

T. Prov.
22/29
T
15
135

**EL LOCUS H DE *Trypanosoma cruzi*: CARACTERIZACION
DE LOS GENES PTERIDINA-REDUCTASA 1 Y TCP17.**



Carlos Robello Porto
Tesis Doctoral



Directores de Tesis

Dr. Francisco Gamarro Conde



Dr. Santiago Castanys Cuello



A.INTRODUCCION.....	3
A.1. LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.....	3
A.2. <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> : GENERALIDADES.....	4
A.3. ALMACENAMIENTO DE LA INFORMACIÓN GENÉTICA EN <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	6
A.4. PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN GENÉTICA EN <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	7
A.4.1. <i>Transcripción policistrónica</i>	7
A.4.2. <i>Adición del mini-exón</i>	7
A.4.3. <i>Poliadenilación</i>	8
A.4.4. <i>Corrección del ADN mitocondrial: "RNA editing"</i>	9
A.5. GENÉTICA EVOLUTIVA DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> : CLONALIDAD <i>VERSUS</i> SEXUALIDAD. 9	9
A.6. QUIMIOTERAPIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.	10
A.7.MECANISMOS DE RESISTENCIA A FÁRMACOS EN PARÁSITOS.....	11
A.7.1. <i>Generalidades</i>	11
A.7.2. <i>El fenómeno de la multirresistencia a fármacos</i>	12
A.8. LA AMPLIFICACIÓN GÉNICA.....	13
A.8.1. <i>Generalidades</i>	13
A.8.2. <i>La región R</i>	13
A.8.3. <i>La región H: un elemento extracromosomal implicado en multirresistencia</i>	14
A.9. LA ENZIMA PTERIDINA REDUCTASA.	15
A.10. RESISTENCIA A FARMACOS EN <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	16
B.1. MATERIALES.....	18
B.1.1. REACTIVOS QUIMICOS Y FARMACOS.....	18
B.1.2. REACTIVOS PARA BIOLOGIA MOLECULAR.....	18
B.1.3. SOLUCIONES Y TAMPONES.....	19
B.1.3.1. <i>Soluciones</i>	19
B.1.3.2. <i>Tampones</i>	19
B.1.4. MEDIOS DE CULTIVO.....	20
B.1.5. VECTORES PLASMIDICOS.....	21
B.1.5.1. <i>Vectores de transformación</i>	21
B.1.5.2. <i>Vectores de expresión</i>	21
B.1.5.3. <i>Vectores de transfección</i>	21
B.1.6. LINEAS CELULARES.....	22
B.1.6.1. <i>Cepas bacterianas</i>	22
B.1.6.2. <i>Levaduras</i>	22
B.1.6.3. <i>Células Vero</i>	22
B.1.6.4. <i>Trypanosoma cruzi</i>	22
B.1.7. OLIGONUCLEOTIDOS SINTETICOS.....	23
B.2. METODOS.....	24
B.2.1. CULTIVO DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	24
B.2.1.1. <i>Cultivo de epimastigotes</i>	24
B.2.1.2. <i>Cultivo de tripomastigotes y amastigotes</i>	24
B.2.2. MANIPULACION DE BACTERIAS Y BACTERIOFAGOS.....	25
B.2.2.1. <i>Cultivo de bacterias</i>	25
B.2.2.2. <i>Preparación de células competentes y transformación</i>	25
B.2.2.3. <i>Infección de bacterias con bacteriófagos</i>	25
B.2.2.4. <i>Transferencia de bacteriófagos a filtros de nylon</i>	26
B.2.2.5. <i>Preparación de bacteriófagos a gran escala</i>	26
B.2.3. AISLAMIENTO DE ACIDOS NUCLEICOS.....	27
B.2.3.1. <i>Aislamiento de ADN genómico de parásitos</i>	27
B.2.3.2. <i>Aislamiento de ADN de fagos</i>	27
B.2.3.3. AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO.....	28
B.2.3.3.1. <i>Miniprep alcalina</i>	28
B.2.3.3.2. <i>Wizard miniprep (Promega)</i>	28
B.2.3.3.3. <i>Wizard maxiprep (Promega)</i>	28
B.2.3.3.4. <i>Aislamiento de ARN total</i>	28

B.2.3.5. Purificación de ARN poliadenilado.....	29
B.2.3.6. Cuantificación de ácidos nucleicos.....	29
B.2.4. TRATAMIENTO ENZIMATICO DE ACIDOS NUCLEICOS.....	29
B.2.4.1. Digestión del ADN con enzimas de restricción.....	29
B.2.4.2. Reacción de ligamiento.....	30
B.2.4.3. Tratamiento con fosfatasa alcalina.....	30
B.2.4.4. Marcado radiactivo del ADN.....	30
B.2.4.5. Reacción de la transcriptasa inversa.....	31
B.2.4.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	31
B.2.4.7. Secuenciación del ADN.....	31
B.2.5. ELECTROFORESIS Y TRANSFERENCIA DE ACIDOS NUCLEICOS.....	32
B.2.5.1. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	32
B.2.5.2. Electroforesis en campo pulsado.....	32
B.2.5.3. Electroforesis de ARN en geles desnaturalizantes.....	33
B.2.5.4. Aislamiento del ADN de geles de agarosa: "GENE CLEAN®".....	33
B.2.5.5. Transferencia de ADN a membranas de nylon: "Southern blot".....	34
B.2.5.6. Transferencia de ARN a membranas de nylon: "Northern blot".....	34
B.2.5.7. Hibridación de ácidos nucleicos con sondas radiactivas.....	34
B.2.6. TRANSFECCION DE PARASITOS Y ENSAYOS CON FARMACOS.....	35
B.2.6.1. Transfección de <i>T. cruzi</i>	35
B.2.6.2. Determinación de la dosis inhibitoria 50 (DI ₅₀).....	35
B.2.7. TECNICAS DE ANALISIS PROTEICO Y ENZIMATICO.....	35
B.2.7.1. Electroforesis de proteínas: SDS-PAGE.....	35
B.2.7.2. Cuantificación de proteínas.....	36
B.2.7.3. Obtención de proteínas totales de parásitos.....	36
B.2.7.4. Obtención de proteínas recombinantes de bacterias transformadas.....	37
B.2.7.5. Purificación de proteínas recombinantes en soportes de Ni-NTA agarosa.....	37
B.2.7.6. Ensayos de actividad enzimática.....	37
B.2.8. TECNICAS INMUNOLOGICAS.....	38
B.2.8.1. Obtención de anticuerpos de conejo.....	38
B.2.8.2. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	39
B.2.8.3. Transferencia de proteínas a membranas de PVDF y Western blot.....	39
B.2.8.4. Inmunofluorescencia indirecta.....	40
B.2.8.5. Inmunomicroscopía electrónica.....	40
B.2.9. ANÁLISIS INFORMÁTICO.....	41
C. RESULTADOS.....	42
C.1. ESTUDIO DE LA PTERIDIN-REDUCTASA DE TRYPANOSOMA CRUZI.....	42
C.1.1. SECUENCIACIÓN DEL GEN DE LA PTERIDIN-REDUCTASA (<i>PTR 1</i>).....	42
C.1.2. LA ORGANIZACIÓN GENÓMICA DE <i>ptr1</i>	45
C.1.2.1. Determinación del número de copias.....	45
C.1.2.2. Localización cromosómica de <i>ptr1</i>	46
C.1.3. La transcripción y maduración del gen <i>ptr 1</i>	47
C.1.3.1. Northern blot.....	47
C.1.3.2. Adición del miniexón.....	47
C.1.3.3. Localización del sitio de poliadenilación.....	48
C.1.5. ESTUDIOS FUNCIONALES DE <i>PTR1</i>	56
C.1.5.1. Actividad enzimática.....	56
C.1.5.2 Transfección de <i>T. cruzi</i> con <i>ptr1</i>	57
C.1.5.2.1. Construcción del plásmido pTEX- <i>PTR1</i>	58
C.1.5.2.2. Transfección de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	58
C.1.5.2.3. Estudio de la organización genómica de los parásitos transfectados.....	59
C.1.5.2.4. Estudio de la expresión de <i>PTR1</i> en los parásitos transfectados.....	59
C.1.5.2.5. Estudio de la resistencia a fármacos de los parásitos transfectados.....	60
C.2. ESTUDIO DEL GEN <i>TCP17</i> DE TRYPANOSOMA CRUZI.....	62
C.2.1. Secuenciación del gen <i>tcp17</i>	62
C.2.2. Estudios de homología de <i>TCP17</i>	63

C.2.3. Organización genómica de <i>tcp17</i>	66
C.2.4. La transcripción y maduración del gen <i>tcp17</i>	66
C.2.4.1. Northern blot.....	66
C.2.4.2. Adición del miniexón.....	68
C.2.4.3. Localización del sitio de poliadenilación.....	68
C.2.5 La traducción de <i>tcp17</i>	68
C.2.5.1. Producción de TCP17 recombinante.....	68
C.2.5.2 Purificación de TCP17 recombinante.....	70
C.2.5.3. Obtención de anticuerpos contra PTR1.....	70
C.2.5.4. Identificación de la proteína PTR1 mediante la técnica de Western blot.....	71
C.2.5.5 Inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	72
C.2.5.6. Inmunomicroscopía electrónica (IME).....	72
D.DISCUSION.....	74
D.1. ORGANIZACIÓN GENÓMICA DE LOS GENES <i>PTR1</i> Y <i>TCP17</i>	74
D.1.1. Número de copias y localización cromosómica.....	74
D.1.2. La expresión de <i>ptr1</i> y <i>tcp17</i>	74
D.3 -LA SECUENCIA DEL GEN <i>TCPTRI</i>	79
D.4. LA FUNCIÓN DEL GEN <i>PTR1</i>	80
D.4.1. Transfección de <i>Trypanosoma cruzi</i> con el gen <i>ptr1</i>	80
D.4.2-Actividad Enzimática de la pteridina reductasa.....	82
D.6. LA SECUENCIA DEL GEN <i>TCP17</i> Y LA DESCRIPCIÓN DE UNA FAMILIA DE PROTEÍNAS CONSERVADA A LO LARGO DE LA ESCALA EVOLUTIVA.....	85
D.7. LOCALIZACIÓN DE TCP17.....	86
D.8- ANÁLISIS EVOLUTIVO DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	88
E. BIBLIOGRAFIA.....	89

A.INTRODUCCION.

A.1. LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas es una parasitosis localizada en el continente americano, causada por el protozoo parásito *Trypanosoma cruzi* y transmitida por diversas especies de insectos de la familia *Reduviidae* (Chagas, 1909).

Actualmente constituye un importante problema de salud pública para la población americana donde alrededor de 90 millones de habitantes de las zonas rurales de la población (25% de la población total) están expuestos al riesgo de contraer la enfermedad, y se estima en aproximadamente 18 millones el número de personas que padecen la enfermedad (W.H.O., 1991).

En humanos, la enfermedad de Chagas presenta dos fases de evolución clínica. Una primera fase aguda que comprende entre los 2 y los 6 primeros meses de infección y se caracteriza por una sintomatología de intensidad y duración variables y por parasitemias de mayor magnitud que en la fase crónica. En la mayoría de los casos esta fase pasa desapercibida, con síntomas leves o inexistentes, mientras que en otros se producen síntomas que van desde un síndrome febril, la aparición de lesiones locales en el sitio de entrada del parásito que reciben el nombre de chagoma cuando es en la piel o "signo de Romanha" cuando es a través de la membrana ocular, o la muerte del paciente en un 2% de los casos.

Estos síntomas desaparecen a los pocos meses y la enfermedad evoluciona hacia una fase crónica con parasitemia baja y asintomática. La enfermedad puede evolucionar hacia una fase crónica, generalmente a los 5-15 años después de la infección. En el 30-40% de los casos se desarrollan síndromes chagásicos (miocardiopatía, megacolon, megaesófago), mientras el resto de los casos desarrolla la forma indeterminada o asintomática. En el caso de aparecer lesiones cardíacas, éstas pueden ser de moderadas a graves, conduciendo a la muerte del enfermo.

A.2. *Trypanosoma cruzi*: GENERALIDADES.

T. cruzi es un protozoario perteneciente a la clase *Zoomastigophora*, Orden *Kinetoplastidae*, Familia *Trypanosomatidae*, Género *Trypanosoma*, subgénero *Schizotrypanum*. El Orden *Kinetoplastidae* está definido por la presencia de una

mitocondria gigante y única que se denomina kinetoplasto. A esta clase pertenecen organismos de vida libre y organismos parásitos, mientras que los tripanosomátidos, es decir, aquellos organismos pertenecientes a la familia *Trypanosomatidae*, son parásitos exclusivamente.

El ciclo de vida de este parásito transcurre entre dos huéspedes, uno invertebrado, el insecto vector, y uno vertebrado, entre los que se han descrito más de 100 especies de mamíferos pertenecientes a diferentes órdenes.

Durante su ciclo de vida *T. cruzi* presenta tres formas principales o estadios, relacionadas con los distintos entornos (Figura 1). Las formas epimastigotas (Fig. 1a), replicativas, se caracterizan por tener el kinetoplasto contiguo al núcleo, en su parte anterior, y un flagelo que emerge de la zona media de la célula. Las formas tripomastigotas (Fig. 1b), no replicativas, presentan una forma alargada con el kinetoplasto en la zona posterior, y un flagelo que si bien emerge de la parte posterior de la célula, permanece unido a ésta por la membrana ondulante en su trayecto desde la extremidad posterior a la anterior, adonde queda libre. Las formas amastigotas (Fig. 1c), intracelulares y replicativas, son redondeadas, sin flagelo, y con el kinetoplasto cercano al núcleo.

Cuando el insecto vector ingiere sangre del vertebrado (Figura 1), deposita sus heces contaminadas con tripomastigotas metacíclicos que pueden ingresar al torrente sanguíneo a través de una solución de continuidad, como por ejemplo la propia herida causada por la picadura. Los parásitos alcanzan el torrente sanguíneo, desde donde pueden invadir varios tipos celulares, principalmente células del sistema fagocítico mononuclear, células musculares y células nerviosas. Una vez dentro de la célula, las formas tripomastigotas se transforman en amastigotas y comienzan a replicarse dentro de la célula hasta hacerla estallar. Unas 12 horas antes de liberarse de la célula, los parásitos comienzan a sufrir una transformación hacia tripomastigotas, que es la forma como circulan por la sangre. Cuando la sangre del huésped vertebrado es ingerida por el insecto vector, los tripanosomas pasan al intestino del insecto, donde se transforman en epimastigotas. Las formas epimastigotas se adhieren a las paredes del intestino medio del insecto, donde se multiplican activamente, y posteriormente migran hacia la ampolla rectal donde se transforman en tripomastigotas metacíclicos. Estos tripomastigotas se eliminarán por las heces, comenzando un nuevo ciclo (Pinto Dias y col., 1991).

A.3. ALMACENAMIENTO DE LA INFORMACIÓN GENÉTICA EN *Trypanosoma cruzi*.

En la mayoría de los eucariotas, la información genética se puede dividir de acuerdo a su ubicación en nuclear y mitocondrial, lo que implica la presencia de dos genomas. El ADN de los tripanosomátidos se organiza también en nuclear y mitocondrial, pero este último a su vez se subdivide en maxicírculos y minicírculos, de funciones distintas, como veremos más adelante.

El tamaño del genoma de *T. cruzi* ha sido estimado entre 100 y 200 Mb dependiendo del clon estudiado (Henriksson y col., 1996). Dentro de su genoma, el 51% corresponde a secuencias medianamente repetidas, el 23% a secuencias de copia única y el resto a secuencias altamente repetidas (Castro y col., 1981). Los genes medianamente repetidos suelen presentar una organización en tándem, pudiendo estar esta unidad de repetición presente en uno o varios cromosomas.

Debido a que la cromatina de *T. cruzi* no se condensa de forma visible durante la mitosis, no se ha podido determinar el número exacto de cromosomas de la especie. La técnica de electroforesis en campo pulsado ha permitido un acercamiento a la organización cromosómica del parásito. Una de las características más notables es el polimorfismo en el tamaño y número de cromosomas entre los distintos clones (Aymerich y Goldenberg, 1989; Henrickson y col., 1990), siendo el número de cromosomas superior a 40, con un tamaño de entre 0,45 y 4 Mb (Henriksson y col., 1996).

La ploidía de *T. cruzi* permanece aún sin aclarar. Los estudios utilizando sondas específicas sugieren diploidía (Henrickson y col., 1990), aunque también existen estudios relacionados con el contenido de ADN de parásitos provenientes de un mismo clon, que sugieren aneuploidía (McDaniel y Dvorak, 1993).

El ADN del kinetoplasto de *T. cruzi* constituye el 16-30% del ADN total, y está compuesto por dos tipos de ADN circular, denominados minicírculos y maxicírculos, concatenados entre sí formando una red altamente compleja fácilmente observable al microscopio electrónico (Chen y col., 1995).

Los maxicírculos tienen un tamaño de aproximadamente 40 kb, encontrándose en un número de 20 a 50 por kinetoplasto. Contienen los genes codificantes para las proteínas y ARN ribosomales mitocondriales y constituyen el equivalente al ADN mitocondrial de los eucariotas (Simpson, 1987). Los minicírculos tienen un tamaño de

1,4 kb encontrándose en un número variable entre 5.000 y 10.000 por parásito. Estos minicírculos contienen las secuencias codificantes para los ARN guías necesarios para la corrección de los transcritos mitocondriales (Pollard y col., 1990, Sturm y Simpson, 1990, Stuart, 1991, Simpson, 1997).

A.4. PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN GENÉTICA EN *Trypanosoma cruzi*

A.4.1. Transcripción policistrónica.

Una de las características de los tripanosomátidos es que los genes estructurales no presentan intrones. Por otra parte, estos genes estructurales se encuentran organizados en densos grupos a nivel del ADN separados por cortas regiones intergénicas. La razón por lo que varios genes se agrupan en regiones del genoma es que en los tripanosomátidos la transcripción de los genes es policistrónica, es decir que la ARN polimerasa transcribe varios genes en una misma molécula precursora. La transcripción de más de un gen junto con sus regiones intergénicas se observó por primera vez en el caso del gen 1F8 de *T. cruzi* (González y col., 1985), observándose posteriormente en otros genes de tripanosomátidos. Esta molécula precursora sufre un proceso de maduración consistente en la adición en el extremo 5' de una secuencia denominada mini-exón y la poliadenilación del extremo 3'. La adición del mini-exón y la poliadenilación del gen adyacente estarían acopladas en un mismo proceso (LeBowitz y col., 1993).

A.4.2. Adición del mini-exón.

Todos los ARN mensajeros caracterizados hasta el momento en tripanosomátidos presentan en su extremo 5' una secuencia conocida como mini-exón o "spliced leader" (SL) que en el caso de *T. cruzi* consta de 39 nucleótidos (De Lange y col., 1984). El proceso mediante el cual los mensajeros adquieren este mini-exón se conoce como "trans-splicing", ya que es una reacción de procesamiento del ARN por la cual exones de dos moléculas distintas de ARN se unen para formar un ARN maduro. Una de las secuencias, la secuencia líder, de 39 nt, deriva de una molécula mayor, y se va a unir al ARN mensajero inmaduro por acción de una ligasa de ARN, en un mecanismo similar al del cis-splicing de eucariotas superiores (Figura 2). Este fenómeno ocurre co-transcripcionalmente (Ullu y col., 1993) y es necesario para la correcta traducción de los mensajeros; ensayos realizados utilizando oligonucleótidos complementarios a esta secuencia inhiben la traducción de los mensajeros en *T. brucei*, sugiriendo que todos

ellos presentan este mini-exón en su extremo 5' (Cornelissen y col., 1986; Walder y col., 1986).

Previamente al proceso de "trans-splicing", el mini-exón adquiere en su extremo 5' una estructura de CAP o caperuza siendo su adición necesaria para el procesamiento del mini-exón (Ullu y Tschudi, 1991). En tripanosomátidos la estructura CAP consiste en una 7-metilguanosina más los primeros cuatro nucleótidos modificados por la adición de grupos 2'O-metilo, por lo que se la denomina CAP 4 (Bangs y col., 1992), a diferencia de eucariotas superiores donde no son más de dos. Su función sería proporcionar estabilidad a los transcritos.

En *T. brucei* el gen que codifica para el mini-exón se encuentra organizado en una unidad de 1,35 kb con aproximadamente 200 copias del gen (De Lange y col., 1983). Este gen produce un transcrito de 140 bases denominado "medRNA" que contiene en su extremo 5' la secuencia del mini-exón con la estructura CAP 4. Este "medRNA" es quien actúa como donante de la secuencia del mini-exón en el proceso de "trans-splicing" (Sather y Agabian, 1985).

La maquinaria que participa en el procesamiento de los precursores recibe el nombre de ayustosoma o "spliceosome". Si bien no está completamente caracterizada, se supone que es similar a la descrita en eucariotas superiores donde participan un complejo de proteínas y ARN nucleares de pequeño tamaño. La adición del mini-exón se produce en un dinucleótido AG localizado corriente arriba del codón de iniciación (Agabian, 1990) que usualmente está precedido por un tracto de polipirimidinas.

A.4.3. Poliadenilación.

La poliadenilación de los ARN mensajeros es un proceso por el cual se añade al extremo 3' de los transcritos una cola constituida por un número variable de adenosinas que se denomina comunmente como "cola poli A". En tripanosomátidos, el proceso de poliadenilación es similar al de eucariotas superiores e implica la participación de una endonucleasa específica que corta el premensajero en su extremo 3'. Posteriormente, la enzima poli A polimerasa añade los nucleótidos de adenosina utilizando como sustrato el ATP. La adición de esta cola poli A tendría una función reguladora de la expresión génica en tripanosomátidos al determinar la estabilidad de los mensajeros y por lo tanto sus niveles en la célula (Hugh y col., 1993).

En eucariotas superiores se ha descrito una secuencia conservada AAUAAA que actúa como señal de poliadenilación (Wahler y Keller, 1992). En tripanosomátidos no se han encontrado secuencias que puedan estar relacionadas con una señal de poliadenilación. LeBowitz y col. (1993) han sugerido que el proceso de adición del mini-exón y la poliadenilación estarían acoplados y sería la señal del aceptor del mini-exón la que determinaría la poliadenilación del extremo 3' del gen situado corriente arriba.

A.4.4. Corrección del ADN mitocondrial: "RNA editing".

El proceso de corrección de los mensajeros mitocondriales o "RNA editing" es característico de los tripanosomátidos y constituye un sistema de regulación de la expresión de los genes mitocondriales. El proceso consiste en la adición o delección de uridinas a los transcritos mitocondriales primarios que producen la aparición o el ajuste de los marcos de lectura de los genes mitocondriales (Hajduk y col., 1993). El proceso de corrección se realiza a través de los llamados ARN guías codificados en los minicírculos. Estos ARN guías se aparean al sitio correspondiente en el transcrito primario, seguido de la formación de un enlace fosfodiéster entre la cola poli U y puntos de apareamiento incorrecto ("mismatch") en la zona complementaria, lográndose de esta manera la complementariedad entre los ARN guías y el premensajero.

A.5. GENÉTICA EVOLUTIVA DE *Trypanosoma cruzi*: CLONALIDAD VERSUS SEXUALIDAD.

Una de las características más importantes de *T. cruzi* es gran su diversidad biológica, y una de los temas más explorados en la microbiología ha sido conocer si las poblaciones naturales de los microorganismos son predominantemente clonales o sexuales. La implicación práctica de esta alternativa surge claramente: si el organismo es clonal sus genotipos se replican de forma incambiada a lo largo de las generaciones, mientras que si el organismo es sexual ocurre lo contrario, ya que sus genotipos varían de generación en generación debido a la recombinación genética. Las tres técnicas más utilizadas para el estudio genético de poblaciones en tripanosomátidos son: los zimodemas, basados en sus perfiles isoenzimáticos (Widmer y col., 1985, Ready y col., 1980, Carneiro y col., 1990), los esquizodemas, basados en los perfiles de restricción del kADN (Morel y Simpson, 1980, Carneiro y col., 1990) y los rapidemas, basados en basado en la amplificación de ADN con nucleótidos al azar, o RAPD (Tibayrenc y col., 1993, Tibayrenc, 1995). En *T. cruzi* los diferentes perfiles isoenzimáticos permitieron una clasificación en los denominados zimodemas que resulta ser muy útil a la hora de determinar las características de los parásitos (Tibayrenc, 1996). Inicialmente se

describieron 3 grupos principales de zimodemas (Miles y col., 1978), y más tarde estos grupos se subdividieron, siendo actualmente más precisa esta división, existiendo hasta 45 zimodemas (Tibayrenc, 1996).

En *T. cruzi* existen evidencias que sugieren una propagación clonal a partir de estudios realizados con aislados de diversos orígenes, por medio de zimodemas y RFLPs por un lado (Tibayrenc y Ayala, 1988) y RAPDs por otro (Tibayrenc y col., 1993). Esta hipótesis se apoya en el hecho de que estudios independientes utilizando las diferentes técnicas muestran resultados similares. El estudio de la divergencia filogenética entre los diferentes clones muestra que existen dos líneas filogenéticas principales, correspondiéndose el primer grupo con el inicialmente denominado zimodema I, y el segundo grupo con los zimodemas II y III (figura 4). Estos a su vez se subdividen en grupos más pequeños y polimórficos, y existe una distancia filogenética muy importante entre ambos ramales, cuatro veces mayor, por ejemplo, que la que separa humanos de chimpancés (Tibayrenc y col., 1986). Incluso, datos recientes sugieren mayores distancias filogenéticas entre clones de *Trypanosoma cruzi* que entre el complejo formado por *Leishmania infantum*, *L. donovani* y *L. chagasi* (Nunes y col., 1997), lo cual implicaría una reevaluación de *T. cruzi* como una única especie, y podría ser un hecho de gran impacto en la taxonomía del parásito y en la epidemiología de la enfermedad de Chagas.

Por último, la hipótesis de la clonalidad en *T. cruzi* adquiere sustancial importancia en dos aspectos fundamentales de la enfermedad de Chagas: la virulencia y la susceptibilidad a fármacos entre los clones más alejados filogenéticamente. Recientemente se ha demostrado que miembros de las dos líneas filogenéticas principales de *T. cruzi* presentan diferencias de hasta 9 veces en la susceptibilidad a benznidazol, y 4,4 veces en la susceptibilidad a nifurtimox (Revollo y col., 1998), las dos drogas utilizadas en el tratamiento de la enfermedad de Chagas (véase más adelante).

A.6. QUIMIOTERAPIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.

En la actualidad no existe un tratamiento efectivo disponible para combatir la enfermedad de Chagas. El éxito alcanzado por países como Uruguay y Chile en detener la transmisión del parásito (TDR News, 1994) se debe principalmente al control del insecto mediante insecticidas y por el control de los bancos de sangre, donde el uso de violeta de genciana ha demostrado ser efectivo en la eliminación de los parásitos de las reservas de sangre (Docampo y Moreno, 1990).

El actual tratamiento de la enfermedad se basa en dos drogas nitroheterocíclicas, el nitrofurano nifurtimox y el 2-nitroimidazol benznidazol. La actividad antiparasitaria del nifurtimox proviene de la reducción del grupo nitro a nitroanión, altamente reactivo. *T. cruzi* es deficiente en mecanismos de detoxificación de metabolitos del oxígeno, y por tanto más sensible a radicales libres que la célula huésped. El mecanismo de acción del Benznidazol se cree que es a través de la unión covalente de intermediarios de nitroreducción a macromoléculas (De Castro, 1993). Ambas drogas tienen una actividad significativa durante la fase aguda de la enfermedad, pero fallan en el tratamiento de la fase crónica. Por tanto, para la mayor parte de los casos no existe un tratamiento eficaz. Por otra parte estos, fármacos son altamente tóxicos y producen importantes efectos colaterales (Gorla y col., 1988, Gorla y col. 1989). Se ha descrito además que la susceptibilidad a ambos fármacos varía según la cepa utilizada (Brener y col., 1976; Andrade y col., 1985), así como también la existencia de resistencia natural a ambas drogas (Filardi y Brener, 1987).

