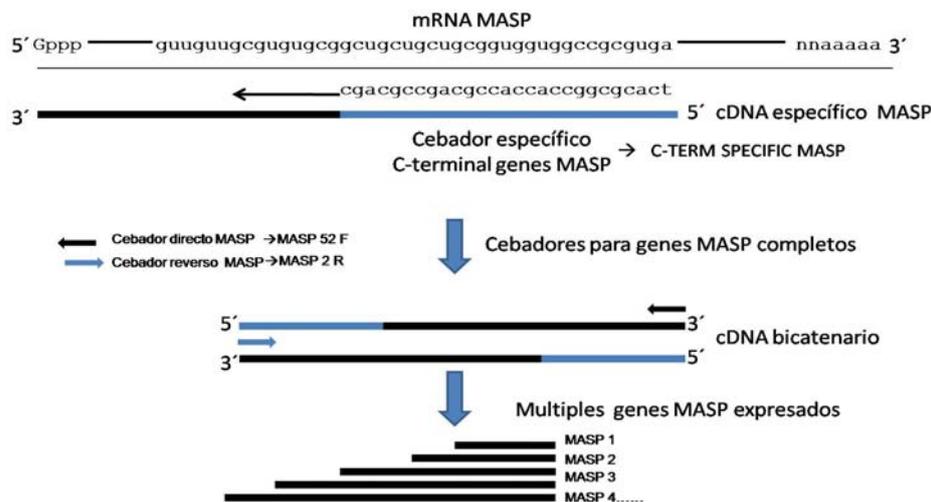
El aislamiento del RNA total de las cuatro diferentes fases del ciclo de vida de *T. cruzi*, se llevó a cabo tras el lavado por centrifugación de los parásitos en PBS, utilizando para ello un mínimo de  $1 \times 10^7$  células de cada fase del parásito. En el caso de los experimentos donde se llevó a cabo el aislamiento del RNA de células infectadas (24, 48, 72 y 96 h postinfección), los frascos de cultivo o las placas fueron lavadas 3 veces con PBS, desprendiendo la monocapa del cultivo mediante un “rubber policeman” (SPL Life Sciences), previo al lisado celular.

Para la extracción del RNA total utilizamos el Kit RNeasy Mini (Qiagen, Hilden, Germany). Una vez aislado el RNA, descartamos la posible contaminación con gDNA mediante el tratamiento con la enzima DNasa suministrada en el kit RNase-Free DNase Set (Qiagen, Hilden, Germany). La

concentración y pureza del RNA fue medida con la relación 260nm /280nm (considerando de calidad óptima valores de aproximadamente 2.1) mediante el equipo Nanodrop® ND-1000 (Thermo Scientific).

La retrotranscripción del RNA, se realizó a partir de 1 µg de RNA purificado de los parásitos utilizando el iScript Select cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Inc). Para la cuantificación de los niveles de expresión de los transcritos obtenidos mediante “PCR-RealTime” se utilizaron cebadores del tipo “Random Primers”, o “cebadores al azar” hexámeros de nucleótidos, que se unirán de forma aleatoria dentro de la población de RNA de la muestra.

Para el caso de la clonación de los diferentes genes MASP, se utilizaron cebadores específicos para el extremo 3' conservado de los genes MASP (C-TERM SPECIFIC MASP) (Figura 3.3). Una vez obtenido, el cDNA específico de los diferentes genes MASP, este se amplificó utilizando los primers diseñados para las secuencias de los extremos 5' y 3' conservados (N-MASP F y C-MASP



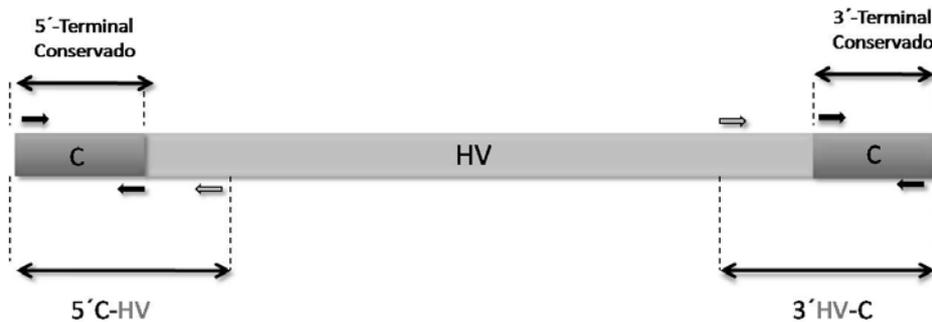
R). (Figura 3.3).

**Figura 3.3.** Estrategia de amplificación usando cebadores específicos para las regiones conservadas 3' y 5' de los genes MASP.

### 2.3.8. Amplificación y cuantificación mediante RTqPCR

Las regiones conservadas de la familia MASP se amplificaron mediante cebadores específicos para los extremos 5' y 3' conservados (Figura 3.4). Para el extremo 5' se utilizaron los cebadores N-Prox MASP F y N-Prox MASP R y para el extremo 3' los cebadores C-Prox MASP F y C-Prox MASP R.

La hipervariabilidad de las secuencias se analizó a partir de la secuencia del gen que codifica para la Masp52 (número de acceso para GenBank: XM814922) de la siguiente manera. Para el extremo 5' utilizamos un cebador de la cadena directa en la zona 5' conservada (MASP-N F), situando el cebador de la cadena reversa en la zona hipervariable de la secuencia (MASP-N R) (Figura 3.4). Para el extremo 3' utilizamos un cebador en la cadena reversa 3' conservada (MASP-C R), situando el cebador de la cadena directa en la zona hipervariable de la secuencia (MASP-C R) (Figura 3.4).



**Figura 3.4.** Estrategia para la amplificación de las regiones 5' y 3' conservadas así como para el estudio de las regiones hipervariables de secuencias específicas MASP. HV, hipervariable., C, Conservado.

Tanto la cuantificación de la expresión de la familia MASP, en los 4 estadios de *T. cruzi*, como específicamente del producto transcrito de la MASP52, se evaluó mediante una RTqPCR empleando los reactivos del Kit Sensimix dT (Quantace). La muestra de RNA de partida con el que realizamos estos ensayos se ajustó en todos los casos a 1 µg. En el caso de la cuantificación para la expresión de la familia MASP utilizamos los Cebadores N-Prox MASP F y N-Prox MASP R que dan lugar a un amplicón de 90 pb para el extremo 5' conservado de la familia MASP como se detalla en la sección de Resultados y para el caso de la Masp52 los primers MASP.220F y MASP.220R que dan un amplicón de 198 pb de la zona hipervariable del gen que codifica para la MASP52 (véase Resultados). Para normalizar la cantidad de cDNA se usaron los primers V1 y V2 que dan lugar a un amplicón de 179 pb del gen que codifica el 18S rRNA ribosomal de *T. cruzi* con número de acceso para GenBank X53917 (Clark *et al.*, 1994). Los amplicones obtenidos fueron

confirmados mediante la observación de las bandas en geles de agarosa y se reconfirmaron mediante secuenciación como se describió anteriormente. La cuantificación relativa de las muestras se realizó, según el método de  $\Delta C_T$ , en donde la relación referencia/ prueba =  $2^{C_T \text{ referencia} - C_T \text{ prueba}}$ , donde la referencia es el gen 18S y la prueba el extremo 5' terminal MASP o la zona hipervariable de la MASP52. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

### **2.3.9. Detección y RTPCR de los “dúplex” RNA-RNA de la fase tripomastigote metacíclico**

El aislamiento del RNA de la fase tripomastigote metacíclico se realizó de la misma manera que fue descrita en el apartado 2.3.7. Una vez aislado este RNA separamos éste en dos fracciones, la primera que tratamos con RNasa A (Promega, Madison, WI) y el kit RNase-Free DNase Set (Qiagen, Hilden, Germany) y la segunda que tratamos únicamente con el RNase-Free DNase Set ambas durante 10 minutos a temperatura ambiente. Una vez realizado el tratamiento, el RNA de las dos fracciones se volvió a purificar utilizando el Kit RNeasy Mini (Qiagen, Hilden, Germany). Una vez se midió la concentración y pureza del RNA, se realizó una RTPCR con el cebador denominado como P1 utilizando el iScript Select cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Inc). Por último se analizó la existencia de dúplex RNA-RNA realizando una reacción de PCR mediante la combinación de las parejas de cebadores P1+P2, P1+P3 y P1+P4 (véase resultados).

## **2.4 Técnicas de Clonación**

### **2.4.1. Reacción de ligación**

Para realizar la ligación de los distintos amplicones MASP al vector de clonación pGEM-T Easy, (Promega) se utilizó el enzima T4 DNA ligasa

(Promega, Madison, WI), que cataliza la ligación de dos hebras de DNA entre los grupos 5'- Fosfato y 3'-hidroxilo de nucleótidos adyacentes. Se utilizó una relación molar de aproximadamente 1:3 (vector-inserto) añadiendo 3 unidades de enzima a la mezcla de reacción en un volumen total de 10  $\mu$ l. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 3 horas o a 4 °C toda la noche. La ligación resultante se utilizó para transformar las bacterias competentes.

#### **2.4.2. Transformación bacteriana**

Se transformó una alícuota de 100  $\mu$ l de células competentes con 10  $\mu$ l del ligado, mezclando células y ligando en agitación ligera. Posteriormente se incubó durante 30 min en hielo y a continuación en baño maría durante 42 °C 90 seg (sin agitar), volviendo a incubarse en hielo durante 2 min para realizar el choque térmico. A continuación, se añadió 800  $\mu$ l de Medio SOC líquido a las células transformantes y se incubó a 37 °C en agitación (225 rpm) durante 45 min. Por último, se sembraron 100  $\mu$ l de las bacterias transformadas sobre placas LB Agar a las que se añadió Ampicilina como antibiótico de selección, IPTG como inductor del gen de la  $\beta$ -Galactosidasa y X-Gal como azúcar a degradar por el anterior gen. Se incubaron las placas a 37 °C toda la noche, siendo las bacterias transformadas, las que crecen en dicha placa formando colonias blancas, que podrán seleccionarse sobre el fondo de colonias azules sin transformarse con el vector mas el inserto.

#### **2.4.5. Rastreo de clones transformantes**

Para el rastreo se hicieron resiembras de las colonias positivas en placas LB Agar tratadas con Ampicilina que se incubaron a 37 °C durante una noche. Al día siguiente, se picaron las colonias sobre la placa suspendiéndolas en 30  $\mu$ l de Agua MilliQ esteril e incubándolas durante 2 min a 92 °C para lisarlas. Fueron centrifugadas a 14500 x g durante 5 min, utilizándose 1  $\mu$ l del sobrenadante obtenido para realizar la PCR utilizando los cebadores de los insertos clonados y confirmar la existencia de clones bacterianos transformados con los plásmidos de interés.

## 2.5 Técnicas para el Estudio de Proteínas

### 2.5.1. Obtención de proteínas totales

Los extractos de proteínas totales de los parásitos se obtuvieron de un total de  $5 \times 10^7$  organismos de cada una de las fases del parásito. Los parásitos de los cuales se iban a obtener las proteínas se lavaron 3 veces con PBS por centrifugación a  $1000 \times g$  durante 10 min. Posteriormente, se resuspendió el botón en 2 ml de Tampón de lisis y se incubó durante 10 min en hielo. Por último, el lisado se sonicó mediante tres ciclos de 30 seg de sonicación a intervalos de 30 seg. La concentración de los homogenados se determinó mediante el método de Bradford (1976) a fin de ajustar las muestras a la misma concentración en los geles de electroforesis. Una vez ajustada la concentración, las muestras fueron disueltas 1:1 (v/v) en Tampón de la muestra y calentadas a  $98^\circ\text{C}$  durante 5 min.

### 2.5.2. Obtención de las membranas de células Vero

La fracción de membrana de células Vero se obtuvo a partir de un número de  $5 \times 10^6$  células. Las células se despegaron de la superficie del frasco de cultivo incubándose durante 10 min en Tampón EDTA-Trips, centrifugándose a  $300 \times g$  durante 10 min. Posteriormente, las células se trataron mediante un choque hiposmótico en un mililitro de tampón Hipotónico completándose la ruptura celular en un disruptor de cuchillas durante 30 seg a  $0^\circ\text{C}$ , evaluándose la ruptura celular mediante observación microscópica. La muestra se centrifugó a  $10000 \times g$  durante 10 min a  $4^\circ\text{C}$  y el botón resultante se lavó 3 veces a la misma velocidad en tampón PBS. Las membranas se purificaron mediante centrifugación en una solución de sacarosa 0.5 M a  $10000 \times g$  durante 10 min a  $4^\circ\text{C}$ , recogándose las membranas de la interfase formada entre el tampón y la sacarosa. Una vez recogidas fueron lavadas 3 veces a fin de eliminar la sacarosa, por centrifugación a  $10000 \times g$  durante 10 min a  $4^\circ\text{C}$  en PBS. Por último, las membranas se resuspendieron en medio de

cultivo MEM sin suero, de cara a realizar la interacción parásito-membranas, como se describe posteriormente.

### **2.5.3. Obtención de las fracciones Hidrofóbica, Hidrofílica y GPI de la membrana de *T. cruzi***

Para obtener las distintas fracciones de membrana de los trypomastigotes metacíclicos seguimos la metodología previamente descrita por Anez Rojas *et al.*, 2006, para obtener las fracciones hidrofílica (HP), hidrofóbica (hp) y GPI de las membranas del parásito. Para ello se partió de 15 ml de cultivo en fase exponencial con un número de  $5 \times 10^7$  flagelados /ml, el cual se lavó tres veces en PBS añadiendo al botón obtenido 500  $\mu$ l de Tampón A incubándolo durante 1 h en hielo (0 °C). A continuación se centrifugó a 8800 x g durante 10 min a 4°C, resuspendiéndose el botón en 3 volúmenes de Tampón B y centrifugándolo a continuación a 8000 x g durante 10 min a 4 °C. Tras la centrifugación, el sobrenadante obtenido se incubó a -20 °C durante 24 h, descongelándose posteriormente a temperatura ambiente. Una vez descongelado, se incubó 12 min a 32 °C, centrifugándose posteriormente a 3000 x g durante 3 min, donde se obtuvieron 2 fases, la fase acuosa (sobrenadante) corresponde a las proteínas Hidrofílicas (HP) de membrana que fue almacenada a -20 °C y la fase detergente (botón), la cual se resuspendió en 3 volúmenes de Tampón B incubándose de nuevo durante 10 min en hielo y luego a 32 °C durante 12 min. La muestra así incubada, se centrifugó a 3000 x g durante 3 min, recogiendo una fase acuosa (sobrenadante: Restos de HP) y una fase detergente (botón) que se resuspendió nuevamente en 3 volúmenes de Tampón B incubándose en hielo durante 10 min. La muestra fue nuevamente centrifugada a 18000 x g durante 10 min a 4 °C, obteniéndose un botón correspondiente con la fracción de proteínas hidrofóbicas (hp) y una fase detergente (sobrenadante) al que añadimos una vez más, 3 volúmenes de Tampón B, procesándose como antes, mediante la incubación durante 10 min en hielo y luego a 32 °C durante 12 min. Por último, se centrifugó la muestra a 3000 x g durante 3 min, correspondiendo la fase detergente a las proteínas unidas a GPI.

#### **2.5.4. Obtención del Medio de Interacción (M.I) parásito-célula**

Para la obtención de medio, cultivos semi confluentes de células Vero o la fracción de membrana celular de éstas, fueron puestas en contacto con las formas tripomastigote metacíclicas como se describió previamente. Tras un periodo de interacción de 24 h, se recogió el MI y se centrifugó a 1000g durante 10 min a 4 °C, el sobrenadante fué filtrado a través de filtros de 0.22 µm de tamaño de poro (Sartorius) con el fin de eliminar todas las formas de parásito libre que pudieran haber sido resuspendidas. Cada 25 ml de medio M.I extraído se añadió una dosis del cocktail anti-proteasas ya descrito anteriormente (Roche Molecular Biochemicals).

#### **2.5.5. Cuantificación de proteínas**

La cantidad de proteínas de las muestras, se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Para ello, se mezcló 1 ml de reactivo de Bradford (Sigma) con 1 ml de muestra diluida en PBS, incubándose la mezcla durante 15 min a temperatura ambiente. La cantidad de proteína presente en la muestra problema, se determinó espectrofotométricamente mediante la extrapolación de los valores de densidad óptica (D.O) a 660 nm de la muestra problema, con los valores de D.O de una recta patrón obtenida mediante las absorbancias de una serie de concentraciones conocidas de albúmina (0 -100 µg). Las medidas se realizaron en un Espectrofotómetro MILTON ROY - Spectronic 3000.

#### **2.5.6. Preparacion de la muestra de proteínas para electroforesis**

Las muestras proteicas se diluyeron a 1:1 con tampón de la muestra según el método de Laemli, 1970. La muestra así diluida, fue calentada 5 minutos a 94 °C a fin de romper la estructura cuaternaria de las proteína, romper los enlaces disulfuro con el β mercaptoetanol y homogenizar y negativizar la carga al tratar las proteínas con el SDS. En aquellos casos en que las proteínas de la muestra se quisieron concentrar, éstas se precipitaron

previamente con 5 volúmenes de acetona fría a -20 °C durante 12h, obteniendo un “pellet” de proteína tras centrifugarlo a 10000 x g durante 10 min.

### 2.5.7. Electroforesis SDS- PAGE

Esta técnica electroforética separa a las moléculas en base a su peso molecular a través de un gel discontinuo de poliacrilamida, bajo condiciones desnaturalizantes según el método descrito previamente por Laemmli, 1970. El gel apropiado para separar las proteínas con un peso molecular comprendido entre 10,000 y 100,000 kDa es el gel 12% (w/v) de acrilamida, bis-acrilamida de (30:0.8). En nuestro caso se emplearon geles comerciales para el caso del sistema Phastsystem (GE healthcare) (formato Phast Gel<sup>®</sup>), o preparados en el laboratorio, en el caso de usar el sistema Mini-protean<sup>®</sup> 3 Cell (BioRad). En el caso de los geles preparados en laboratorio, estos se prepararon con la composición que se describe en la Tabla 2.1, se dejaron polimerizar durante un mínimo de 60 min y un máximo de 12 h.

**Tabla 2.1.** Volúmenes (ml) de las soluciones necesarias para hacer un gel en el sistema discontinuo de Laemmli.

Soluciones	Cantidades para gel separador (12.5%)	Cantidades para gel almacenador (3%)
Agua	3.35	6.1
Soluc. A	2.5	-
Acril./Bis.	4.0	1.35
Soluc. B	-	2.5
APS	0.05	0.05
TEMED	0.005	0.005

Las muestras ya preparadas fueron desarrolladas en la electroforesis a una intensidad constante de 20-25 mA para el sistema Miniprotean y de 10.0 mA para el sistema Phastsystem. Como marcador se usó la mezcla de proteínas con diferentes pesos moleculares LMW (Low Molecular Weight,) (GE healthcare) también preparadas en tampón de la muestra.

### 2.5.8. Tinción con Nitrato de Plata

Este es un método que ha sido introducido para la visualización y la detección de las proteínas en los geles tipo Phast Gel<sup>®</sup>, IEF y gradientes; es una técnica muy recomendada por su alta reproductividad, sensibilidad a las concentraciones de proteínas del orden de 1 a 5ng en nativa-PAGE, y IEF y de 0.3 a 0.5ng en el caso de las electroforesis SDS-PAGE. El método es aproximadamente 20 a 60 veces más sensible que la tinción con Azul Comassie.

Básicamente el método de tinción consta de una fijación, lavado y reducción de nitrato (Ag) en los grupos reductores de la proteína, revelado como si de una película impresionada se tratara y su fijación “fotografica”. El desarrollo de la tinción se detalla a continuación la Tabla 2.1 (ver también materiales)

**Tabla 2.2.** Relación de soluciones utilizadas en la tinción con Nitrato de Plata, así como la Temperatura y tiempo de desarrollo de la tinción durante cada uno de los pasos.

	<i>Soluciones</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Temperatura (°C)</i>
<b>Fijar</b>	Etanol 50%, Ac, acético 10%	2 min	50
	Glutaraldehído 8.3%	6 min	50
<b>Activar</b>	Agua desionizada (lavado)	2min	50
	Agua desionizada (lavado)	2 min	50
<b>Teñir</b>	Nitrato de plata al 0.25%	13 min	40
	Agua desionizada (lavado)	30 seg	30
	Agua desionizada (lavado)	30 seg	30
	Solución de desarrollo	4 min	30

<b>Desarrollar</b>	Solución de desarrollo	4 min	30
<b>Parar el desarrollo</b>	Acido acético 5%	3 min	
	Acético 10%, glicerol 5%	3 min	30
<b>Preservar</b>			50

### 2.5.9. Secuenciación de Aminoácidos

La secuenciación de aminoácidos se llevó a cabo en el Servicio de Proteómica del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa de Madrid. La banda de interés se recortó de forma manual minimizando la cantidad de gel y se digirió “in-situ” de modo automático (empleando un robot-digestor Bruker) mediante tripsina como se describió previamente (Shevchenko *et al.*, 1996). El sobrenadante de la digestión (que contiene los péptidos) se acidificó con TFA al 0.1% secándose en un Speedvac para resuspenderlo en 5 ml de Tampón TA. Una pequeña alícuota (0.5 ml) se depositó en una placa “Anchor-chip” (Bruker) empleando DHB (ácido 2,5-Dihydroxybenzoico) como matriz a una concentración de 5 g/l mediante el método “fast evaporation”. La placa fue medida en un espectrómetro de masas de tipo MALDI-TOF (matriz-assisted laser desorption ionisation/time-of-flight), modelo autoflex (Bruker) equipado con reflector. Los espectros de masas obtenidos se utilizaron como “huella peptídica” para la identificación de proteínas en las bases de datos utilizando los motores de búsqueda accesibles en la red (Mascot, Profound).

### 2.5.10. Síntesis de péptidos sintéticos

La síntesis de los péptidos AEE (centro catalítico de la MASP52) y MAM (Región N-terminal MASP) fue llevada a cabo por el servicio de proteómica del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO) y por el Centro Nacional de Biotecnología de Madrid (CNB). La librería de péptidos solapantes del extremo C-terminal MASP se encargó a la empresa Genscript (USA, Inc).

### 2.5.12. Cromatografía de Afinidad

En este tipo de cromatografía un “ligando de afinidad” específico se une por un sitio o varios sitios de unión a una molécula diana acoplada a una matriz cromatográfica inerte. En determinadas condiciones, la matriz de afinidad unirá moléculas de acuerdo a su especificidad. Después de la etapa de interacción y una etapa de lavado, las moléculas adsorbidas son liberadas y eluidas mediante un cambio en las condiciones del medio o añadiendo un exceso de moléculas competidoras que desplacen a la molécula diana del ligando de afinidad.

En el caso que nos ocupa, como molécula ligadora, se utilizó la lectina de germen de trigo (*Triticum vulgare*) que tiene la capacidad de unirse específicamente a residuos de *N*-acetil glucosamina (Amersham Pharmacia, affinity chromatography, Principles and Methods. Ed AB). La lectina, es una proteína dimérica y libre de carbohidratos, que en nuestro caso, se unió covalentemente a partículas de Sepharosa 6 MB® (Pharmacia) que tienen un diámetro de 250-350µm (macrobeads). Los derivados de Sepharosa permiten una buena inmovilización de ligandos sin necesidad de síntesis química o equipo especial. La estructura de poro de la Sepharose hace el interior de la matriz disponible para la fijación del ligando y asegura un buen acoplamiento, aún para moléculas grandes, proporcionando excelentes propiedades de flujo y rápidas separaciones. La presencia de sus grupos hidroxilo en los residuos de azúcar permiten utilizarlo fácilmente en la fijación covalente del ligando

El azúcar *N*-acetilglucosamina forma parte del esqueleto azucarado de las glicoproteínas cuyos carbohidratos se une por enlaces O- glucosídicos a residuos de Thr o Ser o por N-glucosídicos a un residuo de Asn.

Para la purificación de la MASP52, en primer lugar se concentraron las proteínas contenidas en el M.I mediante filtros de exclusión molecular de 5 kDa (Amicon,®ultra, Millipore), cromatografiándose posteriormente utilizando una columna Mono P 5/200 GL (GE healthcare) capaz de separar las proteínas en función de su Punto isoeléctrico y eluyendo posteriormente mediante polybuffer 96 (GE) como fase líquida. La presión durante el desarrollo de la cromatografía fue de 4 MPa (40 bar, 580 psi) con un flujo de 0.5-1.5 ml/min recogiendo las fracciones comprendidas entre los pI de 5.2 a 4.6.

A continuación, dicha fracción se cromatografió a través de una columna de Wheat Germ Lectin-Agarosa WGL (Sigma), con el fin de purificar las proteínas *N*-glicosiladas. La columna previamente se lavó con Tampón de lavado (5-10 volúmenes de columna), inyectando nuestra muestra ajustada a una concentración aproximada de 2 mg/ml. Una vez estabilizada y lavada con 5 volúmenes de Tampón de lavado, las proteínas retenidas se eluyeron mediante 3 volúmenes de Tampón de elución.

Todas las cromatografías fueron realizadas y monitorizadas en un equipo AKTA® Purifier (GE). El resultado de la cromatografía fue evaluado mediante electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 12.5%. como se describe más adelante.

## **2.6 Técnicas Inmunológicas**

### **2.6.1. Acoplamiento de los péptidos antigénicos a proteínas**

Como proteína “carrier” se utilizó la Hemocianina de cangrejo (KLH), usándose la técnica descrita por Chan *et al.*, 2002, mediante Glutaraldehído como entrecruzador para la polimerización de los péptidos. Para ello se mezclaron 5 mg de péptido sintético con 5 mg de KLH (5 mg/ml) en PBS hasta un volumen final de 2ml. A continuación, se añadió 2 ml de GA 0.2% a los 2 ml anteriores completándose un total de 4 ml. La mezcla se agitó en un agitador magnético durante 1 hora en hielo, añadiéndose 200µl de glicina 1M a

los 4 ml anteriores a fin de bloquear los grupos aldehído libres, resultando una concentración final de 200 mM de Glicina, agitándose la muestra nuevamente durante 1 hora a 0 °C. Por último, se dializó mediante Membranas de tamaño de corte de 4,000 Da (Spectra Pore) en PBS, haciendo 4 cambios uno cada 12 horas, tras lo cual y se liofilizó en un equipo liofilizador LyoQuest (Telstar), evaluando el resultado de la polimerización mediante electroforesis SDS-PAGE.

### **2.6.1. Inmunización de ratones y obtención de suero policlonal**

Los péptidos sintéticos complejos preparados como se ha descrito en el apartado anterior fueron utilizados para inmunizar ratones Balb/c mediante inoculación intraperitoneal de 50 µg de péptido unido a la proteína “carrier” junto a adyuvante completo de Freund (Sigma) en la primera inoculación y con 25 µg más adyuvante incompleto de Freund para el resto de las inmunizaciones inoculaciones. El volumen total inoculado fue de 300 µl por ratón. La pauta de inmunización fue de una dosis cada 15 días, repitiéndose por un total de 5 inmunizaciones.

Tres semanas después de la primera inoculación, se evaluó el título de anticuerpos tras la obtención del suero por sangrado de los animales de la vena submandibular y empleando como método inmunológico la técnica de ELISA indirecta como se describe más adelante. Los niveles de anticuerpos se evaluaron semanalmente. A los 7 días de la última inyección, se sacrificaron los ratones desangrándolos por punción cardíaca y depositando la sangre así extraída en tubos (BD Microtainer® tubes). La sangre así obtenida, se incubó durante 30min a 37 °C tras lo que se mantuvo 3 h a 4 °C, a fin de favorecer la retracción del coágulo y obtener el máximo de suero. Recogido el suero, éste se centrifugó a 5000 x g durante 5 min, almacenándose a -20 °C, purificándose las IgG tanto del suero inmune como del suero de los ratones preinmunes, mediante cromatografía de afinidad empleando proteína A ligada a agarosa, mediante el sistema Protein A HP Spin Trap (GE healthcare). La proteína A es un polipéptido de 42000 Daltons constituyente habitual de la pared celular de *Staphylococcus aureus* que posee cuatro sitios potenciales de unión a los anticuerpos, aunque sólo se puede usar uno a la vez. En las

moléculas de anticuerpo la región de unión a la proteína A se encuentra en las regiones constantes segunda y tercera de la cadena pesada. Por ello, cualquier anticuerpo tiene al menos dos lugares de unión a la proteína A, lo que permite formar complejos multiméricos.

#### **2.1.5. Infección de Ratones Balb/c con *T. cruzi***

Con el objeto de obtener sueros de ratón procedentes de infecciones agudas y crónicas frente a *T. cruzi*, se infectaron un total de 6 ratones hembras cepa Balb/c de 4 semanas con  $1 \times 10^5$  formas de tripomastigotes metacíclicos resuspendidos en PBS e inyectados intraperitonealmente.

Trascurridos tres días de la infección, se procedió a evaluar la parasitemia diariamente mediante examen directo de la sangre de los ratones, obtenida mediante sangrado por sección de la vena de la cola y observada mediante examen directo diluyendo la sangre en PBS con citrato como anticoagulante. Cuando estos presentaron picos de parasitemia (13, 18 y 30 días postinfección) y con el fin de obtener sueros de infección en fase aguda, tres de los ratones fueron sacrificados extrayéndose la sangre por punción cardíaca. Los tres ratones restantes fueron sacrificados a los 5 meses postinfección (150 días), a fin de obtener sueros de ratón en la fase crónica de la enfermedad. Los sueros obtenidos como se ha descrito anteriormente, se les añadió glicerol en razón 1:1 (v/v), se alicuotaron y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### **2.6.2. Determinación del título de Anticuerpos en sueros de ratón, mapeo de epítomos B y evaluación serológica de sueros de pacientes infectados mediante ELISA indirecta o competitiva en presencia o no de agentes caotrópicos**

Para realizar el mapeo de epítomos B, se utilizó una batería de péptidos sintéticos solapantes frente a la región C-terminal de las MASP en el caso de la

ELISA de sueros de sujetos infectados con *T. cruzi* que se describen en la sección de resultados.

Los péptidos sintéticos MAM y AEE sin proteína “carrier” acoplada se usaron como antígenos en el caso de la titulación de anticuerpos de los sueros policlonales frente a éstos.

Para ello, se sensibilizaron placas de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos tipo Maxisorp (Nunc<sup>®</sup> (Denmark)), añadiendo 1 µg de los antígenos por pocillo en PBS. Una vez añadido, se incubaron las placas a 4°C durante toda una noche en cámara húmeda en agitación orbicular a fin de distribuir uniformemente la absorción por el pocillo. Una vez sensibilizados los pocillos, se lavaron 3 veces con tampón de lavado y se añadieron 250 µl de Tampón de bloqueo, incubando durante 1 hora a 37 °C. A continuación, se lavó al menos dos veces con PBS y se incubaron posteriormente con 100 µl de las diferentes diluciones de los anticuerpos primarios diluidos en PBS, durante 45 min a 37 °C, a una dilución 1:200 en el caso de los sueros para ELISA diagnóstico, o con diluciones seriadas desde 1:100 hasta 1:25400 en caso de la titulación de los sueros policlonales frente a los péptidos sintéticos. En el caso del ELISA competitivo se incubaron un pool de sueros positivos a una dilución 1/200 durante 30 min con los diferentes péptidos del mapeo de epítomos B a una concentración de 10 µg/ml y se añadieron 100 µl por pocillo de dicha mezcla también durante 45 min a 37 °C. Se lavaron las placas durante 3 veces con PBS y en el caso del ELISA diagnóstico y los mapeos de epítomos B, una vez incubado el anticuerpo primario se añadieron concentraciones sucesivas de 0.25, 0.5, 1 o 2M de KSCN como agente caotrópico durante 15 minutos a 37°C, para calcular el índice de afinidad de un pool de sueros +, que representa el 50% de la unión efectiva de anticuerpos sin dicho agente, como ya había sido descrito previamente por Pullen *et al.*, 1986. Una vez ajustado dicho índice a 0.92M, se realizó el mapeos de epítomos así como el ELISA diagnóstico a dicha concentración de agente caotrópico. Una vez incubado con dicho agente se lavaron las placas 4 veces con PBS y se diluyó a 1:1000 el anticuerpo secundario en 100 µl de PBS. Los anticuerpos secundarios usados fueron anti-Inmunoglobulinas IgG, IgM (Sigma), o anti-Inmunoglobulinas totales, anti ratón o anti humano marcados con peroxidasa (Dako). Los anticuerpos secundarios marcados, fueron incubados durante 30 min a 37 °C, tras lo que se lavaron las

placas 4 veces, añadiéndose a continuación, la solución sustrato de la peroxidada que se incubó en oscuridad durante 20 min a 37° C y parándose la reacción mediante 50 µl Solución de Parada. La lectura se realizó midiendo la absorbancia a 492 nm en un lector de ELISA Multiskan Spectrum (Thermo). Al objeto de calcular el valor de corte de la técnica, se usaron Sueros Control procedentes de personas procedentes de un área endémica de la enfermedad (Chile) y carentes de la enfermedad. A los valores de absorbancia obtenidos les fue hallada la media y el error estandar de la media, a fin de calcular este valor de corte mediante la formula:  $\bar{x} + (3 \times SEM)$ . Se consideró como título positivo, a todos los sueros con un valor de absorbancia superior a dicho valor de corte.

### 2.6.3. Western-blot

Esta técnica descrita y desarrollada por primera vez por Towbin *et al.*, (1979), basada en la Electrotransferencia a una membrana inerte donde se realiza la identificación de las proteínas. Esta es una técnica inmunoenzimática, lo que constituye una técnica mixta, con la capacidad analítica de la Electroforesis en gel y la sensibilidad del inmunoanálisis, permitiendo la detección de la capacidad antigénica de las proteínas inmovilizadas en un soporte tras la separación electroforética de las bandas de las fracciones antigénicas reconocidas por los anticuerpos presentes en los inmuniseros (Timmons *et al.*, 1990).

Eliminado: ¶

El proceso de la inmunotransferencia, comprende tres etapas diferenciadas:

- **Fraccionamiento de la muestra**, durante la cual pueden perderse parte de epítomos o determinantes antigénicos, por el uso del SDS, β-mercaptoetanol en el tampón de muestra, etc.
- **Transferencia de las fracciones antigénicas a la membrana**, por métodos de transferencia electroforética desde los geles de poliacrilamida. Las membranas usadas con más frecuencia, son las de nitrocelulosa, nylon o PVDF como es nuestro caso y cuya capacidad de electrotransferencia es de hasta 100 µg de proteína/cm<sup>2</sup>.

- **Inmunodetección antigénica** .Para ello se siguió el método descrito por Towbin *et al.*, (1979) en el que tras separar electroforéticamente las proteínas en geles de SDS-PAGE al 20%, fueron transferidas hasta membranas de PVDF ((hydrophobic polyvinylidene difluoride) tipo Hybond-P (GE healthcare), previamente sensibilizadas en tampón de transferencia.

El proceso de transferencia se realizó en la cubeta de transferencia (Phast Transfer Semi-dry Transfer LKB-Pharmacia) bajo las siguientes condiciones:

Paso	Voltaje	Amperaje	Potencia	Temperatura	Voltios/hora
1.1	20V	25.0 mA	1.0 W	15°C	5Vh

La efectividad de la transferencia se le comprobó, tiñéndola con una solución de Rojo Ponceau al 0,2%, bloqueándose las membranas transferidas, con Tampón de Bloqueo por 3 horas a temperatura ambiente y en agitación, o toda la noche a 4 °C. Una vez bloqueada y lavada la membrana transferida, se procedió a incubar a 37 °C durante 2 horas, con los sueros a ensayar, diluidos 1/50 en PBS. Transcurrido el tiempo se lavaron con PBS por tres veces, para remover el exceso de anticuerpos no ligados, y se incubaron las membranas por 2 horas, a temperatura ambiente y en agitación, con el inmunoconjugado, anti ratón marcado con peroxidasa (Dako) diluido a 1/1000 en PBS. Una vez transcurrida la incubación, se lavó por tres veces con tampón PBS a temperatura ambiente durante 10 min cada lavado, y se reveló con la solución substrato de peroxidada 15 a 30 min, en agitación y oscuridad, paralizando la reacción con agua desionizada.

#### 2.6.4. Inmunocitoquímica

La reacción antígeno-anticuerpo, se puede visualizar o cuantificar utilizando varios métodos y marcadores que permitan localizar los sitios de la reacción en las células y en los tejidos. En nuestro caso realizamos esta técnica a fin de poder localizar en las distintas formas del parásito, las proteínas de interés

mediante anticuerpos específicos marcados con oro coloidal frente a ellas, observando posteriormente el marcaje resultante mediante el uso de la Microscopía Electrónica de Transmisión.

Las muestras en estudio, estaban constituidas por las formas epimastigotes, tripomastigote sanguíneo y tripomastigote metacíclico de *T. cruzi*, a una densidad de aproximadamente  $1 \times 10^7$  parásitos /ml, previamente centrifugadas a 1500 x g durante 10 min y lavadas con PBS. El botón obtenido fue fijado a 4 °C durante 2 horas, tras lo cual fue lavado con PBS por tres veces a 4°C mediante centrifugación.

Una vez lavadas las muestra, se deshidrataron en gradientes de etanol (Merck) a -20 °C (etanol al 50%, 70%, 90% y 100% por 2 veces) y se infiltraron en una mezcla de etanol puro con resina LR white (resina acrílica e hidrofílica, polimerizada con luz ultravioleta, a -20°C, mediante los siguientes pasos:

- Etanol 100% mas LR White (3:1) durante 4 horas a -20 °C
- Etanol 100% mas LR White (1:1) durante 4 horas a -20 °C
- Etanol 100% mas LR White (1:3) durante 4 horas a -20 °C
- LR White dos cambios durante 4 horas a -20 °C

Posteriormente, las muestras incluidas en LR White se polimerizaron dentro de cápsulas de gelatina con luz ultravioleta durante 48 horas a -20 °C y posteriormente durante 24 horas a temperatura ambiente. Después del tallado de los bloques se procedió a la obtención de cortes ultrafinos de 500 a 700 Å de espesor en Ultramicrotomo S ó R de Leica, que se montaron sobre rejillas de níquel de malla 300.

Una vez las preparaciones sobre las rejillas, se incubaron en una cámara húmeda a temperatura ambiente, en tampón Glicina 4 veces durante 10 min y se bloquearon 1 hora con Tampón de bloqueo. A continuación, las rejillas fueron lavadas 3 veces en PBS durante 5 min y se incubaron con los anticuerpos primarios a una dilución 1/20 diluidos en Tampón de bloqueo durante 1 hora. Como control negativo se utilizaron sueros de ratones preinmunes y como blancos el propio Tampón de Bloqueo sin suero añadido. Seguidamente, se lavó 4 veces con en PBS durante 5 min y incubandose con el Anticuerpo secundario marcado con Oro (10 nm) (Sigma) a una dilución 1/20 en Tampón de bloqueo durante 1 hora. Por último, lavamos 4 veces

durante 5 minutos en PBS, siendo el último lavado en agua desionizada para eliminar los posibles restos de sales de los Tampones utilizados, dejando secar las rejillas a Temperatura ambiente. Una vez realizado el inmunomarcaje, se procedió al contraste de las mismas con acetato de uranílo al 2%. Observándose las rejillas y fotografiándose en microscopio de transmisión Zeiss EM 10C a 80 kv.

### **2.6.5. Microscopía Laser Confocal**

Otra de las técnicas usadas para la inmunolocalización de nuestras proteínas fue la inmunofluorescencia mediante el uso de la Microscopía Laser Confocal. Los Anticuerpos específicos utilizados fueron inmuniseros desarrollados frente al péptido MAM (Péptido Señal de las proteínas MASP) y frente a al péptido AEE ( Región catalítica de la MASP52).

Para llevar a cabo esta técnica en primer lugar la muestra fue lavada tres veces en PBS centrifugándolo a 1000 x g durante 10 min en el caso de las formas del parásito en suspensión o bien se sumergió tres veces en PBS los cubreobjetos borosilicados de 5 mm de diámetro (Round Glass Cover Slip) sobre los que se crecieron cultivos de células Vero adheridas en monocapa y que estaban siendo infectadas o ya lo habían sido. Para los estadios parasitarios aislados, se incubó el botón de parásitos en Tampón de fijación de inmuofluorecencia durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación, se lavó mediante centrifugación en PBS centrifugando a 5000 x g durante 1 min, depositándose 15µl de la suspensión de células sobre los pocillos de un portaobjetos para fluorescencia (Electron Microscopy Sciences). Para el caso de cristales con células adheridas, la fijación y permeabilización se realizó en un mismo paso, al añadir sobre las células 20 µl de acetona fría (-20 °C) que se mantuvo durante 1 min sobre los cristales los cuales fueron lavados sumergiéndolos tres veces en PBS.

Para el inmunomarcaje, la incubación de los cristales que contienen la muestra se realizó en una cámara húmeda a temperatura ambiente. Para ello, se incubaron previamente las muestras en Tampón de Bloqueo durante 30 min a Temperatura ambiente y se lavaron 4 veces en PBS, incubando las muestras con el anticuerpo primario (dilución 1/100) en Tampón de bloqueo durante 1

hora. Como control negativo, se utilizaron sueros de ratones preinmunes y como blancos el propio Tampón de Bloqueo sin suero añadido. Seguidamente, las muestras se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario marcado con Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) (Sigma) a una dilución 1:256 en Tampón de bloqueo durante 1 hora. Tras la incubación con el anticuerpo secundario marcado, se volvieron a lavar 3 veces en PBS incubándose posteriormente durante 10 min con 20  $\mu$ l de una solución de DAPI 10  $\mu$ g/ $\mu$ l, como marcador de DNA de contraste. Las preparaciones finalmente se lavaron con PBS, montándose en Medio de Montaje (Prolong Antifade Kit, Molecular Probes). El inmunomacaje fluorescente se observó en un microscopio láser Confocal Leica DMI6000.

#### **2.6.6. Adsorción e Inmunomacaje de proteínas a partículas de Bentonita**

La absorción a partículas de bentonita se llevó a cabo a fin de poder observar si la proteína MASP52 intervenía de alguna manera en el proceso de adherencia e invasividad del parásito sobre las células. Para ello se siguió la técnica de Cagan descrita por Osuna *et al.*, (1995). Para lograr la selección del tamaño de partícula se siguió un procedimiento de centrifugación diferencial y para ello, se dispersan 5 mg de Bentonita en 1 ml de agua destilada y se homogenizan durante 1 min por agitación en vortex. Tras ello se adicionan 5 ml de agua destilada, centrifugándose a 500 x g durante 10 min. El botón originado de la centrifugación se desecha y el sobrenadante se vuelve a centrifugar a 750 x g durante 15 min. El botón se resuspende en 1 ml de agua destilada homogenizándose durante 1 min mediante agitación. De esta manera, 100  $\mu$ l de partículas con diámetros comprendidos entre 1 a 2  $\mu$ m se incubaron 12 horas a 4 °C con 50  $\mu$ l de una solución de 20  $\mu$ g/ml de la proteína MASP52 que se pretendían adsorber en las partículas de bentonita problema y albumina sérica bovina (BSA) para las partículas control.

Las partículas así sensibilizadas y seleccionadas, se incubaron con un cultivo de células Vero ( $3 \times 10^5$ ) durante 4 horas a 37 °C en una atmósfera con 4.5 % de CO<sub>2</sub>. Pasado ese tiempo, se lavaron los cultivos tres veces en PBS y se fijaron en acetona fría (-20°C) para su posterior inmunomacaje para Microscopía Laser Confocal como se describió anteriormente. Como anticuerpo

primario se utilizó una dilución 1/100 del anticuerpo policlonal frente a la Masp52 y en las células control una dilución 1/100 de un suero policlonal en ratón anti-BSA (Sigma). Como colorante de contraste fue empleada una solución de Azul de Evans al 0.01% en el momento de la dilución con el Anticuerpo secundario.