La limitada eficacia y la toxicidad de estos fármacos no permite hablar de la existencia de casos de resistencia típicos como pueden observarse en otros parásitos. Sin embargo, no se puede descartar que las diferencias descritas en la susceptibilidad a los fármacos, sean debido a la presencia de mecanismos de resistencia como los que se han caracterizado en otras especies.

A.7.MECANISMOS DE RESISTENCIA A FÁRMACOS EN PARÁSITOS.

A.7.1. Generalidades.

Una de las principales líneas de defensa contra los protozoos parásitos es la quimioterapia, y uno de los problemas más importantes a los que se enfrenta la ciencia médica es la aparición de mecanismos de resistencia a los fármacos utilizados en el tratamiento de enfermedades infecciosas.

Hasta el momento se han descrito varios mecanismos de resistencia en protozoos. Los estudios realizados en parásitos del género *Leishmania*, sobre todo, han aportado resultados extrapolables a otros protozoos. Alguno de los mecanismos descritos, hasta el momento son:

- Amplificación de genes codificantes para el/los enzima/s blanco de acción.
- Amplificación de genes codificantes para el/los enzima/s que provean vías alternativas a la vía metabólica inhibida.

- Mutaciones puntuales que se traducen en cambios estructurales y/o funcionales del enzima blanco de acción.
- Alteraciones en el transporte del fármaco.
- Fenómeno de multirresistencia.

Estos mecanismos de resistencia tienen que ver con los múltiples pasos que debe dar un fármaco para poder actuar sobre su blanco de acción (figura 5). Usualmente el fármaco debe atravesar la membrana plasmática del parásito, y ser activado dentro de la célula. Por otra parte el fármaco debe ser mantenido dentro y no ser eliminado por la célula, y luego que el fármaco alcanza su blanco, el parásito debe ser eficientemente eliminado. Cada uno de estos pasos constituyen sitios para generar mecanismos de resistencia, y usualmente frente a la presión de un fármaco el parásito puede generar varios mecanismos, constituyendo un fenómeno multifactorial. Los principales mecanismos responsables de la resistencia a fármacos se muestran en la figura 5. Los parásitos pueden evadir la acción del fármaco disminuyendo su captación, ya sea por pérdida de los sistemas de captación, modificaciones en la composición de la membrana plasmática o almacenamiento dentro de vacuolas; los mecanismos de activación del fármaco pueden ser suprimidos; la eficiencia de la interacción de la droga con su blanco de acción puede disminuir ya sea por un incremento de sustratos que compitan con el fármaco, o alterando la molécula blanco para hacerla menos sensible al fármaco; el parásito puede activar vías metabólicas alternativas que le permitan vivir a pesar de tener una enzima bloqueada; el parásito puede mejorar sus mecanismos de reparación frente al daño producido por el fármaco; y finalmente el parásito puede aumentar la eliminación del fármaco a través de transportadores de membrana.

A.7.2. El fenómeno de la multirresistencia a fármacos.

El fenómeno de multirresistencia a fármacos fue observado por primera vez en células neoplásicas derivadas de tumores resistentes a quimioterapia. Estas células resistentes a un fármaco resultan a su vez resistentes a otros fármacos no relacionados estructural y funcionalmente. La importancia de las glicoproteínas-P (Pgps) en este proceso, y en procesos similares en organismos que van desde bacterias a tumores humanos, ha sido ampliamente demostrado desde el descubrimiento de estas proteínas por Juliano y col. (1976). Son proteínas de membrana que pertenecen a la familia de transportadores ABC (por ATP binding cassette), constituídas por dos mitades similares, cada una conteniendo seis dominios transmembrana y un sitio de unión a ATP. Las Pgps involucradas en la multirresistencia a fármacos (MDR) confieren

resistencia debido a su capacidad de eliminación del fármaco en contra de un gradiente, por medio de la hidrólisis de ATP.

Otro grupo de proteínas involucradas en el fenotipo MDR lo constituyen las proteínas asociadas a MDR denominadas MRP (de Multidrug resistance-associated protein). Son transportadores de membrana similares a las Pgps y también funcionan eliminando el fármaco de la célula. Experimentos recientes sugieren que la MRP transporta hacia afuera de la célula moléculas complejas conjugadas a glutatión.

A.8. LA AMPLIFICACIÓN GÉNICA.

A.8.1. Generalidades.

Uno de los mecanismos por los cuales *Leishmania spp.* reacciona frente a la presión de un fármaco es mediante la amplificación génica. En estos casos se produce un incremento en el número de copias de uno o más genes que codifican para la enzima blanco de acción del fármaco, de una enzima implicada en una ruta alternativa a la que se está inhibiendo o bien de alguna proteína transportadora implicada en el eflujo del compuesto tóxico. La caracterización de estos amplicones y la identificación de los genes que se encuentran en los mismos constituye una potente herramienta para conocer que enzimas o vías metabólicas se encuentran implicadas en la acción del fármaco y/o en la reacción frente al mismo. El fenómeno de la amplificación génica en *Leishmania* fue descrito por primera vez en estudios de resistencia a antifolatos (Coderre y col., 1983; Beverley y col., 1984), y el estudio en profundidad desde entonces ha mostrado que los parásitos presentan diferentes mecanismos de resistencia frente a un mismo fármaco, constituyendo el mecanismo de la multiresistencia un fenómeno multifactorial. Centraremos nuestro análisis de la amplificación génica en la resistencia a antifolatos.

A.8.2. La región R.

El metotrexato (MTX) es un inhibidor estequiométrico de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) de la mayoría de las especies, y en muchas de ellas la resistencia a MTX se manifiesta como una sobreexpresión de esta enzima debido a la amplificación del gen. También sucede lo mismo en *Leishmania*, donde en líneas resistentes a MTX se observó la presencia de un amplicón de 30 kb al que se denominó la región R, en el que se identificó la presencia del gen de la dihidrofolato reductasa-timidilato sintasa (DHFR-TS) (Coderre y col., 1983, Beverley y col., 1984). Cabe

destacar que en *Leishmania*, al igual que en todos los protozoos parásitos estudiados hasta la fecha, esta enzima es bifuncional, y se codifica fusionada al gen de la timidilato sintasa. La transfección de *Leishmania* con este gen, y por tanto su sobreproducción, demostró que este gen por sí sólo es capaz de conferir resistencia a MTX .

A.8.3. La región H: un elemento extracromosomal implicado en multirresistencia.

También en los primeros estudios con *Leishmania* resistentes a MTX se encontró que existe otra región del ADN amplificada a la que se denomina región H. Esta región, que por sí sola es capaz de conferir resistencia a MTX, posee de 68 a 85 kb según las diferentes especies de *Leishmania*, contiene dos repeticiones invertidas de 30 kb separadas por secuencias únicas de 4 y 5 kb, y proviene del cromosoma 6 (figura 6). Los estudios de esta región mostraron claramente su relación con la resistencia a fármacos. Primero, la selección de líneas resistentes a primaquina y terbinafina, que no están relacionadas ni estructural ni funcionalmente a MTX, produjo líneas que sólo amplifican el círculo H, y que muestran resistencia cruzada a MTX (Ellenberg y col., 1989). Segundo, en selecciones independientes a MTX de líneas de *L. major*, *L. tropica* y *L. infantum* se demostró la amplificación del círculo H solamente, y no del círculo R (Ellenberg y Beverley, Ellenberg y col. 1987, 1989, Gamarro y col., 1994, Chiquero y col., 1994). Tercero, la selección de *L. mexicana amazonensis* con arsenito de sodio mostró también la amplificación del círculo H, y estos parásitos presentaron resistencia a MTX (Katakura y Chang, 1989).

Estos estudios llevaron a analizar la presencia de secuencias codificantes dentro de la región. El primer hallazgo fue la presencia del gen de una glicoproteína-P *pgpA* (Ouellette y col., 1990). Teniendo en cuenta la participación de las Pgps en fenotipos de multirresistencia, la hipótesis más aceptable parecía ser que este gen, amplificado en respuesta a diferentes fármacos, fuera el responsable de conferir resistencia a MTX. Sin embargo, los estudios de transfección mostraron que *pgpA* no es el gen responsable de conferir resistencia a MTX, sino que sólo confiere una débil resistencia a metales pesados (Ouellette y col., 1991; Callahan y Beverley, 1991). También se encontró que en la región cromosómica correspondiente al círculo H se encuentran otros 2 genes *Pgp*, *pgp B* y *pgpC* situados contiguos a *pgpA*, corriente arriba de éste (Ouellette y col., 1991). Estos genes no forman parte del círculo H, pero la localización de tres genes *Pgps* contiguos en el genoma sugirió la posibilidad de una región del genoma relacionada con la función de detoxificación y resistencia a fármacos.

La investigación del mecanismo responsable de la resistencia a MTX prosiguió con la estrategia de transfectar parásitos con fragmentos de la región H, de forma de encontrar el mínimo inserto de ADN cuya sobreexpresión confiriera resistencia. De esta forma se encontró en *L. tarentolae* y *L. major* que un gen por sí solo es capaz de conferir resistencia a MTX, y se lo denominó inicialmente *ltdh* o *hmtx*^r (Papadopoulou y col., 1992; Callahan y Beverley, 1992). Este gen se encuentra corriente abajo del gen *pgpA*.

A.9. LA ENZIMA PTERIDINA REDUCTASA.

Los estudios de transfección de *Leishmania* con el gen *ltdh/hmtx^r* mostraron que este gen confiere resistencia a los antifolatos MTX, aminopterina, trimetoprim y pirimethamina, pero no a arsenito (Papadopoulou y col., 1992; Callahan y Beverley, 1992). Su marco abierto de lectura de 869 nucleótidos codifica para una proteína de 289 aminoácidos con un peso molecular deducido de 30,7 kDa, y presenta significativa homología con la familia de las deshidrogenasas de cadena corta. Estas enzimas, ampliamente distribuidas en la naturaleza, participan de reacciones de óxido-reducción utilizando los cofactores NAD(H) o NADP(H), y tienen un tamaño promedio de 250 aminoácidos. La amplificación *de novo* de este gen es un evento frecuente en leishmanias seleccionadas con MTX, independientemente de que el amplicón pueda variar de tamaño y ser lineal o circular (Papadopoulou y col., 1993).

La participación de este gen en el metabolismo de folatos y pteridinas, y por tanto en la resistencia a antifolatos, quedó claramente demostrada con la generación de mutantes nulos para el mismo. Cabe recordar aquí que *Leishmania* es incapaz de sintetizar folatos *de novo* a partir de *p*-aminobenzoato y glutamato, y que varias pterinas pueden mantener su crecimiento en medios deficientes en folatos (Petrillo-Peixoto y Beverley, 1987), lo cual sugirió que *Leishmania* puede sintetizar folatos a partir de pterinas. Los estudios de interrupción del gen *ltdh* muestran que, a diferencia de la cepa salvaje, que en un medio deficiente en folato puede crecer si se complementa con folato, dihidrofolato o biopterina, los mutantes nulos sólo crecen si se complementan con folato o biopterina. Cuando los mutantes nulos son transfectados con el gen, es decir son complementados funcionalmente, éstos son capaces de crecer no sólo si se complementa el medio con folato, sino también al complementar con biopterina. Estos experimentos indicaron que la *ltdh* participa en alguno de los pasos que lleva a la conversión de pterinas a folatos. También se demostró que los mutantes nulos son altamente sensibles a MTX, y que la complementación funcional revierte esa sensibilidad.

La demostración formal de la función de esta enzima fue hecha por el grupo de S. Beverley, por medio de la purificación de la proteína recombinante y la demostración de su actividad enzimática (Bello y col., 1994). Esta enzima, denominada a partir de entonces pteridina-reductasa 1 (PTR1), cataliza la reducción de biopterina a dihidrobiopterina dependiente de NADPH (figura 7). También es capaz de reducir, aunque con menor actividad, folato, dihidrobiopterina y dihidrofolato. De esta forma PTR1 constituye una vía de salvamento de pteridinas oxidadas, y el gen confiere

resistencia a MTX ya que constituye una vía alternativa para la reducción completa de folato a tetrahidrofolato. Por otra parte, en ensayos con precursores radiactivos se ha demostrado en *Leishmania* que la biopterina se puede transformar en tetrahidrofolato, (Beck y Ullman, 1991), por lo que se ha postulado la existencia de una segunda pteridin reductasa, PTR2, con mayor eficiencia en la reducción de dihidrobiopterina a tetrahidrobiopterina (Nare y col., 1997). En la figura 8 se muestra el modelo postulado de estas 2 vías que conducen a la formación de tetrahidrofolato y tetrahidrobiopterina.

A.10. RESISTENCIA A FARMACOS EN *Trypanosoma cruzi*.

Como dijimos anteriormente, la no existencia de un tratamiento efectivo contra la enfermedad de Chagas no permite hablar de resistencia. Sin embargo, existen por un lado datos de distintas susceptibilidades a fármacos en los distintos aislados, y por otro estudios de la capacidad de *Trypanosoma cruzi* de reaccionar frente a la presión de un fármaco.

La inducción de líneas resistentes a nifurtimox provoca una serie de cambios a nivel del ADN, que se traducen en un aumento del 100% de la masa del ADN nuclear y del 50% del ADN del kinetoplasto (Nozaki y col., 1996). Por otra parte la utilización de sondas específicas para la identificación de cromosomas muestran que estas líneas resistentes presentan cambios en el tamaño de los cromosomas (Nozaki y col., 1996). Este tipo de respuesta fue también observado en líneas de *T. cruzi* resistentes a daunomicina en donde los perfiles cromosómicos de los parásitos salvajes difieren significativamente de los resistentes (Barreiro, 1997). También en esos estudios se demuestra que el contenido de ADN en los parásitos resistentes se encuentra significativamente aumentado (Barreiro, 1997).

Recientemente se ha descrito la inducción de líneas resistentes a benznidazol (Murta y col., 1998), y la importancia de este trabajo radica en que la inducción de resistencia se realizó *in vivo* en ratones infectados con *T. cruzi*, mostrando la posibilidad real de la generación de resistencia durante el curso de la infección.

Por último, se han descrito en *T. cruzi* dos genes P-glicoproteína, *tcpgp1* (Dallagiovanna y col., 1994; Barreiro, 1997) y *tcpgp2* (Dallagiovanna y col., 1996). *tcpgp1* se encuentra amplificado en las líneas resistentes a daunomicina (Barreiro, 1997), mientras que de *tcpgp2* no se conoce claramente su función. Sin embargo su homología con la *pgp* de *Leishmania* *pgpA* lleva a pensar en la posibilidad de una función similar, y

a la pregunta de si se encontrará a nivel del genoma en un contexto de genes relacionados con mecanismos de resistencia a fármacos, como es el caso del locus H de *Leishmania*.

B.1. MATERIALES.

B.1.1. REACTIVOS QUIMICOS Y FARMACOS.

Los reactivos químicos utilizados fueron de las siguientes casas comerciales; Sigma, Panreac, Riedel de Haën, Bio-Rad, Probus, Serva, Boehringer Mannheim, Merck, Difco y Dr. Schirck Laboratories.

Los fármacos empleados fueron: aminopterina, metotrexato, trimetoprim y pirimetamina, todos de SIGMA.

B.1.2. REACTIVOS PARA BIOLOGIA MOLECULAR.

Se utilizaron enzimas de restricción suministradas por Boehringer Mannheim, Promega y Amersham; Fosfatasa alcalina, T4 DNA polimerasa y Taq polimerasa de Boehringer Mannheim; T4 DNA ligasa y Taq polimerasa (Sequencing grade) de Promega; proteinasa K, liticase, RNAsa y DNAsa de Sigma y AMV retrotranscriptasa de Pharmacia. Los desoxinucleótidos utilizados fueron de Boehringer Mannheim.

Se utilizaron los siguientes kits para biología molecular: Random Primed de Boehringer Mannheim; Wizard Minipreps y Wizard Maxipreps de Promega; y Gene Clean de BIO 101 inc.

Los desoxinucleótidos marcados radioactivamente, desoxicitidina-5'-trifosfato (-³²P) (3000 Ci/mmol) fueron suministrados por Dupont.

Los filtros de nitrocelulosa y las membranas de nylon para transferencia de ácidos nucleicos fueron de Amersham.

Para la electroforesis en geles de agarosa se empleó agarosa Sea-Kem de FMS. Los bloques de ADN para electroforesis en campo pulsado (CHEF) se prepararon con agarosa de bajo punto de fusión de Bio-Rad. Los marcadores de tamaño de ADN utilizados fueron ADN del fago lambda y ØX174 cortados con *Hind*III y *Hae*III,

respectivamente, de Promega. El marcador de tamaño de ARN fue el RNA ladder también de Promega.

B.1.3. SOLUCIONES Y TAMPONES.

B.1.3.1. Soluciones.

Solución de aminoácidos AAS: arginina 4,4 mg/ml, cistina 0,8 mg/ml, glutamato 2,5 mg/ml, glutamina 16,4 mg/ml, prolina 69 mg/ml, ornitina 1 mg/ml, glucosa 7 mg/ml, fructosa 4 mg/ml, malato 6,7 mg/ml, a-cetoglutarato 3,7 mg/ml, fumarato 0,55 mg/ml, succinato 0,6 mg/ml.

Solución desnaturizante: NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M.

Solución neutralizante: NaCl 1,5 M, Tris-HCl 0,5 M pH 7,2.

Solución Denhardt's 50x : BSA (seroalbúmina bovina) 1%, Ficoll 1%, PVP (polyvinylpyrrolidone) 1%.

Formamida: previo a su utilización se desionizó con resina de intercambio iónico AG501-X8.

Cloroformo isoamílico: cloroformo más alcohol isoamílico en proporción 24:1.

Fenol: saturado y equilibrado con Tris 0,1 M pH 8,0 más hidroxiquinoleina al 0,1%.

Fenol Sevag: fenol, cloroformo y alcohol isoamílico en proporción 25:24:1.

Solución de hibridación: 6x SSC, 5x Denhardt's, 0,2% SDS y ADN de esperma de salmón (desnaturalizado) 200 µg/ml.

B.1.3.2. Tampones.

Tampón de dilución de fagos SM: NaCl 0,1 M, Tris-HCl 50 mM pH 7,4, MgSO₄ 10 mM.

Tampón TBE 10x : Tris-HCl 89 mM pH 8,3, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM.

Tampón TAE 10x : Tris-HCl 0,4 M pH 7,2, EDTA 50 mM pH 8,0, ácido acético hasta pH 7,2.

Tampón TE: Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM.

Tampón de carga para ADN: Azul de bromofenol 0,25%, xylene cyanol 0,25%, glycerol 30%.

Tampón SSC 20x : NaCl 3 M, citrato sódico 0,3 M, pH 7,2

Tampón glucosa: Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8,0, EDTA 10 mM.

Tampón fosfato salino (PBS) : NaCl 0,14 M, KCl 2,6 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, Na₂HPO₄ pH 7,4.

Tampón MNE 10x : MOPS 0,2 M, acetato sódico 0,05 M, EDTA 10 mM, pH 7,0.

Tampón HBS: Hepes 21 mM, NaCl 137 mM, KCl 5 mM, NaH₂PO₄ 7 mM, glucosa 6 mM, pH 7,4

B.1.4. Medios de cultivo.

- Medio LB líquido: bactotripton 10 g, extracto de levadura 5 g, NaCl 10 g, y agua destilada hasta 1 litro, pH 7,5.

- Medio LB agar: medio LB líquido más bacto agar al 1,5%.

- Medio LB top agarosa: medio LB líquido más agarosa al 0,7%.

-Medio NZY líquido: NZ amina 10 g, NaCl 5 g, casaminoácidos 1 g, extracto de levadura 5 g, MgSO₄·7H₂O 2 g y agua destilada hasta 1 litro, pH 7,5.

-Medio NZY agar: medio NZY líquido más bacto agar al 1,5 %.

-Medio NZY top agarosa: medio NZY líquido más agarosa al 0,7%.

-MEDIO YPD: extracto de levadura 1%, peptona 2%, dextrosa 2%.

-Medio LIT : NaCl 4 g, KCl 0.4 g, Na₂HPO₄ ·7H₂O 15 g, glucosa 2 g, infusión de hígado 3 g, triptosa 5 g, hemina 2%, agua hasta 1 litro pH 7,2.

-Medio RPMI 1640 modificado: medio RPMI 1640 1x, solución de aminoácidos AAS 1x, solución de vitaminas MEM 0,2x, Hepes 25mM, L-glutamina 0,3 mg/ml, Suero Bovino Fetal 20% pH 7,2.

B.1.5. VECTORES PLASMIDICOS.

B.1.5.1. Vectores de transformación.

Plásmido pBluescript KS II +/- (Stratagene) : Vector para subclonado y secuenciación de fragmentos de ADN.

pUC 18 : Vector para subclonado y secuenciación de fragmentos de ADN.

pGEM-T (Promega) : Vector diseñado para el subclonado y secuenciación de fragmentos de ADN amplificados por PCR.

pCR 2.1-TOPO (Invitrogen): Vector diseñado para el subclonado y secuenciación de fragmentos de ADN amplificados por PCR.

B.1.5.2. Vectores de expresión.

pQE-30 (Pharmacia) : Vector para expresión de polipéptidos como proteínas fusionadas a 6 histidinas en el extremo amino terminal.

B.1.5.3. Vectores de transfección.

pTEX (Kelly y col., 1992) : Vector de transfección para *T. cruzi* y *Leishmania*. El vector contiene las secuencias de las regiones flanqueantes y la región intergénica del tandem formado por las dos copias del gen de la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (gGAPDH) de *T. cruzi* clonados en el vector pBS KS. Como marcador de selección lleva el gen *neo* que confiere resistencia a la geneticina (G418).

B.1.6. LINEAS CELULARES.

B.1.6.1. Cepas bacterianas.

Todas las cepas empleadas han sido de la especie *Escherichia coli*.

P 2392: Para crecimiento del fago lambda EMBL3 (Silhary y col., 1984)

Genotipo: hsdR514 (r_k-m_k+), $F^{-}e14^{-}(mrcA^{-})$, supE44, supF58, lacY1 or $\Delta(lacIZY)6$ galT22, metB1, trpR55(P2).

XL1-Blue (Bullock y col., 1987).

Genotipo: recA1, endA1, gyrA96, thi-1, supE44, relA1, lac, [F' proAB, lacI q , ZAM15, Tn10(tet^r)].

B.1.6.2. Levaduras.

Cepa S 13 (Martín, 1980).

Genotipo: a1, trp1, his3, kil, 0. Línea haploide.

B.1.6.3. Células Vero

Células fibroblastoides de mono verde.

B.1.6.4. *Trypanosoma cruzi*.

Todos los estudios descritos en este trabajo han sido realizados principalmente con la cepa Y (Silva, 1953), y CL Brener, un clon derivado de la cepa CL (Brener y Chiari, 1963) de *T. cruzi*, y en algunos casos se han utilizado las cepas Maracay (Jimenez-Ortiz, 1984) y Tulahuen (Pizzi, 1952).

Para el análisis filogenético se han utilizado clones cedidos gentilmente por el Dr. M. Tibayrenc (CEPM.Centre ORSTOM de Montpellier, Francia). A continuación se listan el nombre, origen y zimodema de los mismos:

Clon	País	Huésped	Zimodema
PB6	Bolivia	<i>Rhodnius pictipes</i>	Z 6
C8 cl 1	Bolivia	<i>Triatoma infectans</i>	Z 9
X10 cl 1	Brasil	Humano	Z 17
GAMBA cl 1	Brasil	<i>Didelphis azarae</i>	Z 19
P209 cl 1	Bolivia	Humano	Z 19
ESM cl 3	Brasil	Humano	Z 30
IVV cl 4	Chile	Humano	Z 32
MAS1 cl 1	Brasil	Humano	Z 32
M6241 cl 6	Brasil	Humano	Z 36
Tula cl 2	Chile	Humano	Z 43
CL Bre	Brasil	Humano	ND

B.1.7. OLIGONUCLEOTIDOS SINTETICOS.

En la siguiente tabla se muestra la secuencia de los oligonucleótidos diseñados así como su utilización.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Uso
PR1		T.Reversa
PR2	CATGCGCTTGGCGGACTC	PCR
PR-A	ggagatctATGACGAAACGTCGCA	PCR
PR-C	ggaagcttACCACGCCAGCAAAGC	PCR
P17-1	CCCCTACTAATTCAACAGC	T.Reversa
P17-2	TGTGCCACATTGGTGTTC	PCR
P17-A	atggatccATGTCTGTTGTTGCTTCC	PCR
P17-B	gaaagcttCACTTCAATTATTCAATTCC	PCR
T+ANCH	CCTCTGAAGGTTCCAGAATCGATAGGAATTC(T)17(CAG)N	T.Reversa
ANCH	CCTCTGAAGGTTCCAGAATCGATAG	PCR
IG1F	GGTCGACATGCTCGGTGTGC	PCR
IG1R	AAGCTTCAGTCCGCACTCGTG	PCR
ON-dT	(T)17(GAC)N	T.Reversa
ME	CGCTATTATTGATACAGTTTCTG	PCR

Las letras minúsculas corresponden a secuencias no presentes en el ADN genómico, y fueron agregadas para introducir sitios de restricción. Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados en el "Servicio de Síntesis de Oligonucleótidos" del Instituto de Parasitología y Biomedicina "Lopez-Neyra" (CSIC), Granada.

B.2. METODOS.

B.2.1. CULTIVO DE TRYPANOSOMA CRUZI.

B.2.1.1. Cultivo de epimastigotes.

Para el cultivo de las formas epimastigotas se empleó el medio líquido LIT (Castellani, 1967), suplementado con un 10% v/v de suero bovino fetal inactivado a 50°C, durante 30 minutos, y esterilizado por filtración a través de membranas de 0,2 µm de poro. El cultivo se realizó en frascos estériles de 25 cm² a partir de un inóculo inicial de 4x10⁶ células/ml, a la temperatura de 28°C y en agitación de 70 rpm en agitador Heidolph Unimax 2010. Con objeto de mantener los cultivos en fase logarítmica de crecimiento se realizaban las resiembras cuando el número de parásitos/ml era aproximadamente de 3 x10⁷ parásitos/ml. El recuento celular se realizó utilizando un Coulter Conter.

B.2.1.2. Cultivo de tripomastigotes y amastigotes.

La obtención de formas tripomastigotas se realizó mediante la infección "in vitro" de células Vero. Se partió de cultivos en monocapa de células Vero crecidos a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂, en frascos de 75 cm², con medio RPMI suplementado con bicarbonato de sodio 0,22%, suero bovino fetal al 10% para crecimiento y al 5% para mantenimiento. Todos los cultivos contenían estreptomycinina 0,1 mg/ml y penicilina 100U/ml. Cuando las células alcanzan confluencia se infectan con tripomastigotas a una densidad de 200.000 parásitos/cm² y se incuban a 37°C. A los días 5, 6 y 7 post infección, se recogieron los sobrenadantes que contenían las formas tripomastigotas emergidas por roturas celulares. Se centrifugaron a 3000 rpm por 15 minutos, y se incubaron a 37°C por 2 horas en un incubador de CO₂, para permitir que las formas tripomastigotas (móviles) emergieran del sedimento. Se recogieron cuidadosamente para no perturbar el sedimento, los sobrenadantes que contienen los tripomastigotas purificados.

Las formas amastigotas se obtuvieron a partir de las células Vero infectadas, pero al cuarto día, antes de que emergieran los tripomastigotas, los cultivos se trataron con tripsina al 0,5% y se incubaron a 37°C controlando periódicamente el desprendimiento de la monocapa. Cuando esta se desprende completamente se detiene la acción de la tripsina agregando medio de cultivo y centrifugando a 3500 rpm por 15 minutos. Se incubó luego 2 horas a 37°C para permitir que los tripomastigotes migren al medio, y el sedimento que contiene células Vero infectadas con formas amastigotas se resuspende en

medio fresco y se centrifuga a 10.000xg. El sedimento obtenido contiene amastigotas (Villalta y Kierszenbaun, 1982).

B.2.2. MANIPULACION DE BACTERIAS Y BACTERIOFAGOS.

B.2.2.1. Cultivo de bacterias.

Los cultivos líquidos de bacterias se hicieron en medio LB a 37°C con agitación. En el caso de células transformadas con plásmidos portadores de marcadores de resistencia a ampicilina se agregó al medio el antibiótico a una concentración de 100 µg/ml. Las bacterias también fueron cultivadas en medio semisólido en placas de Petri con LB agar con o sin ampicilina, según fuera necesario. Los stocks de bacterias se conservaron también a -80°C en medio LB suplementado con 15% de glicerol.

B.2.2.2. Preparación de células competentes y transformación.

Los cultivos se realizaron en medio líquido con agitación a 37°C. 3 ml de bacterias se crecieron durante 16 horas y se pasaron a 150 ml de LB, prosiguiendo el cultivo hasta que la DO fue de 0,6 a 600 nm. Las células se centrifugaron a 4000g por 15 min a 4°C, y las células se lavaron en agua bidestilada estéril con los siguientes volúmenes: 1 volumen, 0,5 volúmenes y 0,02 volúmenes, centrifugándose cada vez 15 min a 4000g y 4°C. Las bacterias se resuspendieron en 0,003 volúmenes de glicerol al 10%, se alicuotearon de a 50 µl y se guardaron a -70°C.

Para electroporar se utilizó un electroporador ECM 600 y las condiciones fueron 2,5 kV, 129 ohms, lo cual generó un pulso de alrededor de 5,5 milisegundos.

B.2.2.3. Infección de bacterias con bacteriófagos.

Previamente a la infección, células de la cepa P2392 de *E.coli* fueron crecidas hasta la fase logarítmica, precipitadas y resuspendidas en 0,5 volúmenes de MgSO₄ 10 mM. Un volumen de una dilución de los fagos en SM se incubó con tres volúmenes de las células, anteriormente preparadas, durante 20 min. a 37°C. La dilución de fagos se calculó de forma que se esperaba obtener 3 x 10⁵ placas de lisis por placa de bacterias. Seguidamente, a la mezcla se agregó 6 ml de NZ top agar a 50°C y se vertieron en placas de Petri de 150 mm con NZ agar equilibradas a 37°C. Estas placas se incubaron durante toda la noche a 37°C hasta observar las placas de lisis.

Tras la hibridación, los fagos positivos se purificaron por un procedimiento similar. Las colonias positivas se recogieron con pipetas Pasteur estériles y se resuspendieron en 1 ml de SM. De esta solución se preparan diluciones de manera de plaquear unas 200 a 300 unidades formadoras de placas (ufp) por placa, sometiéndose a un nuevo proceso de selección hasta que todas fueran positivas. Los clones positivos se almacenaron en alícuotas de 1 ml de SM con unas gotas de cloroformo a 4°C, y para tiempos prolongados a -80°C con DMSO al 7% (Sambrook y col., 1989).

B.2.2.4. Transferencia de bacteriófagos a filtros de nylon.

Para la transferencia de los fagos, se colocó sobre las placas de lisis un filtro de nylon seco dejándose absorber durante 1 min. Una vez retirado se colocó un segundo filtro durante 2 min para obtener una réplica del primero, considerándose positivas aquellas placas que daban señal en ambas réplicas.

Para su posterior hibridación, los filtros fueron tratados durante 2 min con solución desnaturalizante, luego 4 min con solución neutralizante, y finalmente durante 2 min en SSC 20x. El tratamiento se hizo en bandejas sobre papeles Whatman 3 MM mojados en las soluciones anteriores, manteniendo los fagos en la parte superior de los filtros. Para fijar el ADN a los filtros, estos se secaron a temperatura ambiente y se fijaron con luz UV (360 nm) durante 5 min (Sambrook y col., 1989).

B.2.2.5. Preparación de bacteriófagos a gran escala.

Para obtener el lisado de bacterias se incubó una mezcla de 100 µl de células P2392 en fase estacionaria con 100 µl del stock de fagos en SM y 100 µl de una solución 1:1 de MgCl₂/ CaCl₂ 10 mM durante 20 minutos a 37°C. Esta mezcla se transfirió a un matraz con 50 ml de medio NZ, incubándose a 37°C con agitación durante 6 a 8 horas hasta observar lisis celular. A este lisado se agregó 500 µl de cloroformo para completar la lisis y posteriormente se centrifuga durante 10 minutos a 10.000 rpm (rotor Sorvall SS-34) para eliminar restos celulares. El sobrenadante se almacenó a 4°C con unas gotas de cloroformo; este sobrenadante suele tener un alto título de fagos siendo conveniente guardar una alícuota como stock (Sambrook y col., 1989).

B.2.3. AISLAMIENTO DE ACIDOS NUCLEICOS.

B.2.3.1. Aislamiento de ADN genómico de parásitos.

Para la extracción de ADN genómico total de *T. cruzi* se siguió el procedimiento descrito por Coderre y col. (1983). Los parásitos se crecieron hasta la fase estacionaria, se centrifugaron y el precipitado de parásitos se lavó dos veces con solución salina de PBS. Las células se resuspendieron en tampón A (0,2 M Tris-HCl pH 8, 0,1 M EDTA) y se lisaron con 0,5% SDS y 100 µg/ml de proteinasa K incubándose 4 horas a 37°C o bien toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó una extracción con NaCl 0,1M y fenol-cloroformo/cloroformo isoamílico. El ADN contenido en la fase acuosa se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto lavándose con un volumen de etanol 70%. El precipitado se resuspendió en tampón TE y se trató con ARNasa (10 µg/ml) 1 hora a 37 °C (o a temperatura ambiente toda la noche). Finalmente, se realizó una nueva extracción fenólica y una nueva precipitación con etanol, resuspendiéndose en agua bidestilada estéril.

B.2.3.2. Aislamiento de ADN de fagos.

La extracción de ADN se realizó a partir de los lisados obtenidos en el procedimiento anteriormente descrito. Los 50 ml de lisado se incubaron durante una hora a 37°C con ADNasa (1µg/ml) y ARNasa (5µg/ml), se agregó entonces 3,5 g de NaCl 8 g de PEG 6000, agitándose durante una hora suavemente hasta la total disolución. Se dejó precipitar toda la noche a 4°C. La mezcla se centrifugó 30 min. a 3000 rpm (rotor SS-34), se dejó secar el pellet y se resuspendió en 1 ml de SM. Los fagos se lisaron entonces ajustándose la solución a 10 mM de EDTA pH8, 0.2% SDS y 100 µg/ml de proteinasa K e incubándose 1 hora a 37°C. A continuación se realizó una extracción con fenol-cloroformo/cloroformo y se precipitó con 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5,2 y 2,5 vols. de etanol. Finalmente, el precipitado se lavó con etanol 70% y se resuspendió en agua bidestilada estéril (Sambrook y col., 1989).

B.2.3.3. Aislamiento de ADN plasmídico.

B.2.3.3.1. Miniprep alcalina.

Cultivos en fase estacionaria se resuspendieron en tampón glucosa y se lisan con una solución 0.2 N NaOH, 1% SDS. La solución se neutraliza con acetato sódico 3 M pH 5,2 y se centrifuga 10 min. a 14.000 rpm. El sobrenadante se precipita con 0,1

volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5,2 y 2 volúmenes de etanol absoluto, lavándose posteriormente con etanol 70%, resuspendiéndose en agua o tampón TE.

B.2.3.3.2. Wizard miniprep (Promega).

El procedimiento consiste también en una lisis alcalina que es precipitada con una solución de acetato de potasio. Una vez centrifugado, el sobrenadante es retenido en una resina, lavado y eluido con agua destilada. Se siguió el protocolo recomendado por la casa comercial.

B.2.3.3.3. Wizard maxiprep (Promega).

El procedimiento es semejante a la miniprep sólo que se parte de 500 ml de cultivo bacteriano. También en este caso se siguió el protocolo de la casa comercial.

B.2.3.4. Aislamiento de ARN total.

Se siguió el procedimiento descrito por Chomczynski y col. (1987) con algunas modificaciones. El ARN se extrajo a partir de cultivos en fase logarítmica que fueron centrifugados durante 15 min. a 3.000 rpm (rotor SS-34), en el caso de las formas tripomastigotas se mantuvieron previamente en hielo y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 15 min.

Los parásitos se resuspendieron en una solución desnaturizante de tiocianato de guanidina 4 M, citrato de Na 25 mM pH 7,5, mercaptoetanol 0,1 M y lauril sarcosina 0,5%. Posteriormente se agregó 0,1 vols de acetato sódico 2 M pH 4 y se realizó una extracción fenólica con 1 vol de fenol saturado en agua tratada con DEPC y 0,2 vols de cloroformo incubándose durante 15 min. en hielo. El sobrenadante se precipitó con un volumen de isopropanol durante 30 min. a -20°C y se resuspendió en 1,2 ml de solución desnaturizante precipitándose por segunda vez con un volumen de isopropanol. El ARN precipitado se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en agua bidestilada tratada con DEPC en un baño a 65°C.

Debido a que el ARN se degrada fácilmente es conveniente que todas las soluciones sean tratadas previamente con DEPC y se trabaje a 4°C o en hielo.

B.2.3.5. Purificación de ARN poliadenilado.

La fracción poliadenilada del ARN se obtuvo mediante cromatografía en columnas de oligo(dT)-celulosa (Aviv y Leder, 1972). Como columnas se utilizaron jeringas de 2 ml lavadas previamente con 10 ml de NaOH 5 N y agua tratada con DEPC. Se agregó a la columna 0,2 g de oligo(dT)-celulosa (Boehringer Mannheim) hidratada en 1 ml de NaOH 0,1 N. La columna se equilibró en tampón de carga (LiCl 0,5 M, Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, SDS 0,1%) hasta que el pH de salida fuera cercano a 7,5. El ARN total se incubó 10 min. a 70°C y se le agregó LiCl a una concentración final de 0,5 M, pasándose posteriormente varias veces por la columna. La columna se lavó con tampón de lavado (LiCl 0,15 M, Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, SDS 0,1%) y finalmente se eluyó el RNA con una solución de EDTA 2 mM pH 8, 0,1% SDS. Ambas fracciones se precipitaron con 0,1 vol de acetato sódico 3 M pH 5,2 y 2,5 vol de etanol absoluto, resuspendiéndose en agua tratada con DEPC a 65°C.

B.2.3.6. Cuantificación de ácidos nucleicos.

Tanto la concentración del ADN como del ARN puede medirse espectrofotométricamente 260 nm.

Para el ADN una unidad de densidad óptica a 260 nm (DO_{260}) corresponde a 50 $\mu\text{g/ml}$. Para el ARN una unidad de DO_{260} corresponde a 40 $\mu\text{g/ml}$. Se considera que para una preparación buena de ácidos nucleicos el cociente 260/280 debe ser superior a 1,8 (Sambrook y col., 1989).

B.2.4. TRATAMIENTO ENZIMÁTICO DE ACIDOS NUCLEICOS.

B.2.4.1. Digestión del ADN con enzimas de restricción.

Las digestiones con endonucleasas de restricción se hicieron siguiendo las instrucciones de las casas comerciales proveedoras. Se realizaron en un volumen final de 30 μl con 1-10 unidades de enzima por microgramo de ADN e incubándose dos horas a la temperatura recomendada.

B.2.4.2. Reacción de ligamiento.

Las reacciones de ligamiento de fragmentos de ADN se realizaron con la enzima T4 DNA ligasa (1U/ μg de ADN), procedente del bacteriófago T4. Esta enzima cataliza la

formación de enlaces fosfodiéster entre los extremos 5' y 3' del ADN, pudiendo unir tanto extremos cohesivos como romos. El volumen final fue de 20 μ l en el tampón suministrado por la casa comercial, utilizando relaciones molares inserto:vector de 5:1. De forma general, la reacción se realizó durante 16 horas a 16°C, aunque en otros casos se realizó la incubación a 25°C durante 4 horas.

B.2.4.3. Tratamiento con fosfatasa alcalina.

Esta enzima hidroliza el grupo fosfato del extremo 5' del ADN. La ligasa necesita de este grupo fosfato para la reacción de ligamiento por lo que el tratamiento de los vectores de clonado con esta enzima disminuye la posibilidad de religamiento de los vectores. La reacción se realizó agregando 1 unidad de enzima a las digestiones con endonucleasas e incubando 30 min a 37°C. Es importante finalizada la reacción inactivar o extraer la enzima para evitar interferencias con la reacción de ligamiento.

B.2.4.4. Marcado radiactivo del ADN.

Se utilizó el procedimiento de "Random Primed" (Feinberg, 1983) para marcar sondas de ADN con ($\alpha^{32}\text{P}$)dCTP (Amersham Corp). Esta técnica se basa en la utilización de una mezcla de hexanucleótidos que actúan como cebadores para la síntesis de ADN por la enzima Klenow.

Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20 μ l con una concentración de ADN de 20 a 50 ng, 50 μ Ci de ($\alpha^{32}\text{P}$)dCTP y 2U de polimerasa Klenow, siguiendo el protocolo de la casa comercial (Boehringer Mannheim). Las sondas marcadas se purificaron mediante cromatografía en columnas de 1 ml de Sephadex G-50 (Pharmacia). El ADN marcado fue resuspendido en un volumen final de 100 μ l y se empleó 1 μ l para medir el número de cuentas por minuto (cpm) en un contador de centelleo.

B.2.4.5. Reacción de la transcriptasa inversa.

La retrotranscriptasa es una ADN polimerasa de origen viral que utiliza como molde una hebra de ARN y por lo tanto se aplica para sintetizar ADN complementario a partir de ARN. En nuestro caso usamos 17U de la AMV retrotranscriptasa ("Avian Myeloblastosis Virus") en una reacción conteniendo 1 μ g de ARN poliA⁺, 100 pmol de cebador antisentido una mezcla de deoxinucleótidos (400 μ M de cada uno), incubándose durante una hora a 42°C. Se realizó una desnaturalización alcalina del ARN que se

encontrara formando híbridos con el ADN sintetizado y finalmente la reacción se precipitó con 0,1 vol de acetato sódico 3 M pH 6,75 y dos volúmenes de etanol.

B.2.4.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite amplificar por una polimerasa termoestable, en este caso la Taq polimerasa de *Thermus aquaticus*, un determinado ADN molde a través de repetidos ciclos de desnaturalización térmica, apareamiento de oligonucleótidos y síntesis de ADN. Estos ciclos dan lugar a una amplificación exponencial de la molécula de ADN (Arnheim y Ehrlich, 1992).

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µl conteniendo una mezcla de 25 pmol de cada cebador, 0,1 vol. de tampón de PCR (Boheringer Mannheim), 400 µM de cada deoxinucleótido, 10-100 ng de ADN molde y 1 a 5 U de Taq polimerasa. Las condiciones del PCR y el número de ciclos de amplificación se ajustaron para cada experimento.

B.2.4.7. Secuenciación del ADN.

La secuenciación de ADN se realizó por el método de terminación de cadena por dideoxinucleótidos descrito por Sanger y col. (1977). El método se basa en la parada de la síntesis de ADN por una polimerasa mediante la incorporación de un dideoxinucleótido, que frena la elongación de la cadena a partir de un cebador, por no tener un extremo 3'-OH al cual añadir el siguiente nucleótido trifosfato.

La secuenciación se realizó con un secuenciador automático 373 Automated DNA (Applied Biosystems) utilizando el *kit* AmpliTaqDyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing (Perkin Elmer) y utilizando una optimización llevada a cabo en nuestro Instituto (Lario y col., 1977). Los cebadores utilizados fueron los universales T3, T7 y SP6, así como oligonucleótidos sintéticos específicos.

B.2.5. ELECTROFORESIS Y TRANSFERENCIA DE ACIDOS NUCLEICOS.

B.2.5.1. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

Mediante esta técnica los fragmentos de ADN pueden ser separados según su tamaño y posteriormente ser transferidos a filtros o bien purificados a partir del gel. Se utilizaron geles de agarosa de porcentaje entre 0,8 y 1,5%, según los tamaños a separar,

preparados en tampón TAE y realizándose la separación a 5 voltios/cm. Las muestras se cargaron en los geles con tampón de carga 1x concentración final.

El ADN se visualizó tiñiendo los geles con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio (BET) y observándolos bajo luz ultravioleta.

B.2.5.2. Electroforesis en campo pulsado.

Esta técnica permite la separación de los cromosomas del parásito en un gel de agarosa mediante la aplicación de campos eléctricos de dirección variable. Una de las variantes utilizadas es la denominada "Clamped Homogeneous Electric Field (CHEF) electrophoresis" (Chu y col., 1986), donde se emplea un circuito con los electrodos distribuidos hexagonalmente que producen patrones rectos de bandas, con lo que se facilita la hibridación y análisis densitométrico.

La preparación de los bloques de agarosa se realizó siguiendo el método de Garvey y col. (1986). Cada bloque debe contener aproximadamente 8×10^7 células (24 µg de ADN). Para su obtención se partió de un cultivo en fase exponencial de crecimiento, los parásitos se centrifugaron a 2000xg a 4°C durante 15 min, y se lavaron 3 veces con PBS. A continuación los parásitos se resuspendieron en 0,3 ml de PBS y se mezclaron con igual volumen de agarosa de bajo punto de fusión (Preparative Grade, BIORAD) al 1,2% en PBS. La mezcla se depositó en moldes y se dejó solidificar a 4°C. Los bloques ya solidificados se depositaron en el tampón de digestión (EDTA 0,5 M pH 9, N-lauril sarcosina sódica 1% y 1% de proteinasa K) y se incubaron durante 48 horas a 50°C. Finalmente, se lavaron 3 veces con EDTA 0,2 M pH 8 (cada lavado de 2 a 3 horas) y se almacenaron en esta solución a 4°C hasta su utilización.

Como marcadores de tamaño se emplearon los cromosomas de *Saccharomyces cerevisiae* cepa S-13 cedida por el Dr. L. M. Ruiz Pérez. Para su preparación se siguió el método descrito por Carle y col. (1985). Las células se crecieron a 28°C en 10 ml de medio YPD hasta alcanzar la fase estacionaria. Un volumen conteniendo 4×10^{10} células se lavó dos veces con EDTA 0,05 M pH 7,5 resuspendiéndose en 1 ml de esta solución. Las células se trataron con la enzima zymolasa durante 20 min. a 37°C y se agregó un volumen igual de agarosa de bajo punto de fusión para preparar los bloques. Los bloques se incubaron en tampón LET (EDTA 0,5 M Tris 0,01 M pH 7,5 y 2-mercaptoetanol 7,5%) a 37°C toda la noche. Finalmente, los bloques se incubaron toda la noche a 50°C en tampón NDS (Tris 0,01 M pH 7,5, EDTA 0,5 M y lauril sarcosina 1%), almacenándose a 4°C en este tampón.

Las muestras de ADN cromosómico se separaron en geles de agarosa al 1% en tampón TBE 0,5x, mantenido a 12°C. Los bloques de agarosa con las muestras se colocaron en los pocillos del gel y se sellaron con agarosa al 1%. La separación cromosómica se realizó a 90 voltios con pulsos de 250, 500, 750 y 1000 segundos durante 24 horas cada uno. Se utilizó un aparato Pulsaphor Plus System (Pharmacia, LKB, modelo 2015). Los geles se tiñieron con una solución de BET 0,5 µg/ml para su visualización.

Finalmente, los geles se transfirieron a membranas de nylon Hybond-N para su posterior hibridación con las sondas radioactivas.

B.2.5.3. Electroforesis de ARN en geles desnaturizantes.

La separación por tamaños del ARN se realizó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa en condiciones desnaturizantes. Las muestras se prepararon en una solución 2 M de formaldehído, 50% formamida y MNE 1x calentándose 15 min. a 65°C (para desnaturizarlos y evitar la formación de estructuras secundarias), para cargarlos en el gel se añadió tampón de carga y 1 µl de BET. Los geles fueron de agarosa al 1%, 2,2 M formaldehído (agente desnaturizante) y MNE 1x, desarrollándose la electroforesis en tampón MNE 1x, a un voltaje entre 50 y 100 voltios. El marcador de tamaño fue el RNA ladder de Promega.

B.2.5.4. Aislamiento del ADN de geles de agarosa: "GENE CLEAN®"

Los fragmentos de ADN se aislaron utilizando el kit comercial "Gene Clean®" (BIO 101 Inc) siguiendo el protocolo de la casa comercial. En este procedimiento, el gel se disuelve en una solución de NaI a 45-55°C y el ADN se retiene en una resina de sílice ("Glass Milk®"). La resina que contiene el ADN se lava con una solución de etanol para eliminar impurezas y se eluye el ADN con agua incubando a 45-55°C durante dos minutos.

B.2.5.5. Transferencia de ADN a membranas de nylon: "Southern blot".

La transferencia de ADN separado mediante electroforesis en geles de agarosa a membranas de nylon Hybond-N® (Amersham) se realizó según la técnica descrita por Southern (1975). Los geles a transferir son tratados 10 min con HCl 0,25 M a fin de depurinizar el ADN y facilitar su hidrólisis, posteriormente son tratados con solución desnaturizante durante 30 min, y con solución neutralizante durante el mismo tiempo. La transferencia se realizó durante toda la noche por capilaridad en tampón SSC 20x.

Finalizada la transferencia, se lavaron los filtros en 2x SSC y una vez secos se fijaron con luz ultravioleta (360 nm) durante 5 min.

B.2.5.6. Transferencia de ARN a membranas de nylon: "Northern blot".

En el caso de la transferencia de ARN, los geles de agarosa-formaldehído se desnaturalizaron durante 15 min en NaOH 50 mM y se renaturalizaron durante 30 min. en Tris-HCl 0,1 M pH 7,5. La transferencia por capilaridad a las membranas y el fijado del ARN a las mismas se realizó igual que en la técnica de Southern blot.

B.2.5.7. Hibridación de ácidos nucleicos con sondas radiactivas.

Las membranas de nylon y los filtros de nitrocelulosa se prehibridaron durante 1 hora a 65°C con un volumen de solución de hibridación (Materiales) de 0,2 ml por cm² de membrana. Posteriormente, se hibridaron toda la noche en un volumen de solución de hibridación de 0,05 ml por cm² en presencia de la sonda marcada radiactivamente, previamente desnaturalizada. La cantidad de sonda empleada fue de 10⁶ cpm por cada ml de solución de hibridación. Los lavados, cada uno de 15 min, se realizaron a 68°C en las siguientes condiciones: 2 lavados con 2xSSC/0,1% SDS; 2 lavados con 1xSSC/0,1% SDS; 2 lavados con 0,1xSSC/0,1% SDS. Finalizado el proceso, se expusieron a una película autorradiográfica (Agfa Curix) a -80°C utilizando pantallas amplificadoras. Los filtros se deshibridaron siguiendo los protocolos recomendados por la casa comercial.

B.2.6. TRANSFECCION DE PARASITOS Y ENSAYOS CON FARMACOS.

B.2.6.1. Transfección de *T. cruzi*.

La transfección de formas epimastigotas de *T. cruzi* con el vector pTEX (Kelly, 1992) se realizó lavando 4 veces los parásitos con HBS estéril y resuspendiéndolos en HBS a 5x10⁷ parásitos/ml. 400 µl de esta suspensión se mezclaron con 50 µl de ADN plasmídico a 2 µg/ml. La transfección se hizo en el sistema ECM 600[®] de BTX utilizando como condiciones 450 voltios, 1300 µF y 13 ohms. Tras la electroporación, los parásitos se incubaron durante 10 min en hielo y se transfirieron a 10 ml de medio LIT, incubándose 24 horas a 28°C tras lo cual se agregó G418 a una concentración de 150 µg/ml. A los tres días se realizó una dilución 1:3 del cultivo, adicionándose nueva G418 a la misma concentración. En esta dilución, los parásitos se mantuvieron durante 3 días tras lo cual se realizó una nueva dilución 1:10, adicionándose G418 a una

concentración de 500 µg/ml. Los parásitos resistentes se observaron a los 15-20 días de la última dilución.

B.2.6.2. Determinación de la dosis inhibitoria 50 (DI₅₀).

La dosis inhibitoria 50 se define como la concentración de fármaco que inhibe en un 50% el crecimiento del parásito. El porcentaje de inhibición del crecimiento (%I) se calculó según la fórmula $\%I = 100 \times (N_c - N_p) / N_c$. Siendo N_c , el número de parásitos/ml en el cultivo control y N_p el número de parásitos/ml en presencia del fármaco.

Para determinar la DI₅₀ se partió de cultivos de parásitos en fase logarítmica. Un preinóculo de 10^6 cels/ml se cultivó en tubos estériles con 2 ml de medio de cultivo en presencia de diferentes concentraciones del fármaco. Los cultivos se hicieron por duplicado para cada concentración utilizada. Los parásitos se incubaron durante 96 horas a 28°C y se contaron en un Coulter Counter.

B.2.7. TÉCNICAS DE ANALISIS PROTEICO Y ENZIMATICO.

B.2.7.1. Electroforesis de proteínas: SDS-PAGE.

La separación de proteínas de acuerdo a su tamaño se realizó mediante la técnica de electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida y SDS según el método de Laemmli (1970). El método se basa en la carga negativa que adquieren las proteínas al unirse al detergente SDS, la unión al SDS está en relación directa al peso molecular de las proteínas. La separación electroforética se realizó en geles discontinuos compuestos por un gel superior de composición constante y un gel inferior con un porcentaje de acrilamida/bis-acrilamida dependiente del tamaño de las proteínas a separar.

La composición del gel superior ("stacking") fue de Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS 0,1%, persulfato amónico 0,04%, TEMED 0,1% acrilamida 4,5% y bisacrilamida 0,1%. La composición del gel inferior o separador fue de Tris-HCl 375 mM pH 8,8, SDS 0,1%, persulfato de amonio 0,04% y TEMED 0,05%, los porcentajes de acrilamida-bisacrilamida utilizados fueron 10% y 14%.

Las muestras de proteínas se prepararon con un volumen de tampón de muestra 2x (Tris-HCl 0,135 M pH 6,8, SDS 6%, glicerol 20% y 2-mercaptoetanol 10%) y se incubaron a 100°C por 5 min antes de cargarlas en el gel. La electroforesis se realizó en tampón de electroforesis (Tris 0,025 M, glicina 0,192 M, SDS 0,1%). Se utilizó una

cubeta Mighty Small SE250 (Hofer Sci. Inst.), realizándose la electroforesis a un amperaje de entre 20-25 mA.

Como marcadores de peso molecular se utilizaron los marcadores de bajo peso molecular de Bio Rad. Una vez finalizada la electroforesis, los geles se tiñieron con una solución de Azul Coomassie (Azul Coomassie 0,2%, Metanol 40% y Acido acético 10%) durante al menos 30 min. Posteriormente se destiñieron en una solución de Acido acético 10% y Metanol 25% hasta visualizar las proteínas teñidas por el colorante.

B.2.7.2. Cuantificación de proteínas.

La concentración de proteínas se determinó utilizando el método colorimétrico de Bradford (1976). Este método consiste en la cuantificación de la unión del colorante Coomassie brilliant blue a las proteínas de la muestra. Esta unión del colorante puede medirse a una longitud de onda de 590 nm. Para obtener los valores se realizó previamente una curva patrón con los valores de DO_{590} obtenidos a partir de concentraciones crecientes de albúmina de suero bovino.

B.2.7.3. Obtención de proteínas totales de parásitos.

La preparación de proteínas se realizó a partir de cultivos en fase exponencial de *T. cruzi*. Los parásitos se centrifugaron 15 min a 1500g. El precipitado se lavó tres veces con PBS frío estéril y se resuspendieron a una concentración de 5×10^8 parásitos/ml en tampón de lisis (10 mM fosfato de sodio, pH 7, 1% SDS, 1% β -mercaptoetanol, 6M urea). La muestra se alicuotó y almacenó a -80°C hasta su utilización.

B.2.7.4. Obtención de proteínas recombinantes de bacterias transformadas.

Se partió de una colonia aislada de bacterias, esta se incubó en 20 ml de LB ampicilina incubada toda la noche a 37°C con agitación. Este cultivo se transfirió a un litro de LB sin ampicilina incubándose a 37°C con agitación hasta una $D.O_{600}$ de 0,6, momento en que se indujo la expresión de la proteína de fusión añadiendo al cultivo IPTG a una concentración final de 500 μM incubándose durante 3 horas a 37°C . El cultivo se centrifugó durante 10 min. a 3000xg resuspendiéndose en 50 ml de PBS, y se le agregó lisozima a una concentración final de 0,5 mg/ml. Las células se incubaron 10 min a temperatura ambiente y se lisaron con 5 pulsos de sonicación de 30 s cada uno, alternados con 30 s de incubación en hielo. El material insoluble y las células intactas se

eliminaron centrifugando las muestras 10 min. a 10000xg. Los sobrenadantes se filtraron a través de filtros de 0,2 μm para eliminar posibles restos de material insoluble y se procedió a la purificación por afinidad.