### **2.6.7. Inhibición de la infectividad de *T. cruzi* mediante anticuerpos frente a la MASP52**

A fin de comprobar, como en el apartado anterior, el papel que pudiera jugar la MASP52 en la invasividad del parásito en la célula hospedadora, se estudiaron las tasas de adherencia a las células y el nivel de invasividad medido en razón del número de parásitos intracelulares usándose como control los mismos tratamientos con el suero de un ratón preinmune.

Para ello, un cultivo de formas tripomastigotes metacíclicos se incubaron previo a la infección durante 30 min a 27 °C diluciones 1/50, 1/100 o 1/200 de un inmunisero frente al péptido AEE perteneciente a la región catalítica de la MASP52. Por otra parte, cultivos de células Vero semiconfluentes ( $3 \times 10^5$  células/ pocillo) se cultivaron sobre cubreobjetos borosilicados de 5 mm de diámetro (Round Glass Cover Slip) en placas de microtitulación de 96 pocillos (Nunc, Denmark). Tras ser lavados en Medio MEM sin suero, a fin de retirar el medio de cultivo, fueron infectados con las formas tripomastigotes metacíclicas que previamente se incubaron con las del antisero antes mencionadas. El tiempo de infección de las células fue de 2 horas a 37°C. Transcurrido ese tiempo, los cultivos se lavaron 3 veces en PBS, se fijaron en metanol y se tiñeron mediante la tinción Diff-Quick (Medion Diagnostics, GMBH, CH-3186 Dürdingen), el cual posee algunas modificaciones sobre la técnica de tinción de Giemsa. Después de teñirse, fueron estudiadas en un microscopio de contraste de fases determinándose el porcentaje de adherencia de los parásitos a las células, el número de parásitos que se encontraban penetrando y el número de parásitos intracelulares con respecto a los parásitos control pretratados con el suero preinmune. El número mínimo de células estudiadas fue de 500 células por muestra y cada experimento fue repetido 4 veces.

## D.RESULTADOS

## 1. Análisis proteómico de proteínas MASP y caracterización de MASP52

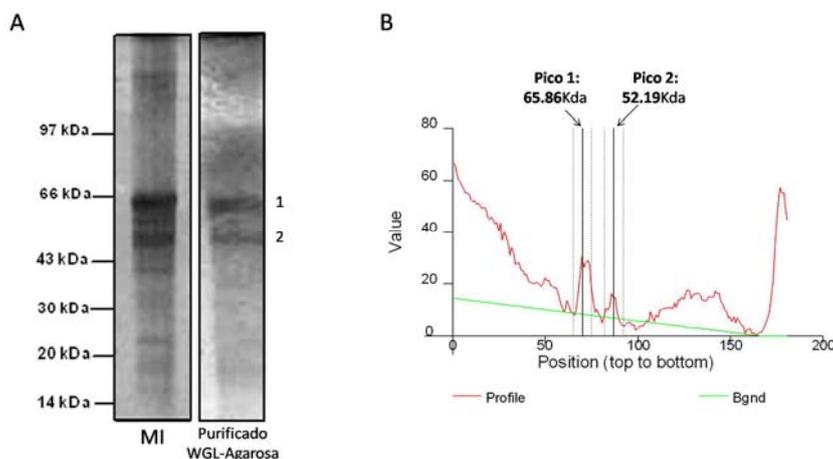
### 1.1 Purificación del medio de interacción mediante cromatografía de afinidad

Como se comentó en la introducción, todas las proteínas pertenecientes a la familia MASP poseen un péptido señal en su extremo amino terminal, lo que les confiere la capacidad de secretarse al exterior.

Al objeto de estudiar la posible excreción /secreción de algunas de las proteínas pertenecientes a esta familia al medio de cultivo durante el proceso de interacción (MI) célula – parásito, se procedió a la purificación y posterior secuenciación a fin de poder identificar proteínas de esta familia.

Para la purificación mediante cromatografía de afinidad, se utilizaron columnas de Lectina Germen de trigo – agarosa (WGL-agarosa), ya que otra propiedad intrínseca de las proteínas MASP es la de poseer lugares para *N*-glicosilación, pudiendo utilizarse la cadena azucarada de dichas proteínas para su purificación por cromatografía de afinidad.

Como se observa en la Figura 1.1, tras la separación electroforética del MI purificado, se obtuvieron dos bandas (1 y 2) que tras su análisis densitométrico mediante el programa QuantiScan V 1.25 resultaron con un peso de 65.86 kDa y de 52.19 kDa.



**Figur**

**a 1.1.** (A) Electroforesis SDS-PAGE al 12.5% del Medio de Interacción y del eluido tras su cromatografía mediante columnas WGL-Agarosa. (B) Densitograma de la muestra purificada donde se indican los pesos moleculares de las dos proteínas obtenidas.

**1.2 Secuenciación de aminoácidos de la fracción purificada y del MI**

Una vez realizada la cromatografía se procedió a la secuenciación de las proteínas purificadas obtenidas directamente del MI. Dicha secuenciación se realizó en el servicio de proteómica del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO) en Madrid. Para ello se envió un gel SDS-PAGE al 12.5% que incluía la fracción purificada como no purificada, tiñéndose mediante tinción Sypro-Ruby de cara a la selección de las bandas de interés. La identificación proteica se realizó tras la digestión trípica de dichas bandas, MALDI-TOF y posterior identificación en las bases de datos utilizando el programa Mascot, como ya se indicó en el apartado de Material y Métodos.

De la banda 1 de la fracción purificada se obtuvieron 7 péptidos que correspondieron con la Albúmina Sérica Bovina (BSA). Mientras que la banda 2 de la fracción purificada obtuvimos 7 péptidos que correspondían con una proteína MASP con un número de acceso: XP\_820015.1 (Tabla 1.1), que se denominó como MASP52.

Igualmente en el MI no purificado identificamos una proteína MASP de bajo peso molecular aproximado de 5 kDa con número de acceso: XP\_820695 y que denominamos como MASP5.

**Tabla 1.1.** Péptidos identificados mediante MALDI-TOF pertenecientes a la MASP5 y MASP52

Nombre	Muestra	Péptidos Identificados
<b>MASP5</b>	Medio de Interacción (MI)	<b>SCLLLPLPPVCWCGcRAVcVfVCLLLWIGVCVVR</b>
<b>MASP52</b>	Fracción Purificada Banda 2	<b>TAIHDQDK</b> <b>ATAASEAAEK</b> <b>AAAEAAETAEK</b> <b>AAEAAKDEAAK</b> <b>EQHEKQQHQQR</b> <b>AKTLAETAETATEAAD</b> <b>AK</b>

### 1.3. Análisis predictivo de motivos estructurales de la MASP5 y MASP52

El análisis predictivo de la secuencia de la MASP5 y MASP52, se realizó de la igual manera al realizado a los diferentes clones de las fases tripomastigote y metacíclico, utilizando el servidor de herramientas proteómicas de ExPASy (<http://www.expasy.ch/tools/>).

#### 1.3.1 Análisis de la secuencia aminoacídica de la MASP5

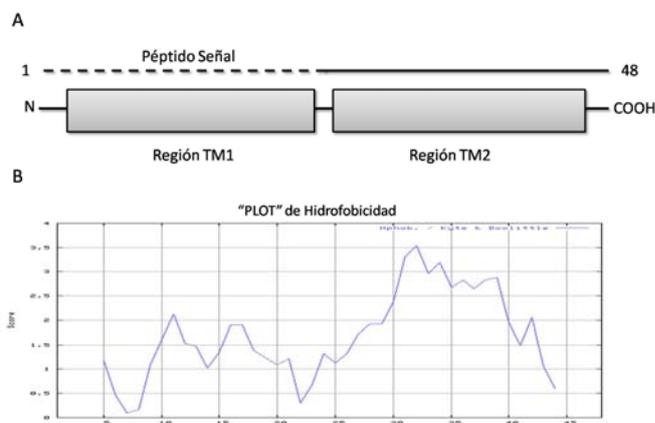
La secuencia de la MASP5 está constituida de un total de 48 aminoácidos, con un peso molecular teórico de 5.31 kDa y un punto isoeléctrico de pH: 9.1 (Figura 1.2).

1 MCMRWSLVCRSCLLLPLPPVCWCCGRAVCFVCLLLWIGVCVVRGVRR  
48

**Figura 1.2.** Secuencia de aminoácidos de la MASP5

La topología de esta proteína se determinó mediante su perfil de hidrofobicidad, así como mediante el análisis predictivo de las regiones transmembrana. Se predijo la existencia de dos regiones transmembrana, la primera correspondía al péptido señal de esta proteína (residuos 1-23), y la segunda en la proteína ya madurada (residuos 24-46) confiriendo una posible topología transmembrana de la MASP 5.

Como se observa en la Figura 1.3, además del péptido señal anteriormente comentado, no se obtuvo ningún resultado tras el análisis de posibles motivos estructurales en la secuencia de la MASP5.

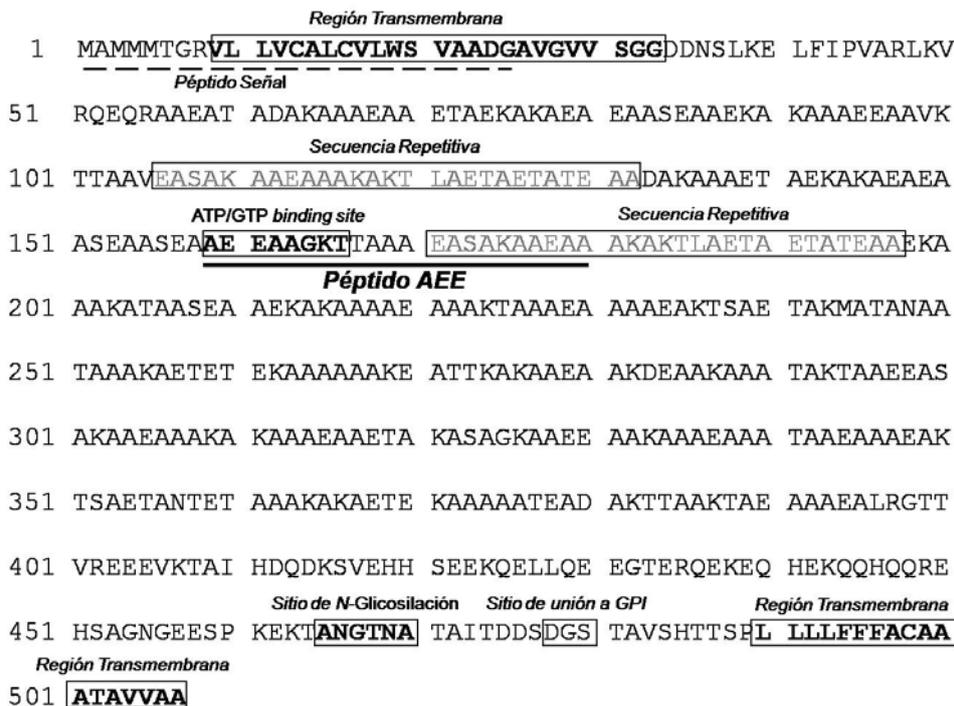


**Figura 1.3. (A)** Representación esquemática de los motivos estructurales de la MASP5. (B) "Plot" de hidrofobicidad de la MASP5

medida según la escala Kyte-Doolittle de hidrofobicidades.TM: Transmembrana

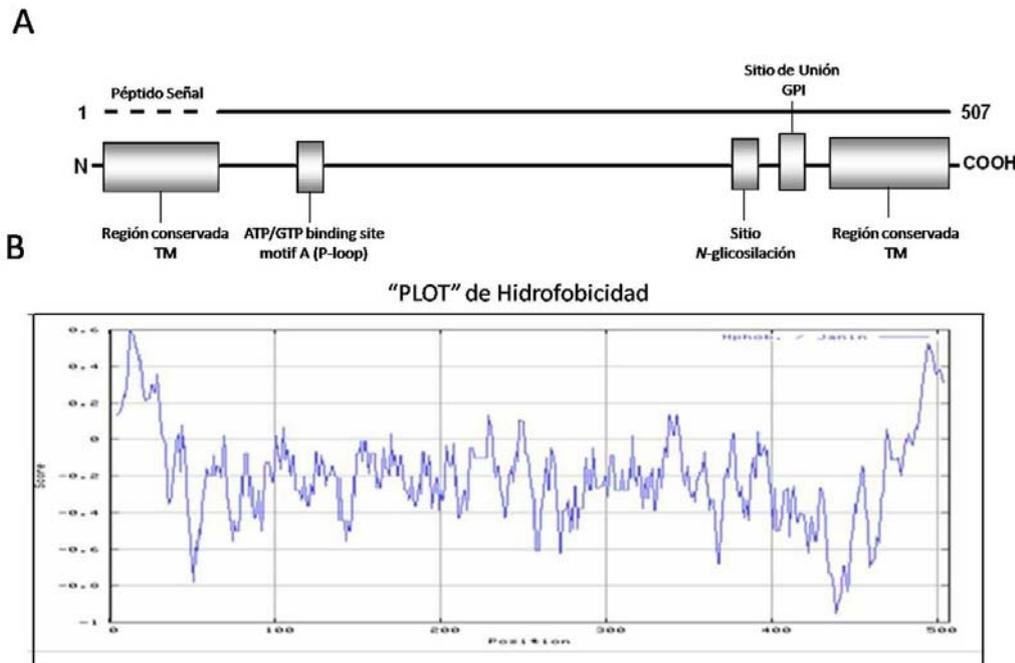
**1.3.2. Análisis de la secuencia aminoacídica de la MASP52**

La secuencia de la MASP52 se constituye de un total de 507 aminoácidos, con un peso molecular teórico de 49.9 kDa y un punto isoeléctrico de pH de 4.5. Como se observa en la Figura 1.4, tras la búsqueda de motivos estructurales obtuvimos un péptido señal (residuos 1-25), un sitio ATP/GTP-binding site motif A (P-loop) que podemos denominar como centro catalítico de la MASP52, (residuos 159-166), un sitio de N-glicosilación (residuos 465 a 470) y un sitio de unión a GPI (residuo 483 con máxima probabilidad). Por otra parte encontramos una secuencia repetitiva característica de este tipo de proteínas (residuos 106 a 132 y 171 a 197). En la figura se señala la posición exacta del Péptido AEE que se utilizó para generar un inmunisero frente a él como se describe en el apartado de Material y Métodos.



**Figura 1.4.** Secuencia de aminoácidos de la MASP52. En los Cuadros se remarcan los diferentes motivos estructurales de que se compone esta proteína. La línea discontinua señala la situación del péptido señal y la línea continua el péptido AEE utilizado para generar un inmunisero frente a la MASP52.

Como anteriormente se realizó para la MASP5, se analizó la topología de la MASP52 mediante su perfil de hidrofobicidad, así como mediante el análisis predictivo de las regiones transmembrana. Como se indica en la Figura 1.5, se encontraron dos regiones transmembrana, una en el extremo N-terminal (residuos 9-28), y una C-terminal (aminoácidos 493-507).



**Figura 1.5.** (A) Representación esquemática de los motivos estructurales de la MASP52. (B) "Plot" de hidrofobicidad de la MASP52 medida según la escala Kyte-Doolittle de hidrofobicidades. TM: Transmembrana.

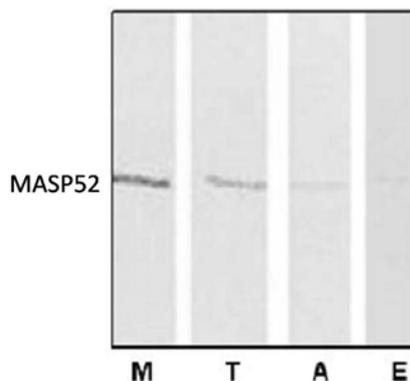
#### 1.4. Expresión proteica y RTqPCR de la MASP52

Para cuantificar la expresión proteica de la MASP52 se realizó una búsqueda de regiones antigénicas dentro de la secuencia de esta proteína utilizándose el programa Antigenic del paquete software de EMBOSS (<http://emboss.bioinformatics.nl/>). Como resultado, se obtuvo un péptido de 11 residuos (170-180) con secuencia: **AEASAKAAEAA**, que ampliamos hasta un total de 21 residuos (159-180) **AEEAAGKTTAAAEASAKAAEAA**, para incluir

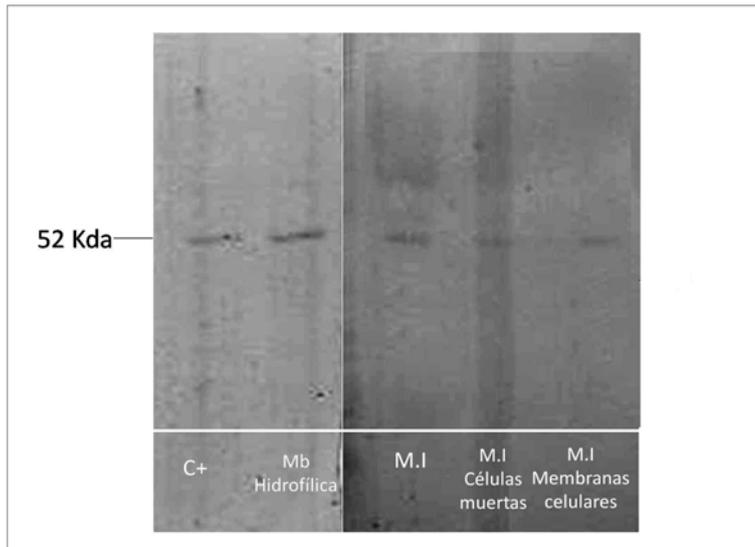
dentro del péptido la “Región Catalítica” (ATP/GTP-binding site motif A (P-loop)) de la MASP52 y que denominamos como péptido AEE.

Para aumentar la respuesta inmunológica frente al péptido y la estabilidad de éste, dicho péptido fue acoplado a una proteína “carrier”, la hemocianina de cangrejo (KLH), como se describió en Material y Métodos. Una vez acoplado se inmunizaron ratones Balb/c con dicha construcción para generar un inmunisero específico frente al complejo KLH-péptido. El suero Anti-AEE dio un título de 1/3600, purificándose las IgG del suero como se describió en Material y Métodos.

Para el análisis de la expresión de la MASP52 en los diferentes estadios de *T. cruzi*, se ajustó la misma cantidad de muestra en los diferentes carriles de la electroforesis SDS PAGE, empleándose las IgG anti-AEE para el desarrollo del Western blot. Como se muestra en la Figura 1.6, se reconoció la MASP52 como una única banda, a la altura de 52 kDa, con diferente grado de expresión en los diferentes estadios del parásito (Figura 1.6). La cuantificación de las bandas obtenidas se realizó mediante análisis densitométrico, utilizando el programa QuantiScan V 1.25. Así, el mayor grado de expresión fue encontrada en la fase tripomastigotes metacíclicos, siendo 12 veces superior que la encontrada en epimastigotes (E), cinco veces superior a la de amastigotes (A) y dos veces superior a la encontrada en tripomastigotes derivados de cultivos celulares (T).



**Figura 1.6.** Western blot de las formas tripomastigotes metacíclicos (M), tripomastigote proveniente de los cultivos celulares (T), amastigotes (A), epimastigote (E) de *Trypanosoma cruzi* usando las IgG anti-CR

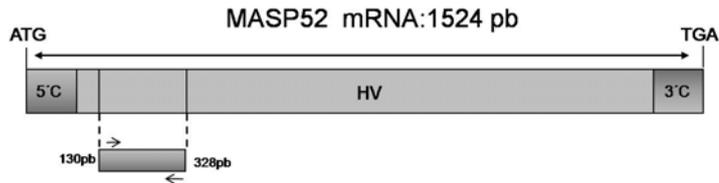


**Figura 1.7.** Western-blot de las fracción de membrana hidrofílica y para los medios de interacción (MI) en presencia de células vivas, células muertas y membranas celulares. El control positivo (C+), se realizó empleando un homogenado de la fase tripomastigote metacíclico.

El western blot correspondiente a las diferentes fracciones de membrana obtenidas, reveló la presencia de la MASP52 en la fracción hidrofílica de las proteínas de membrana de las formas tripomastigotas metacíclicas (Figura 1.7).

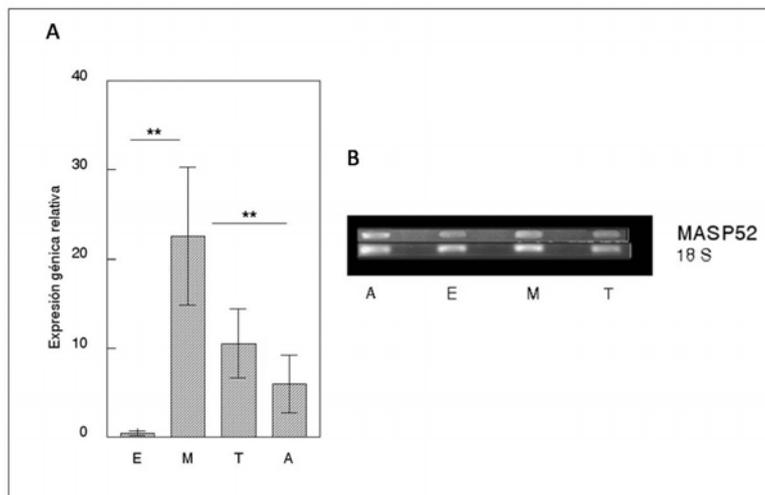
Utilizando los Medios de Interacción de formas metacíclicas frente a células vivas, células muertas y membranas celulares aisladas, y tras realizar un western blot utilizando el antisuero frente al péptido AEE se localiza la banda de 52 kDa perteneciente a la MASP52 (Figura 1.7). Paralelamente, se realizó otro western blot con medios de secreción de las formas metacíclicas libres de células donde no se detectó la presencia de dicha banda.

Una vez obtenida la expresión proteica de los diferentes estadios mediante western blot, se procedió a obtener el mRNA de las mismas fases del ciclo celular, para cuantificar la expresión del gen que codifica para la proteína MASP52. Como se observa en la figura, se amplifica una región específica de 198 pb, de este gen, dentro de la zona hipervariable del mismo, certificándose dicha especificidad mediante una búsqueda de homología usando el programa BLAST.



**Figura 1.8.** Estrategia de selección y amplificación de la MASP52 utilizada para el posterior desarrollo de la RTqPCR. El amplicón de 198 pb obtenido se encontraba situado entre el nucleótido 130 y el 328 de la secuencia de la MASP52. C: conservado; HV: hipervariable.

El resultado del estudio de los mRNA de la MASP52 mediante RTqPCR, mostró resultados similares a los obtenidos mediante Western blot. Todos los estadios ensayados poseían síntesis del mRNA, pero con diferentes niveles de expresión. En las formas tripomastigotas metacíclicas la síntesis de mRNA específico es tres veces superior a la de las formas tripomastigota derivada de tejidos, once veces mayor a la de amastigotes y cincuenta veces superior a la de los epimastigotes. Como se observa en la Figura 1.9, la fase tripomastigote metacíclico poseía una diferencia de expresión significativa ( $P < 0.01$ ) con respecto al estadio epimastigote, así como con respecto al estadio amastigote.



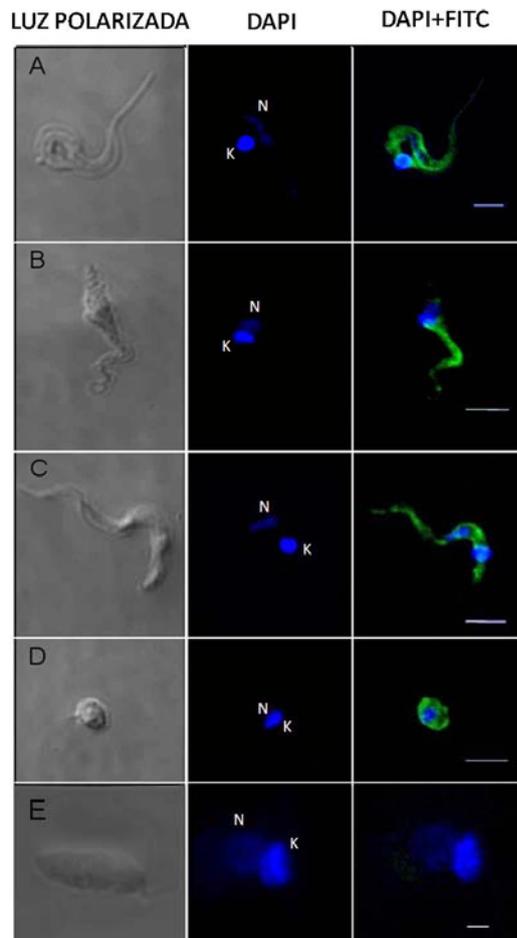
**Figura**

**1.9. (A)**

Valores de expresión relativa con respecto a la fase epimastigote para cuantificar la cantidad relativa de mRNA transcrito de la MASP52 comparándolo frente a la expresión del gen 18S ribosomal según el método de  $\Delta C_T$ . Se midió la cantidad relativa con respecto a la fase epimastigote para los estadios tripomastigote metacíclico, tripomastigote derivado de cultivo celular y amastigote (B) Gel de Agarosa al 2% del amplicón del gen 18S de 179 pb y MASP52 de 198 pb. E: Epimastigote; M: Tripomastigote metacíclico; T: Tripomastigote proveniente de los cultivos celulares; A: Amastigote.

### 1.5. Localización de la MASP52 mediante Microscopía láser confocal en los distintos estadios de *T. cruzi*

Los estudios de localización llevados a cabo mediante microscopía láser confocal empleando las Inmunoglobulinas anti-AEE revelaron la presencia de la MASP52 en todos los estadios del parásito (Figura 1.10). La MASP52 se encontró en la membrana plasmática en los tripomastigotes metacíclicos, tripomastigotes derivados de cultivo celular y amastigote “like forms”, y en citosol y en la bolsa del flagelo o sus proximidades de todas las fases.



**Figura 1.10.** Inmunolocalización de la MASP52 mediante Microscopía

Láser confocal, en los diferentes

estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*. Para el marcaje, utilizamos las IgG anti-AEE (FITC) y DAPI para el

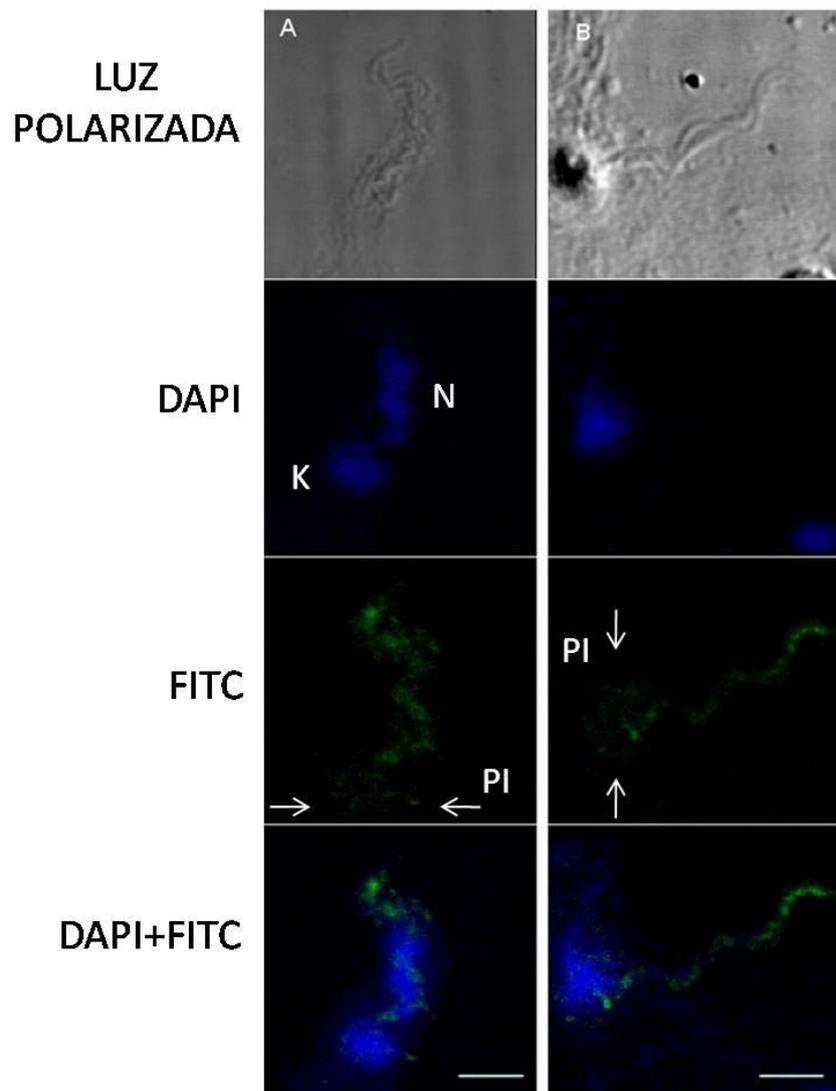
marcaje del DNA (azul). (A) Tripomastigote derivado de cultivo celular (B), Epimastigote (C)

Tripomastigote metacíclico (D), y Amastigote “like” (E) Control negativo. Barra = 2  $\mu$ m.

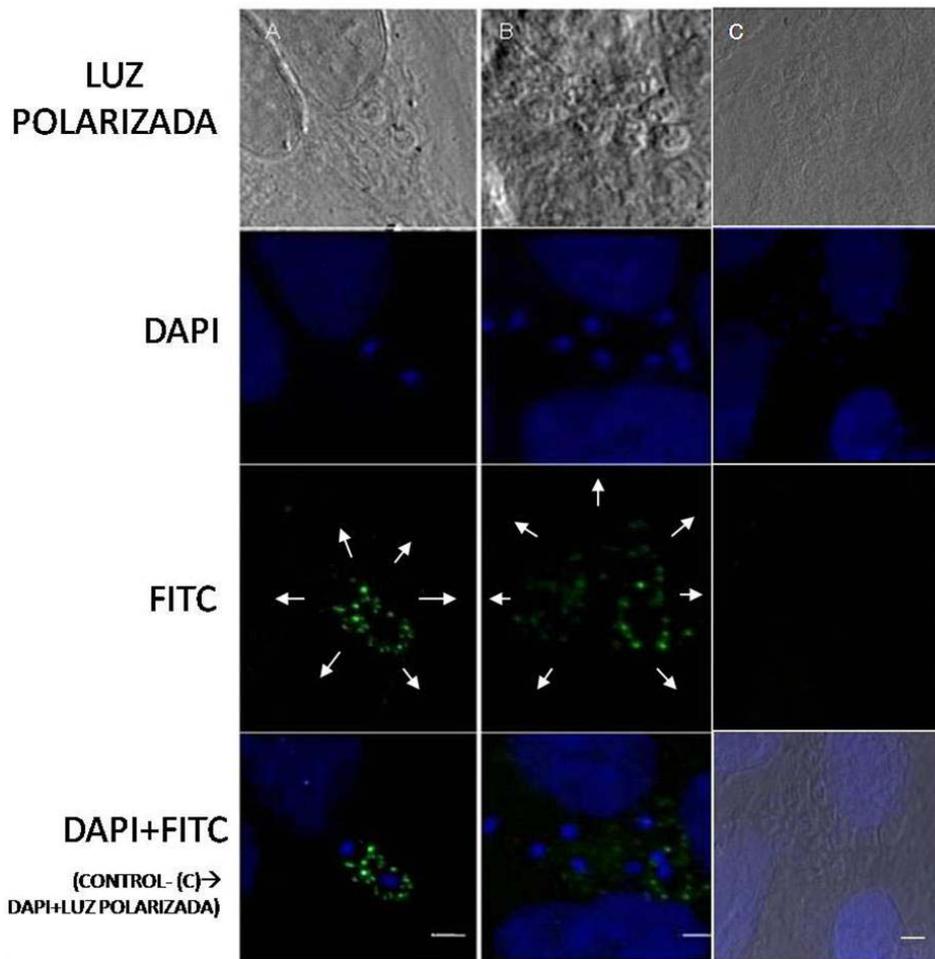
Cuando se llevó a cabo el estudio de la Inmunolocalización de la proteína durante el proceso de interacción entre los tripomastigote metacíclicos y la célula hospedadora, la proteína MASP 52 se encontró en diferentes localizaciones. A las 2h postinfección se observó dispersa en el citosol de los tripomastigotes metacíclicos o formando gránulos o “clusters” de fluorescencia,, así como en el punto de interacción entre el parásito y la célula hospedadora. (Figura 1.11(A)).

En aquellas células donde las formas del parásito ya se habían transformado y multiplicado como formas amastigota, la MASP52, aparece localizada en el citoplasma de la célula hospedadora rodeando a las formas amastigote, de una manera diferente a la que aparece en las formas amastigote-“like” anteriormente descritas (Figura 1.11 (B)).

**A**



## B

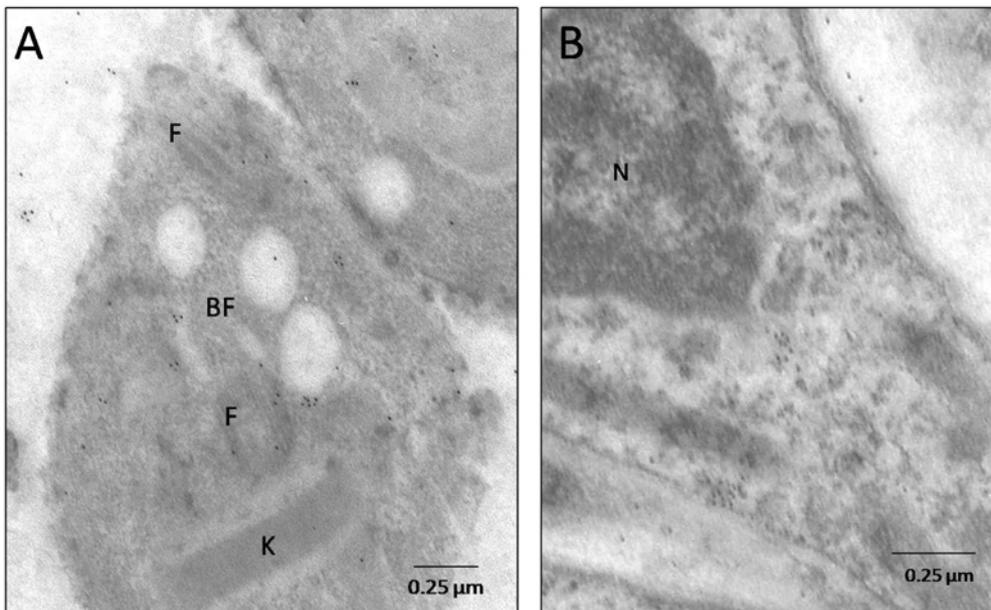


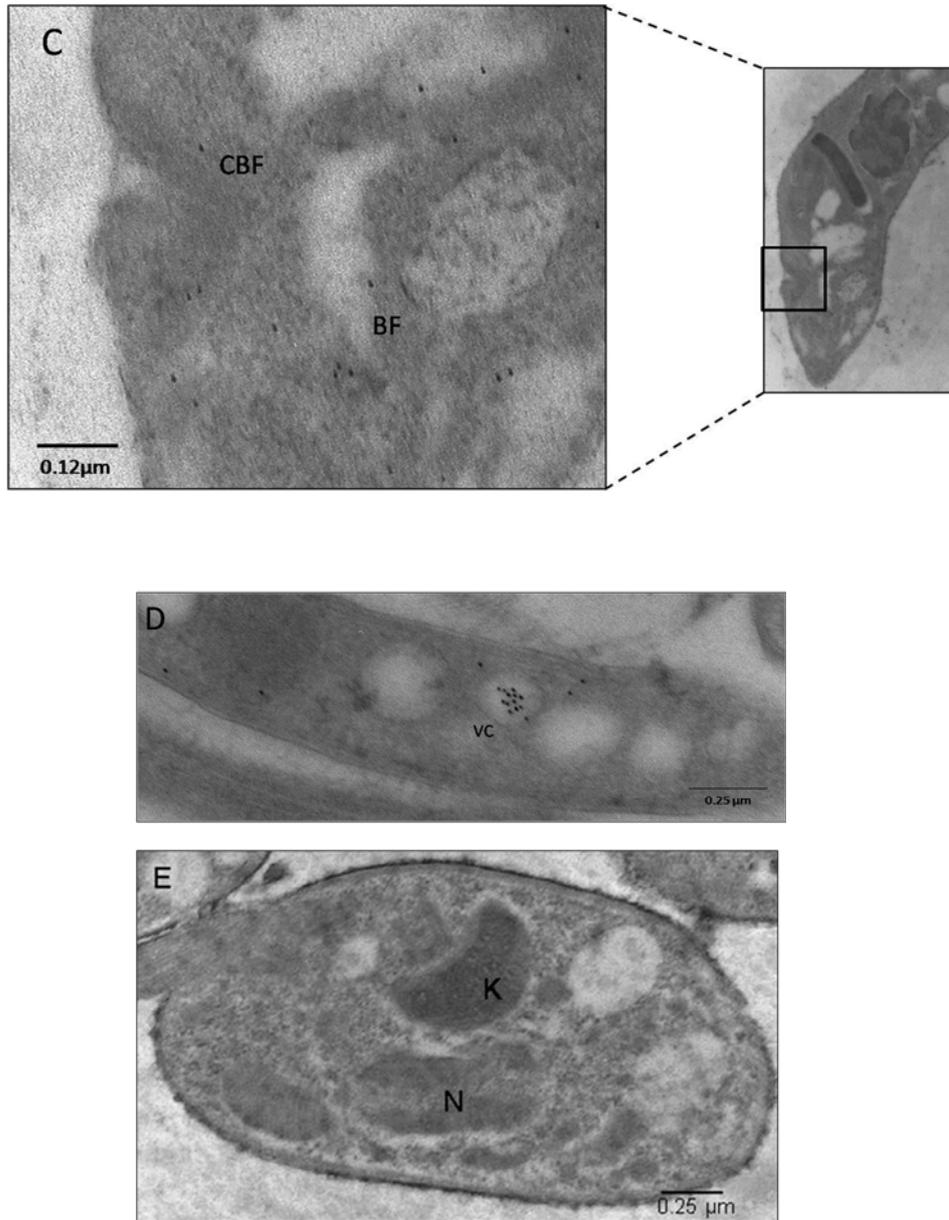
Figura

1.11. Inmunolocalización de la MASP52 en su interacción con la célula hospedadora. Para el marcaje, utilizamos las IgG anti-AEE (FITC) y DAPI para el marcaje del DNA de los parásitos (azul). (A) Diferentes imágenes (AA y AB) de Tripomastigotes metacíclicos penetrando en la célula hospedadora a las 2h postinfección. Barra= 5  $\mu\text{m}$  (Fig.AA), Barra= 10  $\mu\text{m}$  (FigAB) (B). Inmunomarcaje de amastigotes intracelulares (BA y BB) así como el resultado del control negativo con suero de ratón preinmune (BC). Barra= 5  $\mu\text{m}$ . PI: Punto de Interacción; K: Kinetoplasto; N: Núcleo.

### 1.6. Localización de la MASP52 en los diferentes estadios de *T. cruzi* mediante Inmunocitoquímica

Los estudios de localización ultraestructural en los estadios Epimastigote, tripomastigote metacíclico y tripomastigote derivado de cultivo celular, empleando las IgG anti-AEE para localizar a la MASP52, muestran como las marcas de oro se sitúan aisladas en diferentes posiciones o formando "clusters" o agrupamientos de estas. La MASP52 se localizó en la membrana del parásito de las formas metacíclicas y tripomastigotas derivadas de cultivo celular (Figura 1.12 (B) y (D)). También se encontraron marcas en el citosol del parásito dispersas en el caso de epimastigotes o formando agrupamientos de dichas marcas en tripomastigotes derivados de cultivo celular (aunque también se encontraron dispersas) (Figura 1.12 (A), (B)). También se observaron marcas en el interior de vacuolas citosólicas en la forma tripomastigote metacíclica (Figura 1.12 (D)). La presencia de la MASP52 tanto en la base del flagelo como en la bolsa flagelar se observa tanto en las formas epimastigote como tripomastigotes derivados de cultivo celular (Figura 1.12 (A) y (C)).





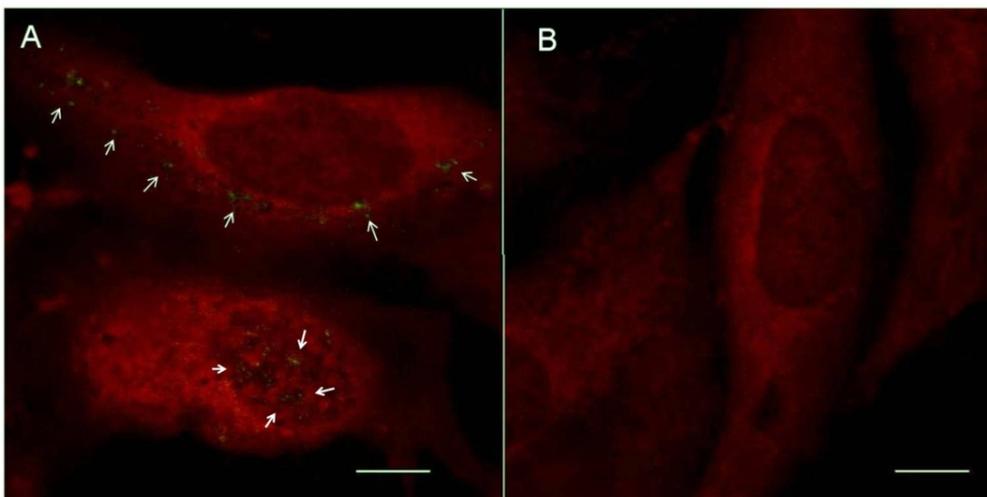
**Figura 1.12.** Inmunocitoquímica de la MASP52 usando las IgG anti-AEE (A) Bolsa del flagelo de Epimastigote. (B) Trypomastigote derivado de cultivo celular, localización en membrana, citosol y exterior celular. (C) Bolsa del flagelo y cuerpo basal del flagelo de Tripomastigote derivado de cultivo celular. (D) Vesículas citosólicas de Tripomastigote metacíclico. (E) Control derivado de cultivo celular.

negativo. K= Kinetoplasto, F= Flagelo, BF=Bolsa del flagelo, CBF=Cuerpo basal del flagelo, VC=Vesículas citoplasmáticas, N= Núcleo.

### 1.7. Endocitosis de la MASP52 adsorbida a bentonita por Células Vero no fagocíticas

Tras una interacción de 4h de células Vero con las partículas de bentonita adsorbidas con la MASP52 o con albúmina sérica bovina (BSA) como control, se procedió a la inmunodetección, de dichas partículas utilizando anticuerpos anti-AEE o anti-BSA para la detección de la BSA. Este estudio reveló que las partículas adsorbidas a la MASP52 eran endocitadas por las células, mientras que las adsorbidas con BSA eran eliminadas por los lavados a que fueron sometidos los cultivos tras el tiempo de interacción.