B.2.7.5. Purificación de proteínas recombinantes en soportes de Ni-NTA agarosa.

Las proteínas recombinantes con su extremo de 6 histidinas se purificaron por cromatografía de afinidad utilizando como soporte sólido Ni^{2+} - ácido nitrilotetra-acético (Ni-NTA) de QIAGEN. La resina equilibrada con tampón de unión (fosfato de sodio 50 mM, NaCl 100mM) a pH 8 se incubó con el sobrenadante filtrado en tubo de polipropileno de 15 ml durante 1 hora a 4°C con agitación suave. Posteriormente se sometió la resina a lavados sucesivos de 15 minutos con tampón de unión a pH 8, 6 y 5. La elución se realizó con imidazol 0,3 M o tampón de unión pH 4 según los casos (ver resultados).

B.2.7.6. Ensayos de actividad enzimática.

Los ensayos de actividad enzimática se realizaron a 30°C midiendo espectrofotométricamente la disminución de absorbancia a 340 nm debida a la oxidación del NADPH. El NADPH tiene un máximo de absorbancia a 340 nm solamente en su forma reducida, con un coeficiente de extinción molar de 6,22 M^{-1} . Para los estudios de actividad específica la reacción se realizó 0,1 mM de coenzima y 0,1 mM de sustrato. Los sustratos utilizados fueron L-biopterina, ácido fólico, ácido dihidrofólico, 7,8-dihidro-L-biopterina, L-sepiapterin y D-neopterina. Las coenzimas estudiadas fueron NADPH, NADH y NADP^+ . Una unidad de actividad enzimática (U) es la cantidad de enzima requerida para producir 1 μmol de producto en 1 min a 30°C.

B.2.8. TECNICAS INMUNOLOGICAS.

B.2.8.1. Obtención de anticuerpos de conejo.

Para la obtención de anticuerpos contra las proteínas recombinantes se utilizaron conejos de la cepa New Zealand White. Previamente a su inmunización, se tomó una muestra de suero preimmune para su utilización como control en los ensayos posteriores. Se realizaron tres inmunizaciones por vía subcutánea con 150 μg de proteína, de acuerdo al siguiente protocolo. La primera inmunización se realizó con 150 μg de proteína en 500 μl de PBS con un volumen igual de Adyuvante Completo de Freund (Sigma),

mezclándose hasta lograr una emulsión homogénea. La emulsión se inyectó por vía subcutánea en tres sitios diferentes. Dos semanas después se realizó la segunda inmunización con igual cantidad de proteína pero esta vez con un volumen de Adyuvante Incompleto de Freund (Sigma), siguiéndose el mismo procedimiento que en la primera. Transcurridas otras dos semanas se realizó la tercera inmunización de igual manera que la segunda.

Finalmente, a los 10 días de la última inoculación se extrajo 1 ml de sangre del conejo midiéndose los títulos de anticuerpo mediante la técnica de ELISA. Posteriormente, se realizó la sangría final mediante la extracción, durante tres días seguidos, de 50 ml/día de sangre de la vena marginal de la oreja.

Los sueros se prepararon incubando las muestras de sangre durante cuatro horas a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron 1 hora en hielo para permitir la contracción del coágulo y se centrifugaron durante 15 min a 2500g. El sobrenadante alicuotado se almacenó la mitad a 4°C con 0,02% de azida de sodio y la otra mitad a -80°C.

B.2.8.2. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).*

Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos de fondo plano (Nunc). Cada pocillo se tapizó con 1 µg de proteína en un volumen de 200 µl de NaHCO₃ 100 mM pH 9,5 incubándose 5 horas a 37°C. Posteriormente, las placas se lavaron tres veces con PBS/1% Tween20 (PBS-T) y se bloquearon con 200 µl por pocillo de una solución de PBS-T más 5 µg/ml de BSA, incubándose durante toda la noche a 4°C. Finalmente, las placas se secaron guardándose a -20°C hasta su utilización.

Previo al ensayo, las placas se lavaron tres veces con 200 µl PBS-T y posteriormente se agregaron 200 µl de las diferentes diluciones del suero en PBS-T incubándose una hora a 37°C. Los pocillos se lavaron nuevamente con PBS-T y se agregaron 100 µl del anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina (Sigma) en una dilución 1: 5.000 incubándose una hora a 37°C. Las placas se lavaron nuevamente y se revelaron con 200 µl de para-nitrofenil fosfato (1 mg/ml) en una solución de dietanolamina 20 mM pH 9,5 y MgCl₂ 10 mM. La reacción se detuvo añadiendo 50 µl por pocillo de EDTA 0,5 M pH 8, midiéndose la D.O₄₀₅ en un lector de placas *Titertek*. Todas las medidas se realizaron por duplicado.

B.2.8.3. Transferencia de proteínas a membranas de PVDF y Western blot.

Las proteínas separadas por electroforesis en geles de acrilamida se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF). Una vez finalizada la electroforesis, los geles se lavaron en H₂O bidestilada y se sumergieron en el tampón de transferencia (Tris-Cl 25 mM, glicina 0,15 M, metanol 20%, pH 8,1-8,4) durante 30 min. Las membranas de PVDF del tamaño del gel se prepararon humedeciéndolas en metanol absoluto durante 30 seg.; posteriormente se lavaron en H₂O bidestilada y finalmente se sumergieron en tampón de transferencia 5 min. El "sandwich" de transferencia se montó con el gel, la membrana y el papel Whatman humedecidos en tampón de transferencia. La transferencia se realizó en un aparato Semi-Phor TE70 (Hoefer Sci. Inst.) durante 1 hora a un voltaje máximo de 25 V y un amperaje máximo de 100 mA. Finalizada la transferencia, las membranas se tiñieron con 0,5% Rojo Ponceau/1% ácido acético para visualizar las proteínas y determinar la eficiencia de la transferencia, destiñiéndose con H₂O bidestilada.

Las membranas de PVDF se bloquearon incubándolas toda la noche a T.a. con una solución de leche desnatada al 5% y 0,02% azida de sodio. Una vez bloqueadas se lavaron tres veces con PBS-0,1% Tween20 (PBS-0,1T) con agitación. A continuación se incubaron durante dos horas a T.a. con la dilución elegida del anticuerpo en PBS-0,1T con agitación suave. La membrana se lavó nuevamente tres veces con PBS-0,1T tras lo cual se incubó durante una hora a T.a. con el anticuerpo anticonejo conjugado a fosfatasa alcalina a una dilución 1: 5.000 en PBS-0,1T. Finalmente, tras un nuevo ciclo de lavados las membranas se revelaron con 5 ml de una solución de NBT-BCIP (Boehringer Mannheim) en tampón fosfatasa (Tris-HCl 0,1 M pH 9,5, NaCl 0,1 M, MgCl₂ 5 mM). La reacción de revelado se detuvo con tampón de parada (Tris-HCl 2 M pH 7,5, NaCl 4 M, EDTA 20 mM).

B.2.8.4. Inmunofluorescencia indirecta.

Los epimastigotes en fase exponencial fueron lavados 4 veces con PBS a 4°C y resuspendidos en PBS a una concentración de 2x10⁶ parásitos/ml. Se utilizaron portaobjetos con 10 círculos de 6 mm de diámetro (bioMerieux) y se depositaron 20 µl de la suspensión de parásitos por círculo, dejándose secar completamente a T.a. y almacenándose a -20° hasta su utilización. Para su fijación, los portaobjetos con parásitos fueron incubados 5 min con etanol absoluto a -20°C y 8 min con acetona a -

20°C. Cuando se quiso impermeabilizar la membrana plasmática los portaobjetos se incubaron con 2,5% formaldehído.

Para la inmunofluorescencia los sueros preinmune e inmune fueron diluidos en tampón IFI (PBS/0,1% albúmina sérica bovina) e incubados 1 h a 37°C en cámara húmeda. Se lavaron los portaobjetos 3 veces en tampón IFI y se incubaron con un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a fluoresceína de SIGMA, diluido 1/200 en tampón IFI/0.01% azul de Evans 1 h a 37°C en cámara húmeda. Los portaobjetos se lavaron 3 veces en tampón IFI y se observaron las muestras en microscopio de fluorescencia.

B.2.8.5. Inmunomicroscopía electrónica.

Los estudios de inmunolocalización por microscopía electrónica fueron realizados por el Dr. J.C.Engel en el Depto. de Patología de la Universidad de California (San Francisco, USA), utilizando los anticuerpos generados en el apartado B.2.8.1. Los epimastigotes se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron con 2% paraformaldehído/0,05% glutaraldehído en tampón fosfato 0,1 M pH 7,4 por 4 horas. Los epimastigotes fueron entonces crioprottegidos, congelados y seccionados, incubándose posteriormente con el anticuerpo específico. El segundo anticuerpo antiIgG de conejo conjugado a oro coloidal se usó para la inmunodetección, y el suero preinmune de conejo fue usado como control.

B.2.9. ANÁLISIS INFORMÁTICO.

Para los análisis de similitud de secuencia en los bancos GenBank y EMBL se utilizó el programa BLAST (Altschul y col., 1990). Para los alineamientos de secuencias se utilizaron los programas desarrollados por la Universidad de Wisconsin GCG (Devereux y col., 1984).

La construcción de los árboles filogenéticos fueron realizadas por el Dr. F. Alvarez de la Universidad de la República (Montevideo, Uruguay). En primer lugar se alinearon las secuencias con el programa CLUSTAL (Higgins y Sharp, 1989), y los árboles se construyeron utilizando los programas MEGA (Kumar y col., 1993) y PAUP 3.0 (Swofford, 1990).

Los análisis de familias y motivos proteínas se realizaron con el programa Expassy Scan Prosite (Appel y col., 1994).

C. RESULTADOS.

Con el objetivo de investigar la presencia de otros genes en el *locus* de *tcpgp2* se secuenciaron las regiones 5' y 3' flanqueantes de dicho gen. La secuenciación se realizó mediante el subclonado de fragmentos de restricción obtenidos a partir del clon genómico aislado por Dallagiovanna (1996) denominado clon 1A (Dallagiovanna, 1997).

C.1. ESTUDIO DE LA PTERIDIN-REDUCTASA DE TRYPANOSOMA CRUZI.

C.1.1. Secuenciación del gen de la pteridin-reductasa (*ptr 1*).

La secuenciación de la región 3' de *tcpgp2* mostró la presencia de un marco abierto de lectura ubicado a 1141 nucleótidos del codón de terminación de *tcpgp2*, de 828 nucleótidos y que codifica para un polipéptido de 276 aminoácidos (figura 1) con un peso molecular deducido de 30 kDa. El estudio de homologías de secuencias con este gen se realizó por búsqueda en los bancos de datos GenBank y SwissProt, utilizando los programas BLAST-P y BLAST-X (Altschul, 1990). Este análisis demostró que la secuencia polipeptídica deducida, a la que denominamos PTR1, presenta una alta homología con la enzima pteridín reductasa de *Leishmania*. Esta enzima ha sido descrita en *L. major* y *L. tarentolae* en relación con la resistencia a antifolatos, y pertenece a la familia de las deshidrogenasas de cadena corta/aldocetoreductasas. El alineamiento de la PTR1 de *T. cruzi* con las de *Leishmania* muestra que las mayores diferencias de homología están en las zonas no conservadas de esta familia. También se pudieron identificar dos dominios proteicos que exhiben un alto grado de conservación (Persson, 1991): uno a nivel del extremo amino terminal que está centrado alrededor de dos residuos de glicina en las posiciones 18 y 24 (marcados con asterisco en fig.3), y sus aminoácidos flanqueantes, que ha sido propuesto que representan parte del sitio de unión al NAD de muchas deshidrogenasas (Persson, 1991), y un segundo sitio a nivel del extremo carboxilo terminal centrado en los residuos tirosina y lisina de las posiciones 182 y 186 respectivamente (marcados con asterisco en fig.3) que se encuentran universalmente conservados y se ha sugerido que forman parte del sitio activo (Persson, 1991). La mutagénesis de esta Tyr en la 15-hidroxi prostaglandina deshidrogenasa humana ha mostrado su esencialidad para la actividad catalítica (Ensor, 1991).

TGATGACTGGCT

GTTTTGGGTGGGCATCCAGCT**TG**AAAAAGTCGAAATCAGATTTTTCATTTTGATTTGTTTTT
TTTGTTTTGCACCATGTGGCGTGTNTCTTTTCTGGGAATATCTCTGGCGTGTGTGCATGTA
TGTAGGGTGTGATGGGTTTGTGTATGTAACATGTATGAAATGTGCCTGTGAAGAGAATG
TGTGGTAAATGGTCAATTGTGTGCCTTGCATCCGCCTTTTTTTCTTTTTTTGCGGCCAG
GGCACAACATGGAGCTTGCCCGTTGTTTATGGGTGAGTTATTGTCTTTAGATCGTCTCGTGA
GCGCGTGGTTTTTTTTTTTCTTTTTTGTGTGTGGTGGGTTTCATCAGTAGGATTTGTGTG
GTGGATCGAGCCCTTGTTTGTTACTGAGTGCTGTGTGTAATGAGCGCCGCGCTGCGCTCAGA
CACCATCTGTTTGTGTTGCCGATCAGTCTGTTTCAACTGTGTGTGTATGTCTTCGTCTATGTG
TGTGTGTCTGCGTTTTCTTCTTCTTGCTAGGCGGGTAGGCTGCAATGCGGCGACTGTGTGC
ATCCGCACAGGGACGCCGACAGTGCCGCATCGACGCTTTGGCAACGCACCGAGCCGTGTGC
GCCCCGTGGAGACGCCAGGCATGCAAGCTTGGCATGCGCATGCACGCATGGCGACAGACCGA
GCGTGAGGTGAGCGTCGCTGTGGCGCTTGCGGTGATGTTTGTAGTGCCCGTTTGGGTGTTC
TGCTCTCGGGCTTGCGGGAGGAGCAGAAGCGTGAGAGTGTGAGGCGGTGGGCCATGGAGCAG
AAGCGTGGCGGCGAGTGAGGCAGGCATCCACACCCACGGGGGAGGGAGAGACTGTGTGTGTG
TGTGTGTGTGTGTGTGAAGCAACGACAGGAATGAGAGAACGTTGTCTGTGACCACGTGTT
GGCGTATGTTGTCGCTGGCACAAGTGTGGAATGAGAGAACGTTGTTGTGACGACGTGTTGGC
GTATGTTGTCGCTGGCAGAAGTGTGTTTGTGTTGCCCTGCCGTGCGTGGTGTGCCCGAGTCC
ACTTCTCTGGCCGCCACAAAACCTGTTGCTCTTCCACCATGGACTTTTCTTGGGAAGCAA
GAGTGAGAAAACACAGGAGGGTGG

ATGAACGAAACGTCGCATGAAGCCTCGGAGTGCCCCGCTGCCATCATCACCGGAGGGGCG
M N E T S H E A S E C P A A I I T G G A

CGACGCATCGGTCACAGTATCGCTGTGCGTCTGCACCAGCAGGGATTTTCGAGTCGTCGTCG
R R I G H S I A V R L H Q Q G F R V V V

CACTACCGTCACTCCGAAGGGGCGGCGCAGCGGCTCGTTGCGGAGCTCAATGCTGCTCGC
H Y R H S E G A A Q R L V A E L N A A R

GCTGGATCCGCTGTGTTGTGCAAGGGGGACCTCAGTCTCGGCAGCTCTCTTCTCGATTGC
A G S A V L C K G D L S L G S S L L D C

TGCGAGGACATCATCGACTGCTCTTTTCGTGCCTTTGGTTCGGTTCGATGTGTTGGTGAAC
C E D I I D C S F R A F G R C D V L V N

AACGCCTCCGCGTATTACCCGACTCCGCTGCTGCCGGGAGATGACACGAACGGCGCCGCG
N A S A Y Y P T P L L P G D D T N G A A

GACGCGAAGCCGATTGATGCGCAGGTCGCCGAGTTATTTGGTTCAAACGTCGTTGCGCCG
D A K P I D A Q V A E L F G S N V V A P

CTTTTTTTGATCCGAGCGTTTGCCCGCAGGCAGGGCGAGGGGGATTTCGTGGAGGAGCCGC
L F L I R A F A R R Q G E G D S W R S R

AACCTGTCGGTGGTCAACCTTTGCGACGCCATGACTGATCTTCCGCTGCCGGGCTTTTGT
N L S V V N L C D A M T D L P L P G F C
GTCTACACGATGGCGAAACATGCGCTTGGCGGACTCACGAGGGCGGCTGCCTTGGAGTTG

V Y T M A K H A L G G L T R A A A L E L
 GCGCCGCGCCACATCCGCGTCAATGCGGTTGCGCCGGGGCTGAGTCTTTTCCCCCGCA
 A P R H I R V N A V A P G L S L F P P A
 ATGCCGCAGGAAACGCAGGAGGAGTATCGGCATAAAGTACCGCTCGGCCAAAGCGAGGCC
 M P Q E T Q E E Y R H K V P L G Q S E A
 TCTGCTGCTCAAATTGCGGATGCCATTGCATTTCTTGTGTCGAAGGACGCAGGTCACATC
 S A A Q I A D A I A F L V S K D A G H I
 ACCGGCATTACATTAAAGGTGGACGGTGGGCTGATTCTCGCCCGTGCCTgaGGCAAATGA
 T G I T L K V D G G L I L A R A

 TCATTTGTTTTTTTTTTTTGTGTGGTGGGTGGTAGTGCTTTTCCCGAGTGCTCTCGCTGTGTG
 TGGGAATTTGTGCTTTGCTGGCGGTGGTAAACATCTTTTTGCACCACGTGAACCCTCACGGT
 ATTGTTGGGCGGGTGAGGCCTGCTGGAAGCGGGACCCGTTGGTGTGAGGCGAAAGGAGGTG
 CACGGCGAGAGTGGGTGAAGGAGGGAAAACAGTTGTCATGACTCCGTTGCACTCAACGGCTG
 CCGGAAAAGAGCTTTTATTTGCCTAATTATTTGTTTAGTTTCTGCTGCCTGCCGCGAATGT
 TTGGGATGGCAGCTGGAGCACACGCATGCGGGTACCCATGCGGAGCGAGATGACACGTTTGC
 TTGGGCAGGCGCTGGTGTGCGTGGAGGAATAGGGAGATAGTGGGGTTGCCGAGGAAGGGTGA
 GAGTGAGAGCACAAGGCCAGCCTGTGTCACGCTCTCCCTTTCTTTTTTGCTGTTTTCACTTA
 TGCATGCATCCGTGTGCTTTTTGCCCCTTNTTTGCTGTTTTGCTGCTCATAGCGCTCAGTTT
 GCCCATATCGGCACACAATACGAATGCGCCACGGAGGGGACGCAAGGAGGACGCAGAGTCAC
 CCACTCGACAAGCGGAGACTCGATATGGCGGCTGCCAGCATGATGGAACGGTTCCCCATCGA
 CCACAAGACCACGCTGCCGATGCGCGTGGACGTGGAGCCCACAAGAAACCGCGCGAGGCGGC
 CACACGCAACGAACACGGGTAGGTTTTGTCTGGCGGACGCAGCAGCATGGCGTGGTACCACG
 CCAGAGAACTTTTTTTCAGGCAGCGGGAAAGGGGAGCCGCTGTTGGGACTCCCGCTTTGGTT
 TGGACCGATCTTGAGGAAAGAATTAAAACGGGGACTGTGCGTCGTGCGCGTCTTTTGATTGA
 GCAGCAGCTTCGCAGTCGCCGGGCTGAGGCCG

Figura 1. Análisis de secuencia del gen *ptr1*. +1 es el primer nucleótido del marco de lectura. Los nucleótidos de la región 5' no traducida se numeraron negativamente. Las secuencias en azul corresponden a los nucleótidos codificantes, y en rojo a la secuencia aminoacídica deducida de PTR1. El sitio AG de adición de miniexón se indica en negro, y se subrayan las secuencias ricas en pirimidinas que preceden a este sitio. En la región 3' no traducida se subraya el sitio de poliadenilación.

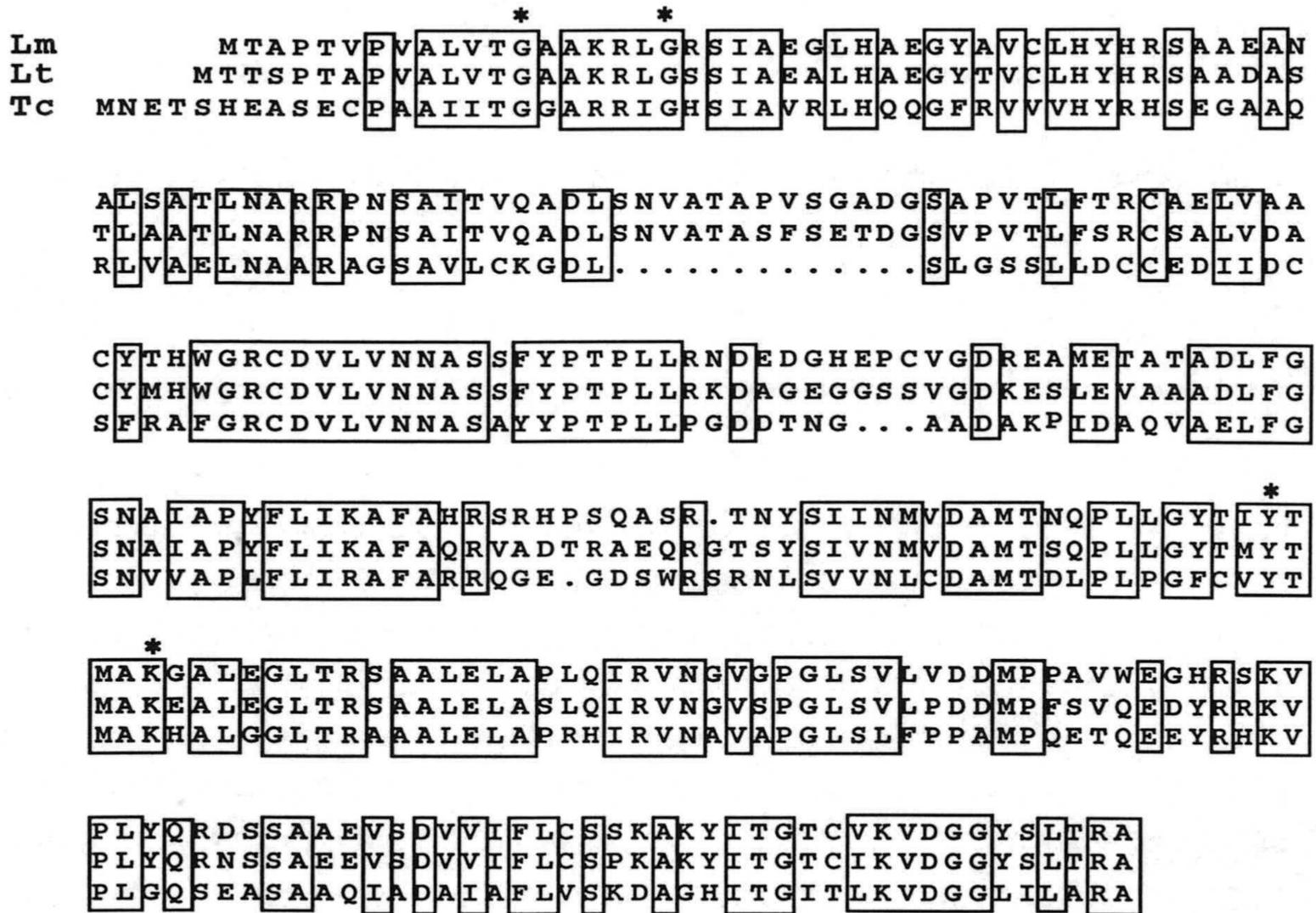


Figura 2. Alineamiento de las secuencias proteicas de *ptr1* de *Trypanosoma cruzi* (Tcptr1), *Leishmania major* (Lmptr1) y *Leishmania tarentolae* (Ltptr1). Las secuencias fueron alineadas para máxima identidad introduciendo gaps, con el programa UWGCG PILEUP. Los residuos idénticos o similares se indican en rojo. Los siguientes grupos constituyen residuos similares: (I,L,V,M), (D,E) y (K,R).

C.1.2. La organización genómica de *ptr1*.

C.1.2.1. Determinación del número de copias.

Para estudiar el número de copias de *ptr1* se digirió ADN total de *T. cruzi* con enzimas de restricción que tenían un sitio de corte dentro del gen (*Bam* HI y *Sac* I) o ningún sitio de corte (*Pst* I, *Sph* I y *Sal* I). Las digestiones se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 0,8% y se transfirieron a membranas de nylon. La hibridación se realizó utilizando como sonda el gen completo de *ptr1* y en condiciones de alta rigurosidad, realizándose los últimos lavados a 68°C en 0,1xSSC/0,1%SDS. El resultado obtenido se muestra en la figura 3, e indica que *ptr1* es un gen de copia única, ya que se observan dos bandas en aquellas enzimas para las cuales *ptr1* tiene un sitio interno, y una banda única en aquellas enzimas que no cortan el gen *ptr1*. Por otra parte el tamaño de las bandas se corresponde con la secuencia el clon 1A.

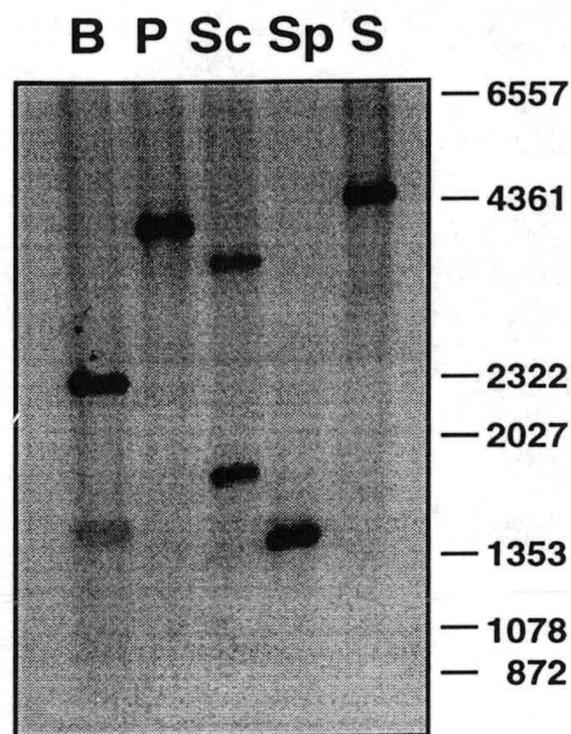


Figura 4. Organización genómica del gen *ptr1*. 5 µg de ADN total de *T. cruzi* fue digerido con diferentes enzimas de restricción y separado por electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, transferido e hibridado con la sonda *ptr1*. B: *Bam* HI; P: *Pst*I; Sc: *Sac* I; Sp: *Sph*I; S: *Sal*I. Los tamaños moleculares en pb derivan del fago lambda digerido con *Hind* III y del fago ØX174 digerido con *Hae* III.

C.1.2.2. Localización cromosómica de *ptr1*.

Para la separación de los cromosomas de *T. cruzi* se realizó una electroforesis en campo pulsado según las condiciones descritas en Métodos. El gel se transfirió a membrana de nylon y se hibridó con la sonda *ptr1*. En la figura 5 se muestra que en las tres cepas estudiadas (Y, Tulahuen y Maracay) el gen *ptr1* se localiza en dos cromosomas de aproximadamente 0,9 y 1,2 Mb respectivamente. La membrana fue deshibridada y posteriormente rehibridada con una sonda específica del gen *tcpgp2* obteniéndose el mismo perfil cromosómico, lo cual reconfirma que ambos genes son de copia única y no se encuentran en otra región del genoma.

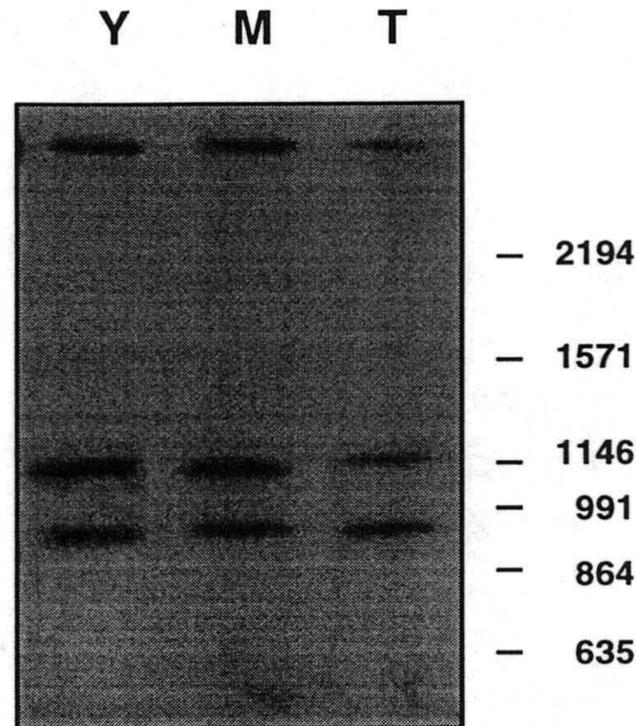


Figura 5. Localización cromosómica de *ptr1*. Los cromosomas de epimastigotes de *T. cruzi* fueron separados por electroforesis en campo pulsado en las condiciones descritas en métodos. El gel transferido se hibridó con la sonda *ptr1*. Y, M y T corresponden a las cepas Y, Maracay y Tulahuen respectivamente. Los pesos moleculares se indican en kb y corresponden a los cromosomas de *Saccharomyces cerevisiae*, cepa S13.

C.1.3. La transcripción y maduración del gen *ptr 1*.

La transcripción del gen *ptr1* se analizó por dos métodos: por Northern blot para conocer su expresión a lo largo del ciclo de vida el parásito, y por transcripción reversa y PCR para localizar los sitios de adición del miniexón y poliadenilación.

C.1.3.1. Northern blot.

Para estudiar la transcripción del gen *ptr 1* 40 μg de ARN total de los 3 estadíos del parásito se separaron por electroforesis en gel de agarosa-formaldehído, se transfirieron a membranas de nylon y se hibridaron con el gen *ptr1* no detectándose la presencia de transcritos en ninguno de los tres estadíos a pesar de la alta actividad específica con que fue marcada la sonda (10^9 cpm/ μg).

C.1.3.2. Adición del miniexón.

El miniexón o "spliced leader" es una secuencia de 39 pb que se adiciona al extremo 5' de los mensajeros de *T. cruzi* durante su maduración por el proceso de "trans-splicing". Este miniexón se ha encontrado en todos los mensajeros maduros descritos

hasta la fecha en *T. cruzi*. El sitio aceptor del miniexón está señalado por el dinucleótido AG, no existiendo una secuencia consenso clara que determine el AG elegido como sitio aceptor del procesamiento.

Para localizar el sitio aceptor del mini-exón en la secuencia 5' del gen *ptr1* se utilizó la estrategia denominada RT-PCR. En primer lugar, se sintetizó el ADNc del extremo 5' específico del mensajero de *ptr1* a partir de ARN poli A⁺ de epimastigotes de la cepa Y, utilizando la reacción de la transcriptasa inversa "AMV", tal como se describe en la sección Métodos. Como cebador se empleó el oligonucleótido antisentido PR1 interno a la secuencia del extremo 5' del gen. La reacción se incubó 1 h a 42°C. Como control se realizó una reacción igual a la descrita pero sin ARN molde. Posteriormente la mezcla de reacción se incubó 15 min a 95°C y se diluyó 10 veces en agua bidestilada 1 µl del ADNc obtenido se amplificó mediante PCR empleando como cebadores el oligo antisentido PR2 y el oligonucleótido ME que contiene parte de la secuencia del mini-exón. Las condiciones del PCR se ajustaron hasta lograr obtener una banda mayoritaria pura. Las condiciones finales fueron 30s a 94°C, 30s a 59°C y 1 min a 72°C, realizándose 32 ciclos con un ciclo final de 5 min. a 72°C. Como control se realizó un PCR utilizando el producto de la reacción control de la retrotranscriptasa.

Se obtuvo una banda mayoritaria de aproximadamente 300 pb (fig 6) que se clonó en el vector pGEM-T (Promega). Este vector ha sido preparado mediante una digestión con EcoRV y sobre los extremos romos generados por esta enzima se ha adicionado una timina en el extremo 3' de ambas hebras. La construcción se aprovecha de la adición inespecífica de una adenina en el extremo 3' de los productos de PCR por la Taq polimerasa. Tres de los clones positivos obtenidos se secuenciaron, conteniendo todos ellos la misma secuencia correspondiente al extremo 5' de *ptr1*. El sitio AG de adición del miniexón se indica en la figura 2 y se encuentra a 30 nucleótidos del codón de iniciación deducido. También se subraya en la figura que el AG está precedido por dos regiones ricas en pirimidinas. Estas regiones fueron descritas en varios genes de tripanosomátidos precediendo al sitio de adición del miniexón (Layden RE, Eisen H. Alternate *trans*-splicing in *Trypanosoma equiperdum*, implication for site selection. Mol Cell Biol 1988;8:1352-60.

C.1.3.3. Localización del sitio de poliadenilación.

Para localizar el sitio de poliadenilación se utilizó la estrategia de RT-PCR que se indica en la figura 7. Para la transcripción reversa se usó como cebador el oligonucleótido T+ANCH (Tabla 1), que consiste en una secuencia de timidinas unida a la secuencia del

oligonucleótido ANCH. Además, T+ANCH se hibridará al comienzo de la cola poliA de los transcritos debido a la constitución de su extremo 3' (tabla 1). Las condiciones de la transcripción reversa a partir de ARN poliadenilado de epimastigotas fueron las mismas que para la localización del sitio de adición del miniexón. La reacción de PCR se realizó usando como cebadores los oligonucleótidos PR3 y ANCH y las condiciones fueron 30s a 94°C, 30s a 50°C y 1 min a 72°C, realizándose 32 ciclos con un ciclo final de 5 min. a 72°C. La banda obtenida de 0,7 kb se purificó de geles de agarosa y se clonó en pGEM-T. La secuenciación de este fragmento demuestra que efectivamente se trata de la región 3' de PTR 1 y que el sitio de poliadenilación se encuentra a 416 nucleótidos del codón de terminación. En la figura 2 se subraya una A que precede a la cola poliadenilada del mARN .

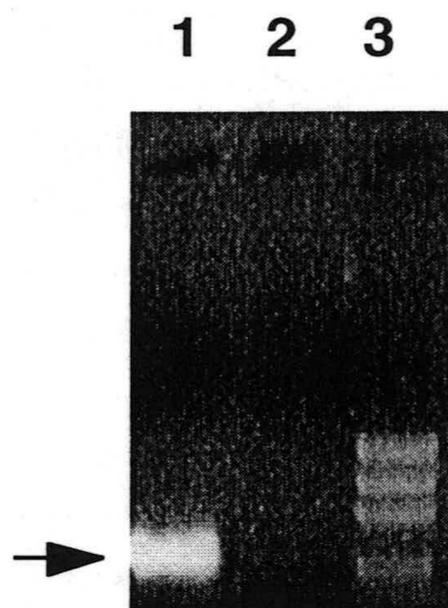


Figura 6. Localización del sitio de adición del miniexón en *ptr1*. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. 1) reacción de PCR a partir del ADNc sintetizado, 2) control de la reacción, 3) marcador de peso molecular.

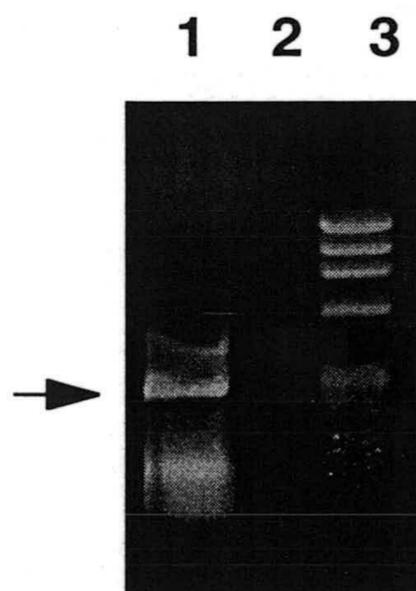


Figura 7. Localización del sitio de poliadenilación de *ptr1*. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. 1) reacción de PCR a partir del ADNc sintetizado, 2) control de la reacción, 3) marcador de peso molecular.

C.1.4. LA TRADUCCION de *ptr 1*.

Para estudiar la expresión de la proteína PTR 1, la secuencia codificante se clonó en el vector de expresión pQE30, se purificó la proteína recombinante y se produjeron anticuerpos anti-PTR 1 que fueron utilizados en estudios de Western blot.

C.1.4.1. Producción de PTR1 recombinante.

La secuencia codificante de PTR1 fue obtenida mediante reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos PR-A y PR-C (tabla 1) correspondientes a los extremos 5' y 3' del gen respectivamente. PR-A presenta un sitio de restricción *Bgl* II en su extremo 5', seguido del codón de iniciación ATG, mientras que PR-C es el oligonucleótido antisentido en cuyo extremo 5' presenta un sitio de restricción *Hind* III, seguido del codón de terminación de *ptr1* en orientación invertida. El PCR se realizó usando como templado ADN total de la cepa Y de *T. cruzi* y las condiciones fueron 30s a 94°C, 45s a 58°C y 1 min a 72°C, realizándose 32 ciclos con un ciclo final de 5 min. a 72°C. El resultado obtenido fue una banda única de 850 pb (figura 8) que se eluyó del gel de agarosa y se clonó en pGEM-. Uno de los clones positivos obtenidos se secuenció, confirmando que no hubo errores introducidos en la reacción de PCR, y se siguió con este plásmido al que se denominó pGEM-PTR1. El mismo se digirió con las enzimas *Bgl* II y *Hind*III, y se ligó al plásmido pQE30, previamente digerido con *Bam* HI y *Hind*III y purificado. Las enzimas *Bam* HI y *Bgl*II generan extremos compatibles, y la razón por la que se introdujo el sitio *Bgl*II en el extremo 5' de *ptr1* es debido a que este gen presenta un sitio *Bam* HI interno. Cuatro clones fueron digeridos con *Bam* HI (sitio interno de *ptrr1*) y *Hind*III, dando la banda esperada de 650 pb. La expresión de la proteína de fusión en respuesta a IPTG se estudió en los 4 clones, mostrando todos niveles similares de expresión (figura 9), continuándose todo el trabajo posterior con el clon 2, al que denominamos pQE30-PTR1

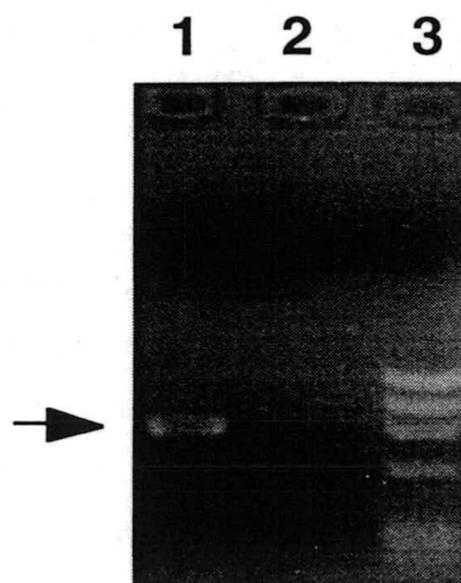


Figura 8. Amplificación del gen completo *ptr1*. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. 1) reacción de PCR a partir de ADN de *Trypanosoma cruzi*, 2) control de la reacción, 3) marcador de peso molecular.

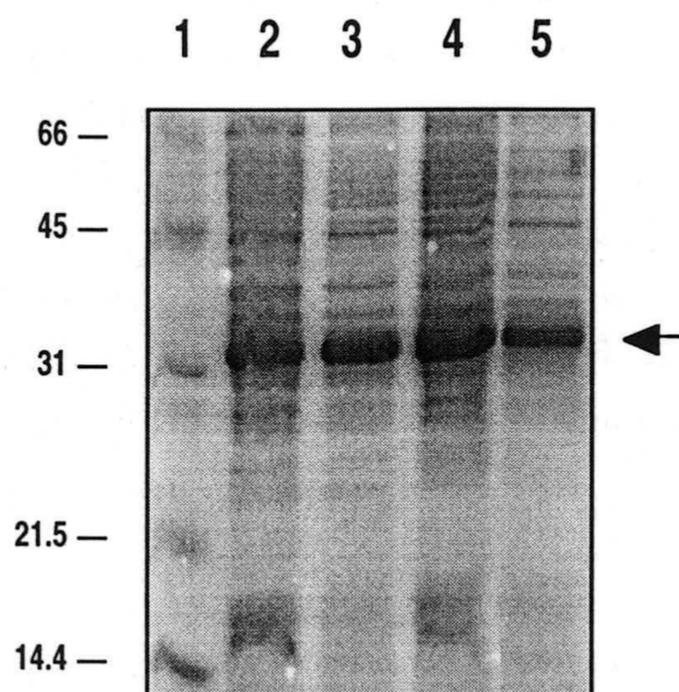


Figura 9. Análisis de cuatro colonias pQE30-PTR1. Los pesos moleculares a la izquierda se dan en kDa. 1, marcadores de peso molecular; 2, 3, 4 y 5, las cuatro colonias analizadas. La flecha indica la proteína sobreexpresada.

C.1.4.2 Purificación de PTR1 recombinante.

Teniendo en cuenta que en el vector pQE30 la proteína se expresa con una extensión de seis histidinas en su extremo amino terminal, la purificación se hizo por cromatografía de afinidad con metal inmovilizado (IMAC; Porath, 1975), en una columna de Ni-NTA-Sepharosa[®] (QIAGEN). El fundamento del método es que las histidinas forman una unión de coordinación con el Ni²⁺ y permanecen unidas a la columna.

Los cultivos bacterianos inducidos con IPTG y lavados (ver METODOS) se sonicaron como se describió previamente, se centrifugó, y la proteína inducida se obtuvo como fracción soluble en el sobrenadante. Este sobrenadante se pasó por la columna .

La elución de la proteína puede hacerse por disminución del pH o aumentando la fuerza iónica, o por competición utilizando altas concentraciones de imidazol, que desplaza a las histidinas para unirse al Ni^{2+} . En el caso de PTR 1, luego de los lavados de la columna a pH 8, 6 y 5 como se describió en METODOS, la proteína se eluyó con imidazol 0,3 M, obteniéndose la proteína con una pureza mayor del 95% (figura 10). La proteína obtenida tiene un peso molecular de 32 kDa lo cual es congruente con el tamaño esperado ya que el peso molecular deducido de PTR1 es 29,5 kDa y el cálculo de pesos moleculares en geles denaturalizantes tiene errores de hasta el 10 %.

C.1.4.3. Obtención de anticuerpos contra PTR1.

Con el objeto de obtener un anticuerpo policlonal contra la proteína PTR1 se inmunizó un conejo de la cepa New Zealand White con la proteína de fusión obtenida. El protocolo seguido fue de tres inmunizaciones con un espacio de tiempo entre ellas de dos semanas, utilizándose 150 μg de proteína de fusión en cada una. Las inmunizaciones se hicieron por vía subcutánea utilizándose en la primera Adyuvante Completo de Freund y en las siguientes Adyuvante Incompleto de Freund. Previo a la primera inmunización se realizó la extracción de 10 ml de sangre de conejo para la obtención de suero preinmune para su utilización como control en los diferentes ensayos serológicos.

Una semana después de la última inmunización se midieron los títulos de anticuerpo del suero mediante la técnica de ELISA, en placas tamizadas con 1 μg /pocillo de PTR1 como se describió en Métodos, comparándolos con los títulos del suero preinmune. Se obtuvieron valores positivos hasta una dilución de 1:120.000, realizándose entonces la sangría final del conejo.

C.1.4.4. Identificación de la proteína PTR1 mediante la técnica de Western blot.

Para evaluar la reactividad del antisuero obtenido frente a proteínas del parásito, 40 μg de proteínas se separaron electroforéticamente en geles de acrilamida al 12% y se transfirieron a membranas de PVDF. Uno de los carriles transferidos se incubó con el suero anti-PTR1 diluido 1/5000 en PBS-0,1T, y el otro se incubó con el suero preinmune en la misma dilución. La incubación con el segundo anticuerpo y el revelado, tal como se

describió en METODOS, muestran que el suero inmune reconoce una banda de aproximadamente 30 kDa (figura 11), que se corresponde con el tamaño calculado a partir de la secuencia nucleotídica, así como con el tamaño obtenido de la proteína recombinante. Además de esta banda, aparece una segunda y más abundante con un tamaño de 16kDa, que es reconocida únicamente por el suero inmune (figura 11) y que no corresponde a un producto de degradación, como se señalará a continuación

Para analizar la expresión de PTR1 a lo largo del ciclo de vida del parásito, se realizó un Western blot de proteínas totales de *T. cruzi* de los estadios epimastigota, tripomastigota y amastigota, utilizando el suero anti-PTR1. El resultado se muestra en la figura 12, e indica que PTR1 es una proteína de expresión diferencial, que se expresa únicamente en el estadio epimastigota. Como puede verse en la misma figura, la banda de 16 kDa aparece en los tres estadios, indicando que es una proteína distinta a PTR1. Por otra parte, su presencia en los tres estadios del parásito constituye un control de normalización del Western blot.

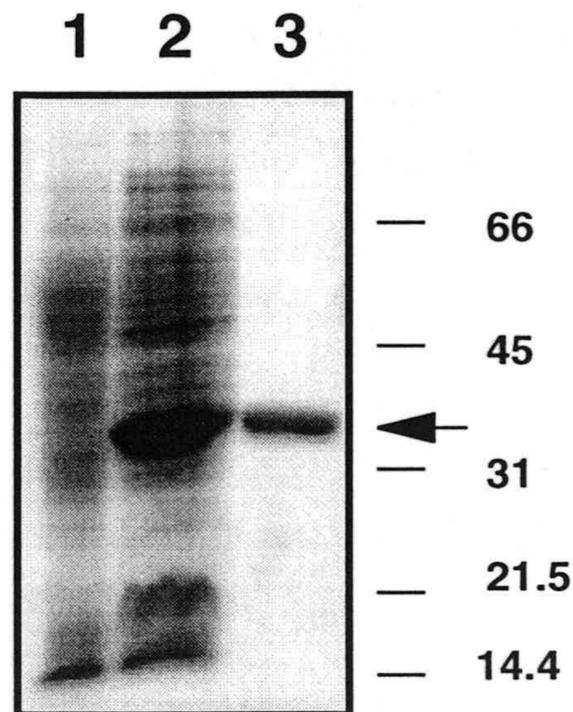


Figura 10. Expresión y purificación de PTR1. 1, pQE30-PTR1 sin inducir; 2, pQE30-PTR1 inducido con IPTG; 3, PTR1 recombinante purificada. La flecha señala la proteína PTR1.

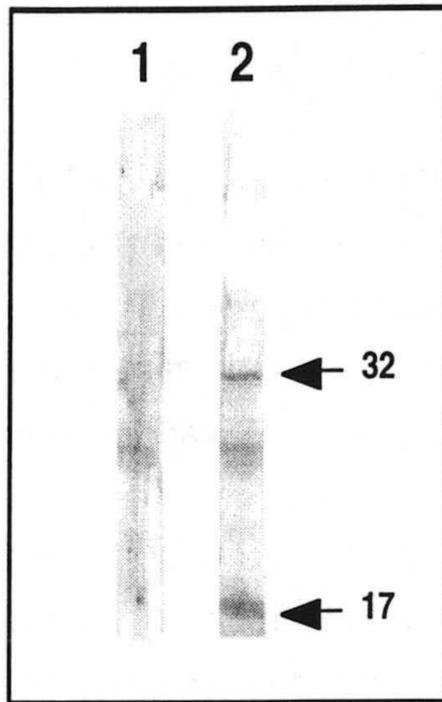


Figura 11. Análisis por Western blot de la reactividad del suero anti-TCP17. 40 μ g de proteínas totales de epimastigotes se separaron y transfirieron a PVDF, incubándose con 1) suero preinmune y 2) suero inmune. Las flechas señalan la PTR1, con un peso molecular aparente de 32kDa, y la proteína de 16 kDa reconocida específicamente por el suero inmune.

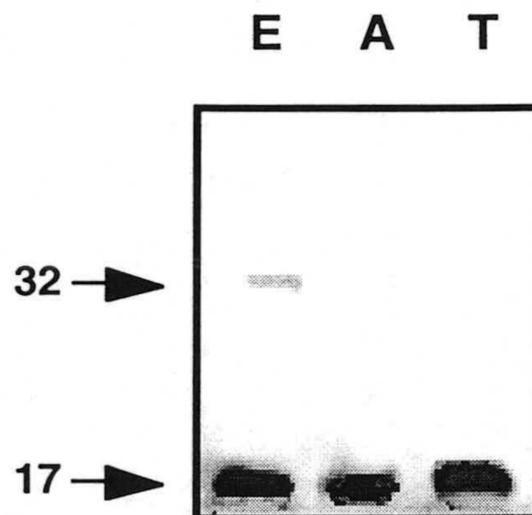


Figura 12. Análisis de la expresión de PTR1 en los diferentes estadios del parásito. Las proteínas de los tres estadios del parásito fueron separadas electroforéticamente y transferidas a PVDF. Para el Western blot se utilizó el suero anti-PTR1. E, epimastigotes; A, amastigotes; T, tripomastigotes. Las flechas indican la PTR1 de 32 kDa y una banda reconocida por el suero de 16 kDa.

C.1.5. Estudios funcionales de PTR1.

PTR1 fue descrita en *Leishmania* como una enzima que cataliza la reducción de biopterina, dihidrobiopterina, folato y dihidrofolato, usando como coenzima al NADPH. Así, además de generar una vía de utilización de biopterina reducida, constituye una vía de salvamento de folato, alternativa a la catalizada por la DHFR. Así, en presencia de inhibidores de la DHFR, los parásitos que sobreexpresan PTR1 presentan mayor resistencia que los parásitos normales.

Con el objetivo de estudiar la función de PTR1 de *T. cruzi*, se llevaron a cabo dos estrategias. Por un lado estudios de actividad enzimática para analizar la especificidad de sustrato de esta enzima en - Porath J, Carlsson J, Olsson I. Belfrage G. 1975, Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. Nature, 258, 598-599T. cruzi, y por otro estudios de transfección para estudiar si también en *T. cruzi* PTR1 es capaz de conferir resistencia a antifolatos.

C.1.5.1. Actividad enzimática.

PTR1 purificada se utilizó en estudios de actividad específica tal como se describió en Métodos. La enzima mostró que funciona con NADPH como coenzima, mientras que con NADH no se detectó actividad, y en las condiciones ensayadas es capaz de reducir biopterina, dihidrobiopterina, folato y dihidrofolato, mientras que no se detectó actividad cuando se usó neopterina o sepiapterina como sustrato (Tabla 4). En primer lugar se ensayó la actividad biopterina reductasa a distintos pH, mostrando que la enzima tiene un pH óptimo de 6 (figura 13). Teniendo en cuenta estos datos, todos los siguientes ensayos se realizaron a pH 6. Como se muestra en la tabla 4 la mayor actividad se obtuvo para las formas oxidadas de los sustratos, siendo de 0,5 U/mg para la biopterina, 0,2 U/mg para el folato, 0,14 U/mg para la dihidrobiopterina y 0,13 U/mg para el dihidrofolato.

Actividad enzimática de PTR1 de *T. cruzi*

Sustratos	Actividad específica (U mg ⁻¹)
Biopterina	0.50±0.06
Dihydrobiopterina	0.14±0.01
Folato	0.20±0.03
Dihidrofolato	0.13±0.02
Sepiapterina	ND
Neopterina	ND

Tabla 3. La actividad se midió usando NADPH como coenzima junto con los diferentes sustratos pteridinas a pH 6 en las condiciones descritas en METODOS. Los valores son el promedio de tres experimentos independientes +/- DS. ND, Ninguna actividad detectada.

C.1.5.2 Transfección de *T. cruzi* con *ptr1*.

Una de las formas de estudiar la función de un gen es mediante ensayos de transfección. Este procedimiento consiste en introducir en células eucariotas un vector de transfección que contiene el gen a estudiar. De esta manera conseguimos sobreexpresar la proteína codificada en líneas celulares con niveles bajos de expresión facilitando el estudio del fenotipo conferido por el gen problema. En el caso del gen *ptr1* de *T. cruzi* queríamos sobreexpresar el gen en *T. cruzi* para conocer si *ptr1* presenta un fenotipo de resistencia a antifolatos.

Para los ensayos de transfección en *T. cruzi* se utilizó el vector pTEX cedido amablemente por J. M. Kelly (Dep. of Medical Parasitology, London School of Hygiene and Tropical Medicine, Inglaterra), vector que ha sido utilizado previamente con éxito para sobreexpresar genes en *T. cruzi* (Kelly, 1993). Este vector está construido a partir de las secuencias intergénicas del gen de la gGAPDH y es capaz de mantenerse y replicarse dentro del parásito bajo la forma de un ADN extracromosómico circular. Como marcador de selección, el vector lleva una copia del gen *neo* que codifica para la neomicina-fosfo-transferasa que le confiere resistencia a la geneticina (G418). El número de copias del plásmido dentro de la célula es dependiente de la concentración de G418; aumentando la concentración del fármaco se puede aumentar el número de copias del vector y esto está directamente relacionado con los niveles de transcripción del gen transfectado.

C.1.5.2.1. Construcción del plásmido pTEX-PTR1.

La construcción del vector pTEX-PTR1 se realizó a partir del plásmido pGEM-PTR descrito en C.1.4.1., digiriéndolo con *Bgl* II y *Hind* III. Este fragmento se insertó en pTEX digerido con *Bam* HI y *Hind* III lo cual permite que el gen se inserte en la misma orientación 5'→3' con respecto a las secuencias del vector derivadas de *T. cruzi*, así como del gen *neo*. Uno de los clones que contenía el inserto completo fue denominado pTEX-PTR1, y fue utilizado en los experimentos de transfección.

Utilizando el kit de aislamiento de ADN Wizard Maxiprep se prepararon aproximadamente 1 mg de los plásmidos pTEX y pTEX-PTR1 para su posterior utilización en los ensayos de transfección.

IV.4.2.2. Transfección de epimastigotes de *T. cruzi*.

Para los ensayos de transfección se emplearon epimastigotes de *T. cruzi* (cepa Y) en fase logarítmica de crecimiento. Los parásitos luego de lavados 3 veces con HBS se resuspendieron en el mismo tampón. 20 millones de parásitos se electroporaron con 100 µg de ADN del plasmido pTEX-PTR1 en un volumen final de 450 µl, en las condiciones que se describieron en METODOS. Como control se electroporó un número igual de parásitos con el plásmido pTEX solo y en ausencia de ADN. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

Una vez realizada la electroporación, los parásitos se resuspendieron en 5 ml de medio LIT suplementado con SBF al 10% sin agitación. A las 24 horas se agregó G418 a una concentración final de 150 µg/ml. A los seis días se realizó una dilución 1/3 incubándose por tres días, tras los cuales se realizó una nueva dilución 1/10, con una concentración final de G418 de 500 µg/ml. A la semana de la última dilución, los cultivos electroporados en ausencia de plásmido habían muerto, comenzándose a seleccionar los parásitos transfectados en los cultivos electroporados con plásmidos.

A los 15 días de la última dilución los parásitos electroporados con pTEX, así como aquellos electroporados con pTEX-PTR1 habían alcanzado un tiempo de duplicación comparable al de los parásitos salvajes. En ese momento, los parásitos control electroporados en ausencia de ADN y crecidos en presencia de geneticina habían muerto.