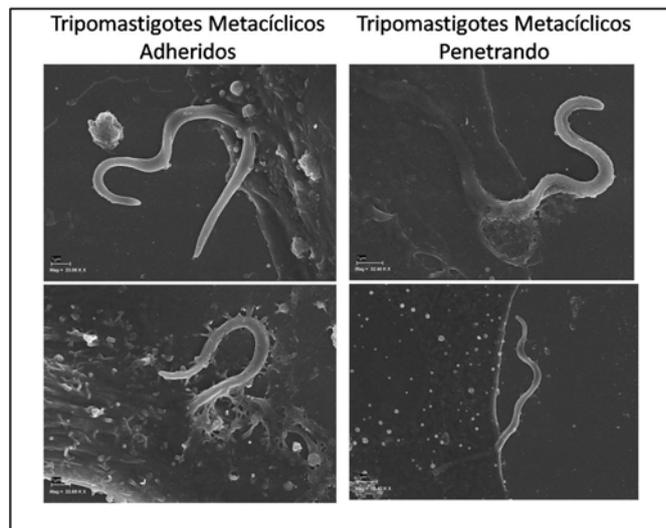
Las partículas absorbidas con la MASP52 se localizaron en el interior de vacuolas dispersas por el citoplasma de la célula (Figura 1.13).



**Figura 1.13.** Localización tras 4 horas de interacción con células Vero de partículas de bentonita adsorbidas a la MASP52 (A) y BSA como control(B). La localización se realizó empleando anticuerpos IgG anti-AEE y un suero policlonal anti-BSA. Como colorante de contraste se utilizó azul de Evans al 0.01%. Las flechas señalan los puntos de fluorescencia donde se localizó a la MASP52. Barra= 10  $\mu$ m

### 1.8. Efectos del antisuero frente a la MASP52 en la invasión celular por parte de formas tripomastigotes metacíclicas.

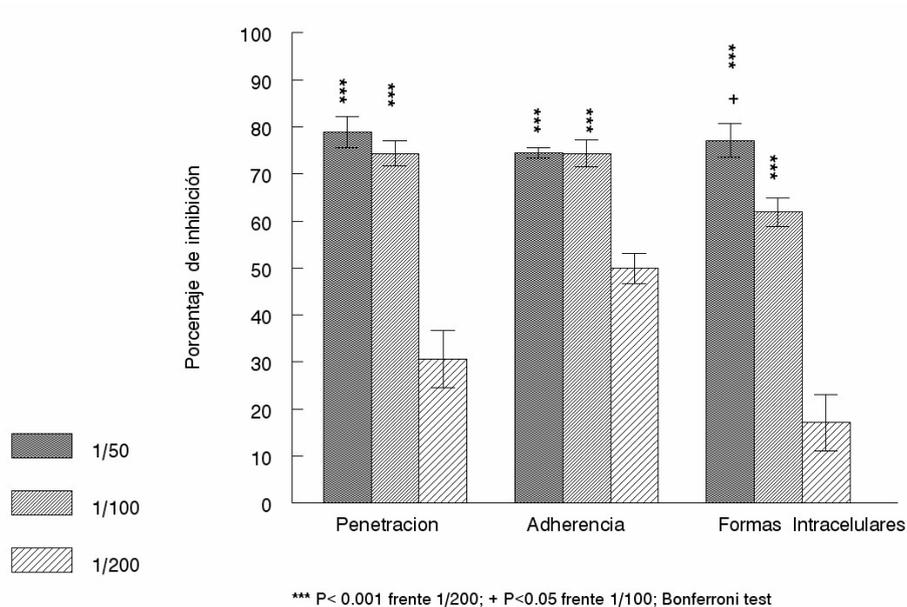
Al objeto de conocer el papel de la MASP52 en el proceso de infección, se incubaron las distintas diluciones de suero frente a la MASP52 (anti-AEE) (1: 50; 1:100; 1:200) con las formas tripomastigotes metacíclicos como se describió en Material y Métodos, realizando a continuación la infección de las células hospedadoras durante 2h. El porcentaje de inhibición del proceso de interacción y entrada de los parásitos en la célula llevado a cabo por las IgG anti-AEE, se calculó con respecto a los obtenidos por el control con suero preinmune. Se determinaron tanto el número de las formas que se encuentran en fase de penetración en la célula, como de formas adheridas a la superficie celular interaccionando (Figura 1.14), y con las formas intracelulares ya internalizadas en el interior de las células.



**Figura 1.14.** Microscopía electrónica de barrido de Tripomastigotes metacíclicos adheridos a células Vero o penetrando en éstas.

Como se observa en la Figura 1.15, el porcentaje de inhibición fue dosis-dependiente con respecto a la dilución de suero ensayada, obteniendo una alta significación de las dos diluciones más concentradas (1/50 y 1/100) con respecto a la dilución más alta (1/200). El porcentaje de inhibición de los

tripomastigotes adheridos a la célula fue del 49.92 % para la dilución 1/200, 74.35 % para 1/100 y del 74.48 % para 1/50. La reducción de los parásitos intracelulares fue del 17.14% para la dilución de suero 1/200, 61.9% para 1/100 y 77.14% para 1/50. Cuando se cuantificó el porcentaje de parásitos penetrando en la célula hospedadora los niveles de reducción fueron del 30.7% para la dilución 1/200, 74.38% para 1/100 y del 78.9% para 1/50.

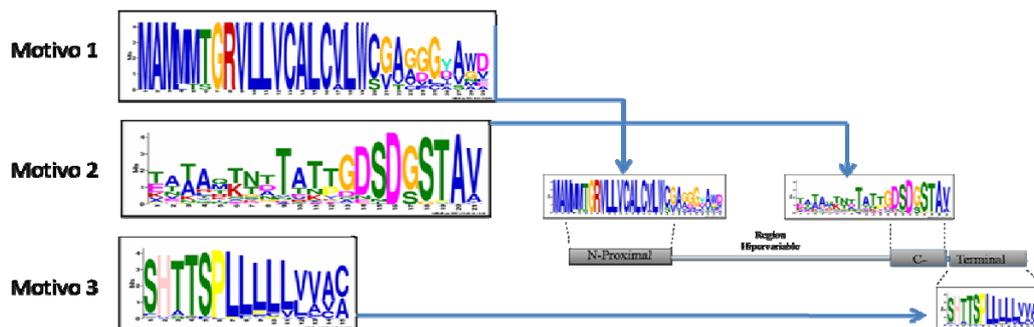


**Figura 1.15.** Efecto de las IgG anti-AEE frente a la región catalítica de la MASP52 en la en la invasividad (Penetración, adherencia y formas intracelulares) de tripomastigotes metacíclicos en células vero. Las diluciones ensayadas de las IgG anti-AEE 1/50, 1/100 y 1/200. Las barras representan la media  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos.

## 2. Análisis de la arquitectura genómica de los genes MASP

## 2.1 Búsqueda bioinformática de motivos repetidos en secuencias MASP en el genoma de *T. cruzi*

Para realizar las diferentes estrategias de amplificación de los genes correspondientes a la familia MASP, se realizó una búsqueda de los motivos repetidos y conservados, mediante el algoritmo MEME 4.3.0, acotando de esta manera, las secuencias tanto conservadas como hipervariables de esta familia génica. Se analizaron un total de 250 secuencias de aminoácidos codificadas por genes MASP en el genoma de *T. cruzi*, depositados en la base de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Como se observa en la Figura 2.1 se obtuvieron tres motivos altamente repetidos en los extremos en estas proteínas. Un motivo altamente conservado en el extremo N-terminal y dos motivos repetidos correspondiente al extremo C-terminal, típicos de esta familia de proteínas (El-Sayed *et al.*, 2005a, Bartholomeu *et al.*, 2009).



**Figura 2.1.** Representación de los motivos estructuralmente conservados de una proteína MASP prototípica, al analizar 250 secuencias mediante el programa MEME. 4.3.0.

## 2.2. Análisis de los extremos 5' y 3' conservados de la familia MASP

Ya que la repetición de secuencias en los extremos de éstas proteínas es una característica básica representativa del genoma de la cepa CL-Brener depositado en las bases de datos, se diseñaron unos cebadores para los extremos 5' y 3' conservados de los genes MASP, cuyos productos de amplificación fueron 90 pb (extremo 5' conservado) y 71 pb (extremo

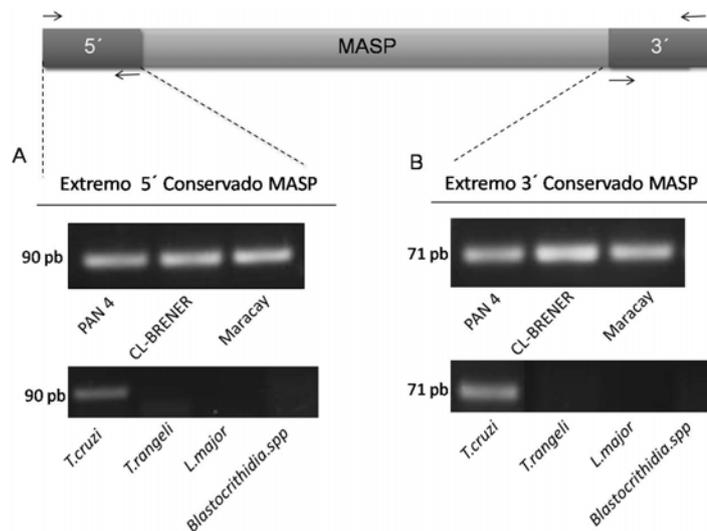
3' conservado) para estudiar si estas características se mantienen constantes entre las diferentes cepas de *T. cruzi*.

Como ya se ha indicado las cepas objeto de estudio fueron PAN 4 (Linaje Tcla/d (Cura C.I *et al.*, enviado), CL-Brener como cepa de referencia (Linaje TcIle (Brener *et al.*, 1963)) y Maracay (Linaje híbrido TcI-II) que poseíamos en nuestro laboratorio y cuyos orígenes geográficos se describen en la Figura 2.2. Al objeto de ratificar que esta familia de proteínas es única de *T. cruzi* y dado que sus extremos de secuencia definen las características básicas la familia MASP, utilizamos los mismos cebadores como marcadores moleculares de la presencia de esta familia en otras especies de kinetoplástitos (*T. rangeli*, *L. major* y *Blastocrithidia. spp*), con el objeto de analizar la posible existencia de estos genes en estas especies pertenecientes al mismo Orden de parásitos.



**Figura 2.2.** Mapa del origen geográfico de las cepas de *T. cruzi* utilizadas para el análisis de los extremos de los genes MASP. Se indica el nombre, linaje y origen geográfico de la cepa.

Como se observa en la Figura 2.3, en todas las cepas de *T. cruzi* ensayadas se obtuvo una única banda del tamaño esperado, probándose que los extremos 5' y 3' se mantienen constantes en *T. cruzi*, mientras que al analizar las otras especies de kinetoplástitos no se obtuvieron productos amplificados, demostrándose así, que dicha familia de genes es específica de *T. cruzi* y que no existe presencia de genes ortólogos en las especies de kinetoplástitos analizadas.

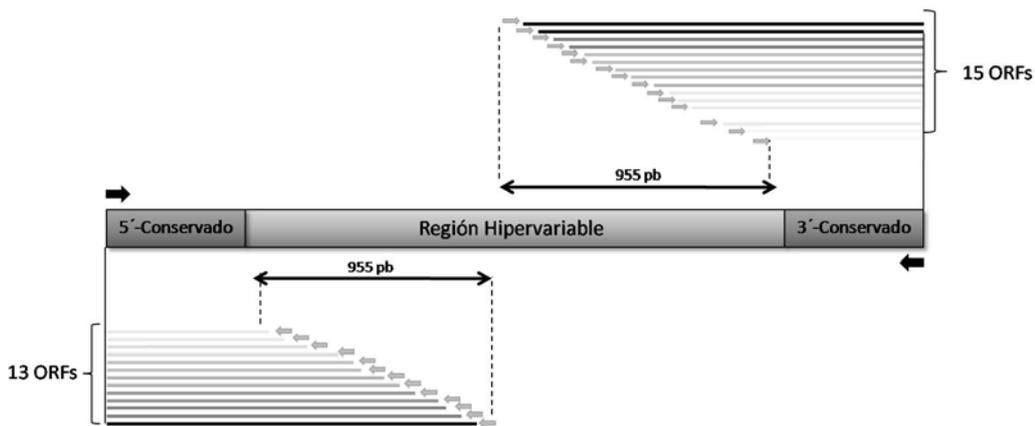


**Figura 2.3.** Electroforesis de agarosa al 2% de los productos de amplificación de los extremos 5' conservado (A) y 3' conservado (B) de los genes MASP en las cepas PAN 4, CL-BRENER y Maracay de *T. cruzi*, así como para las especies de Kinetoplastidos *T. rangeli*, *L. major* y *Blastocrithidia. spp.*

### 2.3. Estudio de la hipervariabilidad de secuencia de la familia MASP en distintas cepas de *T. cruzi* a partir del gen MASP52

Una de las características básicas de esta familia de genes, es la de poseer una región central altamente hipervariable tanto en composición como en la longitud de la secuencia. Para este análisis, se diseñaron dos parejas de cebadores tal y como se describió en material y métodos, estudiándose dicha hipervariabilidad en un total de 22 cepas de *T. cruzi* representativas de todas las unidades discretas de tipificación “DTUs” y haplogrupos existentes dentro de esta especie, y determinados mediante el análisis de regiones intergénicas del “spliced-leader” del RNA de *T. cruzi* (Cura *et al.*, enviado).

De la amplificación mediante estos cebadores se generaron patrones complejos de productos amplificados que corresponden con diferentes Marcos abiertos de lectura (ORFs) generados dentro de la secuencia del gen MASP52 (número de acceso: [XP\\_820015.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/XP_820015.1)), con un rango de longitud de 955 pb para el extremo 5'-HV (desde 134 pb (ORF 1) y 1089 pb (ORF 13)) y de 955 pb para el extremo 3'-HV (entre 132 pb (ORF 1) y 1087 pb (ORF 15)) (Figura 2.4).



**Figura 2.4.** Esquema representativo de la variabilidad de ORFs generados para el extremo 5' y 3' de la MASP52. La flecha negra representa los cebadores MASP-N F y MASP-C R situados en la región MASP conservada, las flechas grises representan a los diferentes lugares de unión de los cebadores MASP-N R y MASP-C F dentro de la zona variable de la MASP52, los cuáles son cepa-dependientes.

Como se observa en la Figura 2.5, el patrón de bandas es ampliamente polimórfico y variable entre cepas, aunque la mayoría de las cepas comparten uno o más ORFs.

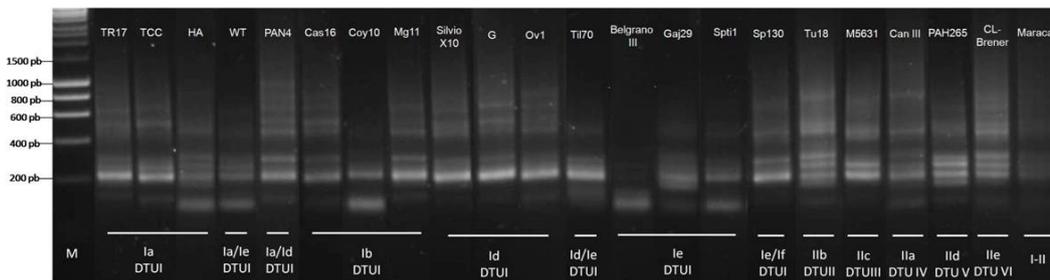
Cuando se comparan bandas individuales, en el caso del extremo 5'-HV, de las 22 cepas 21 poseen el ORF 4 (220 pb aprox), 18 el ORF 8 (460 pb aprox), 12 el ORF 7 (290 pb aprox), 12 el ORF 11 (678 pb aprox) y 12 también el ORF 1 (139 pb aprox). Para el caso del extremo 3'-HV, de las 22 cepas 21 tienen el ORF 3 (200 pb aprox), 12 el ORF 6 (374 pb aprox) 9 tienen el ORF 1 (136 pb aprox). De igual manera se observa la existencia de ORFs cepa-específico, como el ORF 13 de la cepa HA (5'-HV) o el ORF 4 M5621 o el ORF 15 de Tu18 (3'-HV), aunque en algunos de éstos casos la banda se observe de manera tenue.

Cuando se compararon los patrones completos de ORFs entre las diferentes cepas, existen patrones de ORFs muy parecidos para el ensayo de 5'-HV y 3'-HV, posiblemente consecuencia de pertenecer al mismo o semejante haplogrupo y DTU, como ocurre con las cepas TR17 (Ia/DTU I) y TCC (Ia/DTU I) ó CL-Brener (Ie/DTU VI) y Maracay. Obteniéndose patrones semejantes entre las cepas de distinto haplogrupo y DTU como Mg11 (Ib/DTU

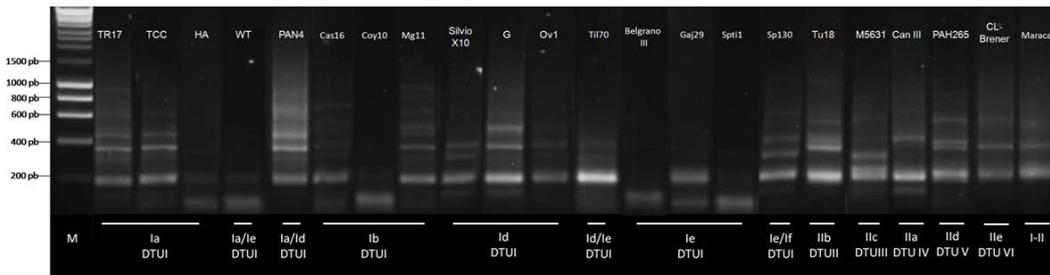
I), M5631 (DTU III/Ilc), Can III (DTU IV/Ila) o PAN4 (Ia/Id/DTU I) y Cas16 (Ib/DTU I) para el extremo 5'-HV. Para el extremo 3'-HV las cepas sp130 y M5631, así como el grupo formado por HA (Ia/DTU I), WT (Ia/Ie/DTU I), Coy10 (Ib/DTU I), Belgrano III (Ie/DTU I) y Spti 1 (Ie/DTU I) que muestran los mismos amplicones.

En todas las cepas excepto HA, WT, Gaj29, Ov1, Spti1, CL-Brener y Maracay, donde existía una divergencia de más del 50 % en el número de ORFs generados, el nivel de variabilidad en la secuencia es bastante semejante en ambos extremos (Tabla 2.1)

A



B



**Figura 2.5.** Electroforesis en geles de Agarosa al 1.5% de los amplicones generados por las 22 cepas de *T. cruzi* ensayadas en el análisis de la hipervariabilidad de los genes MASP. (A) Variabilidad del extremo 5'-HV. (B) Variabilidad del extremo 3'-HV. En la parte de arriba de cada carril del gel se indica el nombre de la cepa y en la parte inferior el haplogrupo y DTU de cada cepa.

**Tabla 2.1.** Tabla en que se describe las características básicas de cada cepa ensayada, así como los ORFs generados para los extremos 5'-HV y 3'-HV.

Cepa	Origen Geográfico	Haplogrupo/DTU	Origen Biológico	Ciclo de Vida	ORFs 5'-HV MASP	ORFs 3'-HV MASP
TR17	Méjico	Ia DTUI	<i>Triatoma sp</i>	Silvestre	2 → 152 pb* 4 → 220 pb 5 → 240 pb 6 → 290 pb 10 → 521 pb 11 → 646 pb	2 → 153 pb ** 3 → 200 pb 5 → 285 pb ** 6 → 341 pb 8 → 435 pb 9 → 487 pb 10 → 618 pb* 11 → 656 pb* 13 → 937 pb *
TCC	Tulahuén Chile	Ia DTUI	Humano	Doméstico ?	2 → 148 pb 4 → 220 pb 5 → 249 pb 6 → 282 pb* 10 → 521 pb 11 → 687 pb	1 → 132 pb* 2 → 157 pb* 3 → 206 pb 5 → 294 pb** 6 → 352 pb 8 → 433 pb 10 → 618 pb *
HA	Casanare, Colombia	Ia DTUI	Humano	Doméstico	1 → 134 pb 4 → 220 pb 5 → 257 pb 7 → 299 pb 8 → 461 pb 13 → 1089 pb*	1 → 136 pb 3 → 200 pb *
WT	IV Región, Chile	Ia/Ie DTUI	Humano	Doméstico	1 → 134 pb 4 → 220 pb 5 → 257 pb 7 → 290 pb 8 → 460 pb* 11 → 666 pb*	1 → 136 pb 3 → 206 pb *
PAN4	Arraiján, Panamá	Ia/Ic DTUI	Humano	Doméstico	1 → 143 pb* 4 → 227 pb 7 → 290 pb 8 → 461 pb 10 → 554 pb 11 → 687 pb 12 → 801 pb 13 → 1024 pb	3 → 206 pb 5 → 294 pb 6 → 433 pb 11 → 656 pb 13 → 909 pb
Cas16	Casanare Colombia	Tc Ib DTUI	<i>Rhodnius prolixus</i>	Peridoméstico	1 → 143 pb**	1 → 136 pb*

					4 → 213 pb 7 → 290 pb 8 → 461 pb 10 → 537 pb 11 → 687 pb* 12 → 801 pb*	3 → 206 pb 7 → 384 pb 9 → 549 pb 11 → 717 pb
<b>Coy 10</b>	Colima Colombia	Ib DTUI	<i>Rhodnius Colombien sis</i>	Selvático	1 → 139 pb 4 → 227 pb 5 → 257 pb**	1 → 144 pb 3 → 212 pb**
<b>Mg11</b>	Magdalena Colombia	Ib DTUI	<i>Rhodnius palescens</i>	Selvático	2 → 157 pb* 3 → 195 pb* 4 → 220 pb 7 → 290 pb 8 → 461 pb 10 → 554 pb* 11 → 687 pb*	1 → 132 pb ** 2 → 162 pb ** 3 → 206 pb 5 → 294 pb 6 → 352 pb 8 → 446 pb 9 → 502 pb 11 → 656 pb* 12 → 832 pb* 14 → 965 pb *
<b>Silvio X10</b>	Pará Brasil	Id DTUI	Humano	Doméstico ?	2 → 152 pb** 4 → 220 pb 7 → 282 pb 8 → 447 pb* 9 → 505 pb* 11 → 666 pb*	2 → 157 pb 3 → 206 pb 5 → 303 pb 6 → 362 pb
<b>G</b>	Región Amazónica Brasil	Id DTUI	<i>Didelphis marsupialis</i>	Selvático?	2 → 152 pb** 4 → 220 pb 7 → 290 pb 8 → 447 pb* 10 → 554 pb 11 → 708 pb	2 → 162 pb 3 → 206 pb 5 → 269 pb 6 → 303 pb 8 → 446 pb ** 9 → 487 pb 11 → 656 pb ** 14 → 965 pb **
<b>Ov1</b>	Sucre Colombia	Id DTUI	<i>Pastrongyl us geniculatus</i>	Peridomést ico	2 → 157 pb** 4 → 227 pb 6 → 282 pb 8 → 475 pb 10 → 571 pb 11 → 708 pb 12 → 852 pb	3 → 212 pb 5 → 303 pb * 6 → 362 pb
<b>Til 70</b>	Región Metropolitana Chile	Id/Ie DTUI	<i>Mepraia spinolai</i>	Selvático	2 → 167 pb** 4 → 227 pb 6 → 290 pb	3 → 212 pb 5 → 303 pb 6 → 373 pb

					8 → 490 pb	
<b>Belgrano III</b>	La Rioja Argentina	Ie DTUI	<i>Triatoma infestans</i>	Doméstico	1 → 139 pb 2 → 213 pb 5 → 257 pb **	1 → 148 pb
<b>Gaj 29</b>	Arica Chile	Ie DTUI	<i>Mepraia gajardoi</i>	Selvático	1 → 134 ** 3 → 183 pb 4 → 213 pb 5 → 249 pb 7 → 290 pb * 8 → 490 pb **	1 → 136 pb 3 → 206 pb
<b>SPTi 1</b>	Región Metropolitana Chile	Ie DTUI	<i>Mepraia spinolai</i>	Selvático	1 → 134 pb 4 → 220 pb 5 → 249 pb 6 → 282 pb 8 → 447 pb 9 → 505 pb	1 → 136 pb 3 → 206 pb **
<b>SP130</b>	IV Región Chile	Tcle/f DTUI	<i>Mepraia spinolae</i>	Selvático	4 → 220 pb 6 → 282 pb 8 → 461 pb 11 → 708 pb *	2 → 172 pb 3 → 218 pb 5 → 312 pb 8 → 408 pb 11 → 637 pb
<b>Tu18</b>	MG Brasil	IIb DTU II	<i>Triatoma infestans</i>	Doméstico	1 → 143 pb * 3 → 189 pb 4 → 213 pb 5 → 265 pb 7 → 309 pb 8 → 461 pb 9 → 521 pb 12 → 801 pb	3 → 218 pb 6 → 352 pb 8 → 420 pb 9 → 549 pb 10 → 618 pb * 15 → 1087 pb**
<b>M5631</b>	PA Brasil	IIc DTU III	<i>Didelphis nomemcinc tus</i>	Doméstico	4 → 227 pb 5 → 265 pb 8 → 461 pb 11 → 753 pb	2 → 172 pb * 3 → 218 pb 4 → 250 pb 5 → 303 pb 8 → 408 pb 9 → 583 pb *
<b>Can III</b>	PA Brasil	IIa DTU IV	Humano	Doméstico	1 → 134 pb * 4 → 227 pb 5 → 265 pb 7 → 309 pb 8 → 475 pb 12 → 852 pb	2 → 167 pb 3 → 212 pb 8 → 408 pb
<b>PAH265</b>	Chaco Argentina	IIId DTU V	?	?	1 → 152 pb *	3 → 225 pb

					3 → 195 pb	6 → 352 pb
					4 → 227 pb	7 → 384 pb
					5 → 273 pb	9 → 565 pb
					6 → 299 pb	11 → 739 pb**
					8 → 461 pb	13 → 883 pb**
					**	
					9 → 505 pb	
					**	
					11 → 753 pb	
					**	
					1 → 143 pb	3 → 218 pb
					**	6 → 362 pb
					4 → 227 pb	9 → 565 pb
					5 → 265 pb	**
<b>CL-BRENER</b>	Rio Grande do Sul, Encruzilhada Brasil	Ile DTU VI	<i>Triatoma infestans</i>	Selvático ?	7 → 299 pb	
					8 → 461 pb	
					9 → 505 pb	
					10 → 589 pb *	
					11 → 687 pb	
					12 → 801 pb *	
					4 → 227 pb	
					5 → 257 pb	
					7 → 299 pb	
					8 → 475	3 → 225 pb
					pb*	6 → 362 pb
<b>Maracay</b>	Maracay Venezuela	I-II? DTU?	Humano	Doméstico	9 → 537	9 → 533 pb **
					pb*	

\* Banda de intensidad débil

\*\*Banda de intensidad muy débil

### 3. Clonación, análisis de (pseudo)genes MASP y expresión de la familia MASP en distintos estadios y cepas de *T. cruzi*

#### 3.1 Estrategia de clonación de (pseudo)genes MASP de la fase tripomastigote metacíclico

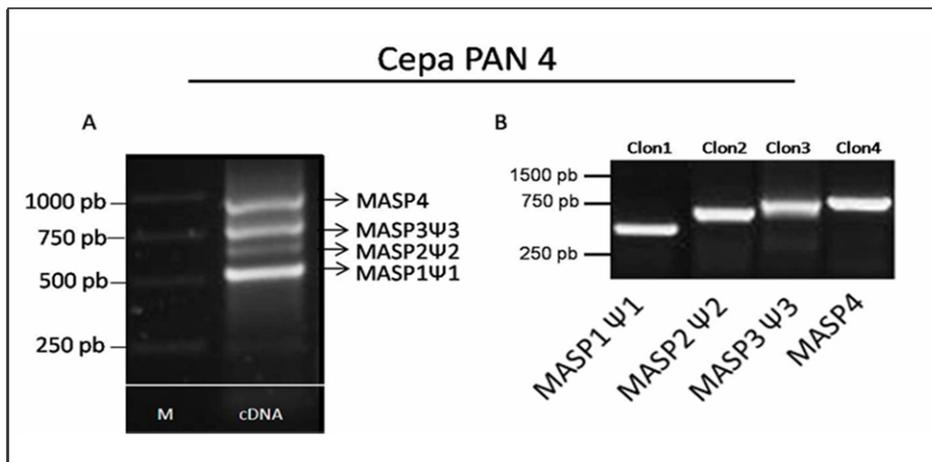
Para la amplificación de los genes MASP completos, se diseñaron cebadores MASP 52 F y MASP2 R que amplificaban desde el extremo 5' al 3'terminal conservados, como ya se explicó en material y métodos. Dado que la familia multigénica MASP se compone de numerosos genes y pseudogenes (1377 y 433 en la cepa CL-Brener ((El-Sayed *et al.*, 2005a)), usamos como molde para la amplificación el cDNA de la fase tripomastigote metacíclico correspondiente a las tres cepas, el cual, además proporciona información

acerca de qué genes son expresados durante este estadio en las cepas ensayadas. Una vez amplificados, los amplicones se insertaron en vectores de clonación pGEM-T Easy, para su posterior secuenciación y análisis.

### 3.2. Clonación de (pseudo)genes MASP del estadio tripomastigote metacíclico en la cepa PAN 4

La cepa PAN 4 es una cepa proveniente de un caso clínico en la provincia de Burunga (Panamá), que en estudios recientes realizados por Cura Cl, *et al* 2010 (datos no publicados) se clasifica como Ia/I<sub>d</sub>, dentro del linaje principal Tc-I. Esta cepa es un híbrido, aislada de un caso clínico humano, en el que debía existir una coinfección con ambos haplotipos.

Como se observa en la Figura 3.1, de los clones obtenidos a partir de los transcritos amplificados, tres de ellos correspondían a Pseudogenes MASP y un único clon a un gen MASP. Los productos los denominamos como MASP1Ψ1 PAN4, MASP2Ψ2 PAN4, MASP3Ψ3 PAN 4 y MASP4 PAN4.



**Figura 3.1.** Electroforesis en gel de agarosa de los amplicones MASP expresados en la fase tripomastigote metacíclico de la cepa PAN4 (A) y de los diferentes insertos clonados en vectores de clonación pGEM-T Easy (B).

Una vez clonados los transcritos, analizamos la secuencia de nucleótidos y aminoácidos utilizando el programa DNA strider para su edición. En verde se señaliza el ATG o codón de inicio y en rojo el TGA o codón de

parada. El marco de lectura abierto tanto para los genes, como para los pseudogenes se señala en gris (secuencia de aminoácidos). Los codones de parada se subrayan en negro y se señalizan con un asterisco, salvo el codón de parada del final de la secuencia que se subraya en fucsia y se señala con tres asteriscos.

**MASPIΨ1 PAN4**

```

ATG GCG ATG ATG ATG ACT GGC CGT GTG CTG CTG GTG TGT GCC CTC TGC GTG CTG TGG TGC
M A M M M T G R V L L V C A L C V L W C
GGT GCC GGC GGT GGC TAC GCG TGG GAT TTA ATG AAC GAT ACG TTG AAT GAA TAT TAT TAT
G A G G G Y A W D L M N D T L N E Y Y Y
GGA GCA GAC GGT GTA TTC TGT AAA ATA TTT CCC AAA ATG TAT TCT TGC GAA TTG AAA ATT
G A D G V F C K I F P K M Y S C E L K I
AAT GCA AGT AAA GCC GCC TTA CTG AAG AAT GCC TCT CAG AGC GGG GAA CTG AGT GGC CAA
N A S K A A L L K N A S Q S G E L S G Q
CCG AAT GCC GGT GGT TCC CCT GGG GGG CAG GAC CAA ACT TTG AAG GAA AAT GGT TCG GAT
P N A G G S P G G Q D Q T L K E N G S D
CAA TCG CAA GGA GAC GCA GGT ACA CAA CCA AAA AAG CCG GGA GAG GGA GGA ACA GAA ACA
Q S Q G D A G T Q P K K P G E G G T E T
CCA ACA CCA GCA ACC CCA CCA GCA ACA GTC ACC GTC GCT CAA ACA AGT GCC ACG AGG GAC
P T P A T P P A T V T V A Q T S A T R D
GCC TGA CGA GAG TGA CGG CAG CAC CGC GGC CTC CCA CAC CAC CTC CCT CTT TTG CTT TCT
A * R E * R Q H R G L P H H L P L L L S
TTT TTT TTG CGT GCG CGG CTG CTA CTG CGG TGG TGG CCG CG TGA
F F L R A R L L L R W W P ? ***
    
```

**MASP2Ψ2 PAN4**

```

ATG GCG ATG ATG ATG ACT GGC CGT GTG CTG CTG GTG TGT GCC CTC TGC GTG CTG TGC TGC
M A M M M T G R V L L V C A L C V L C C
GGT GCC GGC GGA GTT GTA TAC GCG ATG GCG GAC CGC TGC AGT GAA GGT AAC GGG AAT TTA
G A G G V V Y A M A D R C S E G N G N L
TTG ACG CAC ATG AAC AAT TGC AAA AAA AGA GGG AGA TTC AAC ACA AGC ACG AGT GAA TGG
L T H M N N C K K R G R F N T S T S E W
ACA GTC AAG CCC TGA AGA TAC CGT GCC CGT GCA ACA GCT ACA ACT ACC CCA AAG CGA CAC
T V K P * R Y R A R A T A T T P K R H
GAA GTC AAA CAG CAA TTC ACA AAC TGA GGG CAT TGC CTC CAT CAC AGC CAA TTC TCA GAA
E V K Q Q F T N * G H C L H H S Q F S E
TGA AAC ATC TGA CGG CCA TGC AGA AAC AAA GCC ACC ACC CAC GGC AAA CGG TAA TTT TGC
* N I * R P C R N K A T T H G K R * F C
CAA TAA TGA AGC TGA CAA TAG CAC TGA AGA CGG CAT CCC GAA CAG TGA TCC AGC AGT TGA
Q * * S * Q * H * R R H P E Q * S S S *
TGT TGC AAA GAC AAG AGA CGA ACA AAA TGA AAA TAA AGA TGC CAA TCC GAA GGA AAC ACC
C C K D K R R T K * K * R C Q S E G N T
AGT GAC GGC CAC AGC CAT GAA AAA TAC GAC GGC GAC GAC TGG CGA CAG TGA CGG CAG CAC
S D G H S H E K Y D G D D W R Q * R Q H
CGC GGT CTC CCA CAC CAC CTC CCC TCT TTT GCT TCT TGT TTT TGT TGC GTG CCC GGC TGC
R G L P H H L P S F A S C F C C V P G C
TAC TGC GGT GGT GGC CGC G TGA
Y C G G G R ? ***
    
```

**MASP3Ψ3PAN4**

```

ATG GCG ATG ATG ATG ACT GGC CGT GTG CTG CTG GTG TGT GCC CTC TGC GTG CTG TGG TGC
M A M M M T G R V L L V C A L C V L W C
GGT GCC TGG TTG TGT GAT GCG GTG GAG ACT TCA TCG AGT GCT CCG CAT CGT GAC AAT GCG
G A W L C D A V E T S S S A P H R D N A
GAG GAA ACG ACG ACT CCA GAG GAG GTG ACT GAG GCT ATC GAA AAG CTC GCA GAG GGA GTG
E E T T T P E E V T E A I E K L A E G V
    
```

```

CTG GAC ATG ATT CGA GTA TCT TGT CGA ATG TCT TTC ATT ACG AGT GTA AAT GCC ACG TTA
L D M I R V S C R M S F I T S V N A T L
CCC GCG CAC AAC GAT ACA GAA GTT GAG AAA TGC GTA AAC AAA GCG GCG GTT GGG ATT TCC
P A H N D T E V E K C V N K A A V G I S
GGC GTC ACC CCT CGT GGC CGG CCT GCA GCC GCA ACC ACA GAC GCC ACT TTG GCC TCG CCA
G V T P R G R P A A A T T D A T L A S F
TTG CCG TCG TCA AGT TCT GCT GCC AGC GCA TAG CCG GGG CAG GCG CAA GGA TCA CCA GAT
L P S S S S A A S A * P G Q A Q G S P D
GCT GCA CCA GAG CCT GTG AAA CCC CCG CAG ACA GAT CCG GTC AAT AAT GAA CAG CTG TCT
A A P E P V K P P Q T D P V N N E Q L S
GAA ACG CCG GCC TCC ACA GGC GGT GGT CCT GGT GGC GGT GGT GAG TTG GCT GAA AGG AGC
E T P A S T G G G P G G G G E L A E R S
AGC CGT ACA CCG ACC GAC GTC GCA AGA ACA CAT GGA GCA CGC CCA GCT GGT AAC GCC ACT
S R T P T D V A R T H G A R P A G N A T
TCC ACA CCG ACG GAC ACT CAG GGG GAT TTC GAG AAG TCA CCG GCG AAC ACC ACC CGA ACA
S T P T D T Q G D F E K S P A N T T R T
CGT GAG ACA AAC GAG ACT GGT GAC AGT GAC GGC AGC ACC GCG GTC TCC CAC ACC ACC TCC
R E T N E T G D S D G S T A V S H T T S
CCT CTT TTG CTT TTT GTC GCG GCT GCT ACT GCG GTG GTG GCC GCG TGA
P L L L F V A A A T A V V A A ***
    
```

**MASP4 PAN4**

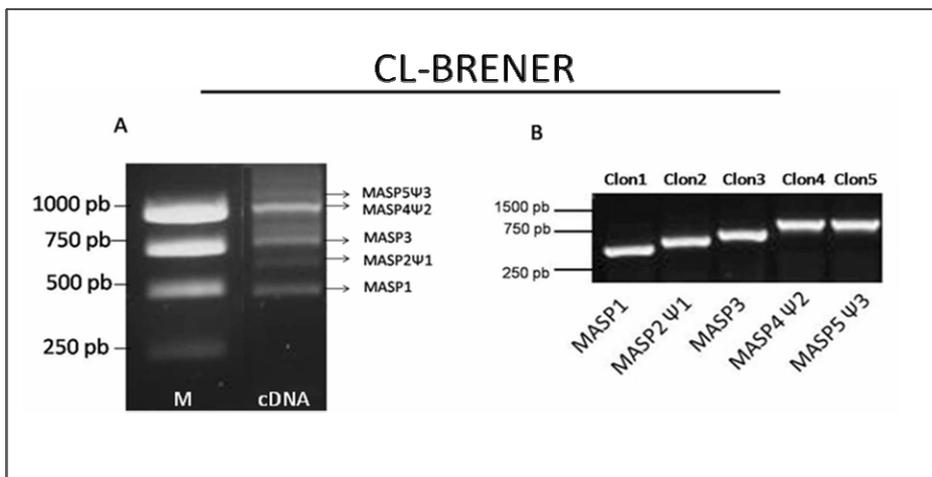
```

ATG GCG ATG ATG ATG ACT GGC CGT GTG CTG CTG GTG TGT GCC CTC TGC GTG CTG TGG TGC
M A M M M T G R V L L V C A L C V L W C
GTT GCC GGC GGT GTT TAT GCG AGG GAC GTC GAC ACC AAC GCA CTG GGT GGC TGC ATG GTG
V A G G V Y A R D V D T N A L Y G C M V
TCG GGA GTG TTG GGA GCG TGT TTC CCC CAC ATG CCT GAC GGA TGT AAT AAA ACT GCG ATT
S G V L G A C F P H M P D G C N K T A I
ACG GTG CCT TTG CCG TCA GTA CTG CCC ATT ACT GCC GTT GCA GCA GCA AAT GAG GAA GTA
T V P L R S V L P I T A V A A A N E E V
AAT AAT ACT TCT CAG CAT CCA AAT AAT TCA GGT TCA GAT ACA AAA AGA GGT TCT GGT GGT
N N T S Q H P N N S G S D T K R G S G G
GGT GGC GGC GGT TCT GCT GCA GCT TCT GCA GCT CCT CCT CCT CCT GGA GGT CCA GGC GCT
G G G S A A A S A A P P P P G G P G A
TCT GTT GGT GCA GGA GGT TCT GGC GCT GGA GGC AGT TCT GTT CCT GGA GGA AGC ATT GGG
S V G A G G S G A G G S S V P G G S I G
ACT TCT ACT GGC GAT CAT GTC ACC GGT GGC GTT TCT TCT GGT TCC TCT GCT GCT TCT CCT
T S T G D H V T G G V S S G S S A A S P
TCT GGT TCA TCT GTT TCT CCT GCT GCT GGC CGA AGT GAT GGT GAG GCG GGG TCC CCA GGC
S G S S V S P A A G R S D G E A G S P G
AGT AAT TCA TCT AAC ACA ACA GGG GGC TCT CAA ACA GGA GAT CAG ACG CCT GCA GCA GCA
S N S S N T T G G S Q T G D Q T P A A A
GCG GCT CAC AGC TCC TCG CCA CCC GAA GGA CCG GCT GAA AAG ACA TCC GGC ACT GGA CAC
A A H S S S P P E G P A E K T S G T G H
AAA GGA CAA GAA GAA AAA GAA GAG GAA GAT CAT GAA AAG CAG CAG CAA AGT GAT GAA GCA
K G Q E E K E E D H E K Q Q S D E A
CAA GTC CAA CAA CAT CAA CAG CAT GAA CAC CCC GCG GAA AAT GGC GAA GAA TTC GCG AAA
Q V Q Q H Q Q H E H P A E N G E E F A K
GAC AAA AAC ACC CTT CGT ACA AAA ATT AAT ACG ACG ACA CCT GGC GAC AGT GAC GGC AGC
D K N T L R T K I N T T T P G D S D G S
ACC GCG GCC TCC CAC GCC GCC TCC CCT CTT TTG CTT CTT CTT GTC GCG GCT GCT ACT GCG
T A A S H A A S P L L L L L V A A A T A
GTG GCC GCG TGA
V A A ***
    
```

Figura 3.2. Secuencias de aminoácidos y nucleótidos de los clones MASPΨ1 PAN4, MASPΨ2 PAN4, MASPΨ3 PAN4 y MASP4.

**3.3. Clonación de (pseudo)genes MASP del estadio tripomastigote metacíclico en la cepa CL-Brener.**

La cepa CL-Brener se clasifica filogenéticamente como linaje Tc-IIe y se utilizó en este trabajo como cepa de referencia ya que fue la cepa escogida para la secuenciación del genoma (El-Sayed *et al.*, 2005a). Debido a la información aportada tras su secuenciación, el estudio con esta cepa permite estudios de genómica comparativa y funcional sobre los genes de dicha cepa. Como se observa en la Figura 3.4, de los clones obtenidos a partir de los transcritos amplificados obtuvimos dos correspondientes a pseudogenes MASP y 3 a genes MASP. Los productos los denominamos como MASP1 CL, MASP2Ψ1 CL, MASP3 CL, MASP4Ψ2 CL y MASP5 CL.



**Figura 3.4.** Gel de Agarosa al 1% de los diferentes insertos de la cepa CL-Brener clonados en vectores de clonación pGEM-T Easy.

Una vez clonados, analizamos la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de los distintos insertos de la cepa CL-Brener utilizando para editarlas, el programa DNA strider. En verde se señala el ATG o codón de inicio y en rojo el TGA o codón de parada. El marco de lectura abierto tanto para los genes, como para los pseudogenes se señala en gris (secuencia de aminoácidos). Los codones de parada se subrayan en negro y se señalizan con un asterisco, salvo el codón de parada del final de la secuencia que se subraya en fucsia y se señala con tres asteriscos.

### MASP1 CL

**ATG** GCG ATG ATG ATG ACT GGC CGT GTG CTG CTG GTG TGT GCC CTC TGC GCG CTG TGG TGC  
**M A M M M T G R V L L V C A L C A L W C**  
 GGT GCC TGC GGT GGC TAC GCG TGG GAT TTT GGC GAA AAA CAA GAG TTG AAT GAA CAT TAT  
**G A C G G Y A W D F G E K Q E L N E H Y**  
 TAT GGA GCA AAC GGT GTA TTC TGT AAA GCC TTT CCC ACA ATG TAT TCT TGC GAA TTG AAA  
**Y G A N G V F C K A F P T M Y S C E L K**  
 ATT AAT GCA AGT AAA CTC AAA GAA GCT GCC TTA CAG AAG AAT ACC GCT CAG AGC GGG ACT  
**I N A S K L K E A A L Q K N T A Q S G T**  
 GGG AGT GGC CAA CCG AAT GCC GGT GGT TCC TCT GGG AGA CAG GCT CAC GGT TCG GAG GAA  
**G S G Q P N A G G S S S G R Q A H G S E E**  
 AGT GGT TTG GGT CAA TCG GAA GGA ACC GCA GGC GAA GGT ACA CCA GAA TTA AAC AAG CCT  
**S G L G Q S E G T A G E G T P E L N K P**  
 GGA GAG GGA GGA ACA GAA ACA CCA ACA CCA CTA TCA TCA CCA CCA ACA GCA ACA GCA ACA  
**G E G G T P T P L S S P P T A T A T**  
 GCC ACC GCC GCT CAA ACA AGT GCT ACG AGG ACG CCT GAC GAG AGT GAC GGC AGC ACC GCG  
**A T A A C Q T S A T R T P D E S D G S T A**  
 CTC TCC CAC ACC TCA CCT CTT TTT CTT CTT CTT GCG TGT GCG GCT GCT ACT GCG  
**L S H T T S P L F L F L L A C A A A T A**  
 GTG GTG GCC GCG **TGA**  
**V V A A \*\*\***

MASP2Ψ1 CL

**ATG** GCG ATG ATG ATG ACT GGC CGT GTG CTG CTG GTG TGT GCC CTC TGC GTG CTG TGC TGC  
**M A M M M T G R V L L V C A L C V L C C**  
 GGT GCC GGC GGA GTT GTA TAC GCG ATG GCG GAC CGC TGC AGT GAA GGT AAC GGG AAT TTA  
**G A G G V V Y A M A D R C S E G N G N L**  
 TTG ACG CAC ATG AAC AAT TGC AAA AAA AGA GGG AGA TTC AAC ACA AGC ACG AGT GAA TGG  
**L T H M N N C K K R G R F N T S T S E W**  
 ACA GTC AAG CCC **TGA** AGA TAC CGT GCC GCA ACA GCT ACA ACT ACC CCA AAG CGA CAC  
**T V K P \* R Y R A R A T A T T T P K R H**  
 GAA GTC AAA CAG CAA TTC ACA AAC **TGA** GGG CAT TGC CTC CAT CAC AGC CAA TTC TCA GAA  
**E V K Q Q F T N \* G H C L H H S Q F S E**  
**TGA** AAC ATC **TGA** CCG CCA TGC AGA AAC AAA GCC ACC ACC CAC GGC AAA CGG **TAA** TTT TGC  
**\* N I \* R P C R N K A T T H G K R \* F C**  
 CAA **TAA TGA** AGC **TGA** CAA **TAG** CAC **TGA** AGA CGG CAT CCC GAA CAG **TGA** TCC AGC AGT **TGA**  
**Q \* \* S \* Q \* H \* R R H P E Q \* S S S \***  
 TGT TGC AAA GAC AAG AGA CGA ACA AAA **TGA** AAA **TAA** AGA TGC CAA TCC GAA GGA AAC ACC  
**C C K D K R R T K \* K \* R C Q S E G N T**  
 AGT GAC GGC CAC AGC CAT GAA AAA TAC GAC GGC GAC GAC TGG CGA CAG **TGA** CGG CAG CAC  
**S D G H S H E K Y D G D D W R Q \* R Q H**  
 CGC GGT CTC CCA CAC CAC CTC CCC TCT TTT GCT TCT TGT TTT TGT TGC GTG CCC GGC TGC  
**R G L P H H L P S F A S C F C C V P G C**  
 TAC TGC GGT GGT GGC CGC G **TGA**  
**Y C G G G R ? \*\*\***

MASP3 CL

**ATG** GCG ATG ATG ATG ACT GGC CGT GTG CTG CTG GTG TGT GCC CTC TGC GTG CTG TGG TGC  
**M A M M M T G R V L L V C A L C V L W C**  
 GGT GCC TGG TTG TGT GAT GCG GCG GAG ACT TCA TCG AGT GCT CCG CAT CGT GAT AAT GCG  
**G A W L C D A A E T S S S A P H R D N A**  
 GAG GAA ACG ACG GCT CCA GAG GAG GTG ACT GAG GCT ATC GAA AAG CTC GCA GAG GGA GTG  
**E E T T A P E E V T E A I E K L A E G V**  
 CTG GAC ATG ATT CGA GTA TCT TGT CGA ATG TCC TTC ATT ACG AGT GTA AAC GCC ACG TTA  
**L D M I R V S C R M S F I T S V N A T L**  
 CCC GCG CAC AAC GAC ACA GAA GTT GAG AAA TGC GTA AAC AAA ACG GCG GTT GAG ATT TCC  
**P A H N D T E V E K C V N K T A V E I S**  
 GGC GTC ACC CCT CGT GGC CGG CCT GCA GCC GCA ACC ACA GAC GCC ACT TTG GCC TCG CCA  
**G V T P R P A A A T T D A T L A S P**  
 TTG CCG TCG CCA AGT TCT GCT ACC AGC GCC TTG CAG GGG CAG GCG CAA GGA TCA CCA GGT  
**L P S P S S A T S A L Q G Q A Q G S P G**  
 GCT GCA CCA GAG CCT GTG AAA CCC CCG CAG ACA GAC CCG GTC AAT AGT GAA CAG CTG TCT  
**A A P E P V K P P Q T D P V N S E Q L S**  
 GAA ACG CCG GCC TTC ACA GGC GGT GGT CCT GGT GGC GGT GGT GAG TTG GCT GAC AGG AGC  
**E T P A F T G G G P G G G G E L A D R S**  
 AGC CGT ACA CCG ACC GAC GTC GCA AGA ACA CAT GAA GCA CGC CCA GCT GGT AAC GCC ACT

S R T P T D V A R T H E A R P A G N A T  
TCC ACA CCG ACG GCC ACT CAG GGG GAT TCC GAG AAG TCA CCG GCG AAC ACC ACC CGA ACA  
S T P T A T Q G D S E K S P A N T T R T  
CGT GAG ACA AAC GAG ACT GGT GAC ACC GAC GGC AGC ACC GCG GTC CTC CAC TCC ACC TCC  
R E T N E T G D T D G S T A V L H S T S  
CCT CTT TTG CTT TTT GTT GCG TGC GCG GCT GCT ACT GCG GTG GTG GCC GCG TGA  
P L L L F V A C A A A T A V V A A \*\*\*

MASP4Ψ2 CL

ATG GCG ATG ATG ATG ACT GGC CGT GTG CTG CTG GTG TGT GCC CTC TGC GTG CTG TGG TGC  
M A M M M T G R V L L V C A L C V L W C  
GGT GCC AGC GGT GTC GGC CGA TGC TGG GGA TTA TGA TGT TTC TTG TGG TCA TGG AAC TTT  
G A S G V G R C W G L \* C F L W S W N F  
GTG CGG AAT TGG AGT TGG TGT TGA CGG TGA ACC CTC CGC CCG GTT GGT AGT CAT GCA TCT  
V R N W S W C \* R \* T L R P V G S H A S  
ACT GGA GGT ACA AAA GGT GAA TGT TTT CAG GGA GGT GGA GGT GAC TCT CCG GGT TCT GCT  
T G G T K G E C F Q G G G D S P G S A  
GCA CCC GCT TGC ACA TCG TCA CCT GCC GAT GCG GAA GAG TCC GAG GGT GGG GCT TTA AAT  
A P A C T S S P A D A E E S E G G A L N  
GGC CCC AAG AAG GAT GTA TCC CGT GTT GAG GAG GAC CCC GAT GCA GCG CAG GAC CCG CTA  
G P K K G D V S R V E E D P D A Q D P L  
CAA CCA GGT CTC ACG TTG TAT CGG CAG CCG AGG TGA TGG CCG CAC AAC CGT GAA GGA AGA  
Q P G L T L Y R Q P R \* W R H N R E G R  
AGT GAC TGG TGT GGA GAG CAG CGA CAC TGC TGA CTT GCC CCC AAC GAG AGC TAC GCA CCA  
S D W C G E Q R H C \* L A P N E S Y A P  
CAA GCA GCA CGA CCG GTG ACG GGG GAG CCG GAA GGC ACA GGG AAA CAG GCA GCA TCG AAG  
Q A A R P V T G E P E G T G K Q A A S K  
GCG TTA TCA ACG CCA GAG GGA GGA GGA ATA TCA GGC GCG ACG GAT CAA AAA GTG GAC  
A L S T P A E G R G I S G A T D Q K V D  
TCA CCA AAG GAG GAA GCC GCG TGC AGC GCA GGT GCC ACA AAC AGT CCG TCA CCT GTC GGT  
S P K E E A T A C S A G A T N S R S P V G  
CAC CAA CAA AAC GAA CCT TCA TCT CCC TCT ACG AGT GGA AGT ACT TCG ACT TTG ACT CCG  
H Q Q N E P S S P S T S G S T S T L T P  
GAA AAG GAA CCC GCT GGG GAG CTC CAT TCC AGC AAT AAC CAG CCA TCT GGT GAC GCG GTA  
E K E P A G E L H S S N N Q P S G D A V  
CCG AAG GAA GGA ACG CAA CAT GAA GGT CTT GCT GGC GGC GAA ACG CAA GTA TAG CCC GCA  
P K E G T Q H E G L A G G E T Q V \* P A  
ACT ACT AAC GAC GAA TCG ATT GGA ACA GCA CCG GCT GGC GAC GGC GAC ATC AGT ACC GTG  
T T N D E S I G T A P A G D G D I S T V  
GCC CCC CAC ACC ACC TCC CCT TTT TGC TCT TGC ATC TTC CTG TGA CGC GTG CCG CTG CTA  
A P H T T S P F C S C I F L \* R V R L L  
CTG CGG TGG TGG CCG CG TGA  
L R W W P ? \*\*\*

MASP5 CL

ATG GCG ATG ATG ATG ACT GGC CGT GTG CTG CTG GTG TGT GCC CTC TGC GTG CTG TGG TGC  
M A M M M T G R V L L V C A L C V L W C  
GGT GCC GGC GGA GGC GAA TGC ACT GAG GTG GTG AAA GCG CCT GCT GAT GGT GCT GGG AGT  
G A G G G E C T E V V K A P A D G A G S  
GGG AGT GAA CCG CTG GTG CAA TCA CAA GAA CTT GGA ACG TCT CCA CAA GGA TCA CAA GAA  
G S E P L V Q S Q E L G T S P Q G S Q E  
TTA AAA GAT GGG GCG CCA GTT GTT AAA AAG GAA GCA CCA CCC GCA CCT CCC ACG CCT TCA  
L K D G A P V V K K E A P P A P P T P S  
TAT GAA GAG GAC GAT GAT GAT GAA GAT AAT GAT GGT AAG GGA GAC GGT GAT GGC CAA GAA  
Y E E D D D D E D N D G K G D G D G Q E  
GAT GAA AGC CCT TCA GAG CGT TTG GAA GAA ACC GTG GAA GAT GCT GCA GGA AAA GAA AAA  
D E S P S E R L E E T V E D A A G K E K  
ACA AAG ACG CAA TTA CAA AAT AAA GAA CAG GAA GTA AGG TAA CCG CCA AAA TCG CAA GTA  
T K T Q L Q N K E Q E V R \* P P K S Q V  
CAT GTA CTA CAG CAA CCG CAG TCA CAA ACG CAA CTG CAG CCG CAG CCA CAC ACT CCT GCT  
H V L Q Q P Q S Q T Q Q P Q P H T P A  
TCA GAA GAG GGT GAA GGT GTT GGC GAG AAC AAT GCG GGT GGA GCA GGT CAG CCC TCA TTG  
S E E G E G V G E N N A G G A G Q P S L  
GGA GTA GAA AAT AAA GGA AAC GCG GAT TCA AGG GCC CTC GGG AAA GGA GAC TCA TTA AAG  
G V E N K G N A D S R A L G K G D S L R

```

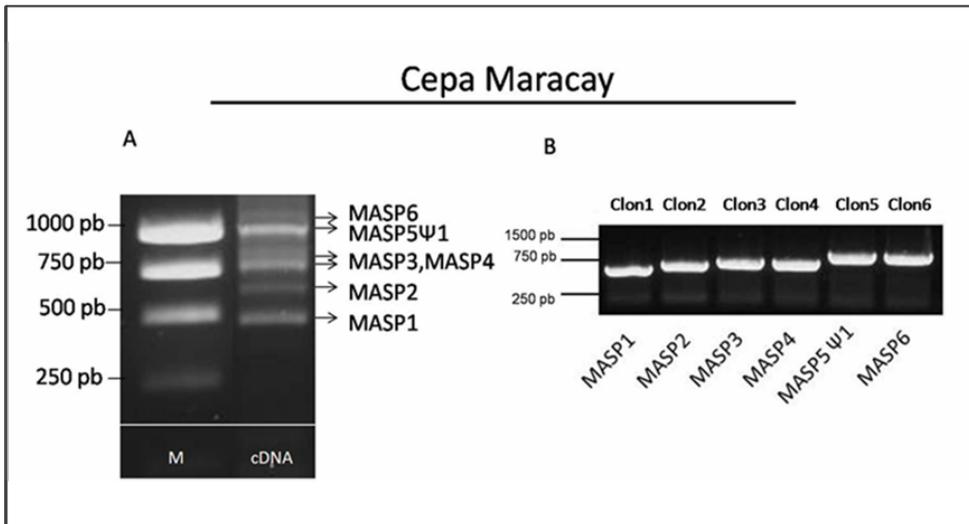
GGT CCA GGT AAA GAA TCA GAA AGC AGT GAA CCG GTC CAA ACG ACG GTG CCA AAC ACA GTA
G P G K E S E S S E P V Q T T V P N T V
CCG CCG GAG CAC AAA ACT AAA AAT GAA ATG TTA ACT CCG GAA CAA AAG ACG AAT GAA GAC
P P E H K T K N E M L T P E Q K T N E S
CAA AGC ACG GAT ACA TCC ACG AAC CTA CCC GAA CTA CAA AAG GAA AAT AAA GAA TAT CCT
Q S T D T S T N L P E L Q K E N K E Y P
GCC TCT ACG GAA GGT GCG GTG CAG AGT ACA TCA ACT GGC ATT CAA GAA CAA GAA GCT GAA
A S T E G A V Q S T S T G I Q E Q E A E
CCA TCT ACA AGC GAA GAA CCT TCC CGT TTT GAG GAA GAA CAC TCC ACA GGG ACG AAG ACA
P S T S E E P S R F E E E H S T G T K T
ACC GAG GAT GCT CGA ACT CCG GAT GCT GCA GCG ACA GAA AAA CGC CAA ACT GGA GAT AAT
T E D A R T P D A A A T E K R Q T G D N
GAA AAG GTT GGC GAC AGT GAC GGC AGC ACC GCG GTC TCC CAC ACC TCC TCC CCT CTT TTG
E K V G D S D G S T A V S H T S S P L L
CTT CTT CTT GTA GCA TGC GCG TGT GCT ACT GCG GTG GTG GCC GCG TGA
L L L V A C A C A T A V V A A ***
    
```

**Figura 3.5.** Secuencias de aminoácidos y nucleótidos para los clones MASP1 CL, MASP2 Ψ1 CL, MASP3 CL, MASP4 Ψ2 CL y MASP5 Ψ3 CL.

### 3.4. Clonación de (pseudo)genes MASP del estadio tripomastigote metacíclico en la cepa Maracay

Esta cepa ha sido recientemente caracterizada por el Dr.A.G. Schijman como un híbrido TcI-TcII, siendo aislada de un caso clínico humano, encontrándose más cerca del linaje tipo II.

Como se observa en la Figura 3.6, de los clones obtenidos a partir de los transcritos amplificados, obtuvimos 5 genes MASP y 1 único pseudogen MASP. Los productos los denominamos como MASP1 Maracay, MASP2 Maracay, MASP3 Maracay, MASP4 Maracay, MASP5 Maracay MASP6 Ψ1.



**Figura 3.6.** Electroforesis en gel de Agarosa al 1% de los diferentes insertos de la cepa Maracay clonados en vectores de clonación pGEM-T Easy.

Una vez clonados los transcritos, analizamos la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de los distintos insertos de la cepa Maracay, utilizando para editarlas el programa DNA strider. En verde se señala el ATG o codón de inicio y en rojo el TGA o codón de parada. El marco de lectura abierto tanto para los genes, como para los pseudogenes se señala en gris (secuencia de aminoácidos). Los codones de parada se subrayan en negro y se señalizan con un asterisco, salvo el codón de parada del final de la secuencia que se subraya en fucsia y se señala con tres asteriscos.

**MASPI MARACAY**

```

ATG GCG ATG ATG ATG ACT GGC CGT GTG CTG CTG GTG TGT GCC CTC TGC GTG CTG TGG TGC
M A M M M T G R V L L V C A L C V L W C
GGT GCC GGC GGT GGC TAC GCG TGG GAT TTT GGC AGC GAC GGC GAA TCG TTG AAT GAA TAT
G A G G G Y A W D F G S D G E S L N E Y
TAT TAC GGC GCA TAC GGT GTA TAC TGT AAT GCT TCC CTC AAC GCT ACT TTT TGC GAA GAA
Y Y G A Y G V Y C N A S L N A T F C E E
AAG AGA AAA GCA ATT AAA CTC AAA GAA GCC GCC CTA CAG AAG AAT ACC GCT CGG AGC GGG
K R K A I K L K E A A L Q K N T A R S G
GAA GGG AGC GGC CAA CCG AAT GCC GGT GGT TCC TCT GGG AGA CAG GCT CAC GGT TCG GAG
E G S G Q P N A G G S S G R Q A H G S E
GAA AGT GGT TCG GGT CAA TCG GAA GGA ACC GCA GGC GAA GGT ACA CCA GAA TTA AAC AAG
E S G S G Q S E G T A G E G T P E L N K
CCT GGA GAG GGA GGA ACA GAA ACA CCA ACA CCA CTA TCA TCA CCA CCA CCA ACA GCA ACA
P G E G G T E T P T P L S S P P P T A T
GTC ACC GCC GCT CAA ACA AGT GCC ACG AGG ACG CCT GAC GAG AGT GAC GGC AGC CCC GCG
V T A A Q T S A T R T P D E S D G S P A
GCC TCC CAC ACC ACC TCA CCT CTT CTG CTT TTT CTT ATT GTG TGC GCG GCT GCT ACT GCG
A S H T T S P L L L F L I V C A A A T A
GTG GTG GCC GCG TGA ***
V V A A
    
```

**MASP2 MARACAY**

```

ATG GCG ATG ATG ATG ACT GGC CGT GTG CTG CTG GTG TGT GCC CTC TGC GTG CTG TGG TGC
M A M M M T G R V L L V C A L C V L W C
GGT GCC GGC GGT GGC GAC GCG TGG GAT TTC AAC AAC GAT TCG TTG AAT GAA TAT TAT TAC
G A G G G D A W D F N N D S L N E Y Y Y
GGC GCA TAC GGT GTA TAC TGT AAT GCT TCC CTC AAC GCT ACT TTT TGC GAA GAA AAA AGA
G A Y G V Y C N A S L N A T F C E E K R
AAT GCA AGT AAA AGA GAA AAA GCT CCC TCA CAG GCG GAT GAT GAC TCT CGG AGA GAC AAT
N A S K R E K A P S Q A D D D S R R D N
GGC AGT GGT CAA CCG AAT GCC GGT GGT TCC TCT GGG GGG CAG GAA CAA ACC TCG GAG AAG
G S G Q P N A G G S S G G Q E Q T S E K
AAT GGT TCT GAT CAA TCG GGA GGA GCC ACA GGT ACA CAA CTA CAA AAG CCG GGA GAG GGA
N G S D Q S G G A T G T Q L Q K P G E G
GGA ACA GAA ACA CCA ACA CCA ACG GTC ACC GCT GCT CAT TCT GCT GAT GGT CAG GAC AAC
G T E T P T P T V T A A H S A D G Q D N
AAT TCG GAG GAA AGT CAT TTG GGT CAA CCG GAA GGA ACT GCA GGC GAA GGT ACA CAG GCA
N S E E S H L G Q P E G T A G E G T Q A
TCA CAG CCG CCG GGA GAG GGA GGA ACA GAA ACA CCA ACA CCA GCA ACA GTC ACC GCC GCT
S Q P P G E G G T E T P T P A T V T A A
CAA ACA AGT GCC ACG AGG ACG CCT GAC GAG AGT GAC GGC AGC ACC GCG GCC TCT CAC ACC
Q T S A T R T P D E S D G S T A A S H T
ACC TCC CCT CTT TTT CTT TTT CTT CTT GCG TGT GCG GCT GCT ACT GCG GTG GTG GCC GCG
    
```

T S P L F L F L L A C A A A T A V V A A  
 TGA  
 \*\*\*

**MASP3 MARACAY**

ATG GCG ATG ATG ATG ACT GGC CGT GTG CTG CTG GTG TGT GCC CTC TGC GTG CTG TGG TGC  
 M A M M M T G R V L L V C A L C V L W C  
 GGT GCC TGG TTG TGT GAT GCG GCG GAG ACT TCA TCG AGT GCT CCG CAT CGT GAT AAT GCG  
 G A W L C D A A E T S S S A P H R D N A  
 GAG GAA ACG ACG ACT CCA GAG GAG GTG ACT GAG GCT ATC GAA AAG CTC GCA GAG GGA GTG  
 E E T T T P E E V T E A I E K L A E G V  
 CTG GAC ATG ATT CGA GTA TCT TGT CGA ATG TCC TTC ATT ACG AGT GTA AAC GCC ACG TTA  
 L D M I R V S C R M S F I T S V N A T L  
 CCC GCG CAC AAC GAC ACA GAA GTT GAG AAA TGC GTA AAC AAA ACG GCG GTT GAG ATT TCC  
 P A H N D T E V E K C V N K T A V E I S  
 GGC GTC ACC CCT CGT GGC CGG CCT GCA GCC GCA ACC ACA GAC GCC ACT TTG GCC TCG CCA  
 G V T P R G R P A A A T T D A T L A S P  
 TTG CCG TCG TCA AGT TCT GCT ACC AGC GCC TTG CAG GGG CAG GCG CAA GGA TCA CCG GGT  
 L P S S S S A T S A L Q G Q A Q G S P G  
 GCT GCA CCA GAG CCT GTG AAA CCC CCG CAG ACA GAT TCA GTC AAT ACC GAA CAG CTG TCT  
 A A P E P V K P P Q T D S V N T E Q L S  
 GAA ACG CCG GCC TCC ACA GGC GGT GGT GAG TTG GCT GAC AGG AGC AGC CAT ACA CCG ACC  
 E T P A S T G G G E L A D R S S H T P T  
 GAC GTC GCA AGA ACA CAT GAA GCA CGC CCA GCT GGT AAC GCA ACT TCC ACA CCG ACG GCC  
 D V A R T H E A R P A G N A T S T P T A  
 ACT CGG GGA GAT TCC GAG AAG TCA CCG GCG ATC ACC ACC CGA ACA CGT GAG ACA AAC GAG  
 T R G D S E K S P A I T T R T R E T N E  
 ACT GGC GAC AGT GAC GGC AGC ACC GCG GTC TCC CAC AGC ACC TCC CCT CTT TTG CTT TTT  
 T G D S D G S T A V S H S T S P L L L F  
 GTT GTG TGC GCG GCT GCT ACT GCG GTG GTG GCC GCG TGA  
 V V C A A A T A V V A A \*\*\*

**MASP4 MARACAY**

ATG GCG ATG ATG ATG ACT GGC CGT GTG CTG CTG GTG TGT GCC CTC TGC GTG CTG TGG TGC  
 M A M M M T G R V L L V C A L C V L W C  
 GGT GCC TGG TTG TGT GAT GCG GCG GAG ACT TCA TCG AGT GCT CCG CAT CGT GAT AAT GCG  
 G A W L C D A A E T S S S A P H R D N A  
 GAG GAA ACG ACG ACT CCA GAG GAG GTG ACT GAG GCT ATC GAA AAG CTC GCA GAG GGA GTG  
 E E T T T P E E V T E A I E K L A E G V  
 CTG GAC ATG ATT CGA GTA TCT TGT CGA ATG TCC TTC ATT ACG AGT GTA AAT GCC ACG TTA  
 L D M I R V S C R M S F I T S V N A T L  
 CCC GCG CAC AAC GAC ACA GAA GTT GAG AAA TGC GTA AAC AAA ACG GCG GTT GAG ATC TCC  
 P A H N D T E V E K C V N K T A V E I S  
 GGC GTC ACC CCT CGT GGC CGG CCT GCA GCC GCA ACC ACA GAC GCC ACT TTG GCC TCG CCA  
 G V T P R G R P A A A T T D A T L A S P  
 TTG CCG TCG TCA AGT TCT GCT ACC AGC GCC TTG CAG GGG CAG GCG CAA GGA TCA CCG GGT  
 L P S S S S A T S A L Q G Q A Q G S P G  
 GCT GCA CCA GAG CCT GTG AAA CCC CCG CAG ACA GAT TCA GTC AAT ACC GAA CAG CTG TCT  
 A A P E P V K P P Q T D S V N T E Q L S  
 GAA ACG CCG GCC TCC ACA GGC GGT GGT GAG TTG GCT GAC AGG AGC AGC CAT ACA CCG ACC  
 E T P A S T G G G E L A D R S S H T P T  
 GAC GTC GCA AGA ACA CAT GAA GCA CGC CCA GCT GGT AAC GCA ACT TCC ACA CCG ACG GCC  
 D V A R T H E A R P A G N A T S T P T A  
 ACT CGG GGA GAT TCC GAG AAG TCA CCG GCG ATC ACC ACC CGA ACA CGT GAG ACA AAC GAG  
 T R G D S E K S P A I T T R T R E T N E  
 ACT GGC GAC AGT GAC GGC AGC ACC GCG GTC TCC CAC AGC ACC TCC CTC TTT GCT TCT TGT  
 T G D S D G S T A V S H S T S P L L L F  
 TAT TGT GCG TGC GGC GCT GCT ACT GCG GTG GTG GCC GCG TGA  
 Y C A C G A A T A V V A A \*\*\*

**MASP5 Ψ1 MARACAY**

ATG GCG ATG ATG ATG ACT GGC CGT GTG CTG CTG GTG TGT GCC CTC TGC GTG CTG TGG TGC  
 M A M M M T A R V L L V C A L C V L W C  
 GGT GCC AGC GGG TGT CGG CCG ATG CTG GGG ATT ATG ATG TTT CTT GTG GTC ATG GAG CTT

G	A	S	G	C	R	P	M	L	G	I	M	M	F	L	V	V	M	E	L
TGT	GCG	GAA	TTG	GTG	TTG	GTG	TTG	ACG	GTG	AAC	CCT	CCG	CCC	GGT	TGG	TAG	TCA	TGC	GTC
C	A	E	L	V	L	V	L	T	V	N	P	P	P	G	W	*	S	C	V
TAC	TGG	AGG	TAC	AAA	GGG	TGA	ATG	TTT	TCA	GGG	AGG	TGG	AGG	TGA	CTC	TCC	GGG	TTC	TGC
Y	W	R	Y	K	G	*	M	F	S	G	R	W	R	*	L	S	G	F	C
TAC	ACC	CGC	TTG	CAC	ATC	GTC	ACC	TGC	CGA	TGC	GGA	AGA	GTC	CGA	GGG	TGG	GGC	TTT	AAA
Y	T	R	L	H	I	V	T	C	R	C	G	R	V	R	G	W	G	F	K
TGG	CCC	CAA	GAA	GGA	TGT	ATC	CCG	TGT	TGA	GGA	GGA	CCC	CGA	TGC	AGC	GCA	GGA	CCC	GCT
W	P	Q	E	G	C	I	P	C	*	G	G	P	R	C	S	A	G	P	A
ACA	ACC	AGG	TCT	CAC	GTT	GTA	TCG	GCA	GCC	GAG	GTG	ATG	GCG	GCA	CAA	CCG	TGA	AGG	AAG
T	T	R	S	H	V	V	S	A	A	E	V	M	A	A	Q	P	*	R	K
AAG	TGA	CTG	GTG	TGG	AGA	GCA	GCG	ACA	CTG	CTG	ACT	TGC	CCC	CAA	CGA	GAG	CCA	CGC	ACC
K	*	L	V	W	R	A	A	T	L	L	T	C	P	Q	R	E	P	R	T
ACA	AGC	AGC	ACG	AGG	GGT	GAC	GGG	GGA	ACC	GGA	AGG	CAC	AGG	GAA	ACA	GGC	AGC	ATC	GAA
T	S	S	T	T	G	D	G	G	T	G	R	H	R	E	T	G	S	I	E
GGC	GTT	ATC	AAC	GCC	AGC	AGA	GGG	ACG	AGG	GAT	ATC	AGG	CGC	GAC	GGA	TCA	AAA	AGT	GGA
G	V	I	N	A	S	R	G	T	R	D	I	R	R	D	G	S	K	S	G
CTC	ACC	AAA	GGA	GGA	AGC	CGC	GTG	CAG	CGC	AGG	TGC	CAC	AAA	CAG	TCG	GTC	ACC	TGT	CGG
L	T	K	G	G	S	R	V	Q	R	R	C	H	K	Q	S	V	T	C	R
TCA	CCA	ACA	AAC	CGA	ACC	TTC	ATC	TCC	CTC	TAC	GAG	TGG	AAG	TAC	TTC	GAC	TTT	GAC	TCC
S	P	T	N	R	T	F	I	S	L	Y	E	W	K	Y	F	D	F	D	S
GGA	ACA	GGA	ACC	CGC	TGG	GGA	GCT	CCA	TTC	CAG	CAA	TAA	CCA	GCC	TTC	TGG	TGA	CGC	GGT
G	T	G	T	R	W	G	A	P	F	Q	Q	*	P	A	F	W	*	R	G
ACC	GAA	GGA	AGG	AAC	GCA	ACA	TGA	AGG	TCT	TGC	TGG	CGG	CGA	AAC	GCA	AGT	ATA	GCC	CGC
T	E	G	R	N	A	T	*	R	S	C	W	R	R	N	A	S	I	A	R
AGC	TAC	TAA	CGA	CGA	ATC	GAT	TGG	AAC	AGC	ACC	AAC	TGG	CGA	CGG	CGA	CAT	CAG	TAC	CGT
S	Y	*	R	R	I	D	W	N	S	T	N	W	R	R	R	H	Q	Y	R
GGC	CCC	CCA	CAC	CAC	CTC	CCC	TTT	TTG	CTC	TTG	CAT	CTT	CCT	GTG	ACG	CGC	GCG	GCT	GCT
G	P	P	H	H	L	P	F	L	L	L	H	L	P	V	T	R	A	A	A
ACT	GCG	GTG	GTG	GCC	GCG	TGA													
T	A	V	V	A	A	***													

MASP6 MARACAY

ATG	GCG	ATG	ATG	ACT	GGC	CGT	GTG	CTG	CTG	GTG	TGT	GCC	CTC	TGC	GTG	CTG	TGG	TGC	
M	A	M	M	M	T	G	R	V	L	L	V	C	A	L	C	V	L	W	C
GGT	GCT	GGC	GGT	GTT	GTG	AAT	GGT	GTT	GGG	GGT	ATC	GAT	GGC	TTA	AGT	GAA	GTT	CCT	TCT
G	A	G	G	V	N	G	V	G	G	I	D	G	L	S	E	V	P	S	
TCT	GGT	GTT	CCA	TCA	AGT	TCA	TCT	TCC	AAT	CCC	AAT	GGG	AAT	GAT	CTT	TCA	AAG	ACC	CTC
S	G	V	P	S	S	S	S	N	P	N	G	N	D	L	S	K	T	L	
AGC	AAT	ACG	CCA	TCC	ATT	CAG	AAC	GGG	GAA	TCC	TCG	GAA	AAA	GGT	GAG	CCG	TCT	GGA	AAA
S	N	T	P	S	I	Q	N	G	E	S	S	E	K	G	E	P	S	G	K
AAA	TCT	CCA	GGG	CCC	GTG	TCC	CCA	AGC	GGG	CAG	ACA	GGA	GAG	GTG	TCA	AAG	CTC	GAA	GAA
K	S	P	G	P	V	S	P	S	G	Q	T	G	E	V	S	K	L	E	E
AAG	TTA	CGC	GCC	TCC	GAT	ACA	CAA	GAA	GAA	GCA	GAA	ACA	TCA	GTT	GCT	GGT	AAG	GAC	ACA
K	L	R	A	S	D	T	Q	E	E	A	E	T	S	V	A	G	K	D	T
ACT	AAA	GCT	GAG	AGG	ACG	CAG	AGT	GAC	ATG	AAG	ACG	GAC	GGC	TCT	TCC	AAC	ACG	TTG	TCC
T	K	A	E	R	T	Q	S	D	M	K	T	D	G	S	S	N	T	L	S
ACC	GCC	GCC	AAG	TCG	AAA	GTA	CAA	TCA	CCA	CCA	CCA	CCA	CCA	CCA	GTA	AAA	CCA	CCA	
T	A	A	K	S	K	V	Q	S	P	P	P	P	P	P	P	V	K	P	P
ACG	GCA	GAA	GAA	CAG	CAG	CCA	AAC	ACA	GCA	CCA	AAA	GAC	CCA	CGC	ACG	GCA	ACA	GAA	GAA
T	A	E	E	Q	Q	P	N	T	A	P	K	D	P	R	T	A	T	E	E
AAA	TAC	GAA	ATG	CCA	ACT	TCA	GCA	ACC	AAA	ACA	AAT	CCC	GAC	ACA	CCT	AAA	ACG	TCT	TTA
K	Y	E	M	P	T	S	A	T	K	T	N	P	D	T	P	K	T	S	L
AAG	GAT	GGC	ATG	GCA	GAC	CGA	CAC	GGT	CAC	GAC	GCA	ACC	ACA	ACG	GTT	TTG	GTC	AAA	AAT
K	D	G	M	A	D	R	H	G	H	D	A	T	T	T	V	L	V	K	N
GCA	GCT	ACC	GGC	AAT	TCA	GCG	GAA	AGA	AAA	TCA	CCA	TCC	ATC	TCC	ACA	AAT	GAC	AGT	GAC
A	A	T	G	N	S	A	E	R	K	S	P	S	I	S	T	N	D	S	D
GAT	GCC	CAA	AGT	ACG	GGG	GAT	GAG	AAC	AAT	GAC	GAT	GAT	CCA	CGG	CCT	AAC	CAC	AAA	GAA
D	A	Q	S	T	G	D	E	N	E	D	D	D	P	R	P	N	H	K	E
ACA	GGT	GAC	CAC	AAA	GCT	GCC	AAT	ACC	AAA	GTC	GGT	TCT	ACA	CCC	AGT	GAG	ACA	GCA	ACA
T	G	D	H	K	A	A	N	T	K	V	G	S	T	P	S	E	T	A	T
CAA	ACC	GTA	AAA	ACA	GAA	ACA	GTA	CCG	TCG	CTC	AAA	AAA	AAT	GAT	ACG	GCG	ACA	AGT	GGC
Q	T	V	K	T	E	T	V	P	S	L	K	K	N	D	T	A	T	S	G
GAC	AGT	GAA	GGC	AGC	CCC	GCG	GCC	TCC	CAC	ACC	TCC	CCT	CTT	TTG	CTT	CTT	CTT	GTT	
D	S	E	G	S	P	A	A	S	H	T	T	S	P	L	L	L	L	L	V
GTT	GCG	GCC	GCG	GCT	GCT	ACT	GCG	GTG	GTG	GCC	GCG	TGA							
V	A	A	A	A	A	T	A	V	V	A	A	***							

**Figura 3.6.** Secuencias de aminoácidos y nucleótidos para los clones MASP1 Maracay, MASP2 Maracay, MASP3 Maracay, MASP4 Maracay, MASP5  $\Psi$ 1 Maracay y MASP6 Maracay.

### 3.5. Análisis de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de los (pseudo)genes MASP

Para analizar la homología e identidad de las secuencias clonadas con respecto a las secuencias depositadas del genoma de la cepa CL-Brener de *T. cruzi*, utilizamos el programa BLAST de la base de datos de NCBI. De esta manera, se determinó la variación en las secuencias entre las tres cepas utilizadas y sus correspondientes (pseudo) genes parálogos en CL-Brener. Las características básicas de los (pseudo) genes clonados se resumen en la tabla 3.1, 3.2 y 3.3, donde además se analiza la identidad y cobertura de secuencia de estos con respecto a la secuencia con mayor puntuación en el genoma para el programa BLAST.

**Tabla 3.1.** Características básicas de las secuencias obtenidas a partir de los clones de la cepa PAN 4.

Cepa PAN 4	Nº pares de Bases	Nº aminoácidos	Nº acceso gen con mayor puntuación BLAST	Identidad	Cobertura de Secuencia
MASP1 $\Psi$ 1	519 pb	141 aa (stop)	<a href="#">XM_805960.1</a>	100%	84%
MASP2 $\Psi$ 2	619 pb	64 aa (Stop)	<a href="#">XM_813918.1</a>	100%	98%
MASP3 $\Psi$ 3	761 pb	130 aa (Stop)	<a href="#">XM_816613.1</a>	95%	95%
MASP 4	904 pb	301 aa	<a href="#">XM_814817.1</a>	84%	97%

**Tabla 3.2.** Características básicas de las secuencias obtenidas a partir de los clones de la cepa CL-Brener

Cepa CL-Brener	Nº pares de Bases	Nº aminoácidos	Nº acceso gen con mayor puntuación BLAST	Identidad	Cobertura de Secuencia
MASP1	552 pb	184 aa	<a href="#">XM_805960.1</a>	100%	91%
MASP2 $\Psi$ 1	619 pb	64 aa (Stop)	<a href="#">XM_813918.1</a>	100%	98%
MASP3	771 pb	257 aa	<a href="#">XM_801872.1</a>	100%	94%
MASP4 $\Psi$ 2	977 pb	31 aa (Stop)	<a href="#">XM_805680.1</a>	90%	86%
MASP5 $\Psi$ 3	1065 pb	133 aa (Stop)	<a href="#">XM_806639.1</a>	100%	98%

**Tabla 3.3.** Características básicas de las secuencias obtenidas a partir de los clones de la cepa Maracay

Cepa Maracay	Nº pares de Bases	Nº aminoácidos	Nº acceso gen con mayor puntuación BLAST	Identidad	Cobertura de Secuencia
MASP1	552 pb	184 aa	<a href="#">XM_806608.1</a>	100%	99%
MASP2	660 pb	220 aa	<a href="#">XM_815706.1</a>	100%	99%

MASP3	755 pb	251 aa	XM 801872.1	100%	99%
MASP4	759 pb	253 aa	XM 801872.1	100%	99%
MASP5 Ψ1	978 pb	56 aa(Stop)	XM 805680.1	90%	86%
MASP6	996 pb	332 aa	XM 799236.1	100%	99%

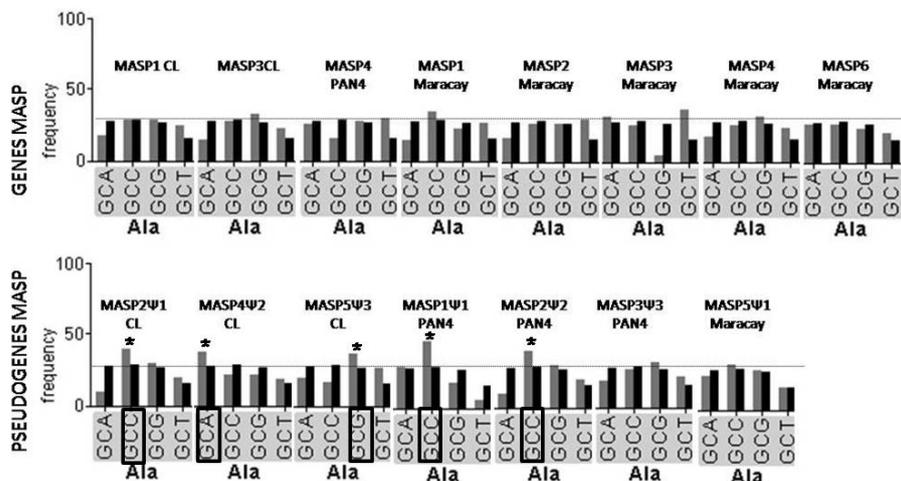
La cepa más divergente en comparación con las secuencias del genoma depositadas en las bases de datos fue PAN 4 que poseía una media de un 94.7% de identidad en sus secuencias, siendo para CL-Brener del 98% y para Maracay del 98.3%.

### 3.6. Análisis diferencial de las secuencias de genes y pseudogenes MASP

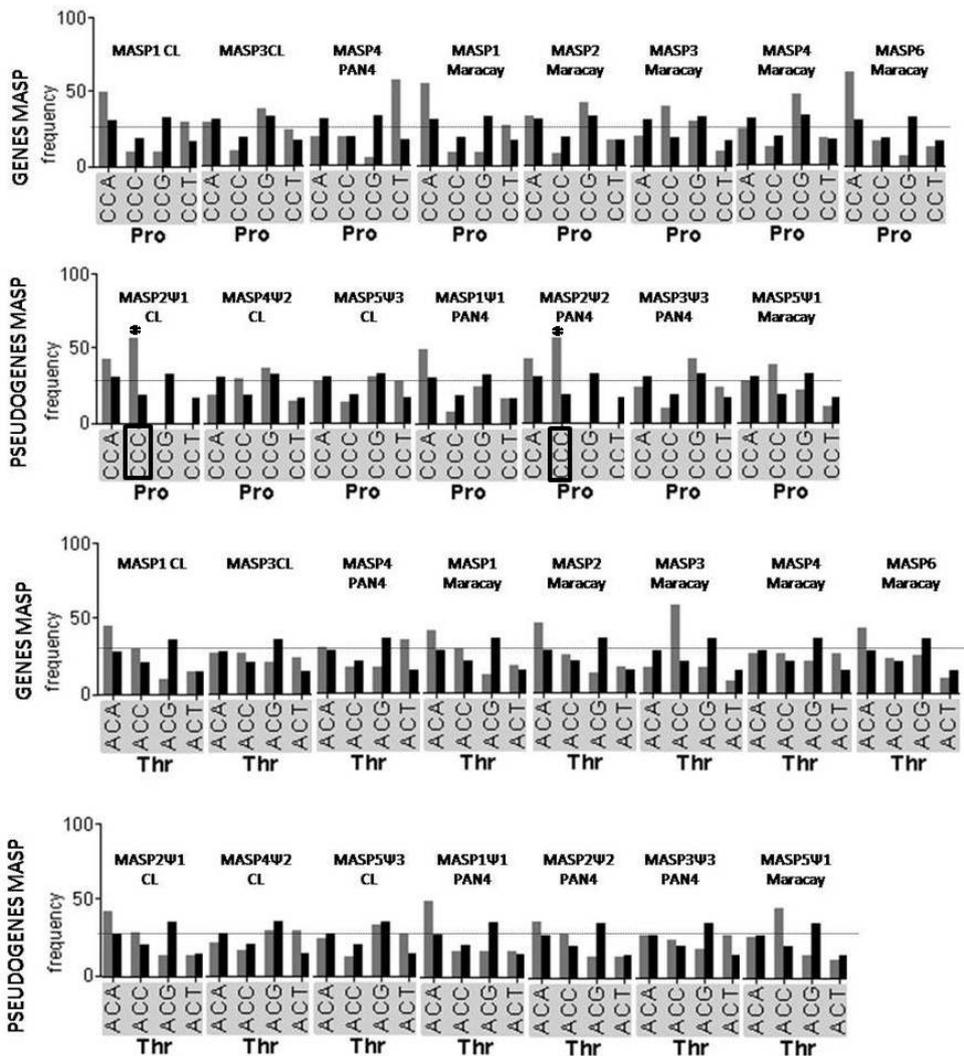
Para determinar diferencias nucleotídicas entre las secuencias de las distintas cepas y entre genes y pseudogenes, se utilizaron los programas “infoseq” y “gcu 2.0” para comparar los contenidos en G+C de las secuencias, así como la frecuencia de uso de los codones de cada aminoácido en comparación con las secuencias extrapoladas del genoma de *T. cruzi*.