A los cultivos positivos se los adaptó a una concentración de G418 2 mg/ml y se les dieron tres pases previo a su análisis mediante las técnicas de Southern y Western.

C.1.5.2.3. Estudio de la organización genómica de los parásitos transfectados.

Para investigar la presencia del plásmido en las células se realizó un Southern blot usando como sonda el fragmento *Bam* HI y *Hind* III de pGEM-PTR1, que corresponde a los últimos 650 nucleótidos de la región codificante de *ptr1*. Se extrajo ADN genómico tanto de los cultivos transfectados como de los parásitos salvajes y aproximadamente 2 µg de ADN de cada uno se digirieron con las enzimas *Bam* HI y *Hind* III. Estas enzimas liberan del plásmido un fragmento de 650 pb, pero dado que el sitio *Hind* III fue creado en la reacción de PCR y no existe en los parásitos salvajes, el tamaño esperado en una digestión genómica de parásitos salvajes es de 2881 pb. En la figura 15 se muestra el resultado del Southern blot. Como puede verse, en todos los carriles aparece la banda esperada de 2881 correspondiente a la copia genómica. Sin embargo, en el carril 3, es decir, en el que se corrió el ADN de los parásitos transfectados, aparece la banda de 650 pb que corresponde con el tamaño esperado para parásitos transfectados con pTEX-PTR1. Para conocer el número de copias de plásmido por célula, se expuso el filtro en un Instant Imager y se contaron las cpm de la banda correspondiente a la copia genómica como la correspondiente al plásmido. La relación banda plasmídica/banda genómica fue de 14, lo cual indica que existe un promedio de 7 copias de plásmido por célula.

C.1.5.2.4. Estudio de la expresión de PTR1 en los parásitos transfectados.

Para estudiar si la transfección era funcional, es decir, si los clones transfectados con pTEX-PTR1 expresaban el gen, se extrajeron proteínas totales de los parásitos salvajes, y de los transfectados con pTEX y pTEX-PTR1, y se realizó la técnica de Western blot. El resultado de la figura 16 muestra que en los transfectantes pTEX-PTR1 sobreexpresan la proteína, mientras que no existe diferencias en la expresión de PTR1 entre los parásitos salvajes y los transfectados con pTEX. Nuevamente aquí puede verse que la banda de 16 kDa está presente en iguales cantidades en los tres carriles, independientemente de la cantidad de PTR1.



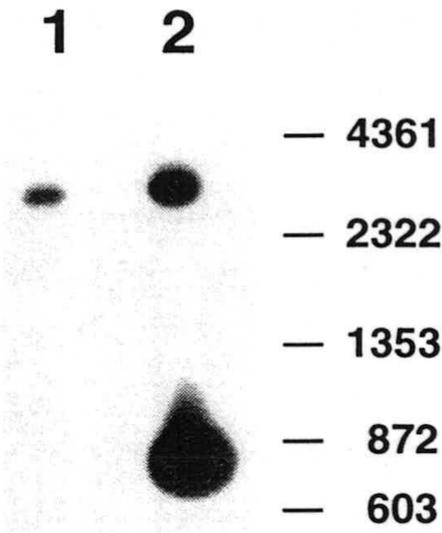


Figura 15. Análisis de la organización genómica de los parásitos transfectados con *ptr1*. El ADN total de los parásitos se digirió con las enzimas *Bam* HI y *Hind* III, se separó electroforéticamente, se transfirió a nylon y se hibridó con la sonda *ptr1*. 1, parásitos transfectados con pTEX; 2, parásitos transfectados con pTEX

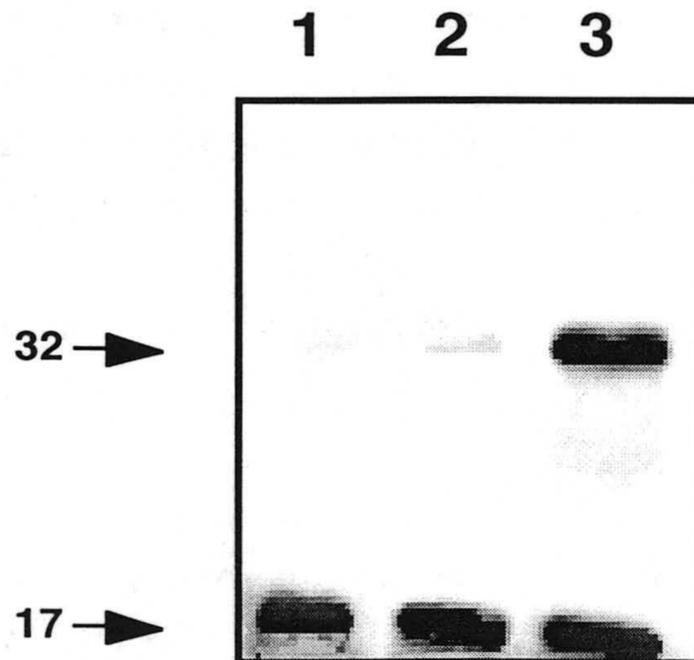


Figura 16. Análisis de la expresión de PTR1 en los parásitos transfectados. Las proteínas totales de los parásitos se separaron electroforéticamente y se transfirieron a PVDF para realizar un Western blot con el anticuerpo anti-PTR1. 1, parásitos no transfectados; 2, parásitos transfectados con pTEX; 3, parásitos transfectados con pTEX-PTR1.

C.1.5.2.5. Estudio de la resistencia a fármacos de los parásitos transfectados.

Con el objetivo de estudiar si al igual que en *Leishmania ptr1* confería resistencia a los antifolatos, se comparó la sensibilidad a estas drogas en los parásitos transfectados con pTEX y con pTEX-PTR1. Los antifolatos utilizados fueron Methotrexato, Aminopterina, Trimethoprim y Pyrimetamina.

Para determinar la capacidad del gen *ptr1* de conferir resistencia a antifolatos se determinó la dosis inhibitoria 50 (DI50) para cada uno de los compuestos que se ensayaron. La DI50 la definimos como la concentración del compuesto necesaria para inhibir el crecimiento de los parásitos en un 50%. Para realizar este cálculo, se partió de pre-inóculos de 10^6 parásitos/ml en fase logarítmica de crecimiento en tubos estériles de polipropileno con 2 ml de medio LIT. Estos cultivos por duplicado se incubaron con agitación en presencia de distintas concentraciones del compuesto elegido durante 5 días, realizándose a continuación el recuento del número de parásitos. Como grupo control se emplearon parásitos mantenidos en ausencia del compuesto.

El porcentaje de inhibición del crecimiento se calculó en relación al crecimiento de los parásitos en ausencia del compuesto. Una vez obtenidos los porcentajes de inhibición para cada concentración de compuesto, se construyó con estos datos una gráfica de porcentaje de inhibición y por interpolación de la curva se obtuvo el valor de la dosis inhibitoria 50. El índice de resistencia (IR) al compuesto se obtuvo a través del cociente entre la DI50 de los parásitos transfectados con el gen *ptr1* y los parásitos control. Se realizaron tres ensayos independientes para cada uno de los compuestos utilizados.

En la tabla 4 se muestran los resultados de este ensayo. Como puede verse los parásitos transfectados con *ptr1* presentan DI50 mayores a los controles, para los fármacos Methotrexate, Aminopterina y Trimethoprim, con IR de 5,0, 10,4 y 5,6 respectivamente. Este resultado indica que *ptr1* confiere resistencia a los antifolatos.

Drogas (μM)	$\text{IC}_{50}^{\text{a}}$		Resistencia relativa ^b
	pTEX	pTEX-PTR	
Methotrexato	30.0 \pm 2.4	152.0 \pm 12.2	5.0
Aminopterina	18.0 \pm 1.5	187.0 \pm 15.1	10.4
Trimethoprim	19.0 \pm 1.7	107.0 \pm 8.6	5.6
Pyrimethamina	1.2 \pm 0.1	1.6 \pm 0.1	1.3

Tabla 4. Resistencia a fármacos en los epimastigotes de *T. cruzi* transfectados con *ptr1*.

^a IC_{50} es la concentración que disminuye la velocidad de crecimiento celular en un 50%. Se indica el \pm S. D. de tres experimentos independientes.

^b La Resistencia Relativa al fármaco es la relación entre la IC_{50} de pTEX-PTR dividida por la IC_{50} de pTEX.

Figura 17. Crecimiento en presencia de fármacos.

Para estudiar el efecto de los antifolatos Methotrexato y Aminopterina sobre el crecimiento de los parásitos transfectados con *ptr1* con respecto a los controles se realizaron curvas de crecimiento en presencia del fármaco a la concentración equivalente a la DI_{50} de los controles. Se partió de 10^6 parásitos/ml y se contaron los parásitos cada día durante 5 días. En la figura 17 se muestra el resultado obtenido, donde claramente se puede ver la resistencia que confiere *ptr1* a los antifolatos.

C.2. ESTUDIO DEL GEN TCP17 DE TRYPANOSOMA CRUZI.

C.2.1. Secuenciación del gen *tcp17*.

La secuenciación de la región 5' de *tcpgp2* mostró la presencia de un marco abierto de lectura ubicado a 831 nucleótidos del codón de iniciación de *tcpgp2*, de 483 nucleótidos y que codifica para un polipéptido de 160 aminoácidos (figura 18) con un peso molecular deducido de 16,50 kDa. El estudio de homologías de secuencias con este gen se realizó por búsqueda en los bancos de datos GenBank y SwissProt, utilizando los programas BLAST-P y BLAST-X (Altschul, 1990). Este análisis demostró que la

secuencia polipeptídica deducida, a la que denominamos *tcp17*, pertenece a una familia de proteínas de función desconocida denominada YER057c. Esta familia es altamente conservada y con una amplia distribución en la escala evolutiva desde *E. coli* hasta humanos. Sin embargo no existía ninguna publicación donde se hablara de esta familia, por lo que decidimos hacer un estudio de homologías entre los miembros descritos, para definir claramente las homologías de secuencia presentes en las mismas. Cabe señalar en este punto que la mayoría de los genes descritos y que se analizarán a continuación, fueron encontrados en el GenBank como parte de diferentes proyectos genoma.

C.2.2. Estudios de homología de TCP17.

El objetivo de este punto fue definir la familia YER057c. Para ello se trabajó con las secuencias aminoacídicas de los 18 genes descritos hasta la fecha que se muestran en la figura 19. En la leyenda de la figura se indica a que corresponde cada gen. Para generar el alineamiento con un máximo de identidad se utilizó el programa GCG PILEUP. Como se ve en la figura, en todos los miembros de esta familia existen residuos aminoacídicos conservados. Los bloques indican los aminoácidos que están presentes en más del 70% de los miembros, los asteriscos indican los residuos idénticos que están presentes en todos los miembros, y los signos más indican aquellos residuos equivalentes presentes en el 100% de los miembros. Estos hallazgos que muestran 100% de conservación nos permitieron definir un “sello” de la familia, es decir, una secuencia aminoacídica que define la pertenencia al grupo. Para simplificar hemos definido una secuencia N-terminal y otra secuencia C-terminal:

N-terminal:

[IV]-X(4)-[AV]-[AP]-X-[AP]-X(3)-Y-X(9)-[LIVF]-X(2)-[SA]-G- [QS]

C-terminal:

[AT]-R-X(2)-[IVFY]-X-[VC]-X(2)-L-P-X(4)-[LIVM]-E-[IVM]-[DE].

Para confirmar la elección de estas secuencias, las hemos enfrentado cada una independientemente contra los bancos SWISSPROT y TREMBL utilizando el programa Expassy Scan Prosite (Appel,1994) y solamente fueron detectados los miembros de la familia.

-126	ATCTGCGTGTGTGTTTTCTGTTGTCGCTTGTGCGCTCTCGTTCCCCGCCCACTCTCCATGTGTTTT	
-51	TCCGCTAGTACCCAAACTTCGGATCACCAATCCACACAAGCTGCCGTTACATGTCTGTTGTTGCTT	8
		M S V V A
-24	GTTGCCGGAATCTCCAGCGCTTGGGCATAAACTTCCAGCCGCAGCAGCGCCTGCAACAAATTACG	33
	V A A N L Q R L G I K L P A A A A P A T N Y	
99	GTCTGCAGTGGCATGCAGCTGCATGTCTCCGGCCAGCTACCAAAGAATGACGTGGGGGGATGCATGA	58
	V C S G M Q L H V S G Q L P K N D V G G C M	
174	CTGGGTGCCTCACTGACAGTAACGGAGGGGCAAGCGCGGCTCGGGCCTGTGCGTTGCAGGTTGTGA	83
	L G A S L T V T E G Q A A A R A C A L Q V V	
249	CAGGCAGCTCTGGGCGACCTGGACCGTGTGAAACGTGTCGTGAAGCTCAACGTCTTTGTGAATTCCT	108
	Q A A L G D L D R V K R V V K L N V F V N S	
324	TTTACGGAGCAGTCGTACGTTGCCAATGGCGCCTCTGACCTTATTCTAAGTGTGTTCCGGGAGGAGG	133
	F T E Q S Y V A N G A S D L I L S V F G E E	
399	CATGCTCGGTGTGCAGTGGGGGTGGCGCAGCTGCCGTTGGGGCCGCCGTTGAGGTGGATGCGTTGG	158
	H A R C A V G V A Q L P F G A A V E V D A L	
474	AATAATTAAAGTGGTTAGCATGTGATGTGATTCCACACATATCTATCCATCCATGCATGCATGGGT	
	N N *	
549	TTGTGTGTACGATGATGAAGGCGTAAAAATTTTTATTTTTATTTTTTGGGAACACCAATGTGGCACA	
		2
624	CAAACATGTATCCACGCAATACATATTGTTATTGTTACTACATTATACATGGGGGACATCTGGTTGC	
699	TTTCTGTGTGTTTGTGCTGTTGAATTAGTAGGGGGAGGAGGAATAAAAGGGAGATAAAAAAATGTTG	
		1
774	GACGGAGGGTGCAAAATCGATCCATATTACTGTTATTAATATTATTAATATTTATTGGATGGCTTCT	
849	ATTGCGTCACTTTTACTCGTTGTTGTTGCTGAAATTTTGTGCGCTTCTTGGTTTCCGCTCCCGGGT	
924	TTTCCATCCTCCTTCTGTGACTGCGGTTGTAAGAAACAAAAGAAAGCAACGTGGAAGCATGCATAG	
999	GAAGACGCACAGCCGCAGGAGGCAATGCCTGGCCGTATGTTGTACGAAGATGCGCAGGTGGTGGAGA	
1074	GCAACTCGTGACGGCGACACCTCGTCCACCTCAATCCTGTCGTCGTCATCATCGTCGTCGTCAGCGG	
1149	GTGGTGTGTGTAAGTCACAGCGCGCTGGCGAAGAGGAAACGGGCTTACGACAGGAGCTACAGCAGCA	
1224	CGAATGCGCGAGATGTGGGGAGTGGGGGAGCCATACACACCCATGGCGGAGACACGGCCACGTGGC	
1299	TTGTATTACA ATG	

Figura 18. Análisis de secuencia de *tcp17*. El primer nt del marco de lectura se numeró +1. Los nucleótidos de la región 5' no traducida se numeraron negativamente. Los números de la izquierda se refieren a los nt y los de la derecha a los aminoácidos. Los oligonucleótidos usados para localizar el sitio aceptor de miniexón se marcaron con una flecha. Los sitios aceptores de miniexón de *tcp17* y *tcpgp2* se indican como AG. La secuencia de pirimidinas que precede a este sitio está subrayada. El ATG final es el codón de iniciación de *tcpgp2*.

Por otra parte, dado que muchas de las secuencias registradas pertenecen a procariotas, y teniendo en cuenta que en estos organismos la transcripción es policistrónica y los genes contiguos y pertenecientes a un mismo operón tienen funciones relacionadas, decidimos investigar qué genes se hallaban cercanos a los miembros de la familia YER057c en procariotas. En la figura 20 se muestran los resultados de esta búsqueda. Es de destacar que en muchos casos estos genes se encuentran en los mismos *loci* que transportadores ABC, como es el caso de *T. cruzi*,

C.2.3. Organización genómica de *tcp17*.

Teniendo en cuenta que los otros dos genes del *locus*, *ptr1* y *tcpgp2*, son genes de copia única, el presente estudio sólo tiene como objetivo confirmar que no existen copias de *tcp17* fuera del *locus*. Para ello se realizó un Southern blot de una digestión genómica y de un CHEF. El resultado del Southern blot se muestra en la figura 20, mostrando que se trata de un gen de copia única. El estudio de CHEF dio el mismo resultado que para *ptr1* (figura 5), confirmando la hipótesis.

C.2.4. La transcripción y maduración del gen *tcp17*.

La transcripción del gen *tcp17* se analizó también por dos métodos: por Northern blot para conocer su expresión a lo largo del ciclo de vida del parásito, y por transcripción reversa y PCR para localizar los sitios de adición del miniexón y poliadenilación.

C.2.4.1. Northern blot.

Para estudiar la transcripción del gen *tcp17* 40 µg de ARN total de los 3 estadios del parásito se separaron por electroforesis en gel de agarosa-formaldehído, se transfirieron a membranas de nylon y se hibridaron con el gen *tcp17*. El resultado se muestra en la figura 22 el gen se transcribe en los tres estadios del parásito, pero difiere el tamaño de los transcritos: en tripomastigotes se ve un transcrito de 2,2 kb, en amastigotes se ve un transcrito de 2,7 kb, mientras que en epimastigotes aparecen dos transcritos de 2,7 y 1,4 kb.

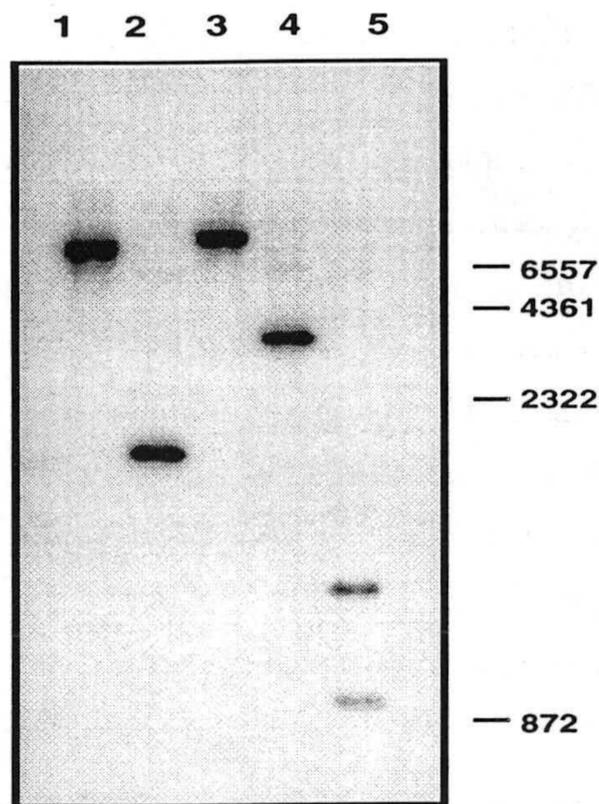


Figura 21. Organización genómica del gen *tcp17*. 5 μ g de ADN total de *T. cruzi* fue digerido con diferentes enzimas de restricción y separado por electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, transferido e hibridado con la sonda *tcp17*. 1, *Bam*HI; 2, *Eco* R I; 3, *Hind* III; 4, *Sall*; 5, *Sph*I. Los tamaños moleculares en pb derivan del fago lambda digerido con *Hind* III y del fago ϕ X174 digerido con *Hae* III

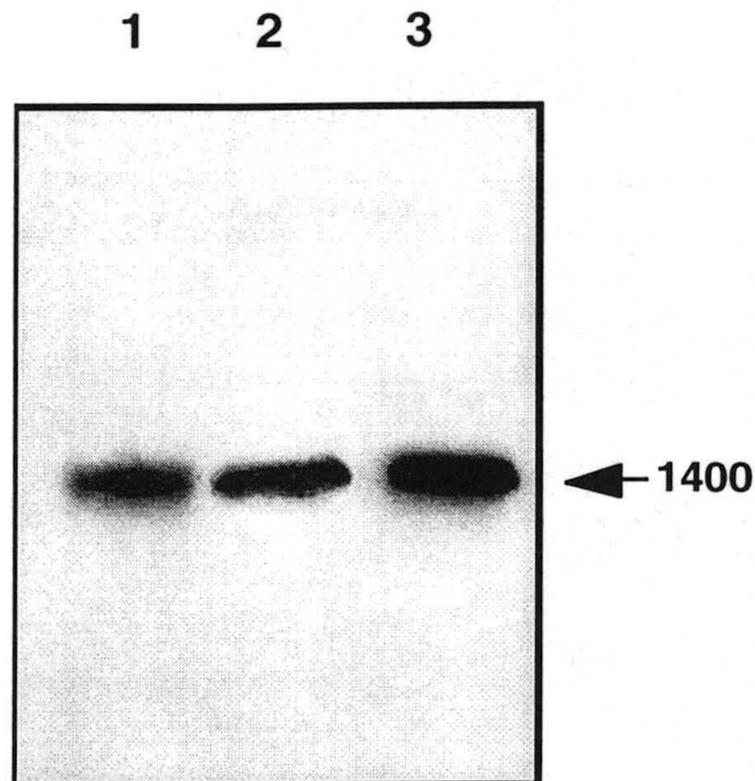


Figura 22. Análisis de la transcripción de *tcp17*. 20 μ g de ARN total de *T. cruzi* se separaron por electroforesis en gel de agarosa/formaldehído, transferidos e hibridados con la sonda *tcp17*. 1, trypomastigotes; 2, epimastigotes; 3, amastigotes.

C.2.4.2. Adición del miniexón.

Para localizar el sitio aceptor del mini-exón en la secuencia 5' del gen *tcp17* se utilizó la misma estrategia descrita para *ptr1*. Como cebador de la transcriptasa reversa se empleó el oligonucleótido antisentido P17-1, y el ADNc obtenido se amplificó mediante PCR empleando como cebadores el oligo antisentido P17-2 y el oligonucleótido ME. Las condiciones del PCR se ajustaron hasta lograr obtener una banda mayoritaria pura, y se obtuvo una banda mayoritaria de aproximadamente 600 pb (fig 23) que se clonó en el vector pGEM-T (Promega). La secuenciación de esta banda demostró que el sitio AG de adición del miniexón (figura 19) se encuentra a 40 nucleótidos del codón de iniciación deducido y, al igual que en *ptr1*, este sitio está precedido por regiones ricas en pirimidinas (figura 19).

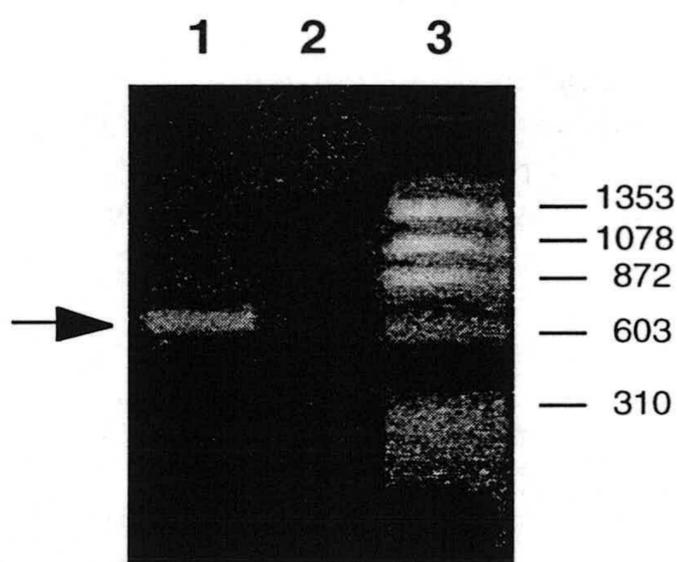


Figura 23. Localización del sitio aceptor de miniexón en *tcp17*. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. 1) reacción de PCR a partir del ADNc sintetizado, 2) control de la reacción, 3) marcador de peso molecular.

C.2.4.3. Localización del sitio de poliadenilación.

C.2.5 La traducción de *tcp17*.

La estrategia seguida fue la misma que para *ptr1* por lo que se omitirán los detalles ya explicados en el numeral C.1.4.

C.2.5.1. Producción de TCP17 recombinante.

La secuencia codificante de TCP17 fue obtenida mediante reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos P17-A y P17-C (tabla 1) correspondientes a los

extremos 5' y 3' del gen respectivamente. P17-A presenta un sitio de restricción *Bgl* II en su extremo 5', seguido del codón de iniciación ATG, mientras que PR-C es el oligonucleótido antisentido en cuyo extremo 5' presenta un sitio de restricción *Hind* III, seguido del codón de terminación de *tcp17* en orientación invertida. El PCR se realizó usando como templado ADN total de la cepa Y de *T. cruzi* y las condiciones fueron 30s a 94°C, 30 a 60°C y 1 min a 72°C, realizándose 32 ciclos con un ciclo final de 5 min. a 72°C. El resultado obtenido fue una banda única de 500 pb (figura 24) que se eluyó del gel de agarosa y se clonó en pGEM-T. Uno de los clones positivos obtenidos se secuenció, confirmando que no hubo errores introducidos en la reacción de PCR, y se siguió con este plásmido al que se denominó pGEM-TCP17. El mismo se digirió con las enzimas *Bgl* II y *Hind*III, y se ligó al plásmido pQE30, previamente digerido con *Bam* HI y *Hind*III y purificado. La reacción de ligamiento se digirió posteriormente con *Bam* HI para eliminar falsos positivos, ya que el ligamiento de la banda *tcp17* a pQE 30 destruye el sitio *Bam* HI, y sólo se digieren los plásmidos pQE30 sin inserto. Se analizaron cuatro clones que mostraron tener inserto, y para ver si la inserción había sido en fase se estudió la expresión de la proteína de fusión en respuesta a IPTG en los 4 clones, mostrando tres de ellos niveles similares de expresión (figura 25) continuándose todo el trabajo posterior con el clon 4, al que denominamos pQE30-TCP17

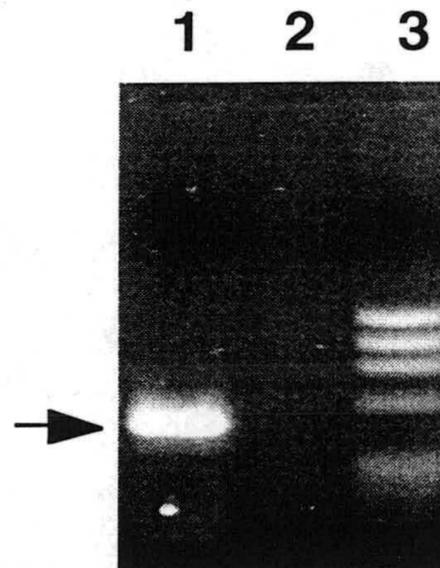


Figura 24. Amplificación del gen completo *tcp17*. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. 1) reacción de PCR a partir del ADN total de *T. cruzi*, 2) control de la reacción, 3) marcador de peso molecular.

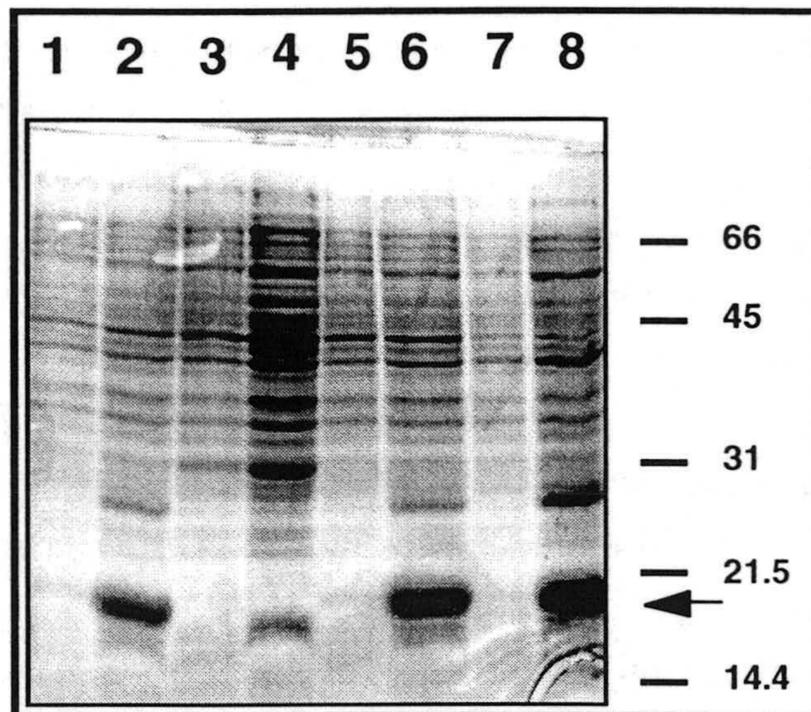


Figura 25. Análisis de cuatro colonias pQE30-TCP17. Los pesos moleculares se dan en kDa. Los números impares son colonias no inducidas y los pares colonias inducidas con IPTG. 1 y 2, clon 1; 3 y 4 clon 2; 5 y 6, clon 3; 7 y 8, clon 4.