Como resultado, se obtuvo un contenido medio de G+C del 56.34% para los genes MASP y de 55.16% para los pseudogenes, desviándose estos valores de la media de G+C del genoma de *T. cruzi* estimada en el 51% para todo el genoma y del 53.4% para genes codificadores para proteínas (El-Sayed *et al.*, 2005a). Al comparar la frecuencia de uso de los codones de los clones, con respecto a los valores medios del genoma de *T. cruzi*, se obtuvo una diferencia media del 14.88% para los genes MASP y del 15.49% para los pseudogenes MASP, existiendo diferencias puntualmente más altas, como es el caso de los pseudogenes MASP2 Ψ1CL y MASP2 Ψ2 PAN4 (19.63%).

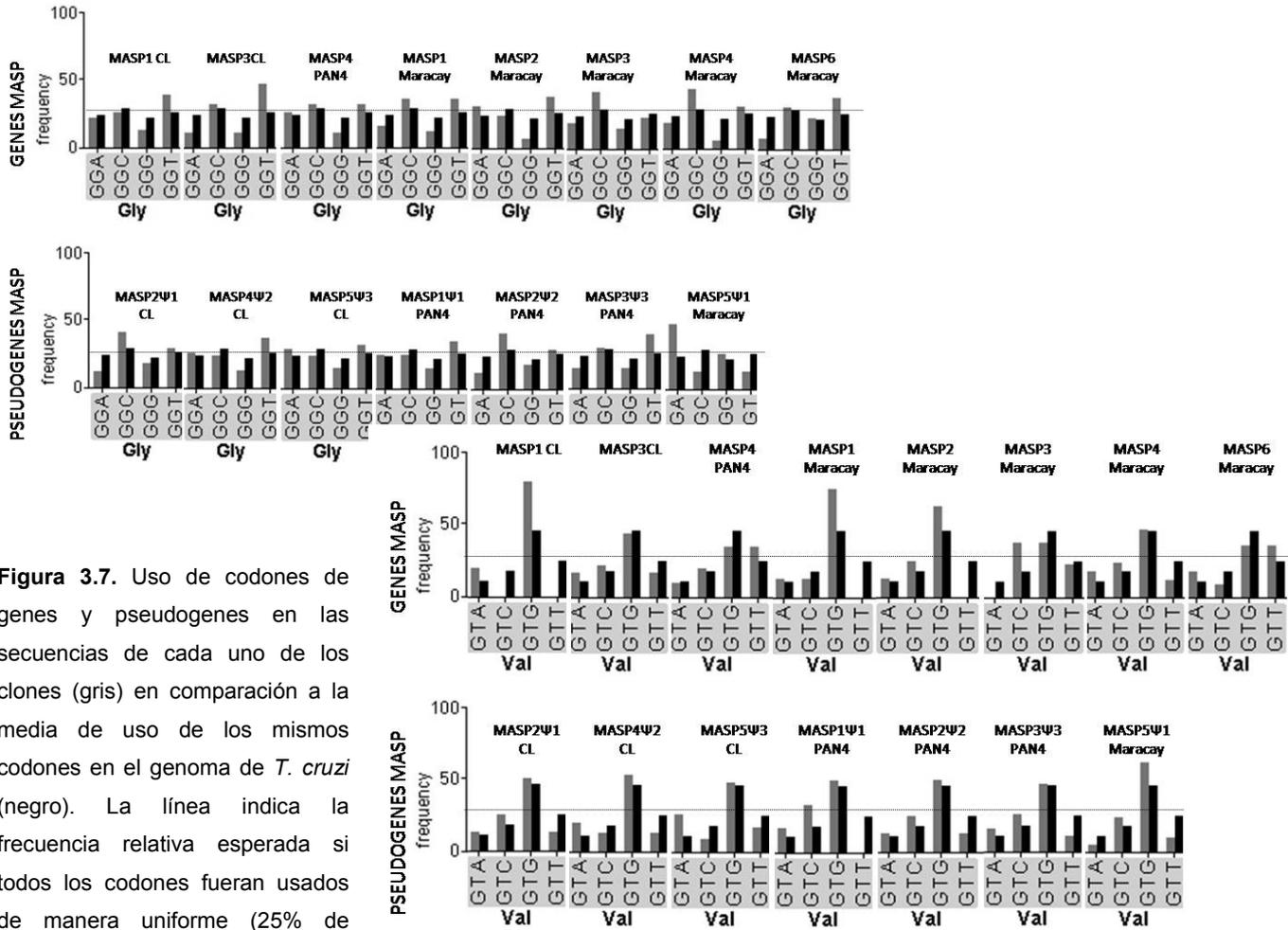
Estas diferencias se hacen más patentes en los aminoácidos codificados por tripletes degenerados en su tercer nucleótido, como en el caso de la Prolina, Valina, Treonina, Alanina y Glicina que poseen hasta cuatro posibles tripletes (Figura 3.7). Como se observa en dicha figura, los pseudogenes MASP2Ψ1CL,



MASP4Ψ2 CL, MASP5Ψ3 CL, MASP1Ψ1 PAN4, MASP2Ψ2 PAN4 favorecen una desviación en la tercera posición de los codones que codifican para el aminoácido Alanina, siendo también relevantes las diferencias para el



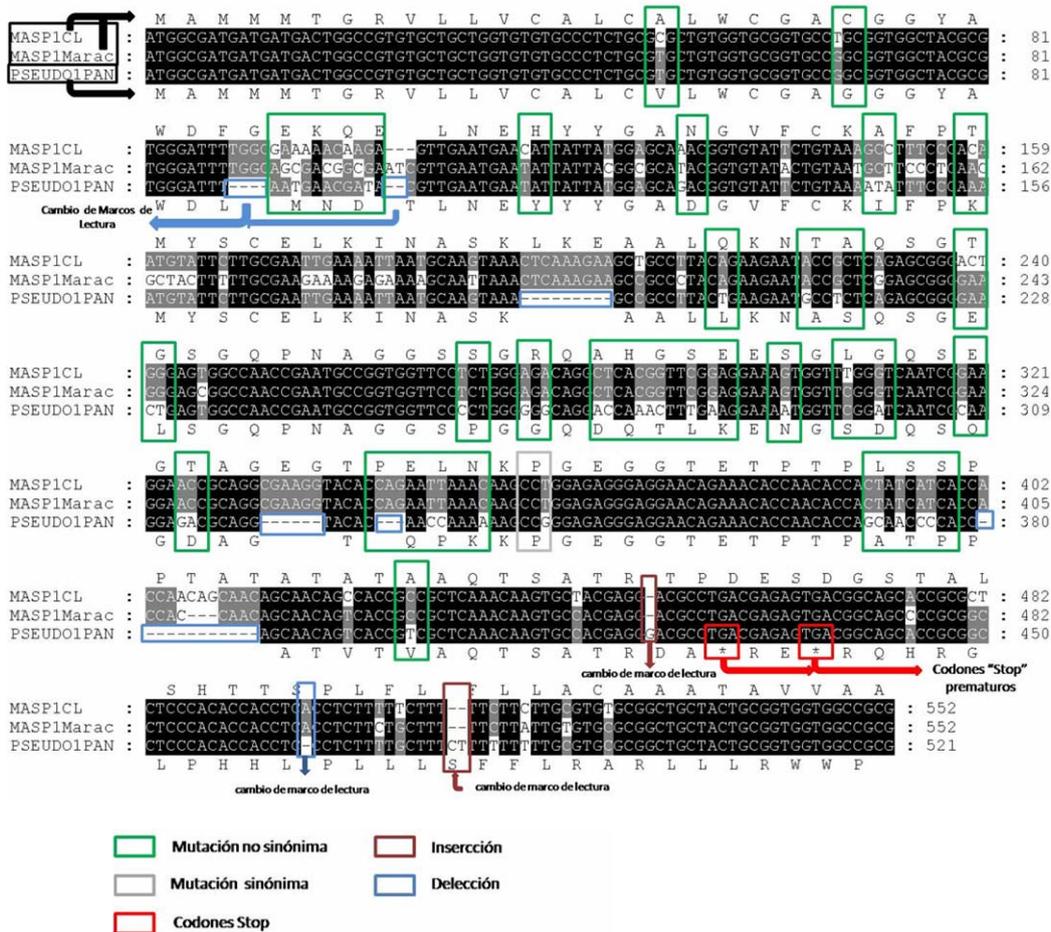
aminoácido Prolina en el caso de MASP2Ψ2 PAN4 y MASP2Ψ1CL.



**Figura 3.7.** Uso de codones de genes y pseudogenes en las secuencias de cada uno de los clones (gris) en comparación a la media de uso de los mismos codones en el genoma de *T. cruzi* (negro). La línea indica la frecuencia relativa esperada si todos los codones fueran usados de manera uniforme (25% de frecuencia). Las frecuencias más relevantes se señalan con un asterisco, así como sus codones correspondientes (marco negro).

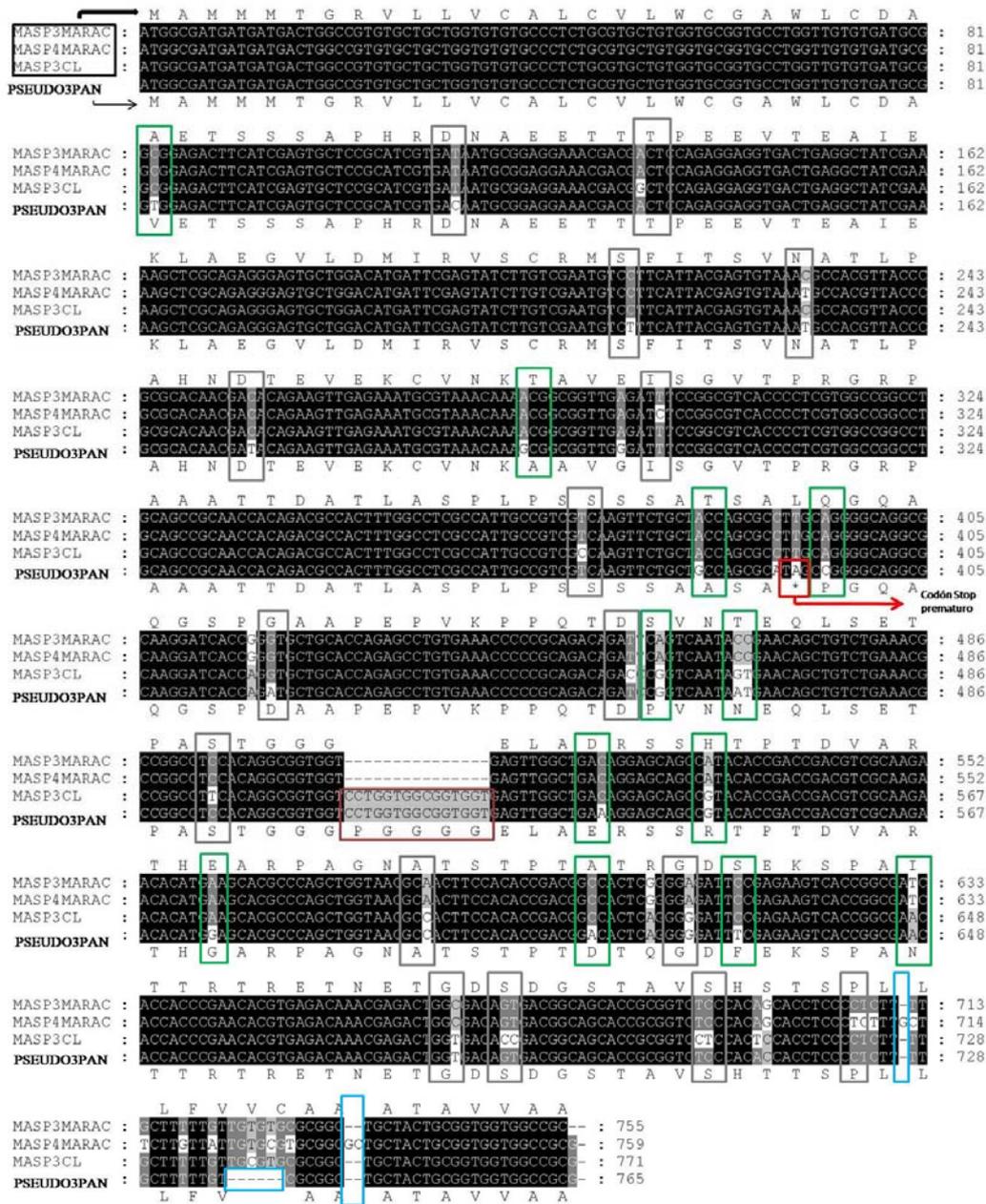
La presencia de genes parálogos es una constante en las familias multigénicas del genoma de *T. cruzi*, así como en otros tripanosomátidos, que seleccionan positivamente los eventos de duplicación como estrategia de evolución adaptativa (Emes *et al.*, 2008). Utilizando el análisis de comparación múltiple de secuencias CLUSTALW de los distintos genes clonados se encontraron dos grupos de (pseudo) genes parálogos bien marcados: el grupo 1 que englobaba a las secuencias MASP1CL, MASP1 Maracay y MASP1Ψ1PAN4 (Figura 3.8) y el grupo 2 que englobaba a MASP3 CL, MASP3 Maracay, MASP4 Maracay y MASP2Ψ2PAN4 (Figura 3.9) y el grupo 3 que

englobaba a MASP2Ψ1CL y MASP1Ψ1PAN4. El grupo 3 poseía características especiales al poseer CL y PAN4 la misma secuencia con un grado de divergencia superior con respecto a la secuencia de Maracay. Para todos los grupos de secuencias parálogas la cepa PAN4, poseía variantes pseudogénicas de los genes expresados en las otras dos cepas, si bien mantenía su expresión a nivel de mRNA. En el grupo 1 de genes parálogos, se encontraron un total de 33 mutaciones no sinónimas y una sola mutación sinónima, mientras que en el grupo 2 existen 16 mutaciones sinónimas y 12 mutaciones no sinónimas. Las deleciones e inserciones (indels) sufridas por MASP1Ψ1PAN4 dan lugar a tres cambios de marco de lectura, que traen como consecuencia la introducción de dos codones de parada en los nucleótidos 427, 426, 425 y 436, 435 434, mientras que en MASP3 y Ψ3PAN4 se encuentra en los nucleótidos 391, 392 y 393.



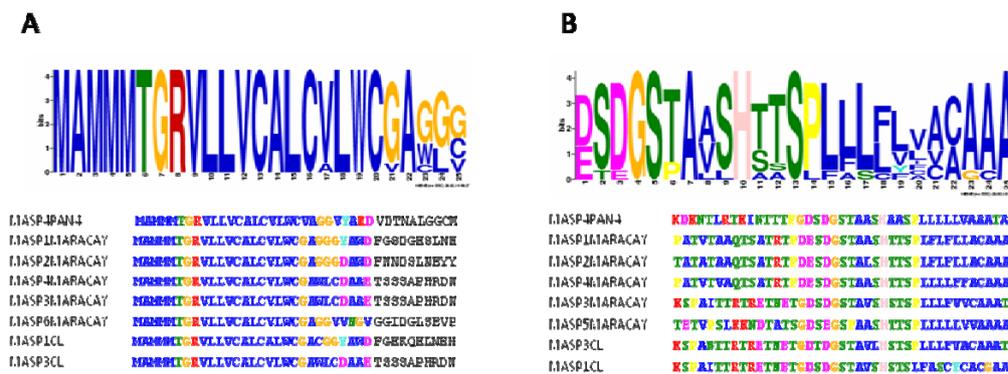
- Mutación no sinónima
- Inserción
- Mutación sinónima
- Delección
- Codones "Stop"

**Figura 3.8.** Análisis “Clustal” del grupo 1 de secuencias parálogas de las cepas CL-Brener, Maracay y PAN4, correspondientes a los genes MASP1CL, MASP1 Maracay y MASP1Ψ1PAN4. Los cuadros de colores indican los distintos tipos de mutaciones e indels) sucedidas de los 2 genes con respecto al Pseudogen MASP1Ψ1PAN4.



**Figura 3.9.** Análisis “Clustal” del grupo 2 de secuencias parálogas de las cepas CL-Brener, Maracay y PAN4, correspondientes a los genes MASP3 Maracay, MASP4 Maracay, MASP3 CL y MASP3Ψ3PAN4. Los cuadros de colores indican los distintos tipos de mutaciones e indels) sucedidas de los3 genes con respecto al Pseudogen MASP3Ψ3PAN4.

A continuación se analizó si los genes transcritos clonados seguían el mismo patrón y características básicas de la familia MASP, como ya había sido descrito previamente en trabajos anteriores (Bartholomeu *et al.*, 2009, El-Sayed *et al.*, 2005a). Tras realizarse una comparación múltiple de las secuencias mediante el programa CLUSTALW, se obtuvieron dos regiones en ambos extremos *N*- y *C*-terminal, claramente conservadas entre todos los miembros secuenciados. Al analizar la frecuencia y repetición de aminoácidos en dichas regiones mediante el programa MEME 4.3.0, se obtuvo un motivo conservado en el extremo *C*- terminal y otro motivo altamente conservado en el extremo *N*-terminal (Figura 3.10).

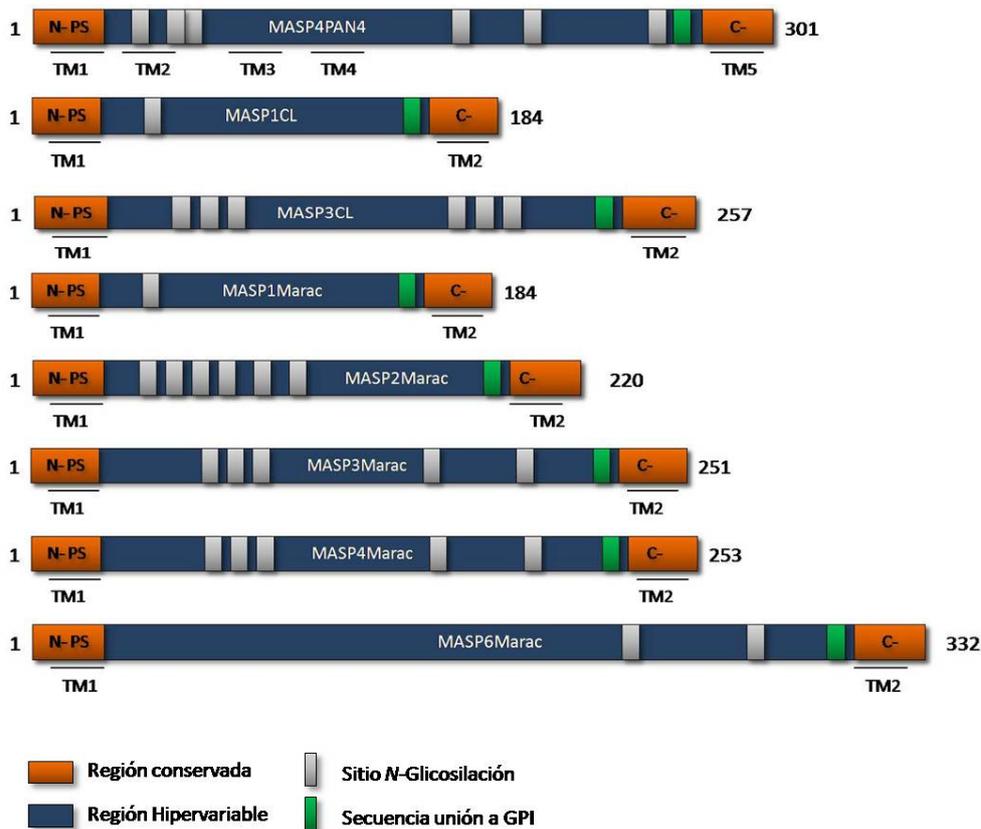


**Figura 3.10.** Alineamiento múltiple y búsqueda de motivos aminoácidos repetidos en las secuencias de los genes MASP clonados tanto para el extremo *N*-terminal (A) como *C*-terminal (B).

El análisis predictivo de los motivos estructurales de las secuencias de los genes MASP, se realizó mediante el servidor de herramientas proteómicas de ExPasy (<http://www.expasy.ch/tools/>). Mediante el algoritmo Kyte-Doolittle se predijo el perfil de hidrofobicidad de las secuencias así como la posible topología de estas. Las regiones *N*- y *C*- terminal de todas las secuencias poseen valores de hidrofobicidad muy altos, correspondiendo con dos regiones transmembrana (TM), excepto en la proteína codificada por el gen MASP4 PAN4, donde además se predicen hasta cinco regiones TM (Figura 3.11). La primera de las regiones TM (Extremo amino), corresponde con el péptido señal, que se pierde durante el proceso de maduración de las proteínas MASP, y la

última, se mantendría en las proteínas ya maduras, localizándose muy posiblemente insertada en la membrana plasmática del parásito.

La mayor parte de los componentes de la superficie de *T. cruzi* se unen a la cara externa de la bicapa lipídica de la membrana plasmática mediante uniones Glicofosfatidilinositol (GPI), estando, como en el caso de las mucinas, altamente glicosiladas (hasta un 60% de su masa molecular) para conferir a dichas moléculas un alto grado de hidrofiliidad y probablemente una conformación extendida (Buscaglia *et al.*, 2006). Como se observa en la Figura 3.11, todas las secuencias de los genes MASP analizadas, poseían un lugar de unión a GPI situado cerca del extremo C-terminal poseyendo *a priori*, señales necesarias para su exposición en la superficie celular, además de motivos para la N-glicosilación a lo largo de la región central hipervariable y residuo de Treonina cerca del extremo C-terminal.



**Figura 3.11.** Representación esquemática de los principales motivos estructurales encontrados en las

secuencias de aminoácidos de los genes MASP de las tres cepas ensayadas. En cada secuencia se indica

el número de residuos aminoacídicos de que se componen. TM: Región Transmembrana;PS: Péptido Señal.

### 3.7. Análisis de la presencia de secuencias de TcTREZO en los (pseudo)genes MASP

Los elementos retro-transponibles TcTREZO (*Trypanosoma cruzi* tandem repetitive element ZO) se sitúan en largas islas no sinténicas inestables del genoma de *T. cruzi*. Parte de la composición de éstas islas corresponde a “arrays” correspondientes a (pseudo)genes pertenecientes a familias de antígenos de superficie (MASP,TS,GP63,Mucinas o genes DGF-1) así como genes RHS (“retrotransposon hot spot protein”) o elementos retrotransponibles VIPER, L1Tc, SIRE oDIRE (Souza *et al.*, 2007). Se sabe que los elementos TcTREZO poseen lugares de inserción específicos en las secuencias de genes MASP, localizándose motivos conservados llamados TcTREZO “upstream” y TcTREZO “downstream” en las regiones 3’ codificadoras de los genes MASP (Souza *et al.*, 2007). Para analizar la situación y existencia de dichos motivos en las secuencias clonadas, realizamos un análisis CLUSTALW que posteriormente editamos mediante el programa Genedoc. Para el análisis utilizamos las secuencias conservadas de los motivos “up” y “downstream” de los elementos TcTREZO que se señalan a continuación junto con su traducción a aminoácidos:

- **TcTREZOUp:**

```
*GGCGACAGTGACGGCAGCACCGCGGTCTCCCACACCACCTCCCCTCTTT
TGCTTCTTCTTCTTGTTGC
```

```
*GDSDGSTAVSHTTSPLLLLLLV
```

- **TcTREZODown:**

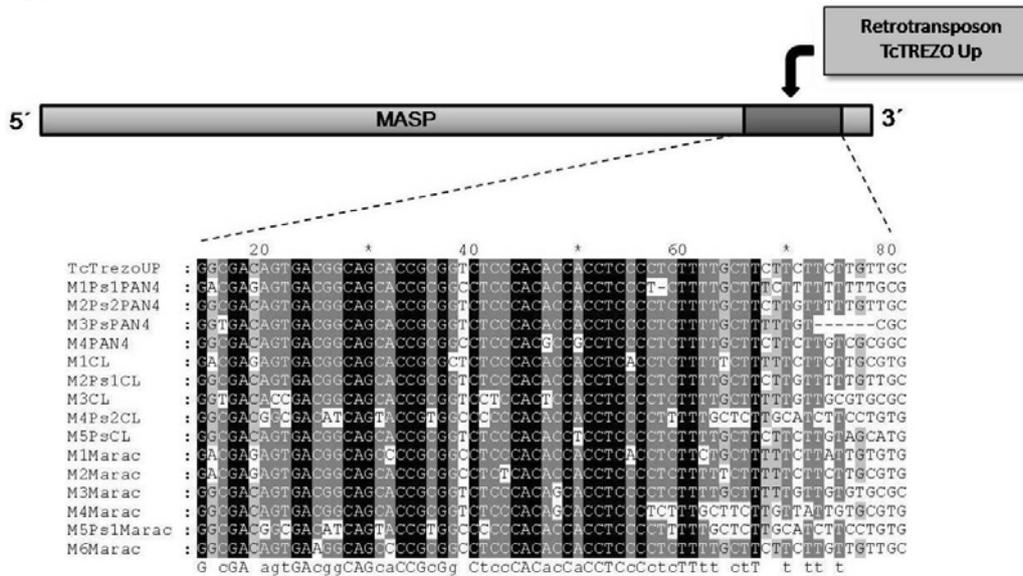
```
*GTGTGTGCGGCTGCGGCTGCGGTGGTGGCCGCGTGAGAGTGAGTGAGA
GAGCGCCATGCACCGC
```

```
*VCAAAA VVTAEVESHA
```

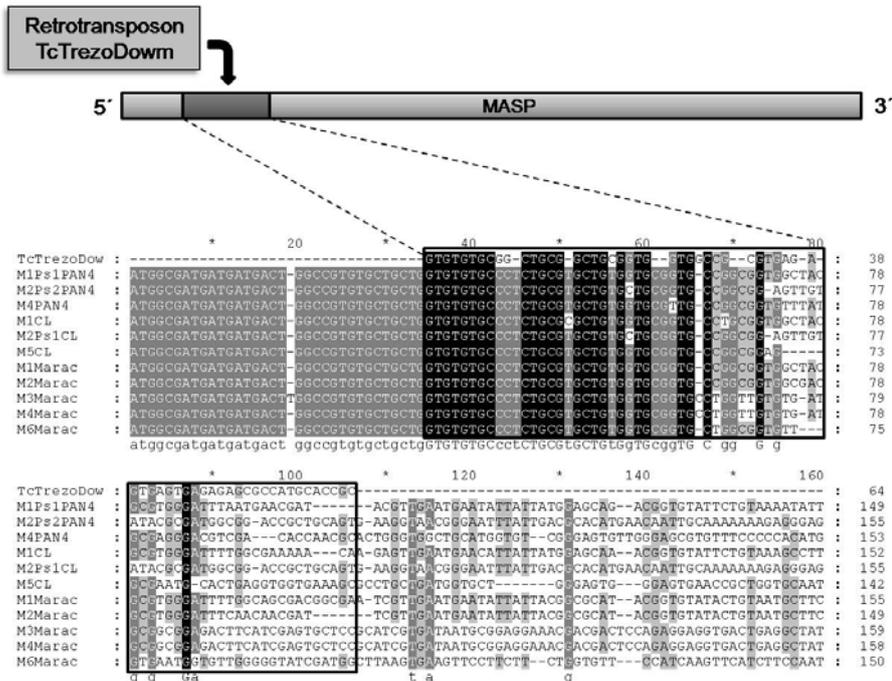
En la Figura 3.12, se describe el alineamiento múltiple así como la localización de los dos motivos estudiados para las distintas secuencias de (pseudo)genes MASP clonados. Todas las secuencias poseían el motivo

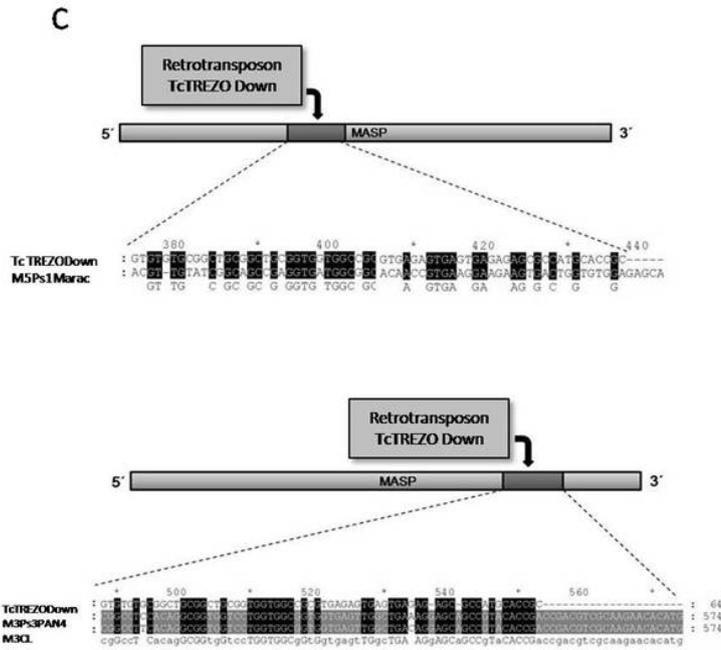
“Upstream” en la región 3’, con un alto grado de conservación. El motivo “Downstream” poseía un grado de conservación ligeramente menor que el “Upstream”, situándose en el extremo 5’ de las secuencias, salvo para MASP5Ψ1 Maracay en el que se situaba en la zona central hipervariable y para MASP3Ψ3PAN4 y MASP3CL donde se encontraba hacia la región 3’ de las secuencias.

A



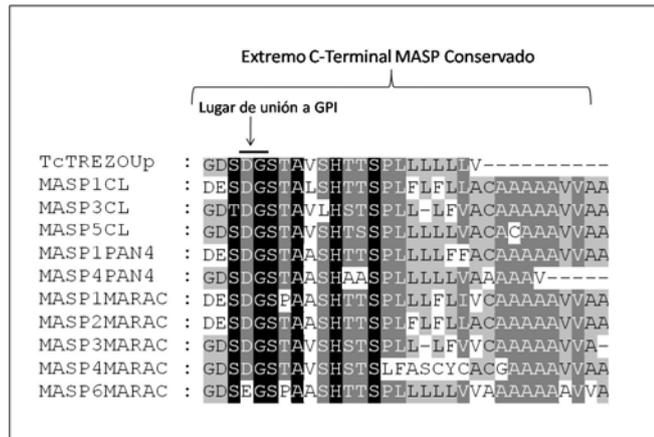
B





**Figura 3.12.** Alineamiento múltiple, así como representación gráfica de los lugares de inserción para los elementos TcTREZO dentro de las secuencias de los (pseudo)genes MASP clonados. (A) Alineamientos múltiples con respecto al motivo TcTREZO Upstream. (B) Alineamientos múltiples con respecto al motivo TcTREZO Downstream. (C) Casos especiales de inserción del motivo TcTREZO Downstream en las secuencias MASP5  $\Psi$ 1 Maracay, MASP3  $\Psi$ 3 PAN4 y MASP3 CL. En negro se señalan los residuos con 100% de conservación y en gris los motivos con >80% de conservación. Al final del alineamiento se señala la secuencia consenso obtenida.

Una vez comprobada la existencia de estos motivos en las secuencias, se tradujo a aminoácidos el motivo “Upstream” conservado de los elementos TcTREZO, realizándose una búsqueda de dicho motivo aminoacídico en el genoma de *T. cruzi*, y un análisis CLUSTALW con respecto a los genes MASP clonados (Figura 3.13). Como resultado, se obtuvieron más de 500 entradas de proteínas MASP en el genoma con esta secuencia insertada, además de mostrarse con un alto grado de conservación en los genes clonados (Figura 3.13). Este motivo representa una gran parte de la región C-terminal de esta familia, aportando el ácido aspártico (D) y la glicina (G) necesarios para el sitio de unión a GPI característico de éstas proteínas.



**Figura 3.13.** Alineamiento múltiple del extremo C-terminal de las secuencias MASP clonadas con el motivo TcTREZOUp traducido a aminoácidos.

### 3.8. RTqPCR de la familia MASP en los estadios Epimastigote, Tripomastigote metacíclico, Tripomastigote derivado de cultivo celular y Amastigote

Para cuantificar el grado de expresión (pseudo) génica de la familia MASP utilizamos la técnica de “Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction” (RTqPCR). Este ensayo se realizó con el objeto de estudiar el comportamiento global de esta familia a lo largo del ciclo de vida del parásito, comparándose además dicho comportamiento en dos cepas de linaje diferente como PAN4 (Tcla/d) y CL-Brener (Tclle). Para esta prueba se escogieron los cebadores N-prox MASP F y N-prox MASP R que amplifican la región 5’ altamente conservada de los (pseudo)genes MASP.

Al ser portadores de esta secuencia, todos los transcritos MASP se pueden cuantificar de manera única en el mismo ensayo, utilizándose para normalizar los resultados el gen 18S ribosomal.

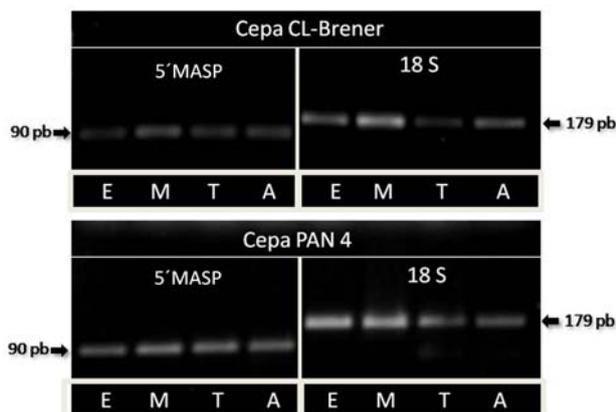
Como resultado, obtuvimos la amplificación del extremo 5’ en todas las fases de las dos cepas (Figura 3.14), si bien la cuantificación divergía tanto entre cepa como entre fase.

Para la cepa PAN4, todas las fases poseían diferencias altamente significativas ( $P < 0.001$ ) de expresión con respecto a la fase epimastigotes, siendo ligeramente significativa ( $P < 0.05$ ) entre la fase tripomastigote

metacíclica y los amastigotes. Con respecto a la fase epimastigote la expresión de la fase tripomastigote metacíclica fue 1.265 veces superior, 3.94 veces superior en la fase tripomastigote derivado de cultivo celular y 1.18 veces superior para la fase amastigote (Figura 3.15)

Para la cepa CL-Brener se encontraron diferencias altamente significativas entre la fase epimastigote y las fases tripomastigote derivado de cultivo celular y amastigote, Se obtuvieron igualmente, diferencias altamente significativas entre la fase metacíclico y tripomastigote derivado de cultivo celular y amastigote, así como entre tripomastigote derivado de cultivo celular y amastigote. No se encontraron diferencias significativas entre las formas epimastigote y tripomastigote metacíclico. Con respecto a la fase epimastigote la expresión de la fase tripomastigote metacíclico fue 32.22 veces superior, 1795.98 veces superior en la fase tripomastigote derivado de cultivo celular y 6494.48 veces superior para la fase amastigote, para la cepa CL-Brener. (Figura 3.15).

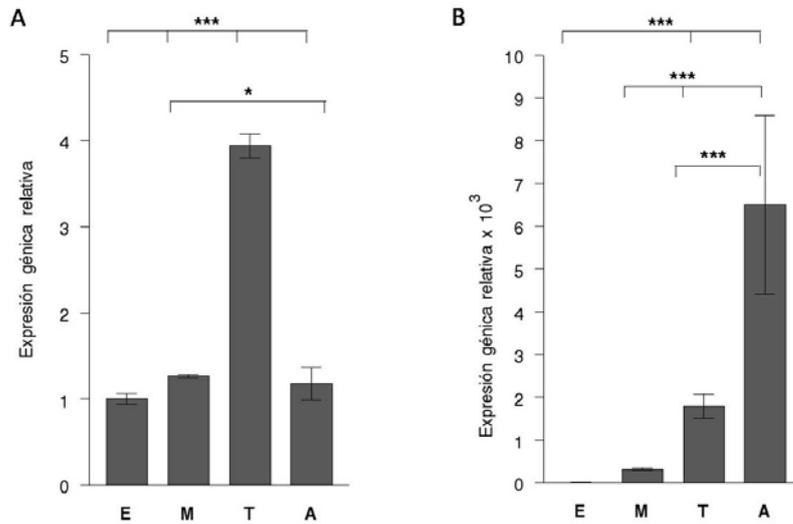
Por tanto, existe una clara diferencia en el comportamiento de la expresión de esta familia entre las dos cepas ensayadas. La cepa PAN4, posee un comportamiento más estable en su expresión en las diferentes fases, si bien existe una mayor cantidad de transcritos en la fase tripomastigote derivado de cultivo celular (3.6 veces más transcritos). La cepa CL-Brener posee un claro aumento de su expresión en la fase Tripomastigote derivado de cultivo celular y sobre todo en la fase amastigote, existiendo una drástica disminución en la fase epimastigote y tripomastigote metacíclico



**Figura 3.14.**

Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los diferentes productos de amplificación generados en la RTqPCR

para la zona 5' MASP conservada y el gen 18S en las cepas CL-Brener y PAN4. E:Epimastigote; M:Tripomastigote Metacíclico; T: Tripomastigote derivado de cultivo celular; A:Amastigote.



**Figura**

**3.15.** Aumento de la expresión génica relativa con respecto a la fase epimastigote en la cepa PAN4 (A) y CL-Brener (B) de acuerdo con el método de  $\Delta C_T$ . Para normalizar los resultados se utilizó el gen 18S ribosomal de *T. cruzi*. E:Epimastigote; M:Tripomastigote Metacíclico; T: Tripomastigote derivado de cultivo celular; A:Amastigote. El nivel de significancia entre medias fue calculado mediante el test de Tukey-Kramer considerando un valor de  $P < 0.05$  (\*) como significativo y de  $P < 0.001$  (\*\*\*) como extremadamente significativo. Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar de la media de los tres experimentos por separado.

### 3.9. Ciclo Intracelular de *T. cruzi* y expresión de (pseudo)genes MASP

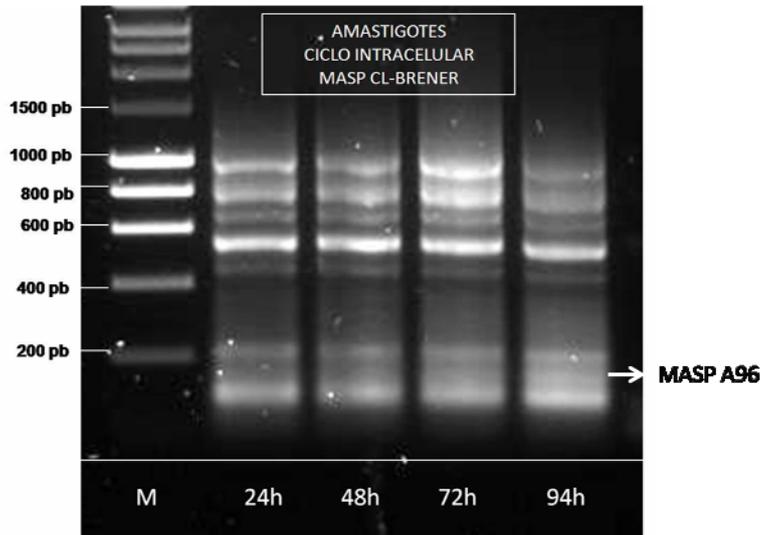
#### .Clonación

#### de la MASP96CL.

Al obtener un resultado tan elevado en la expresión de los transcritos de la fase amastigote de la cepa CL, se procedió al análisis de la expresión de estos genes durante el ciclo intracelular de *T. cruzi*, para ello se procedió a la obtención del Mrna a las 24, 48, 72 y 96h postinfección de las células y posterior RTPCR, analizándose el patrón de bandas de los genes MASP expresados durante el ciclo intracelular del parásito.

Como se puede observar en la Figura 3.16 se obtuvieron un total de 7 amplicones a las 24, 48, 72h, y un total de 8 a las 96h postinfección. La banda

que se expresada diferencialmente a las 96h postinfección, denominada como MASP 96CL, se aisló y se clonó con el fin de determinar su secuencia y sus características básicas mediante bioinformática (Figura 3.17, Figura 3.18, Tabla 3.4.).



Figura

**3.16.** Electroforesis en Gel de agarosa al 1% de los Genes MASP expresados durante el ciclo intracelular de *T. cruzi*. La flecha blanca señala la banda de 188 pb correspondiente a la MASP 96.

**MASP 96**

```

ATG GCG ATG ATG ATG CTG GCC GTG TGC TGC TGG TGT GTG CCC TCT GCG TGC TGT GGT GCG
M   A M M M L A V C C W C V P S A C C G A
GTG TAT CGC CCG CCG CTG GTA TCC TTC CAC TTC ACG GAG GAA TGG TTG TCC GCG GTG CGA
V   Y R P P L V S F H F T E E W L S A V R
CAT TCA GTC TTG ATG AGG CTC AAA CGG AGC ATT GGA GAC GCG GCT GCT ACT GCG GTG GTG
H   S V L M R L K R S I G D A A A T A V V
GCC GCA TGA
A   A   ***
    
```

**Figura 3.17.** Secuencia nucleotídica y aminoacídica de la MASP A96. En verde se señala el ATG o codón de inicio y en rojo el TGA o codón de parada. El marco de lectura abierto se marca en gris (secuencia de aminoácidos). El codón de parada se marca en fucsia y se señalizan con tres asteriscos.

Para analizar la homología e identidad con respecto a las secuencias depositadas del genoma de la cepa CL-Brener de *T. cruzi*, utilizamos el programa BLAST. De esta manera se determinó la variación en la secuencia de

la MASP 96 con respecto a sus (pseudo)genes parálogos depositados en el genoma. Las características básicas de la MASP 96 se resumen en la Tabla 3.4, donde además se analiza la identidad y cobertura de secuencia de esta con respecto al gen con mayor puntuación para el programa BLAST.

Tras la búsqueda de motivos estructurales en la secuencia no obtuvimos ningún resultado, salvo la presencia de un péptido señal en los primeros 20 residuos de la secuencia que corresponde con una región transmembrana. En este caso, solo se obtuvo una ligera identidad (aunque no completa) con el motivo *N*-terminal MASP conservado, no existiendo ninguna identidad con el *C*-terminal conservado. Tampoco se encontraron ni lugares para *N*-glicosilación ni secuencias de unión a GPI, siendo este por tanto un miembro singular, que se aleja de los patrones frecuentes propios de la familia MASP.