C.2.5.2 Purificación de TCP17 recombinante.

Los cultivos bacterianos inducidos con IPTG y lavados (ver METODOS) se sonicaron como se describió previamente, se centrifugó, y también aquí la proteína inducida se obtuvo como fracción soluble en el sobrenadante. Este sobrenadante se pasó por la columna de Ni-NTA agarosa.

LA purificación de TCP17 se realizó usando el mismo protocolo descrito para PTR1, y sólo se varió la etapa de elución: luego del lavado con el tampón de pH 5, se aplicó a la columna tampón a pH 4 y se obtuvo la proteína con una pureza mayor del 95% (figura 26). La proteína obtenida tiene un peso molecular de aproximadamente 17 kDa, lo cual concuerda con el tamaño esperado, ya que el peso molecular deducido de TCP17 es 16,5 kDa.

C.2.5.3. Obtención de anticuerpos contra PTR1.

Con el objetivo de obtener un anticuerpo policlonal contra la proteína TCP17 se inmunizó un conejo de la cepa New Zealand White con la proteína de fusión obtenida, usando el protocolo descrito en METODOS.

Una semana después de la última inmunización se midieron los títulos de anticuerpo del suero mediante la técnica de ELISA, en placas tamizadas con 1 µg/pocillo

de TCP17 y comparadas con los títulos del suero preinmune, obteniéndose valores positivos hasta una dilución de 1:120000, realizándose entonces la sangría final del conejo.

C.2.5.4. Identificación de la proteína PTR1 mediante la técnica de Western blot.

Para evaluar la reactividad del antisuero obtenido frente a proteínas del parásito, 40µg de proteínas se separaron electroforéticamente en geles de acrilamida al 14% y se transfirieron a membranas de PVDF. Uno de los carriles transferidos se incubó con el suero anti-PTR1 diluído 1/5000 en PBS-0,1T, y el otro se incubó con el suero preinmune en la misma dilución. La incubación con el segundo anticuerpo y el revelado, tal como se describió en METODOS, muestran (figura 27) que el suero inmune reconoce una banda única y muy abundante de aproximadamente 17 kDa , que se corresponde con el tamaño calculado a partir de la secuencia nucleotídica, así como con el tamaño obtenido de la proteína recombinante.

Para analizar la expresión de TCP17 a lo largo del ciclo de vida del parásito, se realizó un Western blot de proteínas totales de *T. cruzi* de los estadios epimastigota, tripomastigota y amastigota, utilizando el suero anti-TCP17. El resultado se muestra en la figura 28, e indica que PTR1 es una proteína de expresión diferencial, que se expresa mayoritariamente en el estadio epimastigota, siendo casi nula su expresión en los estadios tripo y amastigota.

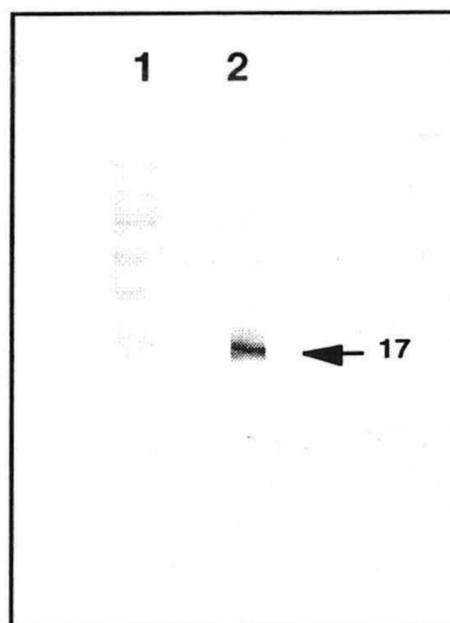


Figura 27. Análisis por western blot de la reactividad del suero anti TCP17. 40 µg de proteínas totales de epimastigotes se separaron electroforéticamente y se transfirieron a PVDF, incubándose en 1 con suero preinmune y en 2 con suero inmune. La flecha indica la proteína TCP17.

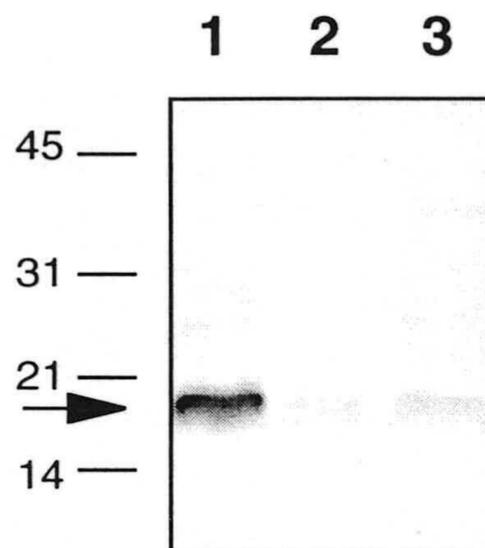


Figura 28. Análisis de la expresión de TCP17 en los diferentes estadios del parásito. Las proteínas de los tres estadios del parásito fueron separadas electroforéticamente y transferidas a PVDF. Para el Western blot se utilizó el suero anti-TCP17. 1, epimastigotes; 2, amastigotes; 3, tripomastigotes. La flecha indica TCP17 de 17 kDa.

C.2.5.5 Inmunofluorescencia indirecta (IFI).

Los estudios de IFI se realizaron fijando las células a portaobjetos. En el proceso de fijación se utilizó acetona, que perfora a las membranas permitiendo el pasaje de macromoléculas. Las células fijadas se incubaron con el suero anti-TCP17. Como control se utilizó suero preinmune. El segundo anticuerpo conjugado a fluoresceína se usó para poder visualizar la localización celular de TCP17 en microscopio de fluorescencia. Además, en la dilución del segundo anticuerpo se puso azul de Evans, que bajo luz fluorescente emite rojo. Como se ve en la figura 29 TCP17 es una proteína que se distribuye por toda la célula de manera homogénea.

Para ver si TCP17 está asociada a membrana, se fijaron los parásitos con formaldehído de forma de no permeabilizar la membrana. La figura 30 muestra que en los parásitos incubados con anti-TCP17 se detecta fluorescencia, no así en los incubados con el suero preinmune, lo que sugiere que esta proteína se encuentra también del lado externo de la membrana plasmática.

C.2.5.6. Inmunomicroscopía electrónica (IME).

Para confirmar los resultados hallados en el numeral anterior se procedió a realizar microscopía electrónica. Esta fue realizada por el Dr. J.C. Engel en la Universidad de

California, utilizando criosecciones del parásito e incubándolas con el suero anti-TCP17 conjugado a oro coloidal. Nuevamente con esta técnica se observa un resultado similar (figura 31): la proteína se distribuye por todo el citoplasma celular. Sin embargo cabe señalar que es notoria su asociación con membranas tanto plasmática (figura 32) como vacuolar (figura 33), y tal como lo sugería la IFI, del lado externo de la membrana. También se la encontró asociada al aparato de Golgi (figura 34).

DISCUSION

1. Organización genómica de los genes *ptr1* y *tcp17*.

1.1. Número de copias y localización cromosómica.

Las bandas obtenidas en los ensayos de Southern blot muestran que *ptr1* es un gen de copia única, coincidiendo con los genes *ptr1* de *Lesihmania*. Por otra parte tanto el gen *tcpgp2* (Dallagiovanna, 1996) como *tcp17* son genes de copia única, indicando que estos genes sólo se encuentran presentes en la región genómica que hemos estudiado.

Los estudios de electroforesis de campo pulsado muestran que ambos genes se localizan en dos cromosomas de 0,9 y 1,2 Mb. La señal obtenida por hibridación es de la misma intensidad para ambos cromosomas y para ambas sondas *ptr1* y *tcp17*. Una posible explicación es que exista polimorfismo alélico y que las bandas obtenidas correspondan a dos cromosomas homólogos de diferente tamaño. Si bien la ausencia de condensación de los cromosomas de *T. cruzi* ha dificultado la determinación de su ploidía, diferentes estudios sugieren que la especie es diploide (Gibson y Miles, 1986; Henricksson y col., 1990). Las diferentes cepas de *T. cruzi* presentan una gran plasticidad en su organización cromosómica con un gran polimorfismo entre ellas (Gibson y Miles, 1986; Aymerich y col., 1989). La existencia de cromosomas alélicos de diferente tamaño ha sido descrita previamente en cepas clonadas y salvajes (Henricksson y col., 1990).

Por último, el perfil de genes de copia única obtenida por Southern blot sugiere que ambas copias alélicas presentan la misma organización.

1.2. La expresión de *ptr1* y *tcp17*.

El gen *ptr1* no pudo ser detectado en ensayos de Northern blot usando sondas de altas actividades específicas, independientemente de que se usaran ARNs totales o ARN enriquecido en la fracción poliadenilada. Los mismos filtros rehibridados con la sonda *tcp17* mostraron señal, como se comentará más adelante. Sin embargo hemos demostrado que el gen *ptr1* se transcribe y se traduce. La transcripción fue demostrada por RT-PCR utilizando oligonucleótidos tanto del miniexón como de la cola poliA (secciones C.1.3.2 y C.1.3.3 respectivamente), y la traducción fue demostrada por su detección con anticuerpos policlonales, como se comentará más adelante. La

imposibilidad de detectar transcritos en Northern blot indica que la población de mRNA para el gen *ptr1* está por debajo de los límites de sensibilidad del Northern blot, debido a una baja concentración de mensajeros. Esta baja concentración puede deberse a una baja tasa de transcripción o a una alta inestabilidad de los mensajeros, o dicho de otra forma, una degradación importante de los mismos. Esta característica de mensajeros inestables ha sido postulada como un mecanismo relevante de regulación de la expresión génica en tripanosomátidos (Gibson y col., 1988, Revelard y col., 1993). Cabe destacar que en *Leishmania* tampoco fue posible detectar por Northern blot mRNA correspondientes al gen *ptr1* (Papadopoulou y col., 1992), indicando que la baja concentración de transcritos sería una característica propia de este gen.

El análisis de la transcripción del gen *tcp17* también se estudió por Northern blot utilizando ARN poliadenilado de los tres estadios de *T. cruzi*. *tcp17* se expresa en los tres estadios del parásito con una señal de similar intensidad, indicando que el gen se transcribe constitutivamente. El tamaño del transcrito fue de aproximadamente 0,9 kb, lo cual es compatible con los sitios de adición de miniexón y poliadenilación, ya que sumados se obtiene un transcrito de 868 nt, a lo que hay que sumar la cola poliA.

Para ambos genes se estudiaron también los sitios de adición del miniexón y de la cola poli A. En el gen *ptr1* se vio que el miniexón se adiciona en la posición -30 con respecto al codón de iniciación de la traducción. Este sitio corresponde al dinucleótido AG, tal como se ha descrito para genes de tripanosomátidos. Además, a 4 nucleótidos corriente arriba del sitio AG existe una secuencia de polipirimidinas que se ha descrito que dirigiría el proceso de adición del miniexón. En el caso de *tcp17* el sitio de adición de miniexón también es el dinucleótido AG, y se encuentra en la posición -45 con respecto al codón de iniciación de la traducción, y a 3 nucleótidos corriente arriba se encuentra la región rica en polipirimidinas.

Para localizar el sitio de poliadenilación se realizó RT-PCR utilizando un oligonucleótido que se hibridó a la cola poli A. En ambos casos se pudo determinar el sitio de poliadenilación, y cabe destacar que no existen en la correspondiente región genómica tramos poliA que pudieran generar falsos positivos. En el caso de *ptr1* el sitio de poliadenilación se encuentra a 414 nucleótidos del codón de terminación, y el sitio de adición de la cola poli A está precedido por una G. Esta es una característica que había sido descrita para los tripanosomátidos (cita). Sin embargo, el análisis del sitio de poliadenilación de *tcp17* muestra que esta no es una condición necesaria: este sitio se encuentra a 340 nucleótidos del codón de terminación y está precedido por una T. Tanto para *tcp17* como para *ptr1* el comienzo de la cola poliA se corresponde con la presencia de un residuo A a nivel genómico. Este resultado es comparable a lo descrito para *T.*

brucei en donde la poliadenilación ocurre en uno o más residuos A (Mattwes y col., 1994, Schurch y col., 1994). En *T. cruzi* posteriormente también se describieron sitios de poliadenilación en residuos A precedidos tanto de T como de G (Nozaki y Cross, 1995).

Cabe señalar también que no se han encontrado en los genes de tripanosomátidos secuencias consenso de poliadenilación. Nuevamente aquí *tcp17* constituye una excepción ya que corriente arriba del sitio poliA se halla una secuencia AAUAAA característica de eucariotas. Este resultado creemos que debe ser relativizado ya que este tipo de secuencias no ha sido descrito en tripanosomas, y además la región intergénica entre *tcp17* y *tcpgp2* presenta varios sectores ricos en A y T. Nuevos estudios de expresión serán necesarios para determinar la importancia relativa de esta secuencia en el mecanismo de poliadenilación. Por último, los estudios comparativos de la región 3' de *tcp17* y *ptr1* con respecto a los respectivos sitios de poliadenilación no mostraron ninguna secuencia que estuviera presente en ambos casos.

Para estudiar la expresión de las proteínas PTR1 y TCP17 se clonaron sus genes en el vector de expresión pQE30 y se expresaron en *E. coli*. En ambos casos la inducción de la proteína fue claramente observable en geles de poliacrilamida y la purificación fue mayor del 95% por cromatografía de afinidad. La producción de anticuerpos policlonales se hizo en conejos inmunizándolos con proteína purificada y en ambos casos se obtuvieron títulos mayores de 1:120000 al ser analizados por ELISA. Los anticuerpos obtenidos se utilizaron en ensayos de Western blot para conocer la expresión de la proteína a lo largo del ciclo de vida del parásito.

El Western blot utilizando el suero anti-TCP17 muestra que esta proteína se expresa diferencialmente, presentando una alta expresión en el estadio epimastigota, mientras que su presencia en los estadios amastigota y tripomastigota es apenas detectable. Este resultado indica que *tcp17* se encuentra regulado a nivel post-transcripcional, ya que en los estudios de Northern blot se ve que el gen se transcribe constitucionalmente en los tres estadios. Cuando se utilizó el suero anti-PTR1 en los ensayos de Western blot se observó el mismo resultado: PTR1 es una proteína de expresión diferencial, expresada únicamente en el estadio epimastigota. Cabe señalar aquí que el suero anti-PTR1 reconoce también a otra proteína de 16 kDa de alta expresión. Dado que PTR1 pertenece a una superfamilia de deshidrogenasas, una posible explicación para este resultado es que este reconocimiento cruzado responda a dos proteínas con similitud de secuencia. PTR1 se detecta como una banda tenue que sugiere una baja expresión de la proteína. Por otra parte la banda de 16 kDa sugiere una proteína de alta expresión, que además se expresa constitutivamente en los tres estadios del parásito. Este reconocimiento cruzado nos permite sin embargo asegurar la

expresión diferencial de PTR1, ya que la banda de 16 kDa, al detectarse en los tres estadios del parásito constituye un control positivo del Western blot.

Para analizar los resultados de expresión obtenidos debemos recordar que varios trabajos en distintos tripanosomátidos indican claramente la implicancia de las regiones 3' no traducidas (que abreviaremos RNT-3') en la regulación de la expresión génica. Estas regiones tienen además un rol principal en la expresión diferencial, y el patrón de expresión de genes diferencialmente expresados puede ser reproducido exactamente ubicando su RNT-3' corriente abajo de un gen reportero o un marcador seleccionable (Berberof, 1995, Nozaki y Cross, 1995, Ramamoorthy, 1995, Charest, 1996). En experimentos realizados por Nozaki y Cross (1995) se transfectó *T. cruzi* con construcciones que tenían el gen de la luciferasa seguido de RNT-3' de genes estadio-específico y genes constitutivos. En epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* las RNT-3' de *gp85* (gen estadio-específico de tripomastigotas) y amastina (gen estadio-específico de amastigota) inhiben la transcripción del gen de la luciferasa (Nozaki y Cross, 1995). Por otra parte, la misma construcción RNT-3' de la amastina aumenta en amastigotas la actividad luciferasa 100 veces, con respecto a la actividad observada en epimastigotas (Nozaki y Cross, 1995). Esta actividad se correlaciona con la diferencia observada en los niveles de ARNm para la luciferasa (Nozaki y Cross, 1995), y es un fenómeno general, en el que la RNT-3' condiciona estabilidad del ARNm. Fenómenos similares han sido descritos en eucariotas superiores como es el caso del mRNA de la transferrina (Mullner y col., 1989). Su RNT-3' presenta una zona sensible al ataque de una endonucleasa específica (Leibold y col., 1990). Este sitio es reconocido por una proteína reguladora que une hierro: en ausencia de hierro se une a la RNT-3' e impide su ataque por la endonucleasa, mientras que en presencia de hierro el complejo proteína-ARN se disocia, permitiendo la degradación del ARN por la endonucleasa (Mullner y col., 1989). En los tripanosomátidos se ha postulado un mecanismo similar, en el que la presencia de reguladores positivos o negativos específicos de cada estadio estabilizarán o inducirían la degradación del mRNA por unión a la RNT-3'.

Un hecho más llamativo aún resulta el caso del efecto directo que las RNT-3' de los tripanosomátidos tienen sobre la traducción. La construcción del gen de la luciferasa con la RNT-3' de *gp72* (gen estadio-específico de epimastigota) induce en el estadio epimastigota un aumento de la traducción de la luciferasa sin afectar su tasa de transcripción (Nozaki y Cross, 1995). Este mismo efecto de una RNT-3' sobre la traducción se observa en los genes PARP, específicos del estadio procíclico de *T. brucei*. Cuando se utiliza el gen CAT como reportero con la RNT-3' de PARP la actividad enzimática disminuye más de 100 veces en las formas circulantes, mientras que los niveles de ARNm sólo disminuyen 10 veces (**el propio PARP98**), indicando

que la RNT-3' de PARP afecta directamente la traducción del gen. Una de las hipótesis planteadas para explicar la influencia de las RNT-3' sobre la traducción es también la existencia de reguladores positivos y negativos estadio específicos que a través de la unión a estas regiones afecten la eficiencia traduccional.

Todos estos elementos nos permiten dar una posible explicación a los resultados que hemos obtenido en los estudios de transcripción y traducción de los genes *tcp17* y *tcp1r1*.

En el caso del gen *tcp17* se observa que la transcripción del gen es similar en los tres estadios del parásito, mientras que por Western blot se puede ver claramente que este es un gen estadio-específico, expresado en epimastigota. Por tanto, y teniendo en cuenta que las RNT-3' son las principales responsables de la expresión diferencial en tripanosomátidos, la explicación sería que la RNT-3' de *tcp17* no ejerce ningún efecto sobre la estabilidad del mRNA, dado que no existen diferencias significativas entre los tres estadios. En cambio si existiría un efecto sobre la eficiencia de traducción. Una forma de demostrar esta hipótesis sería con el uso de un gen reportero al que se le colocara corriente abajo la RNT-3' de *tcp17*, y comparar tanto los niveles de mRNA como la traducción en los tres estadios del parásito.

En el caso de *ptr1* no fue posible detectar transcritos por Northern blot. Sin embargo el gen se traduce de una forma estadio específica, y al igual que *tcp17*, únicamente se expresa en el estadio epimastigota. En este caso nuestra hipótesis es que existe también una acción directa de la RNT-3' sobre la eficiencia de traducción, y que esta acción es estadio específica, de forma de permitir que *ptr1* sólo se exprese en epimastigotas. En cambio la estabilidad del ARN estaría afectada de igual forma en los tres estadios. Esta inestabilidad que tiene como consecuencia la baja concentración de ARNm no parece ser dependiente de estadio, y una posible explicación es que su rol sea mantener bajos niveles de expresión de la proteína. Es posible que también la RNT-3' sea responsable de la inestabilidad de estos mensajeros, dado que esta es una característica de los tripanosomátidos.

Una hipótesis alternativa que debe ser tenida en cuenta es la existencia de una regulación de tipo policistrónica en *T. cruzi*, ya que además, estudios preliminares indican que la proteína TCPGP2 también se expresa solamente en el estadio epimastigota. La expresión diferencial en el mismo estadio de tres genes contiguos en el genoma recuerda al modelo del operón. Se ha descrito hasta ahora que los genes se transcriben como policistrones pero que inmediatamente son procesados para estar regulado cada uno de una forma independiente. Sin embargo recientemente se ha descrito en varios tripanosomátidos (*Leishmania*, *T. brucei*, *T. cruzi*) la presencia de un

locus que presenta 3 proteínas G diferentes aunque probablemente con funciones relacionadas (cita98), y la organización de este *locus* se conserva en todos esos tripanosomátidos. De igual manera ocurre con los genes de la transialidasa y los de las glicoproteínas similares a mucinas, que son los principales aceptores de ácido siálico en *T. cruzi* (60 del paper anterior, Kelly), que se encuentran contiguos en el genoma. Estos ejemplos de ligamiento físico entre genes relacionados funcionalmente nos lleva a pensar en la existencia de otros mecanismos de regulación además de los post-transcripcionales. En el caso del locus que hemos estudiado, si bien no podemos hablar de una relación funcional entre los genes, si podemos decir que existe un agrupamiento de genes que se expresan diferencialmente y en el mismo estadio. Más aún, hemos encontrado el gen *ptr1* contiguo al gen *tcpgp2*, y esta organización es muy similar a la de *Leishmania*: la *ptr1* en estos parásitos se encuentra corriente abajo del gen *pgpA*, que a su vez presenta una importante homología con *tcpgp2*. Los modelos de regulación post-transcripcional por RNT-3' y un modelo de tipo operón no son mutuamente excluyentes sino complementarios: ambos podrían operar, aunque todo parece indicar que el primero sería el de mayor relevancia.

3 -La secuencia del gen *tcptr1*.

A partir de un clon genómico de una genoteca de λ EMBL3 de *T. cruzi* se analizaron las secuencias flanqueantes 5' y 3'. En la región 3' se encontró un marco abierto de lectura de 828 nucleótidos, correspondientes a 276 aminoácidos, y con un peso molecular de 30 kDa. Los estudios de homología mostraron que este gen codifica para la enzima pteridín reductasa. Esta enzima fue descrita en *Leishmania*, y pertenece a la familia de las deshidrogenasas/reductasas de cadena corta (SDR). Estas enzimas están muy extendidas en la escala evolutiva y participan en reacciones de óxido-reducción que pueden ir desde el metabolismo glucídico en bacterias hasta el metabolismo de esteroides en mamíferos (Citas de MO98: Baker94, Krozowsky94, Jornvall95). Esta familia presenta dos características estructurales comunes a todos sus miembros.

La primera involucra no sólo a las SDR sino a las deshidrogenasas en general (MO:Rossman 75, Bocanegra93), y es la presencia en la región N-terminal de la secuencia Gly-X5-Gly (Jornvall,95). Esta secuencia señalada en la figura...participa en la unión de la enzima con la coenzima NAD(H) o NADP(H). La especificidad de coenzima ha sido atribuida en parte a la presencia de un Asp ubicado aproximadamente a 20 residuos de este motivo, cuya presencia o ausencia se correlacionaría con la unión

a NAD(H) o NADP(H) respectivamente (Jornvall 95, MOuelette 97). Cabe señalar aquí que este residuo no se encuentra en la TcPTR1, por lo que cabría esperar que esta enzima utilizara NADP(H) como coenzima.

La segunda característica es propia de las SDR, y es la presencia del motivo Tyr-X3-Lys. La cristalización de dos SDR, la $3\alpha/20\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (del Biochem95: Ghosh 91 y 94) y la dihidropteridin reductasa (del Biochem95: Varughese 92), mostraron que estos residuos se encuentran formando parte del sitio activo de la enzima, postulándose que participan directamente de la catálisis. Los estudios de mutagénesis del residuo Tyr dan como resultado la inactivación completa de la enzima (pag 1 MO, marcado). Este motivo Tyr-X3-Lys también se encuentra presente en TcPTR1, por lo que su estructura primaria se corresponde claramente con la familia SDR.

4. La función del gen *ptr1*.

4.1. Transfección de *Trypanosoma cruzi* con el gen *ptr1*.

El desarrollo de vectores de transfección para tripanosomátidos ha permitido disponer de una valiosa herramienta para el conocimiento de funcionalidad de diversos genes. Estos vectores permiten la sobreexpresión de un determinado gen de manera estable mediante la amplificación de la copia introducida como un ADN circular extracromosómico.

Una vez caracterizado el gen *ptr1* tanto a nivel genético y de expresión, decidimos estudiar el fenotipo de células que sobreexpresaran *ptr1*, interesándonos saber principalmente si las células transfectadas eran capaces de conferir resistencia a antifolatos. Para la transfección utilizamos el vector pTEX, un plásmido desarrollado por Kelly y col.(1992) que ha sido utilizado previamente con éxito para sobreexpresar el gen de la tripanotión reductasa en *T. cruzi* y *L. donovani*, lográndose niveles de sobreexpresión del gen del orden de 15 veces (Kelly y col., 1993). pTEX está diseñado a partir de las secuencias intergénicas del tandem formado por el par de genes que codifican para la gGAPDH y de las secuencias 5' y 3' adyacentes a este tandem subclonadas en pBS KS. Como marcador de selección lleva una copia del gen *neo*.

La transfección se realizó por electroporación de los parásitos, en una relación de 100 μ g de ADN cada 80 millones de parásitos. Los parásitos fueron seleccionados con neomicina comenzando con una concentración de 150 μ g/ml que se aumentó en

pases sucesivos hasta una concentración final de 2 mg/ml. Los controles usados fueron parásitos electroporados en ausencia de ADN que se murieron a las dos semanas de estar en presencia de la neomicina.

Los parásitos resistentes a neomicina se analizaron por Southern blot, utilizando enzimas que liberan al gen *ptr1* del plásmido, y comparando los perfiles de ADN de parásitos transfectados con pTEX con respecto a aquellos transfectados con pTEX-PTR1. El resultado del Southern indica que el gen *ptr1* había sido introducido y se encontraba en un número de copias de aproximadamente 7 veces. El número de copias obtenido no es muy elevado si lo comparamos con lo que se obtiene al transfectar *Leishmania*, pero fue suficiente para realizar los estudios de resistencia. La expresión del gen se analizó por Western blot, y se pudo comprobar que la proteína PTR1 se encontraba sobreexpresada en los transfectantes pTEX-PTR1, mientras que la expresión de PTR1 en los transfectantes pTEX fue similar a la observada en parásitos salvajes. El nivel de sobreexpresión obtenido concuerda con el número de copias extra del gen. En estos ensayos de Western blot el anticuerpo reconoce con igual intensidad en todas las muestras al péptido de 16 kDa, independientemente de los diferentes niveles de expresión, lo que vuelve a indicar que este péptido no constituye un producto de degradación.