**Tabla 3.4.** Características básicas de la MASP 96 obtenida tras 96h de infección.

Cepa CL Amastigote 96 h	Nº pares de Bases	Nº aminoácidos	Nº acceso gen con mayor puntuación BLAST	Identidad	Cobertura de Secuencia
MA SP $\Psi$ 1	188 pb	61 a.a	XM_803302.1	95%	90%



**Figura 3.18.** Representación esquemática de la secuencia de aminoácidos de la MASP 96 y motivos

Estructurales, indicándose el número de residuos aminoácidos de que se compone. TM: Región Transmembrana; PS: Péptido Señal

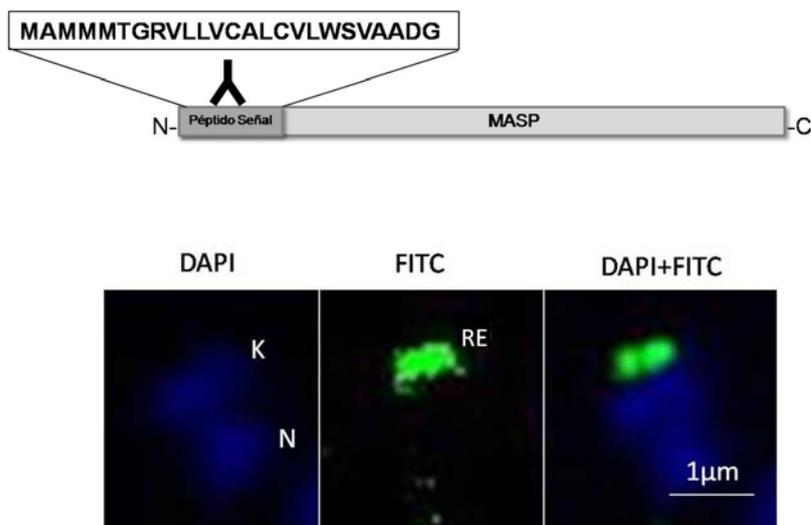
### 3.10. Medida de la expresión de miembros de la familia MASP durante el ciclo intracelular mediante Inmunofluorescencia

Utilizamos la técnica de inmunofluorescencia para determinar si todos los clones de parásitos de una misma muestra expresan uniformemente estas

proteínas, y determinar así mismo la expresión de estas proteínas tras la medida de intensidad de fluorescencia.

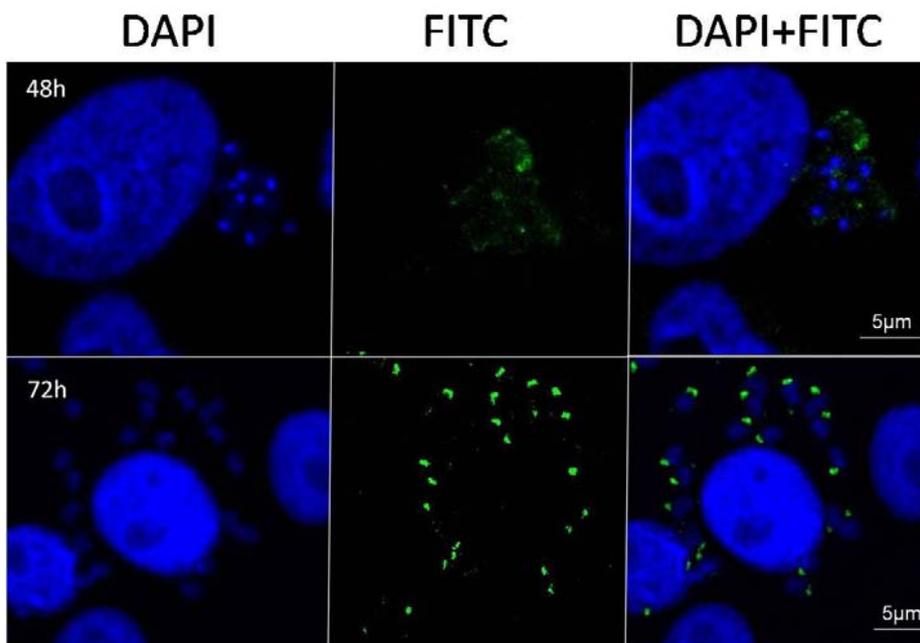
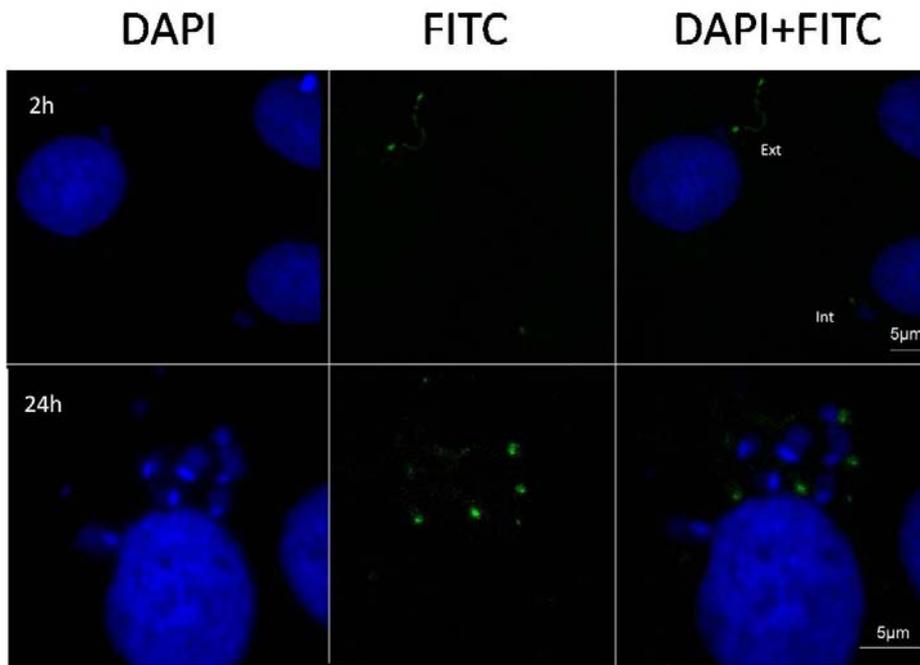
Este ensayo se realizó en la cepa CL-Brener que había demostrado mediante RTqPCR un nivel de expresión muy alto en los transcritos de la fase amastigote, como se describió anteriormente. Para localizar la amplia mayoría de los miembros de la familia MASP, se obtuvo un anticuerpo frente al péptido señal (extremo *N*-terminal conservado) con un título de 1/1600, péptido que portan la amplia mayoría de estas proteínas, y que como se observa en la Figura 3.19 posee una localización muy concreta en el Retículo Endoplasmático, donde se elimina dicho péptido tras la síntesis proteica en el proceso de maduración (Figura). Esta localización puntual nos permitió determinar la carga de proteínas MASP, analizando la intensidad de fluorescencia en cada parásito.

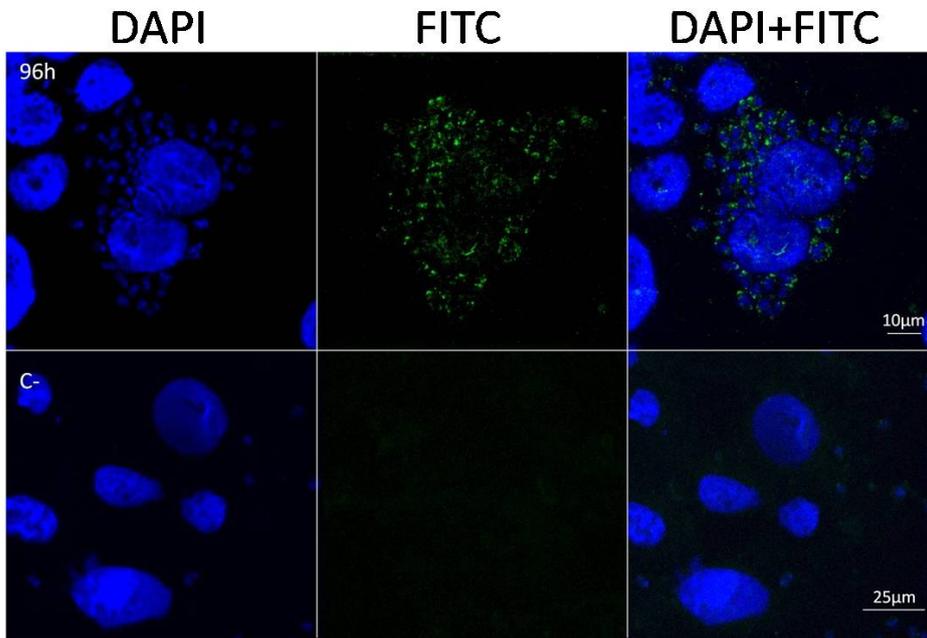
Como se observa en la Figura 3.20, tras ensayar dicho anticuerpo, se observó que existía expresión de proteínas MASP entre las 2 y las 96h postinfección, si bien existían diferencias en la intensidad de la señal fluorescente.



**Figura 3.19.** Representación gráfica de la localización del péptido señal en las proteínas MASP. Inmunofluorescencia frente al péptido señal de las MASP. En verde se observa la señal

dada por el isotiocianato de fluoresceína (FITC) ligado al anticuerpo y en azul el agente marcador de ácidos nucleicos 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). K: Kinetoplasto; N: Núcleo; RE: Retículo Endoplasmático.

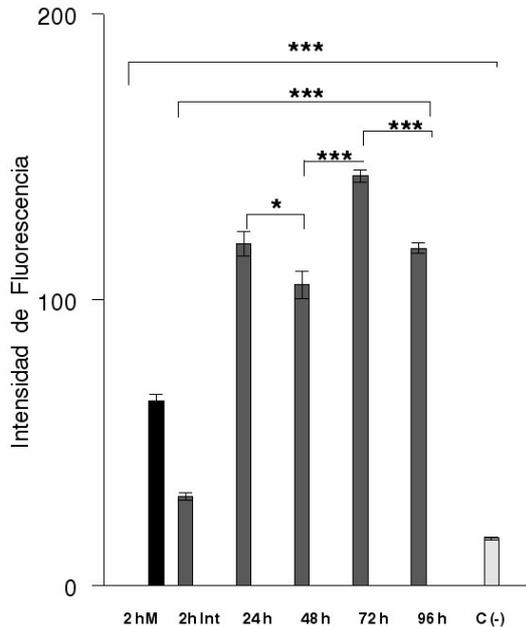




**Figura 3.20.** Inmunofluorescencia para el péptido señal de las MASP. Células Vero sincronizadas e infectadas con *Tripomastigotes* metacíclicos en razón 1: 5 célula-parásito analizadas a las 2, 24, 48, 72 y 96 h postinfección. El control negativo se realizó con un suero de ratón preinmune.

Mediante el programa de análisis de imagen ImageJ, calculamos la intensidad de fluorescencia que aparece en el interior de los parásitos a partir de puntos del Retículo endoplasmático de los parásitos de iguales en área. Como se observa en la Figura 3.21 se encontraron diferencias altamente significativas entre las intensidades de fluorescencia entre las fases tripomastigote metacíclico (2h postinfección) y el control negativo ( $P < 0.001$ ), así como entre la fase intracelular 2h postinfección y los amastigotes a las 24, 48, 72 y 94h y altamente significativas entre a las 48 y 72h así como entre las 72 y las 96 h. Mientras que las diferencias son ligeramente significativas ( $P < 0.05$ ) entre las 24 y 48h postinfección.

Al analizar los datos globalmente se comprueba un claro aumento de fluorescencia entre las 24 y 96h del ciclo intracelular de infección, siendo la intensidad siempre menor en los parásitos intracelulares a las 2h postinfección, así como en los tripomastigotes metacíclicos a las 2h postinfección.



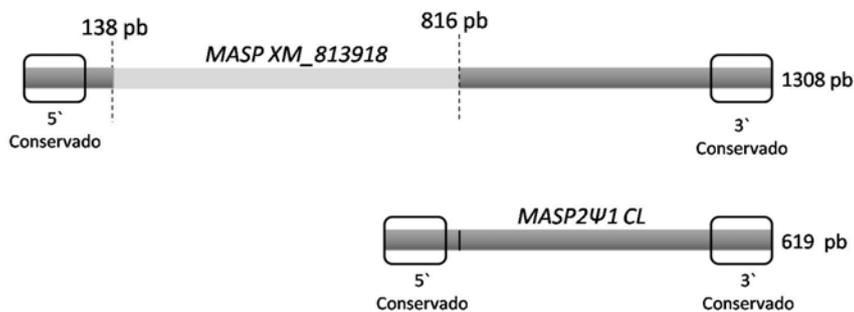
**Figura 3.21.** Intensidad de fluorescencia a las 2, 24, 48, 72 y 96 h postinfección utilizando el anticuerpo frente al péptido señal de las MASP. Las intensidades se midieron sobre un área constante en los puntos donde se localizaba el Retículo Endoplasmático de los parásitos. El nivel de significancia entre medias fue calculado mediante el test de Tukey-Kramer considerando un valor de  $P < 0.05$  (\*) como significativo y de  $P < 0.001$  (\*\*\*) como extremadamente significativo. Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar de la media de medidas realizadas sobre 10 amastigotes de la muestra elegidos al azar. M: Metacíclico, Int: Formas Internalizadas.

### 3.11. Creación de híbridos RNA-RNA estables por el pseudogen MASP2Ψ1 CL

Para demostrar la posible implicación de los pseudogenes MASP como mecanismo regulador a nivel postranscripcional de esta familia, se siguió un esquema de trabajo similar al utilizado por Korneev *et al.*, 1999, por el cual, se puede determinar si los pseudogenes transcritos son capaces de generar cadenas de RNA antisentido complementarias a otros RNA transcritos y así

generar cadenas dúplex RNA-RNA, incapaces de ser digeridas por tratamiento con RNasa A, la cual degrada cadenas monocatenarias de RNA.

Como pseudogen prototipo se estudió el MASP2Ψ1 de la cepa CL, el cual posee, como se describió anteriormente, una secuencia paróloga con un 100% de identidad con el pseudogen MASP2Ψ2 de la cepa PAN4. Como se muestra en la figura, tras realizar un BLAST con la secuencia de este pseudogén, obtuvimos una identidad del (98%) con una secuencia anotada como XM\_813918 pero de más del doble en longitud de su secuencia, dado que en la formación del MASP2Ψ1CL se delecciona un fragmento de 678 pb (Nt 138 al 816) correspondiente a la primera parte de la región hipervariable de



este gen (Figura 3.22).

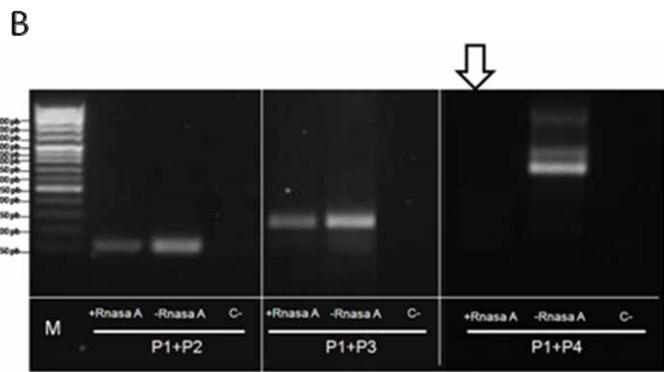
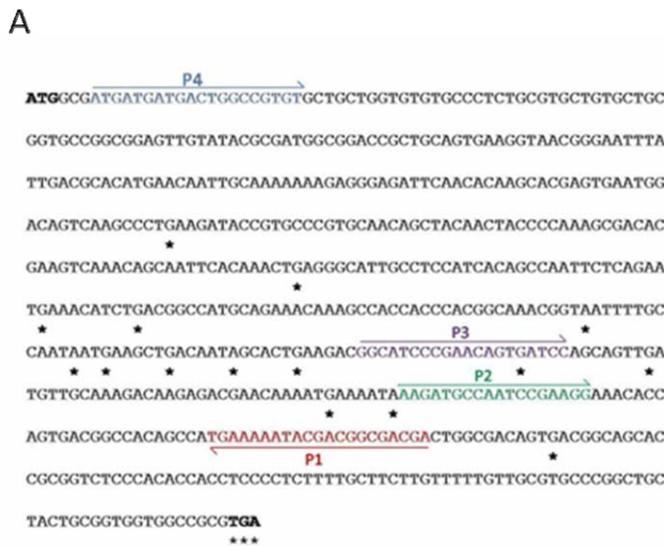
**Figura 3.22.** Representación esquemática de la formación de MASP2Ψ1CL tras la escisión (líneas discontinuas) de un fragmento de 678 pb de XM\_813918.

Como se muestra en la Figura 3.23, utilizamos tres parejas de cebadores, dos capaces de amplificar dentro del núcleo central de los codones de parada del pseudogen (P1+P2, P1+P3) dando lugar a productos de 60 y 124 pb y uno que amplifica desde el comienzo de la secuencia (P1+P4) dando lugar a un producto de 515 pb, aunque si bien pudiera que amplificase otros

genes MASP que compartan el P4 (región conservada) y el P1 (región variable). Tras la digestión con y sin RNasa A, del RNA de la fase tripomastigota metacíclica y posterior RT PCR utilizando el P1 como cebador, se obtuvieron productos amplificados para la pareja de cebadores P1+P2 y P1+P3, no siendo así para la pareja P1+P4 donde solo existe amplificación para el control positivo de cDNA sin tratar con RNasa A (Figura 3.23 (B)).

De esta forma la zona híbrida RNA-RNA estable se define en un mínimo de 124 pb de extensión, desapareciendo en algún punto de la secuencia antes del cebador P4

tras el tratamiento con RNasa A.



**Figura 3.23.** (A) Secuencia de 619 pb del pseudogén MASP2Ψ1 CL, donde se representan con diferentes colores las posiciones de los cebadores utilizados durante el estudio de la formación de cadenas híbridas de RNA. Los asteriscos representan los codones de parada de la

secuencia. (B) Gel de agarosa al 2% de los diferentes productos amplificados con y sin tratamiento con RNasa A para las distintas parejas de cebadores, donde se indica con una flecha, el ensayo en donde no se encuentra amplificación del pseudogén.

#### 4. Mapeo de epítomos B y respuesta humoral al extremo C-Terminal conservado de las proteínas MASP

Tras comprobar que esta familia de proteínas no se encuentra presente en otras especies de Kinetoplástidos ensayadas y que los extremos *N*- (5') y *C*- (3') terminal de las MASP están altamente conservados (ver Resultados capítulo 2.2 ) entre las distintas cepas de *T. cruzi*, decidimos utilizar el extremo *C*-terminal para determinar la posible existencia de una respuesta humoral frente a dicho extremo, dado que se mantiene en las proteínas MASP maduras, no ocurriendo lo mismo con el extremo *N*-terminal (péptido señal), que es eliminado durante la maduración de la proteína.

El extremo *C*-terminal se compone de una secuencia de unos 20-25 aminoácidos muy conservada entre los miembros de la familia MASP, si bien existen algunas sustituciones aminoacídicas eventuales. De hecho, al realizar una búsqueda BLAST con este motivo, pudimos obtener unas 850 entradas de genes MASP depositados en la base de datos de NCBI y TryTripDB. Al objeto de analizar la topología y motivos en la secuencia *C*-terminal utilizamos los programas Tmpred y GPIsom, comprobándose la existencia de una región transmembrana de 18 aminoácidos altamente hidrofóbicos, y un lugar de unión a GPI en el comienzo de ésta.



**Figura 4.1.** Secuencia aminoacídica *C*-terminal consenso para las proteínas MASP y motivos estructurales encontrados en ella.

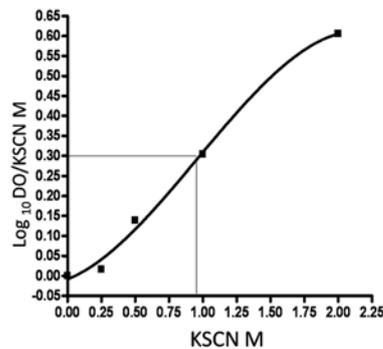
Para realizar el mapeo de epítomos B sintetizamos 7 péptidos solapantes en 12 de sus 15 aminoácidos que denominamos como c1, c2, c3, c4, c5 y c6,

así como un péptido que denominamos como c7 que posee ligeras modificaciones en cuatro de sus aminoácidos, pero basado en la secuencia consenso, correspondiente al extremo C-terminal de la proteína MASP52.

Al tratarse de una región con una alta hidrofobicidad y ser los péptidos sintetizados susceptibles tras la incubación de los sueros a uniones antígeno-anticuerpo de baja afinidad, las muestras fueron tratadas con KSCN, agente caotrópico, a fin de eliminar dichas uniones, que dieran lugar a falsos positivos.

Previo a llevar a cabo el tratamiento con el agente caotrópico fue necesario determinar la concentración efectiva del mismo requerida para reducir en un 50%

anticuerpo, un "pool" de enfermos procesar los concentración dichas uniones 0.92 M, siendo utilizada en el con los diferentes péptidos sintéticos (Figura 4.2).



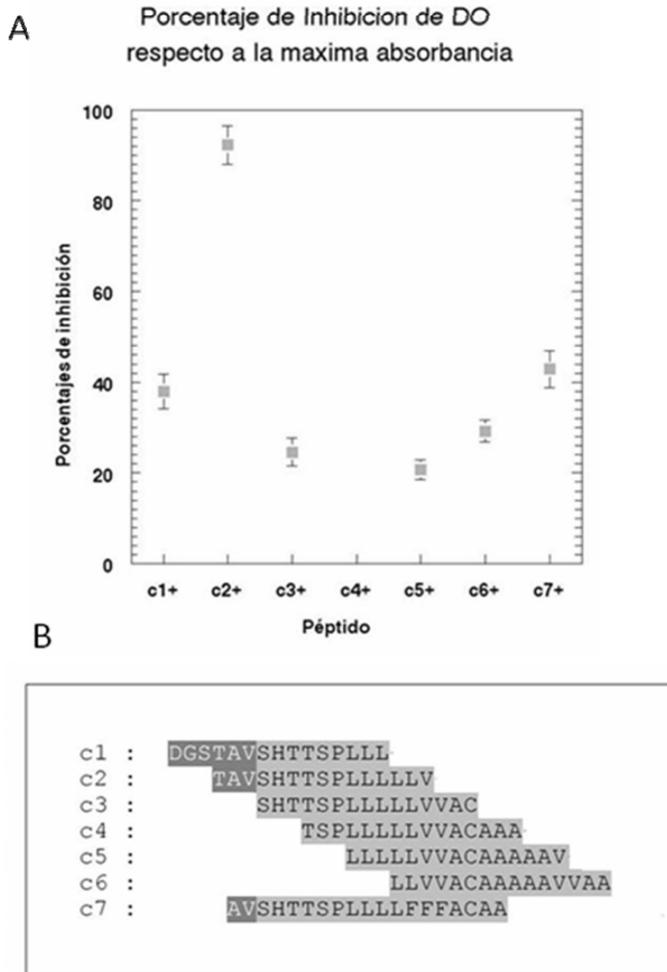
la reactividad antígeno-utilizándose para ello sueros positivos de chagásicos. Tras resultados, la necesaria para eliminar inespecíficas resultado de dicha concentración la resto de experimentos

**Figura 4.2.** Gráfica con ecuación del tipo polinomial grado 3 en que se representa la avidéz del pool de suero positivo frente al péptido c1. Los datos de la grafica corresponden al análisis de la transformación  $Lg_{10}$  partido frente a la concentración en Moles del agente caotrópico (KSCN) en el eje de abcisas, referido a la concentración de agente caotrópico en el eje de ordenadas. (Pullen *et al.*, 1986)

Una vez ajustada la cantidad de agente caotrópico a utilizar en los experimentos, se llevó a cabo el mapeo de epítomos utilizando para ello un pool

de sueros positivos procedentes de enfermos de Chagas y cuya positividad había sido determinada mediante al menos tres técnicas (PCR, aislamiento del parásito y pruebas de ELISA). Para llevar a cabo el mapeo, se realizaron dos ensayos, una ELISA indirecta con cada uno de los péptidos y un ELISA competitivo, donde el suero fue preincubado previa a realizar la ELISA, con cada uno de los péptidos a ensayar, para así determinar los péptidos que se unen con mayor avidez a los anticuerpos anti MASP C-terminal del suero de los pacientes chagásicos, siendo los más específicos aquellos en que se redujera en mayor grado el valor de absorbancia obtenida en la ELISA indirecta, ya que los anticuerpos compiten por el péptido inmovilizado.

Al ensayar los péptidos en la ELISA indirecta, se obtuvo una reacción positiva para el pool de sueros positivos chagásicos, lo que sugiere que comparten epítopos B comunes. Cuando se relativizaron los valores de los dos tipos de ELISA y fue calculado el porcentaje de inhibición de la reacción con respecto al péptido que más densidad óptica inducía (péptido c4), se obtuvo como resultado que los péptidos c1, c2 y c7, poseían los valores más altos de inhibición (38, 92.27, 42.88%) (Figura 4.3 (A)). Estos péptidos comparten una región común de 6 aminoácidos con secuencia **DGSTAV**, que (Calvo-Calle *et al.*, 2006) coincide con el motivo de unión a GPI, siendo el epítipo B más reactivo del extremo C-terminal de las MASP (Figura 4.3 (B)).



**Figura 4.3.** Mapeo de epítomos B del extremo C-terminal de las proteínas MASP. (A) Gráfica donde se representa el porcentaje de inhibición de la DO con respecto al péptido con máxima absorbancia (péptido c4) para el ensayo donde se analiza el valor relativo de DO entre el ensayo de ELISA indirecto y el ELISA competitivo para cada péptido. Cada punto representa la media  $\pm$  el error estándar de la media de tres repeticiones del ensayo con cada péptido (B) secuencia de cada uno de los péptidos solapantes. En gris oscuro se resalta la secuencia del epítomo B más inmunoreactivo con el pool de sueros de enfermos chagásicos positivos. En gris claro la secuencia con reactividad positiva menos intensa.

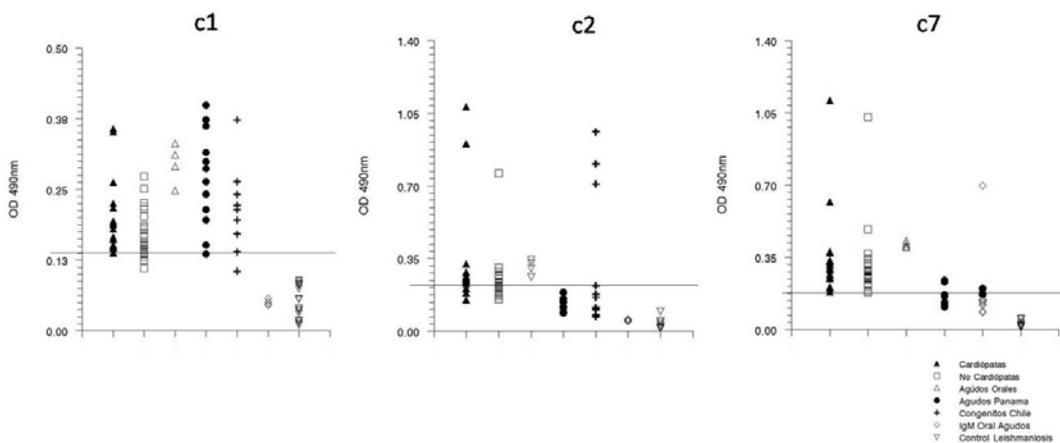
Una vez supimos que péptidos representaban el epítomo B más inmunoreactivo, se ensayaron con respecto distintos grupos de sueros de pacientes chagásico, clasificándos como : sueros crónicos cardiópatas (grupo 1, n=19) y no cardiópatas (grupo 2, n=29); sueros agudos orales (grupo 3, n=4); sueros agudos (grupo4,n =14); sueros congénitos (grupo 5, n=12), junto a

dos grupos, uno en el que medimos la posible respuesta IgM del grupo 3 y un control de sueros de pacientes de leishmania (n=15) al objeto de valorar la reactividad cruzada a los péptidos en este tipo de pacientes.

Para el péptido c1, obtuvimos como resultado un 94.7, 82.7, 100, 100 y 91.6% de sensibilidad para los grupos 1, 2, 3, 4, y 5 respectivamente, no encontrándose respuesta para IgM en el grupo 3 ni en el control de sueros de enfermos con Leishmania (Figura 4.4).

Para el péptido c2, obtuvimos como resultado un 68.4, 44.8, 100, 0, 16.6%, de sensibilidad para los grupos 1, 2, 3, 4, y 5 respectivamente, no encontrándose respuesta para IgM en el grupo 3 ni para el control de sueros de enfermos con leishmaniosis (Figura 4.4).

Para el péptido c7, obtuvimos como resultado un 68.42, 51.7, 100, 0, 8.3 % de sensibilidad para los grupos 1, 2, 3, 4, y 5 respectivamente, no encontrándose respuesta para IgM en el grupo 7 ni para los sueros control de leishmaniosis (Figura 4.4).

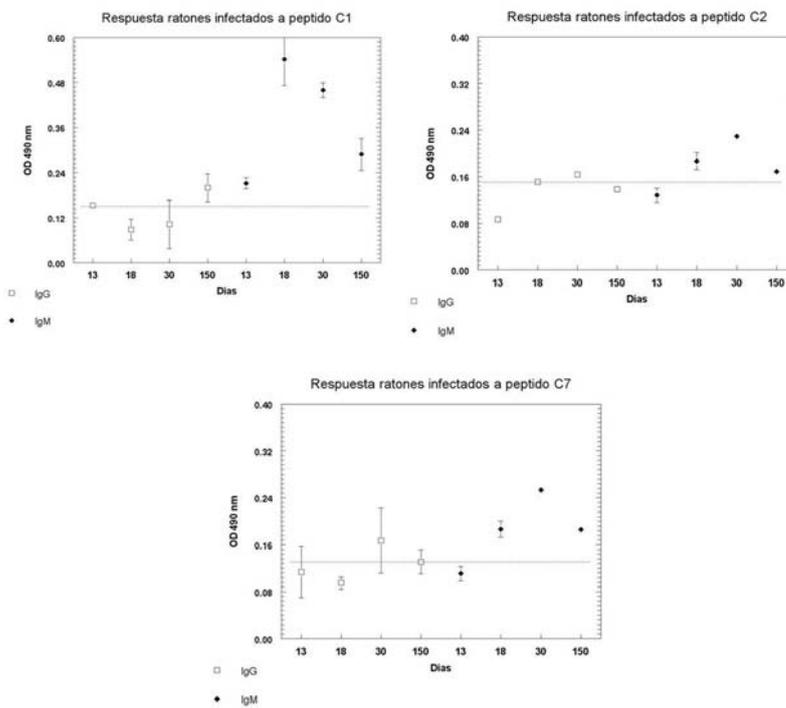


**Figura 4.4.** Gráfica en que se representa la respuesta humoral de los distintos grupos de sueros ensayados frente a los péptidos c1, c2 y c7.

Aunque no se encontró una respuesta IgM frente a los sueros de pacientes agudos orales, se evaluó si estos péptidos constituyen antígenos capaces de dar respuesta durante en la fase aguda de la enfermedad. Para ello se infectaron ratones como se describió en material y métodos siendo evaluada la respuesta serológica IgG como de IgM a los 13, 18, 30 como 150 días postinfección. Como se puede comprobar en la Figura 4.5, obtuvimos una

respuesta humoral por encima del valor de corte, IgM específica, entre el día 18 y 150 postinfección para los péptidos c2 y c7, detectándose dicha respuesta también a los 13 días postinfección para el péptido c1. Los mayores picos de IgM detectados aparecen a los 18 días postinfección para los tres péptidos, obteniendo el valor de DO máxima en el péptido c1.

Cuando se midieron los valores de IgG en los mismos sueros de ratón, se obtuvieron valores de IgG por encima del valor de corte a los 150 días postinfección para el péptido c1, a los 30 días postinfección para el péptido c2 y a los 30 días postinfección para el péptido c7. Los péptidos c1, c2 y c7 obtuvieron DO cercanas al valor de corte a los 13, 18 y 150 días postinfección respectivamente



**Figura 4.5.**

Gráfica de la respuesta humoral IgG e IgM de sueros de ratones infectados con *T. cruzi* para los péptidos c1, c2 y c7 a los 13, 18, 30 y 150 días postinfección.

## E. DISCUSIÓN

## 1. Clonación y análisis de las secuencias de (pseudo)genes MASP de distintas cepas de *T. cruzi*

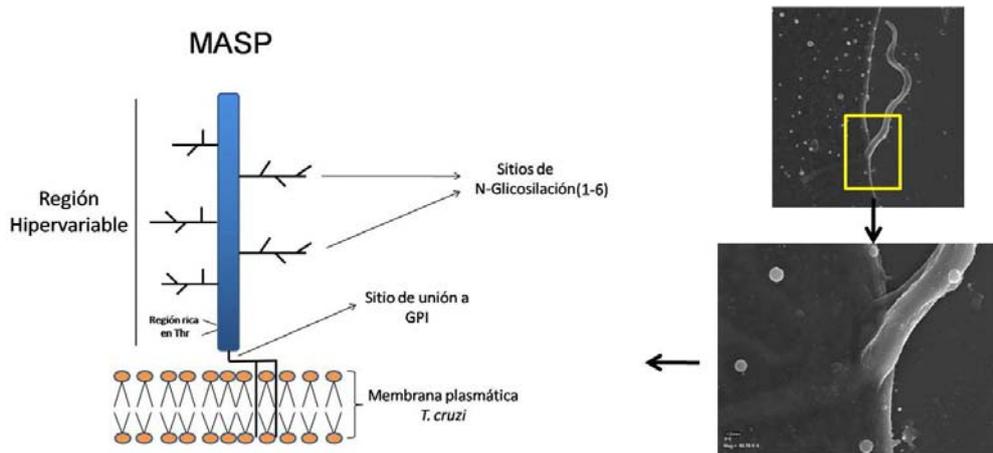
El estudio del del genoma de *T. cruzi* ha permitido conocer la tremenda expansión tanto de su tamaño como del número genes en comparación con el resto de los protozoos kinetoplástidos secuenciados (El-Sayed *et al.*, 2005b). Las familias multigénicas de *T. cruzi*, TS, MASP, DGF-1, mucina y gp63, que codifican para proteínas de superficie, se han extendido enormemente, constituyendo el aproximadamente el 18% del genoma de éste parásito (El-Sayed *et al.*, 2005a). La familia MASP es la segunda en número de miembros, con una serie de características en sus secuencias que la caracterizan, como la de poseer dos extremos N-(5') y C- (3') terminales conservados, una zona central altamente hipervariable, lugares de unión a GPI y sitios para N-glicosilación (Bartholomeu *et al.*, 2009).

De todos los genes que componen esta familia se sabe que sólo algunos de éstos se expresan de forma simultánea, representando según las estimaciones realizadas un 1.8 al 2.8% del total de los transcritos de la fase tripomastigote derivado de cultivo celular (Bartholomeu *et al.*, 2009). Debido a ello, la estrategia de clonación de genes MASP se realizó a partir de cDNA de la fase tripomastigote metacíclica (cepas PAN4, CI-Brener y Maracay) de la cual se carece de datos de expresión así como de la fase amastigote (cepa CL-Brener) donde también se carecen de datos concretos.

Tras el diseño de la estrategia de clonación a partir de los extremos 5'y 3' conservados de esta familia, se consiguió la amplificación y posterior clonación de un total de 15 transcritos (8 genes y 7 pseudogenes) de las diferentes cepas empleadas en la tripomastigote metacíclico y un gen de la fase amastigote. Al analizar las secuencias nucleotídicas de los 15 clones, se encontraron en ellos los extremos conservados 5'y 3' ya descritos, característicos de esta familia, y una gran región hipervariable tanto en longitud como en secuencia.

Considerando que sólo los genes y no los pseudogenes transcritos se traducen finalmente a proteína, se hallaron en las secuencias de aminoácidos los patrones y motivos típicos de las MASP descritos por Bartholomeu *et al.*, 2009 como son la existencia de las dos regiones N- y C- terminales conservadas, señales que se perderán en las proteínas maduras,

correspondiendo al péptido señal y una región altamente hidrofóbica en la porción transmembrana del extremo C-terminal que se perderán en la proteína madura, un motivo de unión a GPI y varios residuos de Treonina cerca del extremo C-terminal, existiendo sitios para N-glicosilación a lo largo de la región hipervariable central en las diferentes secuencias como se representa en la Figura 1.1.



**Figura 1.1.** Representación de los motivos y regiones características de una MASP prototípica anclada a membrana de la fase tripomastigote metacíclico. Imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido de una forma Tripomastigote metacíclico invadiendo una célula.

Cabe resaltar, como ya se ha indicado en la sección de resultados de esta Tesis, que la secuencia MASP96 de la fase Amastigote, solo posee la región N-terminal conservada (Figura D.3.18), perteneciendo dicha proteína, al grupo de las “MASP quiméricas”, las cuales portadoras de una sola de las regiones conservadas de esta familia o bien presentan secuencias híbridas entre TcMUC o TS y MASP (El-Sayed *et al.*, 2005a, Bartholomeu *et al.*, 2009).

El análisis comparativo entre las secuencias clonadas de las distintas cepas utilizadas, dio como resultado el encontrar tres grupos claros de genes MASP parálogos entre las tres cepas, que muestran una alta identidad entre ellos, si bien han debido de estar sujetos a presiones selectivas diferentes, dado que las diferentes cepas empleadas en los estudios, pertenecen a distintos linajes sujetos a diferentes presiones eco-epidemiológicas.

Actualmente no existe consenso sobre la evolución de los linajes de *T. cruzi* y sus relaciones, siendo un tipo de estructura de población “clonal”, en los que los parecen escasos o muy poco frecuentes los eventos de recombinación sexual, y en la que cada clon representaría un linaje individual, diferenciándose los diferentes linajes mediante eventos mutacionales, desde un ancestral antecesor común (Buscaglia *et al.*, 2003).

Si la evolución del parásito fuera totalmente asexual, tendría lugar, el conocido como “efecto Meselson” en el que nada impide que dos alelos de un mismo locus evolucionen de manera diferente (Macedo *et al.*, 2004). Sin embargo, se sabe mediante el análisis con microsatélites, que existe un alto grado de homocigosis en alelos determinados de *T. cruzi*, debiendo el parásito que homogeneizar sus secuencias mediante eventos recombinativos (Macedo *et al.*, 2004). Una familia multigénica se define como un grupo de genes que han descendido desde un gen ancestral y por tanto, poseen funciones similares y similares secuencias (Nei *et al.*, 2005). Teniendo en cuenta esto, sería posible explicar la existencia de genes MASP parálogos y no parálogos en las tres cepas mediante varios modelos que se indican a continuación y en la Figura 1.2.

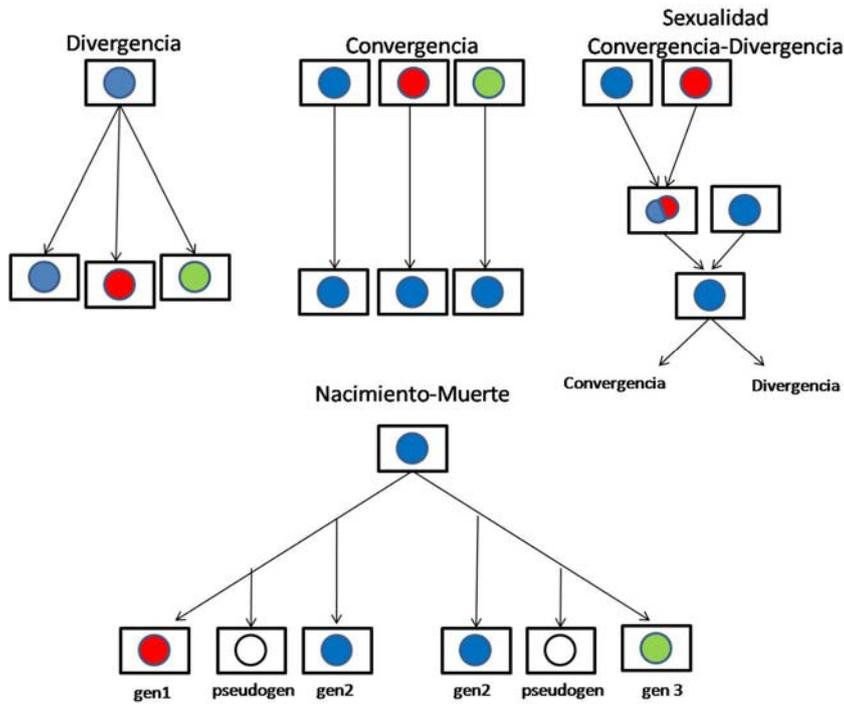
1. **Asexualidad y existencia de un antecesor común, Divergencia de las MASPs.** Mediante esta hipótesis podemos definir un clon de *T. cruzi*, antecesor común de los distintos linajes actuales, el cual codificaría y expresaría un gen MASP, del grupo 1 o 2 de los genes parálogos analizados en esta memoria (Figura D 3.8 y D. 3.9). Si la estructura poblacional fuera clonal, esto es, asexual, este antecesor daría lugar a los sucesivos linajes, en los que el gen MASP aportado evolucionaría de manera independiente, dando lugar a isoformas MASP parálogas en el caso de que la secuencia ejerciera un efecto positivo para el parásito.
2. **Asexualidad y antecesor común, Convergencia y evolución concertada de las MASPs.** En este caso un clon de *T. cruzi* antecesor común no codificaría para ninguno de los genes MASP de ninguno de los grupos de genes parálogos. Tras ocurrir una separación asexual entre linajes, genes MASP de cada uno de los grupos parálogos empezarían a expresarse y por deriva evolutiva se seleccionarían

positivamente aquellos que representaran un beneficio para el parásito, teniendo progresivamente a la homogeneizar las secuencias expresadas y por tanto a converger las secuencias MASP expresadas a partir de un fondo genético semejante.

- 3. Sexualidad y antecesor común. Convergencia-divergencia de las MASPs.** A pesar de que, como ya se explicó anteriormente, la sexualidad en *T. cruzi* no es la manera, al menos más usual de reproducción, este tipo de eventos podrían dar lugar a que dos clones independientes de *T. cruzi*, pudieran compartir una misma secuencia MASP, en un momento evolutivo puntual dando un evento drástico de convergencia, y evolucionando posteriormente de manera independientemente dando lugar a isoformas MASP parálogas, siempre que la secuencia ejerciera un efecto positivo para el parásito (divergencia).

A pesar de que ocurran divergencias entre las secuencias obtenidas en los dos grupos de genes parálogos, las ventajas que confieren dichos genes hacen que *T. cruzi* exprese preferentemente estos genes, sobre el amplio fondo genético que representa la familia MASP en su genoma. De no ser así, sería estadísticamente muy complicado el encontrar miembros tan parecidos, teniendo en cuenta el diferente linaje, origen biológico y geográfico de las cepas y el fondo genético que representa una familia multigénica de 1377 (pseudo)genes como es el caso de la cepa secuenciada, CL-Brener.

De todos los modelos el más cercano a los resultados obtenidos es el denominado como modelo evolutivo de “muerte y nacimiento” (Liao, 1999, Nei *et al.*, 2005). En este modelo, el “nacimiento” o “muerte” de los genes puede ocurrir por eventos al azar o sujetos a una selección, pudiendo estar grupos de genes relacionados entre sí por evolución concertada (genes MASP parálogos) o bien divergentes entre sí por la falta de relación entre ellos o por deriva evolutiva desde un antecesor común (genes MASP cepa-específicos), dándose lugar durante el proceso a un elevado número de pseudogenes, como ocurre con los genes de los receptores olfatorios entre distintas especies (Niimura *et al.*, 2006).



**Figura 1.2.** Representación esquemática de los modelos propuestos para la generación de grupos parálogos y no parálogos de genes MASP

La mayoría de los eventos mutacionales entre los grupos de genes parálogos, se suceden en la región hipervariable de las secuencias, que como se discute más adelante, es una fuente constante de variabilidad genética, en nuestro caso se han encontrado diferencias en la relación nucleotídica sinónima versus no sinónima ( $d_s/d_N$ ) entre las diferentes cepas, siendo superior esta relación, en las cepas CL-Brener y Maracay, encuadradas dentro del linaje TcII, que para la cepa PAN4, linaje Tc I. Es por tanto en el grupo Tc I, donde se encontraron mayores tasas de sustituciones no sinónimas. Esto quiere decir que, dentro de un mismo grupo, las relaciones  $d_s/d_N$  entre grupos parálogos de genes MASP, pueden determinar la similitud genética y distancia evolutiva que existe entre cepas de *T. cruzi*. Por otra parte, el alto grado de identidad encontrada entre las secuencias de un grupo parálogo, pudiera explicarse debido al beneficio funcional obtenido por el parásito.

Considerando que la cepa PAN4 en los tres grupos parálogos analizados da lugar a pseudogenes, la funcionalidad puede no ser, una fuerza selectiva para generar secuencias parálogas transcritas en función del tipo de producto encontrado caso de un gen-pseudogen. No obstante, ambos tipos de

productos si pueden tener función biológica para el parásito, actuando los genes MASP a nivel de proteínas y los pseudogenes MASP (o algunos de éstos) a nivel de mRNA, como se describirá en el capítulo posterior.

## **2. Arquitectura genómica y diversidad genética de la familia MASP entre distintas cepas de *T. cruzi***

La diversidad genética, además de la bioquímica y biológica, ofrecida por las diferentes cepas de *T. cruzi* así como sus diferencias eco-epidemiológicas, muestran como este es un protozoo altamente complejo (Buscaglia *et al.*, 2003, Macedo *et al.*, 2004, Pena *et al.*, 2009).

La variabilidad se demuestra por el hecho de que el último consenso realizado hasta la fecha, clasifica a *T. cruzi* en hasta seis unidades discretas de tipificación (DTU I- VI), complicándose aun mas por la existencia de especies híbridas, como ocurre con la CL- Brener (DTU VI) bastante difíciles de clasificar al poseer características compartidas entre linajes. De hecho, no suele bastar con una técnica aislada para clasificar a una cepa dentro de un linaje recomendándose hasta tres diferentes para conseguir la asociación a cualquier DTU (Lewis *et al.*, 2009)

Tras amplificar los extremos N- (5') y C- (3') de las MASP, se comprobó que estas regiones poseen un alto grado de conservación entre cepas de *T. cruzi* con linajes diferentes como PAN4 (Tc Ia/Tc Id/DTUI), CL-Brener (Tc IIe/DTU VI) y Maracay (híbrido Tc I-II), obteniéndose como resultado en todos los casos, un solo producto de amplificación de 90 pb (extremo 5') y de 71 pb (extremo 3') (Figura D. 2.3). Esto indica que esta familia de genes se encuentra ubicua en ambos linajes Tc I y Tc II, y por tanto muy posiblemente presente antes de que los dos linajes encontraran condiciones de poder solapar sus nichos ecológicos tras la deriva continental que unió Norte y Sudamérica, momento durante el cual ocurriría dejaría de existir una especiación críptica dada la separación existente entre vectores y hospedadores en ambos continentes (Briones *et al.*, 1999).

Cuando se utilizaron con otras especies de kinetoplastidos (*L. major*, *T. rangeli* o *Blasthocrithidia.sp*) las sondas capaces amplificar estos dos extremos N- (5') y C- (3') conservados, no se obtuvo ningún producto amplificado (Figura

D. 2.3), lo que demuestra que esta familia de genes es específica de *T. cruzi*, coincidiendo estos resultados con la ausencia de secuencias ortólogas a las MASPs en los genomas de *T. brucei* y *L. major* (El-Sayed *et al.*, 2005b, El-Sayed *et al.*, 2005a).

Se estima que la separación de las principales especies de kinetoplastidos (*L. major*, *T. brucei* y *T. cruzi*) ocurrió entre 200-500 millones de años (Emes *et al.*, 2008), momento a partir del cual se inicia la evolución de las familias multigénicas características *T. cruzi*, por tanto la existencia de los extremos conservados de la familia MASP es un marcador molecular de la especie de *T. cruzi*, siendo una característica esencial para clasificar a un protozoo dentro de este taxón.

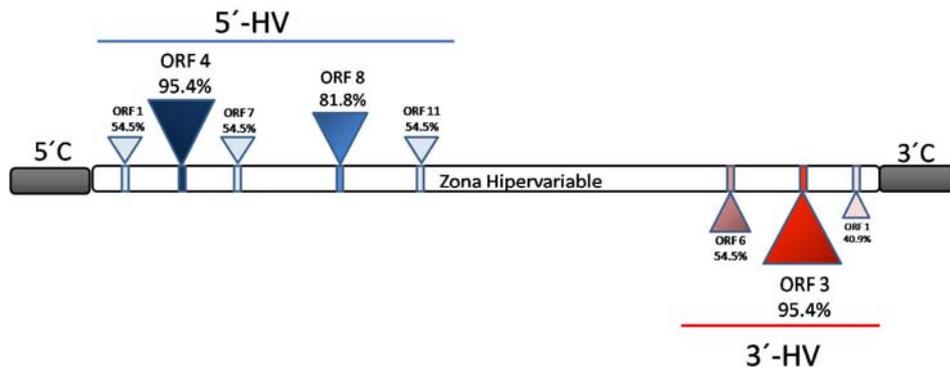
Técnicas como la de RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA-PCR) o LSS-PCR (Low Stringency Single Specific Primer-PCR) que generan patrones polimórficos de productos amplificados y que se basan en la amplificación mediante cebadores con secuencias arbitrarias o a través de la amplificación de un amplicón de un fragmento de kDNA en condiciones muy laxas, muestran como *T. cruzi* es un taxón muy heterogéneo (Tibayrenc *et al.*, 1993, Macedo *et al.*, 2004).

El ensayo llevado a cabo para el estudio del polimorfismo de secuencia dentro de una región hipervariable del gen MASP52 reveló un patrón altamente polimórfico en las 22 cepas utilizadas tanto para el extremo 5'-HV como para el 3'-HV (Figura D.2.5). Estas cepas eran representativas de todos los DTU y linajes de *T. cruzi* consensuados hasta la actualidad, observándose en los resultados como esta familia posee un poder mutacional muy elevado, encontrándose solo dos grupos de dos cepas tenían patrones iguales o muy parecidos para ambos extremos (cepas TR17 -TCC y CL-Brener-Maracay), perteneciendo estas cepas al mismo o a un linaje parecido.

Aunque se observaron pocos ORFs cepa-específicos (cepas HA, M5621 y Tu18), si se pueden definir marcos de lectura abiertos (ORF) comunes entre cepas, como los que se representan en la Figura 2.1, lo que indica la existencia dentro de la zona hipervariable de zonas menos propensas que otras a cambios mutacionales (Tabla D. 2.1).

Se sabe que *T. cruzi* favorece positivamente la selección para generar variabilidad genética en los genes de familias multigénicas y en especial

aquellos que corresponden a proteínas de superficie, como en el antígeno TSSA perteneciente al grupo de las mucinas TcMUC III (Di Noia *et al.*, 2002). El gen que codifica para dicha proteína posee dos alelos diferentes, generándose variaciones mutacionales, que cambian la composición aminoacídica sobre todo a nivel del mayor epítipo B de su secuencia, pudiendo así, ser reconocido de manera diferente por los sueros de individuos infectados con distintos linajes de *T. cruzi* (Di Noia *et al.*, 2002). La amplia variabilidad que hemos encontrado dentro de la región hipervariable de la MASP52, su localización superficial y en especial el análisis de sus secuencias y los experimentos de Microscopía láser conFocal (Figura D. 1.10 y D 1.12), sugieren que las proteínas MASP, al igual que sucede con las mucinas, pueden sufrir variaciones mutacionales y dichas variaciones alteren la exposición de antígenos o epítipos al sistema inmunitario del hospedador, jugando la región hipervariable un importante papel inmunomodulador durante el transcurso de la infección, y permitiendo al parásito sobrevivir y desarrollarse dentro en su hospedador (Buscaglia *et al.*, 2006, Di Noia *et al.*, 2002, Bhattacharyya *et al.*)



**Figura 2.1.** Puntos dentro de la región hipervariable de la MASP52 menos susceptibles a sufrir variaciones en su secuencia. Resultados del análisis de 22 cepas de todos los DTUs conocidos en la actualidad. Los Triangulos señalan los puntos más conservados para la unión de la sonda utilizada para la amplificación de la MASP52. El porcentaje de aparición de los ORFs más frecuentes en las cepas se representa tanto en valor numérico como en escala de degradación de colores azul para el extremo 5'-HV y roja para 3'-HV. HV: hipervariable, C: conservado.

### 3. Retrotransposición como mecanismo formador de (pseudo)genes MASP

Una de las fuerzas generadoras de variabilidad y que modulan la evolución de un genoma son los elementos génicos móviles (Kazazian, 2004).

Se conoce que una considerable proporción de los genomas de eucariotas superiores contienen este tipo de elementos génicos, y que constituyen el 40% del genoma humano, el 50% del maíz y hasta el 90 % en algunas plantas (Kazazian, 2004, Bringaud *et al.*, 2007). Las funciones asociadas a estas secuencias, no implican solo la propia supervivencia de éstas, sino que también pueden actuar como elementos reguladores transcripcionales interaccionando con regiones codificadoras de proteínas de genes celulares (Bringaud *et al.*, 2007). Un ejemplo de ello son los elementos LmSIDER2 de *Leishmania* los cuales son capaces de desestabilizar el mRNA, constituyendo un mecanismo regulador post-transcripcional en respuesta a diferentes tipos de estrés (Bringaud *et al.*, 2007).

Normalmente, las dianas de los retrotransposones para llevar a cabo su actividad endonucleasa son secuencias relativamente conservadas, lo que da lugar a un sitio de rotura (sitio diana), el cual, una vez se inserta el nuevo DNA, genera dos lugares duplicados (sitio diana duplicado) que son característicos de las secuencias retrotranspuestas (Kazazian, 2004). Los transposones que poseen lugares específicos de inserción se denominan sitioposones.

En *T. cruzi* recientemente se ha caracterizado la presencia de una nueva familia de estos retrotransposones a los que se le denomina TcTREZO (*Trypanosoma cruzi* tandem repetitive element ZO)(Souza *et al.*, 2007). Estos retroelementos se sitúan en islas no sinténicas del genoma de *T. cruzi*, encontrándose sus sitios de inserción en los motivos conservados de los (pseudo)genes MASP, lo que hace a la familia MASP un punto caliente de recombinación homóloga para que estos elementos transponibles se dupliquen y subsistan en el genoma (Souza *et al.*, 2007).

Para comprobar la existencia de estos elementos en los 15 clones de genes MASP de la fase tripomastigote metacíclico de las cepas estudiadas, se utilizaron los lugares de inserción conocidos como TcTREZO Up y TcTREZO

Down, llevándose a cabo un análisis CLUSTAL de las secuencias. Todas las secuencias tenían los motivos conservados, flanqueando los extremos 5' (Down) y 3' (Up), mientras que las secuencias correspondientes a los clones MASP3Ψ3PAN4 y MASP5Ψ1Maracay, poseían el motivo Down se encuentra más cerca de la región central de éstos pseudogénes. Las tres cepas analizadas en esta memoria poseían estos motivos, lo que coincide con los datos de Souza *et al.*, 2007, donde mediante Southern-Blot analizaron las cepas CL-Brener, G, Y y Silvio en donde se obtenía una hibridación positiva de la secuencia TcTREZO marcado con <sup>32</sup>P (Souza *et al.*, 2007). Estos resultados demuestran que la extensión y formación de todas las variantes (pseudo)génicas MASP clonadas, se deben a eventos de retrotransposición por parte de los elementos TcTREZO, dando lugar a los conocidos como retrogenes o retropseudogenes según el producto formado (Ding *et al.*, 2006). Por tanto, la familia MASP posee un mecanismo único y específico para la generación de variabilidad, poseyendo un mecanismo de evolución completamente dependiente de los retrotransposones TcTREZO.

#### **4. Pseudogenes MASP: Expresión y funcionalidad**

Como resultado del análisis de las secuencias de los 15 clones correspondientes con secuencias MASP, se obtuvieron un total de 7 pseudogenes transcritos en las tres cepas estudiadas.

Se sabe, por otra parte, que la alta cantidad de pseudogenes generados en una familia de genes corresponde con el alto nivel de mRNA generado por dichos genes, como ocurre con los genes humanos ribosomales (Balasubramanian *et al.*, 2009). Por ello, el alto número de pseudogenes que contiene la familia MASP (433) puede ser consecuencia de las altas tasas de mRNA generados por ésta, que como comentamos anteriormente, corresponden con el 1.8 al 2.8% del total de los transcritos de la fase tripomastigote derivado de cultivo celular (Bartholomeu *et al.*, 2009). Existen pocos datos de la expresión pseudogénica en *T. cruzi*, si bien un estudio llevado a cabo por Allen *et al.*, 2001, describió la existencia un “array en tándem” de 6 pseudogenes correspondientes a la familia multigénica de las mucinas con un único codón de parada interno. Como se ha comentado en el

anterior capítulo, el mecanismo generador de la diversidad genética de la familia MASP es la retrotransposición mediante los elementos móviles TcTREZO, deduciéndose por tanto, que los pseudogenes clonados, corresponden con el tipo de Pseudogenes Procesados o Retropseudogenes (Ding *et al.*, 2006). La retrotransposición puede dar lugar a una pérdida de la región promotora del gen progenitor. Para mantener su actividad transcripcional, un pseudogén procesado debe integrarse aguas abajo de un promotor preexistente, pudiéndole conferirle una capacidad de expresión espacio-temporal diferente a la de su progenitor ancestral (Ding *et al.*, 2006). Considerando el número total de secuencias clonadas (aunque con grandes diferencias entre cepas), se han encontrado que un 46.6% de estos transcritos son catalogados como pseudogenes. Es muy posible que el procesamiento policistrónico del mRNA de *T. cruzi* (Teixeira, 1998), le pueda conferir al parásito una mayor capacidad para transcribir secuencias pseudogenicas, debido al bajo número de promotores que éste parásito necesita para expresar sus genes codificadores para proteínas. Por tanto, la retrotransposición y el procesamiento policistrónico pueden conferir al parásito, la posibilidad de ampliar y transcribir los pseudogenes procesados de la familia multigénica MASP, distanciándose nuestros resultados del concepto descrito por otros autores de que cuando los pseudogenes se procesaban, se insertaban en su nueva localización “muertos en su llegada” ya que perdían la capacidad de transcribirse (D'Errico *et al.*, 2004, Balakirev *et al.*, 2003, Ding *et al.*, 2006)

Según los estudios realizados con secuencias del genoma de humano y de ratón, la tasa de formación de pseudogenes procesados a partir un gen concreto es de un 1 a 2% cada millón de años, constituyendo este mecanismo una fuente constante de diversidad genómica (Nakao *et al.*, 2004). Del análisis de nuestros resultados, no se encontraron en las secuencias obtenidas, una gran diferencia en el contenido de G+C entre las secuencias génicas y pseudogénicas, si bien si encontramos una mayor predisposición a la degeneración de la tercera posición de codones codificadores para los aminoácidos Alanina y Prolina (Figura D. 3.7). Si bien el valor encontrado es parecido, el uso de codones con respecto al anotado en el genoma de *T. cruzi*, posee una divergencia ligerísimamente superior para los pseudogenes MASP obtenidos (15.49%) con respecto a los genes MASP (14.88%). Al no existir una

clara divergencia gen-pseudogén, la evolución neutral de los pseudogenes postulada por algunos autores, no se encuentra reflejada en los valores encontrados, siendo posible que los pseudogenes se encuentren sujetos a algún tipo de presión selectiva, como ha sido demostrado en los pseudogenes procesados ribosomales en cuatro genomas diferentes de mamíferos (Balasubramanian *et al.*, 2009).

Una vez se demostró la existencia de transcripción activa de productos pseudogenicos MASP, se procedió al análisis de la posible funcionalidad de dichos transcritos. Para realizar dicho estudio, seleccionamos el pseudogén MASP2Ψ1CL que poseía un 100% de identidad de secuencia con respecto al pseudogén MASP2Ψ2PAN4. Estos niveles de identidad, sugieren la existencia de una funcionalidad biológica de dichos pseudogenes, dado que dicha identidad es consistente con la presencia de una presión selectiva que evolutivamente hubiera fijado dichas secuencias, debido a que pueden jugar un rol importante en la para el parásito. Estos niveles de identidad se observan en otros pseudogenes como el Makorin1-p1 en ratón o el PgiC1 con respecto al ΨPgiC2 en plantas silvestres del género *Clarkia* (Balakirev *et al.*, 2003, Podlaha *et al.*, 2004).

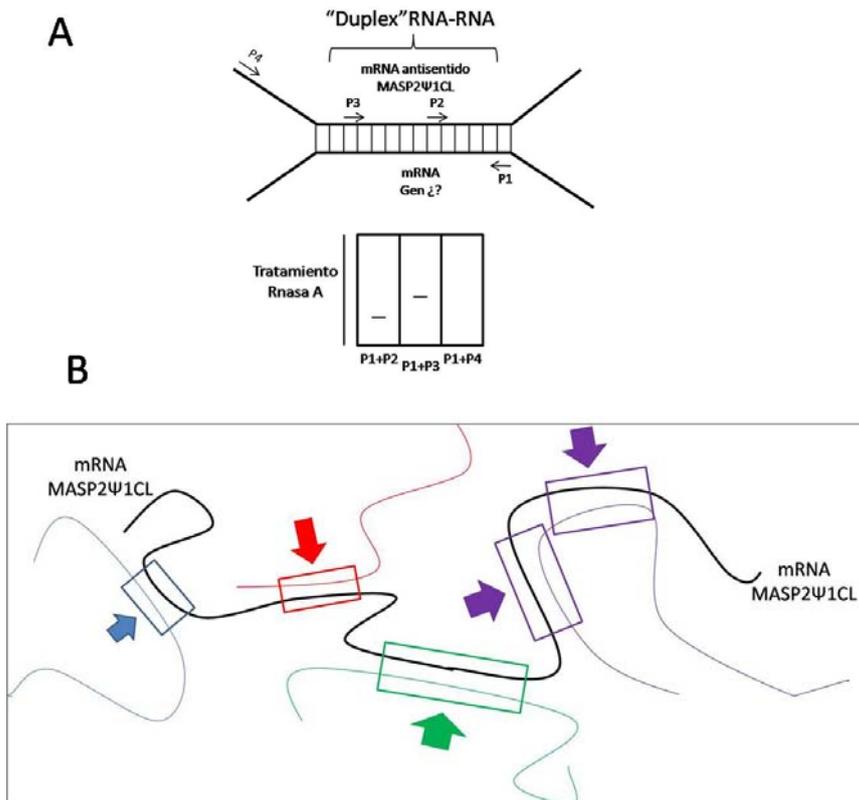
Aunque no hay publicados demasiados trabajos sobre la funcionalidad de pseudogenes *in vitro*, se sabe que estos son una posible fuente de regulación postranscripcional, debido a que puedan incluir secuencias parcialmente invertidas de otros genes, que puedan servir como RNA antisentido de otros RNA transcritos, generándose híbridos RNA-RNA que silenciando la expresión génica y por tanto la traducción del producto proteico final (Korneev *et al.*, 1999, Balakirev *et al.*, 2003). Como postulan algunos autores, los pseudogenes podrían ser una gran fuente de RNA de interferencia endopseudogénicos (endo-sRNAi) de unos pocos nucleótidos de longitud (~20-25 Nts), generados a partir de la rotura de segmentos de RNA por ribonucleasa citoplasmática "Dicer", los cuales se procesan por el complejo multiproteico RISC para alinearse y reconocer el mRNA complementario a este, silenciando así, la expresión del gen diana de los endo-sRNAi (Sasidharan *et al.*, 2008, Guo *et al.*, 2009). Al no existir homólogos de Dicer para generar RNAi en las secuencias del genoma de *T. cruzi*, este parásito debe usar mecanismos de regulación post-transcripcional alternativos a nivel del RNA,

con lo que el papel señalado de los pseudogenes podría ser uno de los mecanismos de regulación (El-Sayed *et al.*, 2005b).

En base a los resultados obtenidos, y al tratar el RNA total de la fase tripomastigote metacíclico con RNasa A, la cual digiere hebras monocatenarias de RNA, se conservó aproximadamente un 1.5%, del total de RNA de partida, lo que correspondería con hebras bicatenarias de RNA. Tras sintetizar el cDNA específico del pseudogén MASP2Ψ1CL a partir de RNA tratado y no tratado con RNasa A y amplificar distintas regiones de este, obtuvimos la amplificación de las dos primeras parejas de cebadores (P1+P2 y P1+P3), no obteniendo amplificación de la última pareja de cebadores (P1+P4), en la muestra tratada con RNasa A (Figura D. 3.23). Este hecho significa que existe una región del mRNA que correspondería a la secuencia del MASP2Ψ1CL, no digerible por la ribonucleasa A, y que corresponde al producto de los cebadores P1+ P3 de 124 pb de la región hipervariable central. Si bien esta región no es digerible por la RNasaA, si que se hidroliza por dicha enzima a la altura del extremo 5' del pseudogen, donde situamos el cebador P4 (Figura 4.1.(A)).

Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Korneev *et al.*, 1999, en los cuales se obtenían híbridos RNA-RNA de 139 pb de longitud entre el gen de la óxido nítrico sintasa y su pseudogen asociado, híbridos estables tras el tratamiento con RNasa A. La estabilidad en 124 nucleótidos del mRNA MASP2Ψ1CL puede indicar que dicho pseudogen es un potencial regulador postranscripcional de otros genes, implicando la existencia de una secuencia antisentido complementaria a la de otros transcritos del tripomastigote metacíclico que estén siendo expresados en ese instante (Figura 4.1.(B)).

La inversión de la secuencia de MASP2Ψ1CL y posterior búsqueda en BLAST de secuencias antisentido de dicho pseudogen, no produjo ningún resultado que alineara 124 nucleótidos, si bien se encontraron identidades de diversos genes a la altura de la región hipervariable de MASP2Ψ1CL de pocos nucleótidos de longitud (17-20 Nts), (8 proteínas hipotéticas, 1 serín peptidasa dipeptidil peptidasa 8-“like” y 2 receptores para adenilato ciclasa), siendo el alineamiento más extenso el encontrado para 51 nucleótidos en un gen MASP con un número de acceso: XM\_815553.1). Es posible que estos resultados impliquen que MASP2Ψ1CL interaccione con más de un gen a la vez. (Figura 4.1. (B)).



**Figura 4.1.** (A) Esquema de la estrategia seguida para la determinación de la existencia de "dúplex" RNA-RNA estables. (B) Mapa complejo de interacciones RNA-RNA sugerido para el pseudogen MASP2Ψ1CL. Las flechas y los rectángulos indican puntos de interacción de los mRNA de diferentes genes con secuencias antisentido de MASP2Ψ1CL, creándose varios dúplex a lo largo del mRNA del pseudogén.

## 5. Expresión de la familia MASP en distintas fases y cepas de *T. cruzi*

Del total de genes MASP secuenciados en el genoma de *T. cruzi* (El-Sayed *et al.*, 2005a), sólo un porcentaje relativamente pequeño de éstos se expresan hasta proteína, pudiendo por ello, utilizarse las regiones conservadas de esta familia como herramienta para construir sondas a partir de ellas y medir el nivel de expresión, como previamente se ha descrito utilizando el extremo 3' conservado o la región 3'UTR del mRNA de las MASP (Bartholomeu *et al.*, 2009). En el trabajo realizado para confeccionar la presente memoria, se diseñaron cebadores para el extremo 5' de las MASP, dado que presenta un mayor nivel de conservación que el extremo 3' utilizado por Bartholomeu *et al.*,

2009, analizando el nivel de expresión mediante RTqPCR en los cuatro estadios del parásito de las cepas PAN4 (Tcla/Tcld/DTUI) y CL-Brener (Tclle/DTUVI), alejadas filogenéticamente.

El mayor nivel de expresión encontrado dentro de la cepa CL-Brener correspondió a la fase amastigote, el cual posee una expresión 3.6 veces superior al de tripomastigotes derivados de cultivo celular (Figura D.3.15). Este resultado difiere del encontrado por Bartholomeu *et al.*, 2009 donde obtienen una menor expresión en el estadio amastigote con respecto al estadio tripomastigote derivado de cultivo celular o incluso en las aproximaciones proteómicas donde solo se encontraron nueve péptidos de esta familia en la fase tripomastigote derivado de cultivo celular (Atwood *et al.*, 2005). Estas diferencias pueden deberse al tipo de sonda utilizada (en nuestro caso se utilizó el extremo 5', en vez del 3' conservada de los genes MASP o la región 3'UTR) y que en el estudio realizado por Bartholomeu *et al.*, 2009 se realizó con parásitos de tipo amastigote-“like”, y no con los amastigotes intracelulares, empleados por nosotros, donde el nivel de expresión se asemejaría más a las condiciones naturales de infección. Estas diferencias se comentan en el capítulo siguiente de esta Discusión donde se habla de la Inmunolocalización de la MASP52 sobre los amastigotes extracelulares o intracelulares y donde el patrón de localización varía dependiendo de la procedencia de los amastigotes (Figura D.1.10 y D.1.11).

Al contrario de lo que ocurre en la cepa CL-Brener, es la fase tripomastigote derivado de cultivo celular en la cepa PAN4 la que posee el mayor nivel de expresión, siendo 3.33 veces superior a la de la fase amastigote. En ambas cepas la fase con menor expresión para las MASP fue la fase epimastigote, y especialmente la más baja con respecto a las demás fases en la cepa CL-Brener, lo que coincide con los resultados obtenidos por Bartholomeu *et al.*, 2009. Y si bien el nivel de expresión relativa entre las distintas formas del ciclo biológico de la cepa CL, coinciden con los descritos por estos últimos autores, encontramos que en la cepa PAN 4, el nivel de expresión de las MASP en las formas epimastigotes es muy superior a lo actualmente descrito, dado que los niveles de expresión de las formas no infectantes son semejantes a la de las fases metacíclica y amastigote (Figura D.3.15).

Hasta los resultados para la presente memoria de tesis, no existían datos acerca de la expresión de la familia MASP en la fase tripomastigote metacíclico. De los datos de RTqPCR se deduce que la fase infectante, posee un nivel de expresión 3.11 veces menor que la fase tripomastigote derivada de cultivo celular en la cepa PAN4 y 56 y 202 veces menor que la fase tripomastigote de cultivo celular y amastigote en la cepa CL-Brener. Por tanto no sólo encontramos una expresión diferencial entre los distintos estadios del parásito, sino que existen diferencias de expresión significativas, entre las diferentes cepas.

La posible explicación a la menor expresión por parte de las formas metacíclicas respecto a las formas tripomastigotas sanguíneas, pudiera deberse al hecho de que estas formas metacíclicas están preparadas para poder llevar a cabo una infección rápida de las células a través de las mucosas o de la piel, como responsables de la primo infección, sin tener que estar condicionadas a mecanismos de protección frente al sistema inmunitario. Mientras que las formas tripomastigotas sanguíneas pasan tras el ciclo intracelular, al sistema circulatorio o linfático y por lo general deben estar expuestas a una masiva respuesta inmunitaria específica y debiendo también estar preparadas para poder invadir un amplio grupo de células o incluso ser ingeridas por parte de los insectos triatominos, para así completar el ciclo fuera del hospedador mamífero.

Las características biológicas de las cepas pertenecientes a linajes diferentes dentro del taxón *T. cruzi*, indican que existe una clara divergencia entre ellas tanto *in vivo* como *in vitro*, pudiéndose incluso, realizar clasificaciones filogenéticas en base al biotipo particular de cada cepa (Devera *et al.*, 2002, Zingales *et al.*, 1997, Yoshida, 2006, Devera *et al.*, 2003), lo que apoya los diferentes resultados en los patrones de expresión entre la cepa PAN4 y la cepa CL-Brener (Figura D.3.15).

De igual manera se han descrito diferencias eco-epidemiológicas, asociándose las cepas del tipo Tc I preferentemente con un ciclo selvático y las cepas Tc II con un ciclo periurbano o doméstico (Buscaglia *et al.*, 2003, Pena *et al.*, 2009).

Los niveles de parasitemia encontrada en ratones Balb/c infectados con diferentes cepas como la cepa G (DTUI/TcI), Y (DTUII/TcII) o CL-Brener (DTU

VI/TcII), indican que existen diferencias de virulencia entre las cepas durante la fase aguda de la infección en los ratones infectados, poseyendo un mayor nivel de infectividad las cepas Y y CL que la cepa G, es decir las cepas del linaje Tc II con respecto a las cepas tipo Tc I (Yoshida, 1983). A la diferente infectividad *in vivo*, se acompaña de otras características diferenciales, como el diferente tropismo tisular que muestran las cepas de *T. cruzi*, clasificándose como cepas miotrópicas cuando invaden preferentemente el tejido muscular, reticulotrópicas cuando invaden células fagocíticas mononucleares y un tercer grupo que invade el tejido nervioso, sistema reproductivo u otros (Devera *et al.*, 2003). Por tanto, la expresión diferencial de (pseudo)genes MASP, de los distintos estadios del parásito en las cepas PAN4 y CL-Brener, se corresponde con la dicotomía Tc I-Tc II existente en el comportamiento biológico de las cepas.

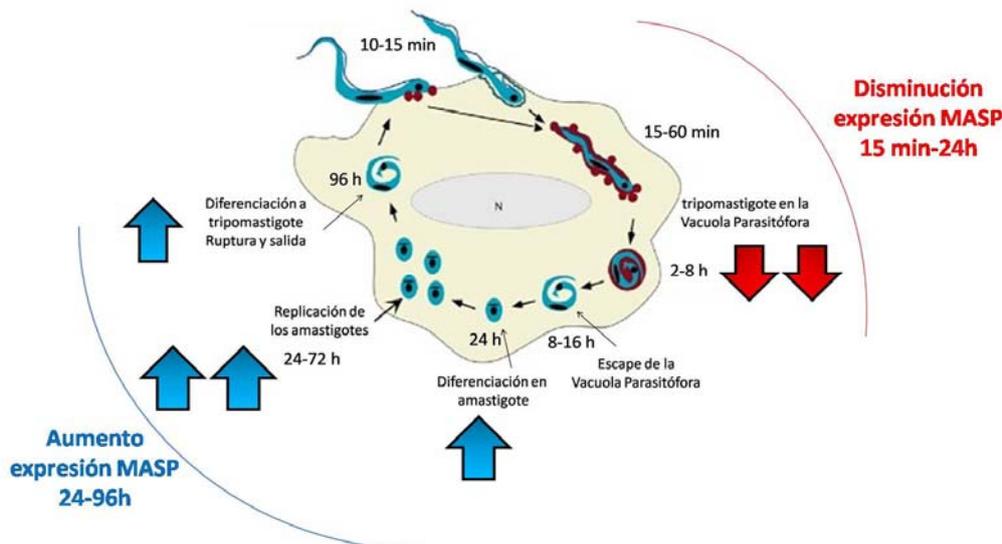
La gran expansión de la familia MASP en el genoma de *T. cruzi*, sugiere que dicha familia es esencial para la supervivencia del parásito. La alta expresión de estas en la fase tripomastigote derivado de cultivo celular puede ser debida, como ya se ha mencionado, a que dicha fase es la que posee una mayor exposición con el sistema inmune y por tanto la expresión de variantes proteicas MASP en la membrana de *T. cruzi* sería un mecanismo necesario para la evasión de dicha respuesta, con un mecanismo no igual, pero semejante a como ocurre con las proteínas VSG de *T. brucei* (El-Sayed *et al.*, 2005a, Marcello *et al.*, 2007, Bartholomeu *et al.*, 2009). También se postula que la expansión de dicha familia, su alta expresión en la fase tripomastigote derivado de cultivo celular, su exposición en la superficie e incluso su secreción, sería un mecanismo generador de proteínas que participaran en los procesos de interacción y supervivencia durante la invasión y multiplicación en la célula hospedadora facilitando la invasión en numerosos tipos celulares, característico de *T. cruzi* (Bartholomeu *et al.*, 2009).

Otro resultado que indica la divergencia entre cepas Tc I y Tc II, se encuentra reflejada en el diferente nivel de expresión de transcritos MASP en las fases amastigote de las cepas PAN4 y CL-Brener, encontrándose la mayor expresión como ya se ha indicado, en esta última cepa. Esto coincide con los datos obtenidos por diversos autores, los cuales muestran que las cepas asociadas a linaje Tc II suelen ser más infectivas, poseyendo no sólo una

mayor capacidad de invasión, sino de multiplicación de los amastigotes intracelulares (Zingales *et al.*, 1997, Yoshida, 2006), lo que también podría relacionarse con el papel antes asignado a las MASP. Estudios realizados utilizando las cepas G (Tc I) y CL-Brener (Tc II), demostraron que parte de los motivos por los que las cepas pueden tener diferente infectividad, se podría deber a la diferente expresión de glicoproteínas de superficie (gp82, gp35/50 y gp90) y su distinta capacidad que estas glicoproteínas tienen para elevar los niveles de  $Ca_{2+}$  en el interior de la célula hospedadora (Ruiz *et al.*, 1998), por lo que las diferencias de expresión de las MASP entre las cepas PAN4 y CL-Brener, podrían también dar lugar a un comportamiento biológico diferente de éstas cepas.

Por todo ello, se podría pensar que las mayores tasas de replicación intracelular de la fase amastigote se correlacione con la mayor transcripción de miembros de la familia MASP (Figura D.3.15.B), constituyendo una serie de recursos de invasión y supervivencia a los diferentes ambientes tanto intracelulares como extracelulares por los que tiene que pasar *T. cruzi* a lo largo de su ciclo biológico. El estudio del nivel de expresión a lo largo del ciclo intracelular mediante microscopía láser confocal, permitió determinar que los niveles de expresión de las proteínas MASP eran bajas en las formas tripomastigotas metacíclicas durante el proceso de adherencia y penetración en la célula hospedadora (2h post infección), dato que coincide con los obtenidos por RTqPCR ya discutidos anteriormente. Las mayores tasas de expresión de las proteínas MASP, se obtienen en los amastigotes a partir de las 24h postinfección (Figura D. 3.21), lo que coincidiría con el momento durante el cual el parásito se libera de la vacuola parasitófora y se expone directamente al citosol celular, supuestamente mediante la participación de una molécula formadora de poros conocida como TcTox (Andrews *et al.*, 1990, Burleigh *et al.*, 2002). A modo simplemente de recordatorio el amastigote formado, debe de iniciar su propio metabolismo iónico, energético y sintético, iniciando la multiplicación de los amastigotes, en el ambiente fisiológico del citoplasma celular, lo que le permite ocupar el citoplasma antes de transformarse nuevamente en tripomastigotes, todo ello en aproximadamente 96h (Burleigh *et al.*, 2002). La determinación inmunológica mediante el uso de anticuerpos frente al péptido señal (extremo N-terminal conservado) de las MASP, detectó

un incremento en la producción de MASP con un pico máximo de intensidad de fluorescencia, (máximo de expresión) a las 72h postinfección (Figura D. 3.21), momento durante el cual en la fase amastigote se empieza a iniciar la diferenciación a tripomastigote (Burleigh *et al.*, 2002, Yoshida, 2006). Por tanto, la expresión de las MASP pudiera estar relacionada por una parte, como respuesta al estrés intracelular, ya que se observa un aumento de la producción de las MASP a partir de las 24 horas postinfección, momento a partir del cual, el parásito deja de poseer la protección de la vacuola parasitófora que lo protege durante las primeras horas tras la entrada en la



célula (Osuna *et al.*, 1986, Andrews, 1995). Como hemos indicado antes, la expresión de las MASP es máxima (72 horas postinfección), cuando el parásito comienza a prepararse para la salida como trypomastigote para invadir una nueva célula, cuando ocurre el contacto con el medio extracelular a la célula o incluso al acceder al ambiente del tracto digestivo de los insectos que actúan como hospedadores intermediarios. Por tanto, cabe suponer que quizás las MASP sean una forma de protección biológica al estrés que el acceso a dichos ambientes a las que las formas tripomastigotas sanguíneas pueden verse potencialmente envueltas.

**Figura 5.1.** Esquema de la expresión de las proteínas MASP durante el ciclo intracelular de *T. cruzi* de la cepa CL-Brener. Figura modificada de Burleigh *et al.*, 2002.

## 6. Detección proteómica de proteínas MASP y caracterización de la MASP52

El hecho de que los miembros de la familia MASP posean un péptido señal en su extremo *N*-terminal, indica su posterior localización en membrana o incluso su secreción al medio externo (El-Sayed *et al.*, 2005a, Bartholomeu *et al.*, 2009). Debido a ello, se decidió estudiar si entre las proteínas secretadas por *T. cruzi* durante el proceso de invasión celular por tripomastigotes metacíclicos, se encontraban proteínas pertenecientes a ésta familia de proteínas. Hasta este momento hay reportadas en la bibliografía un total de 14 proteínas MASP, que han sido identificadas como péptidos únicos mediante aproximaciones proteómicas (Atwood *et al.*, 2005, Atwood *et al.*, 2006, Ferella *et al.*, 2008), sugiriendo que esta familia de genes o no se expresan tan abundantemente como otras proteínas como las TS, o que poseen modificaciones posttranscripcionales como las mucinas, lo que complica su detección proteómica.

Como resultado de nuestra purificación en el medio de interacción parásito- célula, se identificó una proteína, que tras su secuenciación se identificó como perteneciente a la familia MASP con un peso molecular de la proteína nativa de 52 kDa y un peso molecular teórico de la proteína secuenciada de 49.9 kDa. En la secuenciación de dicha proteína se encontraron 7 péptidos pertenecientes de una proteína MASP previamente descrita en el genoma (nº de acceso: XP\_820015.1) y a la que denominamos como MASP52. En el medio no enriquecido por columnas, se detectó igualmente un péptido que correspondía con una proteína MASP y que denominamos como la MASP5 en función de su peso molecular.

El estudio de la secuencia de la MASP52 correspondía con la estructura de una MASP prototípica (Figura D.1.4 y D.1.5), mientras que tras el estudio de la MASP 5 concluimos que ésta pertenecía al grupo de las proteínas MASP quiméricas, ya que ha perdido el extremo *C*-terminal conservado de las MASP (El-Sayed *et al.*, 2005a, Bartholomeu *et al.*, 2009).

La purificación de la MASP52, como ya se ha descrito, se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad con la WGA-lectin, a partir del medio la interacción entre las formas tripomastigote metacíclico infectantes y las células

que estaban siendo invadidas. El hecho de mostrar afinidad por dicha lectinas, confirma que dicha proteína se encuentra glicosilada con residuos terminales en su secuencia azucarada de *N*-acetilglucosamina capaces de ligarse a la lectina (Mintz *et al.*, 1979). Dicho resultado se corroboró mediante el análisis de la secuencia en busca de motivos para *N*-glicosilación, obteniéndose un motivo con secuencia ANGTNA correspondiente a las posiciones aminoacídicas 465 al 470 de la secuencia (Figura D 1.4 y D.1.5) capaz de ser glicosilado. Igualmente se encontró un motivo del tipo A de unión a ATP/GTP (P-loop) con secuencia AEEAAGKT (secuencia consenso: [AG]-x(4)-G-K-[ST]) situado entre la posición 159 a la 166 (Figura D 1.4 y D.1.5), al que denominamos como centro catalítico de la proteína y que se relacionaría con una potencial actividad enzimática de la MASP52. El análisis BLAST de éste motivo en la base de datos de TriTrypDB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>) mostró que dicha secuencia catalítica únicamente se encuentra de forma completa en la MASP52 dentro del genoma de *T. cruzi*.

De igual manera el estudio de la secuencia de la MASP52 indica ésta posee una región transmembrana altamente hidrofóbica, típica de este tipo de proteínas, en el extremo C-terminal conservado (Figura D 1.4 y D.1.5) (aminoácidos 493-507) y un motivo de unión a GPI (aminoácido 483) que permitiría su anclaje a la membrana del parásito. La confirmación de dicho anclaje a la membrana se realizó mediante western blott al detectarse la MASP52 en la fracción de proteínas de membrana hidrofílicas de las formas tripomastigotas metacíclicas (Figura D.1.7), así como mediante los estudios inmunoquímicos, tras el reconocimiento con el anticuerpo dirigido frente al centro catalítico (IgG anti-AEE) (Figura D 1.10 y D.1.11). Los resultados de los estudios inmunoquímicos, nos confirman la localización de la MASP52 en la membrana plasmática y citosol de todas las fases estudiadas. Esta localización coincide con los datos aportados por otros autores en los cuales se detecta la presencia de las proteínas MASP en la membrana plasmática de los epimastigotes de *T. cruzi* y en la membrana de las formas tripomastigotas derivadas de cultivo celular (Ferella *et al.*, 2008, Bartholomeu *et al.*, 2009). Dichos autores, empleando metodologías similares a las nuestras, mediante la detección por inmunofluorescencia de las MASP mediante anticuerpos frente a un péptido MASP consenso obtenido por el análisis de múltiples regiones

hipervariables de genes MASP (Bartholomeu *et al.*, 2009), concluyen la posible existencia de subgrupos poblacionales de estas proteínas, dentro de una población clonal de un mismo stock de parásitos, ya que sólo un 5% de los parásitos eran inmunodetectados con el anticuerpo originado de dicha secuencia consenso. Nuestros resultados difieren de los obtenidos por Bartholomeu *et al.* 2009, dado que de los ensayos de Inmunolocalización, muestran como el 100% de los parásitos reaccionan frente a los anticuerpos anti-AEE, no confirmándose, al menos para el caso de la MASP52, que esta sólo esté presente en subgrupos poblacionales. Tras estos resultados, en que la totalidad de los parásitos expresan la MASP52, los datos de expresión proteica y cuantificación mediante Western-blot (Figura D.1.6), así como mediante la cuantificación de los niveles de expresión de los mRNAs mediante RtgPCR (Figura D.1.9) confirman que la MASP52 se expresa en todos los estadios de *T. cruzi*, con niveles de expresión diferentes entre las distintas formas del ciclo biológico del parásito, siendo las fases tripomastigote metacíclico y tripomastigote derivado de cultivo celular, las que poseen mayores niveles de expresión tanto de mRNA como de proteína, manteniéndose en la fase amastigote un nivel intermedio y basal para las formas epimastigotes.

La cuantificación de los niveles de mRNA y de la proteína MASP52 fue llevado a cabo en la cepa PAN4, obteniéndose un patrón un tanto diferente del encontrado cuando analizamos la familia MASP al completo (Véase capítulo anterior). Esto indica, que la expresión entre miembros puntuales de esta familia varía, posiblemente debido al hecho de que al poseer estos una región tan hipervariable en secuencia y longitud, la funcionalidad espacio-temporal de dichas proteínas sean muy diferentes entre sí. No obstante, se confirma la expresión diferencial de esta familia de proteínas en las diferentes fases del ciclo de vida del parásito, así como el posible papel de la MASP52 en el proceso de invasividad del parásito en la célula, ya que es en los estadios infectivos donde encontramos la mayor expresión, semejante a los resultados de otros autores donde que obtienen la mayor expresión en los tripomastigotes derivados de cultivo celular (Atwood *et al.*, 2005, Bartholomeu *et al.*, 2009).

Algunas de las imágenes de inmunolocalización bajo microscopía electrónica, permiten observar acúmulos de la MASP52 formando “clusters”

tanto en vacuolas citosólicas así como en la bolsa del flagelo (Figura D.1.10, D.1.11(A) y D.1.12) de las formas tripomastigotas metacíclicas, fase durante la cual existe la mayor expresión de la MASP52. Si bien las MASP son proteínas que han sido descritas ancladas en la membrana (El-Sayed *et al.*, 2005a, Atwood *et al.*, 2005, Bartholomeu *et al.*, 2009), recientemente también se han descrito como proteínas secretadas (Bartholomeu *et al.*, 2009). Los datos mostrados en la presente memoria confirman la existencia de la secreción de la MASP52 y de la MASP5 por parte de las formas tripomastigotes metacíclicos durante el proceso de interacción parásito célula, secreción en el caso estudiado con más detalle de la MASP52, que ocurre en presencia de las células (vivas o muertas) y en presencia solo de las membranas celulares (Figura D1.7). La no detección de esta proteína mediante western-blot en el medio de incubación de parásitos aislados, sugiere que el mecanismo de secreción de la MASP52 es un proceso activo e inducible tras la interacción con la membrana de la forma infectiva del parásito con ligandos presentes en la membrana de la célula hospedadora.

Las imágenes de fluorescencia obtenidas por microscopía confocal, muestran como la MASP52 aparece en el punto de la interacción de la forma metacíclica con la célula hospedadora y que dicha proteína se internaliza en la célula justo cuando el parásito está realizando su entrada en el citoplasma celular o incluso previa a la completa interiorización (Figura D.1.11 (A)).

Como se comentó en el capítulo anterior, la distribución del patrón de los patrones de fluorescencia observado frente a la MASP52 en las formas amastigotas, variaban si se trataba de los amastigotes intracelulares presentes en las células infectadas o de las formas amastigotas purificadas tras completar el ciclo del parásito intracelular (Figura D 1.10 y D.1.11). En este último caso, la MASP52 se sitúa en el citosol y la membrana del parásito (Figura D.1.10(D)), mientras que en el caso de los amastigotes intracelulares, la proteína se localiza en el exterior del parásito distribuyéndose por el citoplasma celular que rodea al amastigote (Figura D.1.11(B)). Aunque existen proteínas descritas como la TcTox o las TS (Burleigh *et al.*, 2002, Andrade *et al.*, 2005, Rubin-de-Celis *et al.*, 2006, Yoshida, 2006) que juegan un papel en el proceso de la ruptura y escape desde el citosol de la célula donde se han multiplicado los amastigotes, desconocemos si la MASP52 pudiera jugar algún papel en el

mecanismo de transformación en tripomastigotes y posterior ruptura celular necesaria para la liberación de los parásitos.

La capacidad de invadir y multiplicarse en una gran variedad de tipos celulares del hospedador vertebrado, es una característica diferencial de *T. cruzi* con respecto a otros kinetoplastidos (Stuart *et al.*, 2008). La especificidad de la familia MASP en *T. cruzi*, la diversidad de genes que contiene, la expresión por las fases infectivas de *T. cruzi* y la existencia de regiones altamente hipervariables, induce a pensar que algunas de las proteínas codificadas por dichos genes deben estar relacionadas con el proceso de entrada y establecimiento del parásito en la célula hospedadora (Atwood *et al.*, 2005, Buscaglia *et al.*, 2006, Bartholomeu *et al.*, 2009). Al igual que las proteínas TS, gp82, Tc-1, POPTc80, algunas de las cuales ya han sido citadas en esta memoria, y han sido descritas como esenciales en el proceso de entrada e invasión celular, dado que el uso de anticuerpos frente a dichas proteínas inhibe el proceso de invasión celular (Villalta *et al.*, 2001, Yoshida *et al.*, 1989, Bastos *et al.*, 2005, Atayde *et al.*, 2007, Augustine *et al.*, 2006), de nuestros resultados se deduce, que el bloqueo mediante anticuerpos frente a la región catalítica de la MASP52, evidencian la participación esta proteína en el proceso de entrada del parásito en su célula (Figura D.1.15). Participación que fue corroborada con los experimentos de absorción e Inmunolocalización de partículas inertes de bentonita sensibilizadas con MASP 52. En la Figura D.1.13 se observa como las partículas de bentonita absorbidas con la MASP52 tras cuatro horas de interacción con las células, son reconocidas por los anticuerpos anti-AEE en el interior del citoplasma de las células con las que interacciona. Dichas partículas se observan en el interior de vacuolas, similares a vacuolas endocíticas, mientras que las células interaccionadas con partículas de bentonita absorbidas con BSA, no mostraban partículas fluorescentes dado que debieron ser eliminadas por los lavados previos al no haber sido endocitadas, lo que sugiere la participación de la MASP52 en un proceso de endocitosis activa por parte de la célula incluso en células no fagocíticas como las empleadas en estos experimentos. Estas evidencias, junto a la expresión mayoritaria de mRNA específicos y proteína, en los estadios infectivos para la célula hospedadora, y la inhibición de la entrada mediante anticuerpos frente al centro catalítico, indican que algunos miembros de la

familia MASP y en concreto la MASP52 pudieran estar involucrados en el proceso de la infección celular por parte de *T. cruzi*.

## **7. Respuesta humoral y mapeo de epítomos B del extremo C-terminal conservado de las MASP**

Como se vió en el capítulo 2.3 de la Introducción de esta memoria, la presencia de dominios repetitivos de aminoácidos en organismos procariontas y en concreto en *T. cruzi*, es una clara diana de la respuesta humoral, entre otros motivos, debido a la alta exposición de éstos al sistema inmune (Goto *et al.*, 2007, Goto *et al.*, 2008). Existen numerosos trabajos que describen antígenos con dominios repetidos que poseen una respuesta humoral frente a ellos durante el transcurso de la infección por *T. cruzi*, encontrándose dichos dominios en el 1.2% de los genes de dicho parásito (Lafaille *et al.*, 1989, Affranchino *et al.*, 1989, Ibanez *et al.*, 1988, Burns *et al.*, 1992, Gruber *et al.*, 1993, Buscaglia *et al.*, 2004, DaRocha *et al.*, 2002, Houghton *et al.*, 2000, Goto *et al.*, 2008). El 40% de los genes que poseen dominios repetidos a lo largo del genoma de *T. cruzi* pertenecen a las tres familias multigénicas más extensas de este parásito como son las TS, mucinas y MASPs las cuales presentan entre sus principales características la presencia de un péptido señal y de uno o más dominios transmembrana (Goto *et al.*, 2008).

Por estos motivos, se decidió rastrear la presencia de una respuesta humoral frente al extremo C-terminal, que poseen la mayoría de proteínas MASP. Dicho extremo representa un dominio transmembrana altamente conservado entre los miembros de la familia MASP, conteniendo también al motivo de unión a GPI característico, como ya se ha indicado, de este tipo de proteínas (El-Sayed *et al.*, 2005a, Bartholomeu *et al.*, 2009). Según los resultados obtenidos (Figura D.3.13) esta región corresponde con uno de los sitios de inserción del elemento transponible TcTREZO (TcTREZOUp), el cual genera el extremo C-terminal de los genes MASP sobre los que actúa, proporcionando este retroelemento una fuente antigénica constante para su detección por la respuesta humoral del organismo hospedador.

A partir de las secuencias de los diferentes clones en las diferentes cepas de *T. cruzi*, se utilizó el algoritmo MEME para determinar la secuencia

consenso del extremo C-terminal, ya que a pesar de ser muy conservada, posee sustituciones aminoacídicas en algunas posiciones del final del segmento transmembrana donde se encuentran preferencialmente los aminoácidos Leucina y Valina. Dicha secuencia consenso coincidió con la previamente descrita por Bartholomeu *et al.*, 2009. Una vez caracterizado el extremo C-terminal se realizó un mapeo de epítomos B, sintetizándose péptidos solapantes en 12 de sus 15 aminoácidos, para los 30 aminoácidos de que se compone la secuencia C-terminal consenso obtenida. Tras el mapeo mediante la combinación de la técnica de ELISA indirecta e indirecta competitiva con un pool de sueros positivos para Chagas, obtuvimos una respuesta positiva para los todos los péptidos, siendo los denominados como c1, c3 y c7 los que mejor comportamiento obtenían. Estos tres péptidos presentaban un solapamiento de varios aminoácidos, determinando el epítomo B más inmunoreactivo en la secuencia DGSTAV, la cual se encontraba fuera de la región transmembrana. Esto significa que la respuesta generada, se desarrolla frente a epítomos lineales y no conformacionales, como ocurre en péptidos de *T. cruzi* descritos anteriormente como los Ag1, Ag2, Ag13, Ag30, Ag36, SAPA, PEP-2 o TcD testados mediante experimentos de ELISA (da Silveira *et al.*, 2001, Houghton *et al.*, 2000). De este resultado deducimos que existe una fuerte respuesta humoral frente al extremo C-terminal de las MASP, de manera análoga a como ocurre en las proteínas del tipo de las mucinas, donde el extremo C-terminal que también posee una alta reactividad con sueros de pacientes Chagásicos, así como de ratones infectados con *T. cruzi* (Buscaglia *et al.*, 2004). De igual manera se deduce, que aunque 3 de los péptidos eran más inmunoreactivos, la respuesta encontrada para los otros péptidos sería consecuencia de la existencia de epítomos B solapantes a lo largo de los 30 aminoácidos ensayados. La existencia de epítomos B solapantes ha sido ampliamente descrita en proteínas de la familia de las TS, las cuales poseen un dominio repetido de 12 aminoácidos situados en el extremo C-terminal, conocido como SAPA, el cual se ha caracterizado mediante librerías de péptidos solapantes utilizando la técnica de SPOT (Alvarez *et al.*, 2001). Esta respuesta humoral frente dicha región repetitiva se asocia con la inducción de anticuerpos neutralizantes, incrementándose la vida media de dichas proteínas al poseer epítomos solapantes y discontinuos en la secuencia de esta región, lo que hace

que dicha proteína mantenga su actividad enzimática, y se establezca como factor de virulencia (Alvarez *et al.*, 2001, Pitcovsky *et al.*, 2001).

Otra deducción del ensayo de mapeo de epítomos B, es que al encontrar en el péptido c7 una alta inmunoreactividad (péptido de 19 aminoácidos correspondiente a parte del extremo C-terminal de la MASP52), no sólo la secuencia C-terminal consenso posee una respuesta humoral asociada, sino que el sistema inmune también reconoce las múltiples variantes de pocos aminoácidos que existen dentro de esta región, encontrando muy posiblemente no solo epítomos solapantes, sino variables epitópicas con pequeñas sustituciones aminoacídicas del extremo C-terminal entre miembros de la familia MASP. Otro hecho que puede apoyar esta hipótesis, es que tras el análisis de las secuencias de los clones, la secuencia de aminoácidos DGSTAV posee el menor nivel de variación entre dichos clones, siendo la secuencia que puede tener asociada una respuesta humoral más elevada que la región transmembrana (péptidos c5 y c6), donde encontramos mayor nivel de variación debido a las diferentes variantes que *T. cruzi* es capaz de crear, y que dicha región transmembrana es posible que no se encuentre en las proteínas maduras, siendo una señal para que se agregue el GPI a nivel de Retículo Endoplasmático.

Una vez obtenidos los péptidos con mejor respuesta, estos se ensayaron frente a varios grupos de sueros. El péptido que mejor sensibilidad produjo fue el c1, que considerando todos los grupos de sueros en conjunto (n=78) obtuvo un 93.8% de sensibilidad, bajando dicho porcentaje al 45.96% y 45.68% en los péptidos c2 y c7. Dicho porcentaje para el péptido c1, se sitúa en niveles parecidos a los encontrados en otros descritos previamente por otros autores como los péptidos PEP-2 o el TcD, que obtuvieron un 91 y 93% de sensibilidad respectivamente a partir de una muestra de 378 sueros de individuos chagásicos y no chagásicos (Peralta *et al.*, 1994, da Silveira *et al.*, 2001). No se pudieron determinar claras diferencias entre los grupos de sueros de pacientes crónicos cardiopatas o no cardiopatas, si bien existe un ligero aumento de la respuesta en el grupo con cardiopatía chagásica para c1 (Figura D.4.5).

Del estudio realizado cabe resaltar que el péptido c1 reconoció el 100% de los sueros de pacientes agudos infectados por vía oral procedentes de Brasil y Panamá, siendo también la seropositividad del 100% para estos sueros

en el caso de los péptidos c2 y c7. Una de las características del tipo de infección oral, es la severidad del curso de la infección, pudiendo llegar en algunos casos a la muerte del individuo en la fase inicial de la enfermedad, con una letalidad del 12.5% a los 30 días postinfección (Yoshida, 2008, Benchimol-Barbosa, 2009). La infección oral, es normalmente debida a la ingesta de bebidas fabricadas a partir de zumo de caña de azúcar y el açai, un tipo de fruto de una palmera del norte de Brasil, en donde entre los años 1969 y el 2000 el 50% de los casos de infección por Chagas en determinadas zonas de Brasil, pueden ser atribuidos a microepidemias de infección transmitida oralmente (Coura *et al.*, 2002, Benchimol-Barbosa, 2009). Al medir el reconocimiento de IgM en estos sueros se obtuvieron valores por debajo del valor de corte, correspondiendo por tanto la inmunoreactividad a una respuesta de tipo IgG, quizás debido al tiempo transcurrido entre la primoinfección y la extracción del suero de los pacientes. Los resultados de detección de respuesta humoral frente a sueros de pacientes con Chagas agudo por transmisión oral son muy importantes de cara a la posible utilización de estos péptidos como marcadores de la respuesta aguda por vía oral, que es una de las principales vías de contaminación en países como Brasil, o Venezuela en los que el número de casos por esta forma de infección aumenta progresivamente (Coura, 2006, Benchimol-Barbosa, 2009)(Figura D.4.5).

Al analizar el grupo de sueros de pacientes chagásicos infectados por vía congénita de Chile, la mayor respuesta obtenida fue frente al péptido c1 (91.6%). Diversos factores, entre ellos la carga parasitaria de la madre, la cepa de parásito o el estado inmunológico que pueden contribuir al riesgo de infección congénita de la enfermedad (Hermann *et al.*, 2004). Estimaciones recientes indican que al menos 15.000 recién nacidos se infectan por vía congénita en Latinoamérica y 2000 en Norteamérica (Buekens *et al.*, 2008). En países no endémicos, el flujo de población inmigrante desde regiones endémicas hace que los casos de enfermedad de Chagas congénito aumente en número (Schmunis, 2007), describiéndose recientemente varios casos en Europa y más concretamente en España (Riera *et al.*, 2006, Munoz *et al.*, 2007, Pehrson *et al.*, 1981). Entre el 5-6% de los recién nacidos provenientes de madres infectadas son capaces de adquirir la enfermedad, por tanto es importante implementar nuevos marcadores de diagnóstico temprano de la

enfermedad, junto a una sensibilización del problema entre la clase médica que atiende estos potenciales pacientes. Debido a que se ha logrado detectar una serología positiva frente al péptido c1, este péptido se postula como un posible marcador serológico de la enfermedad en recién nacidos, al igual que el péptido SAPA postulado por otros autores como Reyes *et al.*, 1990, capaz de detectar IgG e IgM específicas de la enfermedad desarrollada en el recién nacido.

Debido al hecho de que se detectó un nivel de sensibilidad del 100% en el grupo de sueros agudos de Panamá para el péptido c1, es posible que dicho péptido tuviera una respuesta humoral asociada en la fase aguda comportándose el extremo C-terminal y en concreto el péptido c1 como un antígeno de fase aguda, resultados similares se obtuvieron con el antígeno SAPA de las TS el cual reconoce a un 90% de los sueros de pacientes en la fase aguda de la enfermedad, detectando un 50-60% de los casos agudos en recién nacidos (Reyes *et al.*, 1990, da Silveira *et al.*, 2001). Para el análisis de la respuesta en fase aguda se caracterizó la curva de respuesta humoral de las IgG e IgM en ratones infectados con formas tripomastigotas metacíclicas de la cepa CL-Brener frente a los péptidos c1, c2 y c3, tomando muestras de suero de los ratones a los 13, 18, 30 y 150 días postinfección. La curva de respuesta a las IgG mostraron valores por debajo del valor de corte a los 13 y 18 días postinfección para los tres péptidos, encontrando valores positivos para los péptidos c2 y c7 a los 30 días post infección. El péptidos c1 es el único que mantuvo una serología positiva en ratones crónicos tras 150 días de infección. La curva en respuesta a las IgM de los sueros, obtuvo una mayor intensidad de señal que la obtenida para las IgG para todos los péptidos ensayados, hecho que apoya que estos péptidos quizás se comporten como antígenos para la fase aguda de la enfermedad y que sean capaces de inducir una mayor respuesta IgM frente a dichos péptidos. Todos los péptidos mostraron máximos de respuesta de IgM entre los 18 y los 30 días postinfección, siendo el péptido c1 el más precoz a la hora de ser detectado por las IgM (13 días postinfección), lo que indica la rápida respuesta humoral que el sistema inmune de ratones Balb/c es capaz de generar frente a dicho péptido. El hecho de que exista una respuesta IgM tan alta en tan poco tiempo, indica que el péptido c1 puede ser

usado como marcador diagnóstico temprano en los casos agudos de la enfermedad de Chagas.

## F.CONCLUSIONS

1. From the interaction medium of the infecting forms of *Trypanosoma cruzi* with the host cells, two secreted proteins belonging to the multigene family MASP have been identified. The analysis of these proteins show that they have molecular weights of 52.19 and 5.31 kDa, respectively, and thus were called MASP52 and MASP5. The presence of sugars in the MASP52 protein enabled its purification by the use of lectins. The differences found in molecular weight for MASP52 between the theoretic studies and that found in the native protein may be due to the weight of the glycosylate part of this protein. From the results, it is deduced that the secretion mechanism of the MASP52 corresponds to an active process inducible by the infecting forms of the parasite. These results imply the first proteome description of members belonging to the family MASP secreted during the cell-invasion process by the metacyclic trypomastigotes.
2. The data compiled after the characterization of MASP52 suggest that this protein has an active role in the infectivity of the parasite. This protein is found to be overexpressed in the metacyclic forms with respect to the other forms of the parasite. The protein is located in cytosolic membranes and vacuoles of the trypomastigotes prior to their release during the cell-invasion process. The release of the MASP52 into the cytoplasm of the host cell during the intracellular replication of the amastigote stage suggests that this protein must participate in other processes of intracellular development of the parasite still to be determined. The protein MASP52 is capable of inducing endocytosis of inert particles into the cell cytoplasm. This supports the idea that proteins of the family MASP could be involved in cell-invasion processes on the part of *T. cruzi*.
3. The cloning of 15 transcripts of the metacyclic trypomastigote forms of the strains PAN4 (Tcla/Tcld/DTUI), CL-Brener (TCIle/DTUVI), and Maracay (Tcl-TcII) have been successful. Of the total cloned products, 8 were MASP genes and 7 were MASP pseudogenes. From the sequence analysis of the clones, 3 MASP genes and 3 MASP pseudogenes were obtained, expressed differentially in each of the three strains assayed and 8 genes that formed three groups of paralogy with a low nucleotide divergence in their sequences. These data support the contention that there are strain-specific MASP genes and pseudogenes with divergent evolution and other gene and pseudogene groups subjected to a strong positive selection and concerted evolution in their sequences, over the genetic background that represents the MASP family, giving rise to groups of paralogy among them, according to the "birth-and-death" model of evolution.

4. It is suggested that the mechanism forming the different members of the MASP family is retrotransposition by mobile elements of the TcTREZO type. This mobile element is specific of this gene family, possessing their insertion sites at the conserved 5' and 3' ends of the MASP genes and pseudogenes.
5. We classified the MASP pseudogenes as processed pseudogenes by retrotransposition, having the capacity to transcribe themselves and to have functional activity, forming stable RNA-RNA duplexes with other RNA generated within the same spatial-temporal framework.
6. From the cDNA of the amastigote phase of the CL-Brener, we cloned a gene that we call MASP96, which is expressed differentially at 96 h post-infection, and this can play a relevant part at the time of rupture and release of the host cell by the *T. cruzi* tripomastigotes.
7. After analysing the genome of *T. cruzi*, as well as the clones obtained from the PAN4, CL-Brener, and Maracay strains, it was demonstrated that the 5' (N-terminal) and 3' (C-terminal) regions are a molecular marker of the MASP family, corroborating the high degree of conservation in the MASP sequences found in the experimental work.
8. After the analysis of the 5' and 3' regions of the MASP family in other different kinetoplastids of *T. cruzi* such as *Leishmania major*, *Trypanosoma rangeli*, and *Blastocrithidia sp.*, it was confirmed that the proteins of the MASP family are specific of *T. cruzi*, as they have not been found in phylogenetically related kinetoplastids.
9. As the results suggest, using as a model the hypervariable sequences of the MASP52 gene in 22 strains of all the lineages of DTUs of *T. cruzi*, the hypervariability of the MASP sequences have a very rapid evolution among these strains, confirming that the hypervariable regions within the same MASP gene show differences at the mutational level among strains, with hot points existing for this region.
10. It was confirmed that there is a clear dichotomy in the expression pattern of the MASP family in the four main *T. cruzi* forms of the PAN4 strain, belonging to the TcI lineage and of the CL-Brener strain belonging to the TcII lineage. The maximum levels of expression corresponded to the amastigote phase of the CL-Brener strain and to the trypomastigote form from the cell culture in the PAN4 and CL-Brener strains. Given that the trypomastigote blood stage is the one that should be prepared to tolerate greater environmental stress, as they are capable of invading new cells to be phagocyted by monocytes and other cells of the host defence, to

be subjected to the action of antibodies and complement and even to be prepared for maintaining the cycle outside the vertebrate host, it might be thought that proteins of the MASP family are some of the agents responsible for capacitating the trypomastigote forms to survive in these environments. In addition, the data gathered from the overexpression of the MASP proteins in the intracellular parasites beginning at 24h post-infection, prior to the division of the amastigotes, suggest that some of the proteins of this extensive family play a major biological role in the survival and multiplication of intracellular amastigotes.

11. We have confirmed the existence of a humoral immune response in the serum of Chagas disease patients against the conserved C-terminal end of the members of the MASP family. After the mapping of the B-cell epitopes, we conclude that the sequence **DGSTAV** is the most immunogenic B-cell epitope of the C-terminal region. The peptide called c1 constitutes a possible diagnostic marker of the disease.
  
12. The strong and rapid IgM response generated against the peptides c1, c2, and c7 in mice infected with *T. cruzi*, suggests that these peptides can be used as immunological markers in the diagnosis of the early acute phase of Chagas disease.

## G. BIBLIOGRAFÍA

## BIBLIOGRAFÍA

- Affranchino, J.L., Ibanez, C.F., Luquetti, A.O., Rassi, A., Reyes, M.B., Macina, R.A., *et al.* (1989). Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol* **34**, 221-228.
- Alvarez, P., Leguizamon, M.S., Buscaglia, C.A., Pitcovsky, T.A. and Campetella, O. (2001). Multiple overlapping epitopes in the repetitive unit of the shed acute-phase antigen from *Trypanosoma cruzi* enhance its immunogenic properties. *Infect Immun* **69**, 7946-7949.
- Andrade, L.O. and Andrews, N.W. (2005). The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nat Rev Microbiol* **3**, 819-823.
- Andrews, N.W., Abrams, C.K., Slatin, S.L. and Griffiths, G. (1990). A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. *Cell* **61**, 1277-1287.
- Arcari, P., Martinelli, R. and Salvatore, F. (1984). The complete sequence of a full length cDNA for human liver glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: evidence for multiple mRNA species. *Nucleic Acids Res* **12**, 9179-9189.
- Arner, E., Kindlund, E., Nilsson, D., Farzana, F., Ferella, M., Tammi, M.T. and Andersson, B. (2007). Database of *Trypanosoma cruzi* repeated genes: 20,000 additional gene variants. *BMC Genomics* **8**, 391.
- Atayde, V.D., Cortez, M., Souza, R., da Silveira, J.F. and Yoshida, N. (2007). Expression and cellular localization of molecules of the gp82 family in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes. *Infect Immun* **75**, 3264-3270.
- Atwood, J.A., 3rd, Minning, T., Ludolf, F., Nuccio, A., Weatherly, D.B., Alvarez-Manilla, G., *et al.* (2006). Glycoproteomics of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes using subcellular fractionation, lectin affinity, and stable isotope labeling. *J Proteome Res* **5**, 3376-3384.
- Atwood, J.A., 3rd, Weatherly, D.B., Minning, T.A., Bundy, B., Cavola, C., Opperdoes, F.R., *et al.* (2005). The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science* **309**, 473-476.
- Augustine, S.A., Kleshchenko, Y.Y., Nde, P.N., Pratap, S., Ager, E.A., Burns, J.M., Jr., *et al.* (2006). Molecular cloning of a *Trypanosoma cruzi* cell surface casein kinase II substrate, Tc-1, involved in cellular infection. *Infect Immun* **74**, 3922-3929.
- Azuaje, F.J., Ramirez, J.L. and Da Silveira, J.F. (2007). In silico, biologically-inspired modelling of genomic variation generation in surface proteins of *Trypanosoma cruzi*. *Kinetoplastid Biol Dis* **6**, 6.
- Baida, R.C., Santos, M.R., Carmo, M.S., Yoshida, N., Ferreira, D., Ferreira, A.T., *et al.* (2006). Molecular characterization of serine-, alanine-, and proline-rich proteins of *Trypanosoma cruzi* and their possible role in host cell infection. *Infect Immun* **74**, 1537-1546.
- Balakirev, E.S. and Ayala, F.J. (2003). Pseudogenes: are they "junk" or functional DNA? *Annu Rev Genet* **37**, 123-151.

- Balasubramanian, S., Zheng, D., Liu, Y.J., Fang, G., Frankish, A., Carriero, N., *et al.* (2009). Comparative analysis of processed ribosomal protein pseudogenes in four mammalian genomes. *Genome Biol* **10**, R2.
- Barrias, E.S., Dutra, J.M., De Souza, W. and Carvalho, T.M. (2007). Participation of macrophage membrane rafts in *Trypanosoma cruzi* invasion process. *Biochem Biophys Res Commun* **363**, 828-834.
- Bartholomeu, D.C., Cerqueira, G.C., Leao, A.C., daRocha, W.D., Pais, F.S., Macedo, C., *et al.* (2009). Genomic organization and expression profile of the mucin-associated surface protein (masp) family of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic Acids Res* **37**, 3407-3417.
- Bastos, I.M., Grellier, P., Martins, N.F., Cadavid-Restrepo, G., de Souza-Ault, M.R., Augustyns, K., *et al.* (2005). Molecular, functional and structural properties of the prolyl oligopeptidase of *Trypanosoma cruzi* (POP Tc80), which is required for parasite entry into mammalian cells. *Biochem J* **388**, 29-38.
- Benchimol-Barbosa, P.R. (2009). Trends on acute Chagas' disease transmitted by oral route in Brazil: Steady increase in new cases and a concealed residual fluctuation. *Int J Cardiol.*
- Berasain, P., Carmona, C., Frangione, B., Cazzulo, J.J. and Goni, F. (2003). Specific cleavage sites on human IgG subclasses by cruzipain, the major cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* **130**, 23-29.
- Bhattacharyya, T., Brooks, J., Yeo, M., Carrasco, H.J., Lewis, M.D., Llewellyn, M.S. and Miles, M.A. Analysis of molecular diversity of the *Trypanosoma cruzi* trypomastigote small surface antigen reveals novel epitopes, evidence of positive selection and potential implications for lineage-specific serology. *Int J Parasitol* **40**, 921-928.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Brener, Z. and Chiari, E. (1963). [Morphological Variations Observed in Different Strains of *Trypanosoma Cruzi*.]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **19**, 220-224.
- Bringaud, F., Muller, M., Cerqueira, G.C., Smith, M., Rochette, A., El-Sayed, N.M., *et al.* (2007). Members of a large retroposon family are determinants of post-transcriptional gene expression in *Leishmania*. *PLoS Pathog* **3**, 1291-1307.
- Briones, M.R., Souto, R.P., Stolf, B.S. and Zingales, B. (1999). The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Mol Biochem Parasitol* **104**, 219-232.
- Buekens, P., Almendares, O., Carlier, Y., Dumonteil, E., Eberhard, M., Gamboa-Leon, R., *et al.* (2008). Mother-to-child transmission of Chagas' disease in North America: why don't we do more? *Matern Child Health J* **12**, 283-286.
- Burleigh, B.A. and Woolsey, A.M. (2002). Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cell Microbiol* **4**, 701-711.
- Burns, J.M., Jr., Shreffler, W.G., Rosman, D.E., Sleath, P.R., March, C.J. and Reed, S.G. (1992). Identification and synthesis of a major conserved

- antigenic epitope of *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 1239-1243.
- Buscaglia, C.A., Campo, V.A., Di Noia, J.M., Torrecilhas, A.C., De Marchi, C.R., Ferguson, M.A., *et al.* (2004). The surface coat of the mammal-dwelling infective trypomastigote stage of *Trypanosoma cruzi* is formed by highly diverse immunogenic mucins. *J Biol Chem* **279**, 15860-15869.
- Buscaglia, C.A., Campo, V.A., Frasc, A.C. and Di Noia, J.M. (2006). *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nat Rev Microbiol* **4**, 229-236.
- Buscaglia, C.A. and Di Noia, J.M. (2003). *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes Infect* **5**, 419-427.
- Calvo-Calle, J.M., Oliveira, G.A., Watta, C.O., Soverow, J., Parra-Lopez, C. and Nardin, E.H. (2006). A linear peptide containing minimal T- and B-cell epitopes of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein elicits protection against transgenic sporozoite challenge. *Infect Immun* **74**, 6929-6939.
- Clark, C.G. and Pung, O.J. (1994). Host specificity of ribosomal DNA variation in sylvatic *Trypanosoma cruzi* from North America. *Mol Biochem Parasitol* **66**, 175-179.
- Coura, J.R. (2006). [Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease]. *Rev Soc Bras Med Trop* **39 Suppl 3**, 113-117.
- Coura, J.R., Junqueira, A.C., Fernandes, O., Valente, S.A. and Miles, M.A. (2002). Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol* **18**, 171-176.
- Cunha-e-Silva, N., Sant'Anna, C., Pereira, M.G., Porto-Carreiro, I., Jeovanio, A.L. and de Souza, W. (2006). Reserosomes: multipurpose organelles? *Parasitol Res* **99**, 325-327.
- Cunha-Neto, E., Duranti, M., Gruber, A., Zingales, B., De Messias, I., Stolf, N., *et al.* (1995). Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3541-3545.
- D'Errico, I., Gadaleta, G. and Saccone, C. (2004). Pseudogenes in metazoa: origin and features. *Brief Funct Genomic Proteomic* **3**, 157-167.
- da Silveira, J.F., Umezawa, E.S. and Luquetti, A.O. (2001). Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *Trends Parasitol* **17**, 286-291.
- DaRocha, W.D., Bartholomeu, D.C., Macedo, C.D., Horta, M.F., Cunha-Neto, E., Donelson, J.E. and Teixeira, S.M. (2002). Characterization of cDNA clones encoding ribonucleoprotein antigens expressed in *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *Parasitol Res* **88**, 292-300.
- Dauby, N., Alonso-Vega, C., Suarez, E., Flores, A., Hermann, E., Cordova, M., *et al.* (2009). Maternal infection with *Trypanosoma cruzi* and congenital Chagas disease induce a trend to a type 1 polarization of infant immune responses to vaccines. *PLoS Negl Trop Dis* **3**, e571.
- De Souza, W. (2002). From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. *Kinetoplastid Biol Dis* **1**, 3.

- de Souza, W., Carreiro, I.P., Miranda, K. and Silva, N.L. (2000). Two special organelles found in *Trypanosoma cruzi*. *An Acad Bras Cienc* **72**, 421-432.
- Devera, R., Fernandes, O. and Coura, J.R. (2003). Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? a review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **98**, 1-12.
- Devera, R., Illarramendi, X., Montoya-Araujo, R., Pirmez, C., Fernandes, O. and Coura, J.R. (2002). [Biodemes of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from humans from three endemic areas in Minas Gerais State]. *Rev Soc Bras Med Trop* **35**, 323-330.
- Di Noia, J.M., Buscaglia, C.A., De Marchi, C.R., Almeida, I.C. and Frasch, A.C. (2002). A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. *J Exp Med* **195**, 401-413.
- Ding, W., Lin, L., Chen, B. and Dai, J. (2006). L1 elements, processed pseudogenes and retrogenes in mammalian genomes. *IUBMB Life* **58**, 677-685.
- El-Sayed, N.M., Myler, P.J., Bartholomeu, D.C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A.N., *et al.* (2005a). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* **309**, 409-415.
- El-Sayed, N.M., Myler, P.J., Blandin, G., Berriman, M., Crabtree, J., Aggarwal, G., *et al.* (2005b). Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science* **309**, 404-409.
- Emes, R.D. and Yang, Z. (2008). Duplicated paralogous genes subject to positive selection in the genome of *Trypanosoma brucei*. *PLoS One* **3**, e2295.
- Falla, A., Herrera, C., Fajardo, A., Montilla, M., Vallejo, G.A. and Guhl, F. (2009). Haplotype identification within *Trypanosoma cruzi* I in Colombian isolates from several reservoirs, vectors and humans. *Acta Trop* **110**, 15-21.
- Ferella, M., Nilsson, D., Darban, H., Rodrigues, C., Bontempi, E.J., Docampo, R. and Andersson, B. (2008). Proteomics in *Trypanosoma cruzi*--localization of novel proteins to various organelles. *Proteomics* **8**, 2735-2749.
- Garin, M.I., Chu, C.C., Golshayan, D., Cernuda-Morollon, E., Wait, R. and Lechler, R.I. (2007). Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood* **109**, 2058-2065.
- Goto, Y., Carter, D. and Reed, S.G. (2008). Immunological dominance of *Trypanosoma cruzi* tandem repeat proteins. *Infect Immun* **76**, 3967-3974.
- Goto, Y., Coler, R.N. and Reed, S.G. (2007). Bioinformatic identification of tandem repeat antigens of the *Leishmania donovani* complex. *Infect Immun* **75**, 846-851.
- Gruber, A. and Zingales, B. (1993). *Trypanosoma cruzi*: characterization of two recombinant antigens with potential application in the diagnosis of Chagas' disease. *Exp Parasitol* **76**, 1-12.
- Guo, X., Zhang, Z., Gerstein, M.B. and Zheng, D. (2009). Small RNAs originated from pseudogenes: cis- or trans-acting? *PLoS Comput Biol* **5**, e1000449.

- Hermann, E., Truyens, C., Alonso-Vega, C., Rodriguez, P., Berthe, A., Torrico, F. and Carlier, Y. (2004). Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* is associated with maternal enhanced parasitemia and decreased production of interferon- gamma in response to parasite antigens. *J Infect Dis* **189**, 1274-1281.
- Houghton, R.L., Benson, D.R., Reynolds, L., McNeill, P., Sleath, P., Lodes, M., *et al.* (2000). Multiepitope synthetic peptide and recombinant protein for the detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in patients with treated or untreated Chagas' disease. *J Infect Dis* **181**, 325-330.
- Ibanez, C.F., Afranchino, J.L., Macina, R.A., Reyes, M.B., Leguizamon, S., Camargo, M.E., *et al.* (1988). Multiple *Trypanosoma cruzi* antigens containing tandemly repeated amino acid sequence motifs. *Mol Biochem Parasitol* **30**, 27-33.
- Kazazian, H.H., Jr. (2004). Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* **303**, 1626-1632.
- Korneev, S.A., Park, J.H. and O'Shea, M. (1999). Neuronal expression of neural nitric oxide synthase (nNOS) protein is suppressed by an antisense RNA transcribed from an NOS pseudogene. *J Neurosci* **19**, 7711-7720.
- Lafaille, J.J., Linss, J., Krieger, M.A., Souto-Padron, T., de Souza, W. and Goldenberg, S. (1989). Structure and expression of two *Trypanosoma cruzi* genes encoding antigenic proteins bearing repetitive epitopes. *Mol Biochem Parasitol* **35**, 127-136.
- Lewis, M.D., Ma, J., Yeo, M., Carrasco, H.J., Llewellyn, M.S. and Miles, M.A. (2009). Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: systematic selection of assays allowing rapid and accurate discrimination of all known lineages. *Am J Trop Med Hyg* **81**, 1041-1049.
- Liao, D. (1999). Concerted evolution: molecular mechanism and biological implications. *Am J Hum Genet* **64**, 24-30.
- Macedo, A.M., Machado, C.R., Oliveira, R.P. and Pena, S.D. (2004). *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **99**, 1-12.
- Marcello, L. and Barry, J.D. (2007). Analysis of the VSG gene silent archive in *Trypanosoma brucei* reveals that mosaic gene expression is prominent in antigenic variation and is favored by archive substructure. *Genome Res* **17**, 1344-1352.
- Mintz, G. and Glaser, L. (1979). Glycoprotein purification on a high-capacity wheat germ lectin affinity column. *Anal Biochem* **97**, 423-427.
- Munoz, J., Portus, M., Corachan, M., Fumado, V. and Gascon, J. (2007). Congenital *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic area. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **101**, 1161-1162.
- Nakao, A., Yoshihama, M. and Kenmochi, N. (2004). RPG: the Ribosomal Protein Gene database. *Nucleic Acids Res* **32**, D168-170.
- Nei, M. and Rooney, A.P. (2005). Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annu Rev Genet* **39**, 121-152.
- Niimura, Y. and Nei, M. (2006). Evolutionary dynamics of olfactory and other chemosensory receptor genes in vertebrates. *J Hum Genet* **51**, 505-517.
- Opperdoes, F.R. (1990). The glycosome of trypanosomes and Leishmania. *Biochem Soc Trans* **18**, 729-731.

- Osuna, A., Gamarro, F., Castanys, S. and Ruiz-Perez, L.M. (1986). Inhibition of lysosomal fusion by *Trypanosoma cruzi* in peritoneal macrophages. *Int J Parasitol* **16**, 629-632.
- Osuna, A., Rodriguez-Cabezas, N., Gamarro, F. and Mascaro, C. (1994). The different behavior of diphtheria toxin, modeccin and ricin in HeLa cells infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Eukaryot Microbiol* **41**, 231-236.
- Pehrson, P.O., Wahlgren, M. and Bengtsson, E. (1981). Asymptomatic congenital Chagas' disease in a 5-year-old child. *Scand J Infect Dis* **13**, 307-308.
- Pena, S.D., Machado, C.R. and Macedo, A.M. (2009). *Trypanosoma cruzi*: ancestral genomes and population structure. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **104 Suppl 1**, 108-114.
- Peralta, J.M., Teixeira, M.G., Shreffler, W.G., Pereira, J.B., Burns, J.M., Jr., Sleath, P.R. and Reed, S.G. (1994). Serodiagnosis of Chagas' disease by enzyme-linked immunosorbent assay using two synthetic peptides as antigens. *J Clin Microbiol* **32**, 971-974.
- Pitcovsky, T.A., Mucci, J., Alvarez, P., Leguizamon, M.S., Burrone, O., Alzari, P.M. and Campetella, O. (2001). Epitope mapping of trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* reveals the presence of several cross-reactive determinants. *Infect Immun* **69**, 1869-1875.
- Podlaha, O. and Zhang, J. (2004). Nonneutral evolution of the transcribed pseudogene Makorin1-p1 in mice. *Mol Biol Evol* **21**, 2202-2209.
- Pullen, G.R., Fitzgerald, M.G. and Hosking, C.S. (1986). Antibody avidity determination by ELISA using thiocyanate elution. *J Immunol Methods* **86**, 83-87.
- Reyes, M.B., Lorca, M., Munoz, P. and Frasch, A.C. (1990). Fetal IgG specificities against *Trypanosoma cruzi* antigens in infected newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 2846-2850.
- Riera, C., Guarro, A., Kassab, H.E., Jorba, J.M., Castro, M., Angrill, R., *et al.* (2006). Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Europe (Spain): a case report. *Am J Trop Med Hyg* **75**, 1078-1081.
- Rubin-de-Celis, S.S., Uemura, H., Yoshida, N. and Schenkman, S. (2006). Expression of trypomastigote trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* increases parasite escape from its parasitophorous vacuole. *Cell Microbiol* **8**, 1888-1898.
- Ruiz-Perez, L.M., Osuna, A., Castanys, S., Gamarro, F., Craciunescu, D. and Doadrio, A. (1986). Evaluation of the toxicity of Rh(III) and Pt(II) complexes against *Trypanosoma cruzi* culture forms. *Arzneimittelforschung* **36**, 13-16.
- Ruiz, R.C., Favoreto, S., Jr., Dorta, M.L., Oshiro, M.E., Ferreira, A.T., Manque, P.M. and Yoshida, N. (1998). Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca<sup>2+</sup> signalling activity. *Biochem J* **330 ( Pt 1)**, 505-511.
- Santucci, L., Fiorucci, S., Rubinstein, N., Mencarelli, A., Palazzetti, B., Federici, B., *et al.* (2003). Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice. *Gastroenterology* **124**, 1381-1394.
- Sasidharan, R. and Gerstein, M. (2008). Genomics: protein fossils live on as RNA. *Nature* **453**, 729-731.

- Schmunis, G.A. (2007). Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **102 Suppl 1**, 75-85.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. and Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* **68**, 850-858.
- Snapper, C.M. and Paul, W.E. (1987). Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* **236**, 944-947.
- Souza, R.T., Santos, M.R., Lima, F.M., El-Sayed, N.M., Myler, P.J., Ruiz, J.C. and da Silveira, J.F. (2007). New *Trypanosoma cruzi* repeated element that shows site specificity for insertion. *Eukaryot Cell* **6**, 1228-1238.
- Stuart, K., Brun, R., Croft, S., Fairlamb, A., Gurtler, R.E., McKerrow, J., *et al.* (2008). Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J Clin Invest* **118**, 1301-1310.
- Teixeira, S.M. (1998). Control of gene expression in Trypanosomatidae. *Braz J Med Biol Res* **31**, 1503-1516.
- Tibayrenc, M., Neubauer, K., Barnabe, C., Guerrini, F., Skarecky, D. and Ayala, F.J. (1993). Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 1335-1339.
- Timmons, T.M. and Dunbar, B.S. (1990). Protein blotting and immunodetection. *Methods Enzymol* **182**, 679-688.
- Villalta, F., Smith, C.M., Ruiz-Ruano, A. and Lima, M.F. (2001). A ligand that *Trypanosoma cruzi* uses to bind to mammalian cells to initiate infection. *FEBS Lett* **505**, 383-388.
- Yoshida, N. (1983). Surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* **40**, 836-839.
- Yoshida, N. (2006). Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *An Acad Bras Cienc* **78**, 87-111.
- Yoshida, N. (2008). *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. *Parasitol Int* **57**, 105-109.
- Yoshida, N., Mortara, R.A., Araguth, M.F., Gonzalez, J.C. and Russo, M. (1989). Metacyclic neutralizing effect of monoclonal antibody 10D8 directed to the 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* **57**, 1663-1667.
- Zingales, B., Andrade, S.G., Briones, M.R., Campbell, D.A., Chiari, E., Fernandes, O., *et al.* (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **104**, 1051-1054.
- Zingales, B., Pereira, M.E., Almeida, K.A., Umezawa, E.S., Nehme, N.S., Oliveira, R.P., *et al.* (1997). Biological parameters and molecular markers of clone CL Brener--the reference organism of the *Trypanosoma cruzi* genome project. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **92**, 811-814.
- World Health Organization (WHO)(1991). Control of Chagas disease. Report of a WHO Expert Committee. *World Health Organ Tech Rep Ser* **811**, 1-95.
- World Health Organization (WHO)(2002). Control of Chagas disease. *World Health Organ Tech Rep Ser* **905**, i-vi, 1-109, back cover.