Para las experiencias con antifolatos se comparó la sensibilidad a fármacos de los transfectados con pTEX con respecto a los transfectados con pTEX-PTR1 y se determinaron las DI50 para los fármacos metotrexato, aminopterina, trimetoprim y pirimetamina, todos inhibidores de la enzima DHFR-TS. Los resultados obtenidos indican que los parásitos transfectados con *ptr1* son resistentes a aminopterina, metotrexato y trimetoprim, siendo respectivamente 10, 5 y 5 veces menos sensibles que la línea control. Sin embargo no existen diferencias significativas en la sensibilidad a pirimetamina. Este resultado coincide con la *ptr1* de *Leishmania*. Para estudiar el efecto de fármacos sobre el crecimiento de los parásitos se realizó una curva de crecimiento en presencia de aminopterina, observándose a partir del 3er día una importante caída en la concentración de parásitos transfectados con pTEX, mientras que en aquellos transfectados con pTEX-PTR1 el fármaco no afectó de manera significativa el crecimiento de los parásitos. Estos resultados demuestran que también en *T. cruzi* PTR1 es capaz de conferir resistencia a los antifolatos. En *Leishmania* el mecanismo por el cual este gen confiere resistencia es a través del salvamento de pteridinas que, por mecanismos no conocidos, se pueden transformar en tetrahidrofolato, o directamente a través de la reducción completa del folato. Para investigar si en *T. cruzi ptr1* es capaz de catalizar la reducción de folatos y pteridinas decidimos estudiar la actividad enzimática de la proteína.

4.2-Actividad Enzimática de la pteridina reductasa

La enzima PTR1 fue descrita únicamente en *Leishmania* en asociación con la resistencia a inhibidores de la enzima DHFR-TS o antifolatos (Callahan y Beverley, 1992, Papadopoulou y col., 1992). Estudios posteriores en esos parásitos demostraron que esta enzima es capaz de conferir resistencia debido a que constituye una vía alternativa de reducción del ácido fólico, aunque es la biopterina el sustrato para el cual presenta la mayor actividad específica (Bello y col., 1994, Wang y col., 1997).

Para estudiar la actividad de la PTR1 de *T. cruzi* se utilizó la proteína purificada a partir de pQE30. En primer lugar se estandarizaron las condiciones de purificación ya que la enzima al ser eluída con imidazol no presentó actividad, y al intentar eliminar el imidazol por diálisis la proteína precipitaba. Como método alternativo de elución de la columna de afinidad se utilizó un tampón de pH 4 (que por sí sólo no fue capaz de liberar la proteína) y NaCl 1M. Con el aumento de la fuerza iónica en un medio ácido se pudo obtener la proteína en forma activa. Para fijar las condiciones de reacción se trabajó con biopterina como sustrato, y se analizó la actividad utilizando tres pHs: 4,7, 6,0 y 7,0, a 30°C. La mayor actividad se obtuvo a pH 6, al igual que la PTR1 de *L. tarentolae*. En *L. major* el pH óptimo descrito fue de 4,7. Estas diferencias entre leishmanias y la mayor similitud en la relación pH/actividad de la PTR1 de *T. cruzi* con la de *L. tarentolae* no se corresponden con una mayor homología de secuencias, ya que la enzima de *T. cruzi* presenta la misma homología (casi 59 %) con ambas enzimas. Un elemento a tener en cuenta aquí es que las tres enzimas fueron clonadas en distintos sistemas de expresión, lo cual puede traducirse en pequeñas diferencias cinéticas.

Una vez fijadas las condiciones de reacción se estudió la actividad utilizando varios sustratos. En primer lugar se estudió la especificidad de coenzima. La enzima fue capaz de reducir biopterina en presencia de NADPH pero no en presencia de NADH. Esta parece ser entonces una característica de las PTR ya que tampoco en *Leishmania* se detectó actividad cuando se usó NADH como coenzima. Este resultado está en concordancia con la ausencia de un residuo aspártico 20 aminoácidos por delante del motivo N-terminal G-X5-G: todas las SDR que presentan ese residuo utilizan NADH como coenzima, y las que no lo presentan utilizan NADPH (Jörnvall y col., 1995).

La especificidad de sustrato se estudió mediante medidas de actividad específica para diferentes folatos y pteridinas, comprobándose que la enzima es capaz de reducir biopterina, dihidrobiopterina, folato y dihidrofolato. La actividad observada fue mayor

estudios con *Crithidia*, como un factor imprescindible para el crecimiento de estos tripanosomátidos (Nathan y Cowperthwaite, 1955, Kidder y Dutta, 1958). En segundo lugar, los mutantes nulos para el gen *ptr1* en *Leishmania* son incapaces de sobrevivir en un medio sin biopterina (Bello y col., 1994), y el agregado de folato no suple esta carencia de biopterina, lo cual demuestra la importancia de la biopterina por sí sola. Sin embargo el o los roles de la biopterina en los tripanosomátidos no han sido determinados. En humanos la biopterina sirve como cofactor en diferentes procesos como la hidroxilación de la fenilalanina (Kaufman, 1963), el clivaje de grupos alquil-éter (Tietz y col. 1964) o la biosíntesis de óxido nítrico (Tayeh y Marletta, 1989), pero desafortunadamente nada se sabe aún sobre estos procesos en tripanosomátidos.

Para determinar las constantes cinéticas de PTR1 se utilizó biopterina y NADPH como sustratos. Cuando se varió la concentración de uno de los sustratos y se mantuvo fijo el otro en condiciones de saturación se obtuvo una cinética de tipo Michaelis-Menten, y los valores de K_m para los sustratos biopterina y NADPH fueron de 21,3 μM y 17,0 μM respectivamente, mientras que las constantes catalíticas fueron de 0,43 y 0,46 respectivamente. El valor de K_m para la biopterina es muy similar a los valores obtenidos para las enzimas de *L. major* y *L. tarentolae*, que son de 12,2 μM y 10,9 μM respectivamente (Nare y col., 1997), así como los de NADPH que para la enzima de *L. tarentolae* es de 16,9 μM (Wang y col., 1997). Como vemos, se trata de una enzima que presenta un amplio rango de sustratos pero que presenta baja actividad. Así por ejemplo en *Leishmania* la DHFR-TS tiene una actividad de un orden de magnitud mayor que la PTR1, mientras que en *T. cruzi* esta diferencia sería de dos órdenes de magnitud.

A modo de resumen se esquematiza el modelo propuesto para el metabolismo de las pteridinas y folatos en la siguiente figura, en donde el grosor de las flechas corresponde a la contribución relativa de cada enzima.

Los datos presentados sugieren que en un diseño de quimioterapia que tenga como blanco de acción a la DHFR-TS se debe tener en cuenta que la PTR1 puede actuar reduciendo el dihidro folato. Por tanto, una quimioterapia efectiva sería a través del diseño de inhibidores para ambas enzimas, lo cual podría requerir el desarrollo de dos compuestos separados dirigidos contra cada una de las enzimas. Sin embargo, dado el solapamiento estructural entre los sustratos de ambas enzimas también es concebible la posibilidad de generar un único compuesto que las inhiba a ambas. En esta línea de investigación se han estudiado una serie de compuestos químicos aunque sin potentes actividades de inhibición (Hardy y col., 1997). Uno de los compuestos estudiados

para la biopterina que para el folato, y la enzima mostró una mayor actividad para las formas oxidadas de las especies estudiadas. Por otra parte no se detectó ninguna actividad cuando se usaron las pteridinas neopterina y sepiapterina. También se analizó la reacción inversa, usando NADP^+ y NAD^+ como coenzimas, y las formas reducidas de los sustratos, pero no se observó ninguna actividad. Por tanto, PTR1 cataliza la reducción de biopterina y dihidrobiopterina, y de folato y dihidrofolato, aunque esta última con mucha menor eficiencia que la enzima DHFR-TS. Sin embargo, en situaciones en que la DHFR-TS está inhibida, ésta sería una vía alternativa de reducción de folatos. Este resultado explicaría porqué los parásitos transfectados con *ptr1* presentan menor sensibilidad a los antifolatos: cuando la DHFR-TS se encuentra inhibida la producción de tetrahydrofolato es posible por acción de PTR1. Por otra parte, y teniendo en cuenta que la principal actividad de PTR1 es para el sustrato biopterina, debemos recordar aquí que varios trabajos sobre requerimientos nutricionales de kinetoplástidos demuestran que existe una conexión entre el metabolismo de los folatos y las pteridinas. En primer lugar, las experiencias con *Leishmania* en medios químicamente definidos demuestran que estos parásitos tienen un requerimiento absoluto de folatos en el medio debido a su incapacidad de realizar síntesis *de novo* (Scott y col., 1987). En segundo lugar, si la deficiencia en folatos en el medio de cultivo se suple con el agregado de biopterina, tanto *L. major* (Pettillo-Peixoto y col., 1988) como *L. donovani* (Kaur y col., 1988) son capaces de proliferar. Además se ha demostrado que no sólo la biopterina suple esta deficiencia sino también una amplia variedad de pteridinas (Beck y Ullman, 1990). Este mismo efecto había sido sugerido muchos años atrás en *Chritidia fasciculata* (Kidder y col., 1958). Por último, utilizando biopterina marcada radiactivamente se demostró que como *L. donovani* es capaz de transformarla a tetrahydro folato (Beck y Ullman, 1991). Estos datos, sumados a la amplia especificidad de sustratos de PTR1 indican que esta enzima es responsable del salvamento de pteridinas y folatos, y su fundamental importancia radica en que los kinetoplástidos son auxótrofos para estos compuestos. Por tanto, no sólo constituyen una vía alternativa a la de la DHFR-TS catalizando la misma reacción, sino que además la captación de biopterina puede ser derivada a la síntesis de folatos reducidos. No se conoce el mecanismo bioquímico por el que se produce esta conversión, y su conocimiento será de fundamental importancia en el diseño de inhibidores de la síntesis de tetrahydrofolato.

Un último punto muy importante a destacar es que hasta ahora hemos discutido la influencia de PTR1 sobre el metabolismo del folato, pero que su principal sustrato es la biopterina. Es muy poco lo que se sabe del metabolismo de la biopterina en tripanosomátidos, pero varias líneas de evidencia sugieren un rol crucial para este metabolito. En primer lugar recordaremos que la biopterina fue descrita inicialmente en

inhibe ambas enzimas, pero desafortunadamente este compuesto no presenta actividad cuando se traslada al modelo de infección en ratón (Nare y col., 1997).

6. La secuencia del gen *tcp17* y la descripción de una familia de proteínas conservada a lo largo de la escala evolutiva.

Al analizar la región 5' del gen *tcpgp2* encontramos la presencia de un marco abierto de lectura a 831 nucleótidos corriente arriba del codón de iniciación de *tcpgp2*. Este marco de 483 pb codifica para una proteína de 160 aminoácidos con un peso molecular deducido de 16,5 kDa a la que denominamos *tcp17*. Al analizar la homología de *tcp17* en los bancos de datos encontramos que como resultado de los diferentes proyectos genomas existían varios genes de función desconocida que presentaban homologías con *tcp17*. Estos genes pertenecían a los más variados organismos, desde bacterias hasta mamíferos, y se les denominó como la familia YER057c, por ser este el nombre del primer gen de la familia inscripto en el GenBank. No existe bibliografía sobre dicha familia, salvo una mención en PROSITE con el código PDOC00838 (localización en INTERNET: <http://www.expasy.ch/sprot/prosite.html>) en donde se incluyen 11 de los 20 genes descritos hasta la fecha. Allí también se define la siguiente "firma" de la familia: P-[AT]-R-[SA]-X-[LIVMY]-X(2)-A-X-L-P-X(4)-[LIVM]-E. Sin embargo, cuando realizamos el alineamiento aminoacídico encontramos que esta secuencia no aparece en varios de los miembros y por tanto es insuficiente a los efectos de la definición de la familia. Por tanto, analizando los aminoácidos que se encuentran 100% conservados, ya sea idénticos u homólogos hemos definido dos nuevas "firmas" de la familia, una N-terminal: [IV]-X(4)-[AV]-[AP]-X-[AP]-X(3)-Y-X(9)-[LIVF]-X(2)-[SA]-G-[QS], y otra C-terminal: [AT]-R-X(2)-[IVFY]-X-[VC]-X(2)-L-P-X(4)-[LIVM]-E-[IVM]-[DE]. Para confirmar que esta definición era correcta hemos comparado estas secuencias con los bancos SWISS-PROT y TREMBL usando el programa Expasy Scan Prosite (Appel, 1994; localización en INTERNET: <http://www.expasy.ch/sprot/>) y el resultado obtenido para ambas secuencias fue que únicamente los miembros de la familia YER057c fueron detectados.

Dado que muchos de los genes de la familia YER057c descritos lo fueron en proyectos genoma, muchos de ellos se encuentran secuenciados en el contexto de todo un *locus*. Por tanto decidimos observar en esos casos qué genes se encontraban cercanos a los miembros de YER057c, y sorprendentemente encontramos que, al igual que en *T. cruzi*, en varios organismos estos genes se encuentran en regiones donde existen genes para transportadores ABC. En *Mycobacterium tuberculosis*, el gen *MTV025.025c* se encuentra contiguo a dos genes ATPasa transportadores de aniones. En *Helicobacter pylori*, el gen *HP0944* está en el mismo locus que tres

transportadores de aminoácidos. El gen *yhar* de *E. coli* está en el mismo locus que una permeasa de serina/treonina. Cabe aclarar que todos estos genes se encuentran en la misma orientación. Ya que en esos organismos procariotas los genes localizados cercanos se encuentran regulados de forma común, y muchas veces presentan funciones relacionadas, no podemos descartar una relación funcional entre los genes de la familia YER057c y los transportadores de membrana. También el gen *YER057c* de *Sacharomyces cerevisiae* se encuentra en el mismo locus que tres permeasas de purina/citosina.

Existe un grupo de genes dentro de esta familia denominados PSP-1 o UK114 que pertenecen a mamíferos y fueron descritos inicialmente como genes de mamíferos diferencialmente expresados en hígado y riñón (Levy-Favatiér y col., 1993, Oka y col., 1995, Ceciliani y col., 1996). La utilización de anticuerpos contra estas proteínas demostraron la presencia de las mismas en la superficie celular de células tumorales de varios tumores malignos humanos (Bartorelli y col., 1996). Estos genes además de pertenecer a la familia YER057c presentan en su mitad C-terminal una débil homología (25% de identidad) con HSP90 (Ceciliani y col., 1996), una chaperona molecular implicada en el plegamiento de proteínas *in vivo*. Cuando analizamos la misma región C-terminal en TCP17 encontramos que también presenta homología con otra chaperona, GroEL, una molécula bacteriana que también está implicada en el plegamiento de proteínas (Ewalt y col., 1997, Ellis, 1998), y esa homología es con la región apical de GroEL, que es la región directamente implicada en la unión a péptidos (Fenton y col., 1994). Una posible explicación a estas homologías podría ser la presencia de un dominio de interacción proteína-proteína en esta familia. Esta hipótesis, aunque especulativa, podría explicar la localización de TCP17 en la superficie celular de *T. cruzi* que se discutirá más adelante, ya que sus perfiles de hidrofobicidad no se corresponden con los de una proteína de membrana. Por otra parte, la localización genómica contigua a genes transportadores se vería también explicada.

6. Localización de TCP17.

Con el objetivo de analizar si TCP17 era también una proteína asociada a la membrana se analizó su localización por inmunofluorescencia e inmunomicroscopía electrónica utilizando el anticuerpo policlonal obtenido. Debido a la alta especificidad mostrada por Western blot no se purificaron las inmunoglobulinas sino que se procedió con diluciones del suero, y en ambos casos se utilizó como control negativo el suero preinmune a la misma dilución que el suero inmune.

Para la inmunofluorescencia se utilizó en la solución azul de Evans, ya que en ausencia de fluoresceína su incorporación a las células permite observarlas de color rojo en microscopio de fluorescencia, y la fluoresceína presente en el anticuerpo secundario, que constituye la señal positiva, de color verde. Además los parásitos se fijaron a los portaobjetos, y en un caso se conservó la membrana sin permeabilizar, mientras que en el otro se permeabilizó con acetona. Se trabajó con una dilución del suero 1:200, y tiempos de incubación de una hora en cámara húmeda. El análisis de los parásitos cuyas membranas fueron permeabilizadas con acetona muestra que TCP17 es una proteína ubicua que se distribuye por toda la célula. Incluso en el flagelo de los parásitos se detectó la proteína, distinguiéndose señal también en la membrana ondulante. Cuando se analizaron los parásitos cuyas membranas se mantuvieron impermeables se obtuvo también una distribución homogénea en toda la célula, incluyendo el flagelo. Y en ambos casos, en los controles con suero preinmune no pudo distinguirse ninguna señal de fluoresceína, indicando que no existe reconocimiento inespecífico. Estos resultados muestran que TCP17 es una proteína altamente expresada, como había sido observado también en los ensayos de western blot, y con una amplia distribución por toda la célula, lo cual habla a favor de la relevancia de la misma en estos parásitos. Además, el hecho de que se haya detectado en parásitos impermeables implica que se encuentra presente en la cara externa de la superficie celular. Esta ubicación está en concordancia con la localización descrita para el antígeno tumoral UK114 (Bartorelli y col, 1996).

Para confirmar esta localización se realizaron estudios de microscopía electrónica utilizando como control negativo el suero preinmune. La dilución utilizada fue de 1:500, y a dicha dilución no se observó ninguna señal con el suero preinmune. El resultado de la microscopía electrónica muestra nuevamente una amplia distribución de TCP17 en toda la célula. Sin embargo las mayores concentraciones se observaron en membrana plasmática, membranas de vesículas y aparato de Golgi. Cabe destacar que en las imágenes en que TCP17 está asociado a membrana la proteína se encuentra en su cara externa. Esta localización confirma el resultado de la inmunofluorescencia con membranas no permeabilizadas.

En resumen, los datos de inmunolocalización obtenidos indican que TCP17 es una proteína de alta expresión y ubicua, con una importante concentración en la cara externa de la membrana.

7- Análisis evolutivo de *Trypanosoma cruzi*.

Varios aspectos evolutivos de los tripanosomátidos permanecen sin ser elucidados. Estos organismos pertenecen a un orden, el kinetoplástida, donde existen

organismos de vida libre como parásitos, que es el caso de los tripanosomátidos. El estudio de las relaciones evolutivas de este último grupo tiene la importancia de aportar datos sobre el origen del parasitismo. Un elemento de fundamental importancia en el estudio de estos parásitos es la evidencia de que *T. cruzi* presenta una propagación clonal. Los distintos clones de estos parásitos han sido agrupados como zimodemas basados en sus perfiles isoenzimáticos (Widmer y col., 1985, Ready y col., 1980, Carneiro y col., 1990), esquizodemas basados en los perfiles de restricción del kADN (Morel y Simpson, 1980, Carneiro y col., 1990) y rapidemas basados en RAPD (Tibayrenc y col., 1993, Tibayrenc, 1995). Los trabajos de rapidemas muestran que existirían dos grupos I y II claramente diferenciados dentro de la especie *T. cruzi*. Por otra parte, recientemente se ha demostrado que la actividad promotora del gen rRNA del clon CL, perteneciente al grupo I, al ser transformado con el gen CAT como reportero, sólo presenta actividad en los clones del mismo grupo, y ninguna actividad pudo detectarse al transfectar parásitos del grupo II (Nunes y col., 1997).

Con el objetivo de confirmar esa división dentro de la especie *Trypanosoma cruzi* decidimos estudiar la región intergénica I, entre *tcp17* y *tcpgp2*, para analizar las relaciones y diferencias entre clones. Para que nuestro estudio pudiera compararse con los trabajos de zimodemas, esquizodemas y rapidemas hemos utilizado los mismos clones que en dichos trabajos, cedidos gentilmente por el Dr. Tibayrenc. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de la región intergénica corresponden a la región 3' codificante de *tcp17* y a la 5' codificante de *tcpgp2*. Las bandas obtenidas se secuenciaron completamente, se alinearon y a partir de sus secuencias se construyeron árboles filogenéticos. El resultado obtenido muestra es que existe una alta conservación de secuencia entre los distintos clones (mayor del 90%). El análisis filogenético demuestra claramente la división en dos grupos nítidamente diferenciados. Los dos grupos que hemos obtenido coinciden completamente con los descritos por el grupo del Dr. Tibayrenc (Tibayrenc y col., 1993, Tibayrenc, 1995). Otro elemento que surge del análisis es que el clon CL Brener, que es el clon de referencia del proyecto genoma de *Trypanosoma cruzi*, se encuentra en el grupo II, es decir, de aquellos zimodemas mayores de 30.

Por tanto, el método que hemos utilizado resultó ser útil para este análisis, y constituye una forma precisa de determinar estos aspectos evolutivos dentro de la especie, mostrando que existe una divergencia primitiva en *Trypanosoma cruzi* que permite subdividirla en los grupos I y II. Dentro del grupo I se encuentran aquellos clones de zimodema 22 o menor, y en el grupo II los clones de zimodema 30 o mayor. Si bien no hemos estudiado clones comprendidos entre los zimodemas 23 y 29, no existe una caracterización importante de estos clones a la fecha. Estos resultados

destacan la importancia de un estudio más profundo en la dilucidación de la especiación de *T. cruzi* y sus consecuencias, en particular en lo que tiene que ver con la sensibilidad a fármacos, con la virulencia y también con el tipo de lesiones producidas.

E. BIBLIOGRAFIA

Agabian, N. (1990). Trans splicing of nuclear pre-mRNAs. *Cell* 61: 1157-1160.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410

Andrade, SGM; Magalhaes, JB; Pontes, AL. (1985). Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. *Bulletin of the World Health Organization.* 63; 721-726.

Andrews, N.W; Hong, K; Robbins, E.S; Nussenzweig, V. (1987). Stage specific surface antigens expressed during morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. *J.Exp.Med.*167:300-314.

Appel, R.D., Bairoch, A., Hochstrasser, D.F. (1994). A new generation of information retrieval tools for biologists: the example of the ExPAS y WWW server. *Trends Biochem. Sci.* 19: 258-260.

Arnheim, N., Ehrlich, H.(1992) Polymerase chain reaction strategy. *Annu. Rev. Biochem.* 61:131-156.

Aviv, H; Leder, P. (1972). Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidilic acid cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 1408-1412.

Aymerich, S; Goldenberg, S.(1989) The karyotype of *Trypanosoma cruzi*.Dm28c: comparison with other *Trypanosoma cruzi*. strains and trypanosomatids. *Exp.Parasitol.* 69:107-115.

Bangs, JD; Crain, PF; Hashizume, T; McCloskey, JA; Boothroyd, JD. (1992). Mass spectrometry of mRNA Cap 4 Trypanosomatids reveals two novel nucleosides. *J. Biol. Chem.* 267: 9805-9815.

Barreiro, L.(1997). Caracterización molecular del gen *tcpgp1A* asociado con la resistencia a fármacos en *Trypanosoma cruzi*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

Bartorelli, A., Bussolatti, B., Millesimo, M., Gugliotta, P., Bussolatti, G. (1996). Antibody-dependent cytotoxic activity on human cancer-cells expression UK-114 tumor membrane antigen. *Int. J. Oncol.* 8, 543-548.

Beck, J.T.; Ullman, B.(1990) Nutritional requirements of wild-type and folate transport-deficient *Leishmania donovani* for pterins and folates. *Mol.Biochem.Parasitol.*, 43, 221-230

Beck, JT; Ullman, B.(1991) Biopterin conversion to reduced folates *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol.Biochem.Parasitol.* 49:21-28.

- Bello, AR; Nare, B; Freedman D; Hardy L; Beverley SM: (1994) PTR1: a reductase mediating salvage of oxidized pteridines and methotrexate resistance. . Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91:11442-11446.
- Berberof, M., Vanhamme, L., Tebabi, P., Pays, A., Jefferies, D., Welburn, S., Pays, E. (1995) The 3'-terminal region of the mRNA for VSG and procyclin can confer stage-specificity to gene expression in *T. brucei*. EMBO J. 14:2925-2934.
- Beverley, SM; Coderre, JA; Santi, DV; Schimke, RT. (1984). Unstable DNA amplifications in MTX-resistant *Leishmania* consist of extrachromosomal circles which relocalize during stabilization. Cell, 38:431-439.
- Bradford, MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 131, 499-503.
- Brener, Z., Chiari, C.(1963) Variacoes morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop.Sao Paulo 5:220-224.
- Brener, Z; Costa, CAG; Chiari, C. (1976). Differences in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains to active chemotherapeutic agents. Rev. Inst. trop. São paulo. 18: 450-455.
- **Bullock, W. O., Fernández, J. M. and Short, J. M.** (1987). XL1 blue: A high efficiency plasmid transforming *recA* Escherichia coli strain with Beta galactosidase selection. Biotechniques 5, 376-378.
- Callahan, HL; Beverley, SM. (1991) Heavy metal resistance: a new role for P-glycoproteins in *Leishmania*. J.Biol.Chem.266:18427-18430.
- Callahan, HL; Beverley, SM. (1992) A member of the aldoketoreductase family confers resistance to methotrexate in *Leishmania*. J.Biol.Chem.267:24165-24168.
- Carle, GF; Olson, M. (1985). An electrophoretic karyotype for Yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 3756-3760.
- Carneiro, M., Chiari, E., Goncalves, A.M., Silva Pereira, A.A., Morel, C.M., Romanha, A.J.(1990) Changes in the isoenzyme and kinetoplast DNA patterns of *Trypanosoma cruzi* strains induced by maintenance in mice. Acta Trop. 47:35-45.
- Castellani, O; Ribeiro, LV; Fernandez, JF. (1967). Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. J. Protozoology 14, 447-451.
- Castro, C; Hernández, R; Castañeda, M. (1981). *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA: internal break in the large molecular mass species and number of genes. Mol. Biochem. Parasitol. 16, 975-982.
- Cecilian, F., Faotto, L., Negri, A., Colombo, Y., Berra, B., Bartorelli, A., Ronchi, S. (1996). The primary structure of UK114 tumor antigen. FEBS Letters 393, 147-150.
- Chagas, C (1909) Nova tripanosomiasis humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*., agente etiológico da nova entidade mórbida do homem. Mem.Inst.Oswaldo Cruz, 1:159-219.
- Charest, H., Zhang, W.-W., Matlashewski, G. (1996) The developmental expression of *Leishmania donovani* A2 amastigote-specific genes is post-transcriptionally

mediated and involves elements in the 3'-untranslated region. J. Biol. Chem. 271: 17081-17090

Chen, J; Rauch, C. A; White, JH; Englund, PT; Cozzarelli, NR. (1995). The topology of the kinetoplast DNA network. Cell 80: 61-69.

Chiquero, M.J., Olmo, A., Navarro, P., Ruiz-Perez, L.M., Castanys, S., Gonzalez-Pacanowska, D., Gamarro, F.(1994). Amplification of the H locus in *Leishmania infantum*. BBA 1227:188-194.

Chomczynski, P; Sacchi, N. (1987). Single step method of RNA isolation by acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform extraction. Anal. Biochem. 162, 156-159.

Chu, G; Volbrath, D; Davis, R. (1986). Separation of large DNA molecules by contour clamped homogeneous electric fields. Science 234, 1582-1585.

Coderre,JA; Beverley, SM; Schimke, RT; Santi, DV. (1983) Overproduction of a bifunctional thymidilate synthetase-dihydrofolate reductase and DNA amplification in methotrexate-resistant *Leishmania tropica*. Proc.Natl.Acad.Sci.USA (80),2132-2136.

Cornelissen, AWCA; Verspieren, MP; Toulmé, JJ; Swinkels, BW; Borst, P. (1986). The common 5' terminal sequence of trypanosome mRNAs: a target for anti-messenger oligodeoxynucleotides. Nucleic Acids Res. 14: 5605-5614.

Dallagiovanna, B., Castanys, S., Gamarro, F. (1994). *Trypanosoma cruzi*: sequence of the ATP binding site of a P-glycoprotein gene. Exp. Parasitol. 79: 63-67.

Dallagiovanna, B.,Gamarro, F; Castanys, S. (1996). Molecular characterization of a P-glycoprotein-related *tcpgp2* gene in *Trypanosoma cruzi*. Mol.Biochem.Parasitol. 75:145-157.

De Castro, SL. (1993) The challenge of Chagas' disease chemotherapy: an update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. Acta tropica, 53: 83-98.

De Lange, T; Lui, AYC; Van der Ploeg, LHT; Tromp, MC; Van Boom, JH. (1983). Tandem repetition of the 5' mini-exon of variant surface glycoprotein genes: a multiple promoter for VSG gene transcription?. Cell 34: 891-900.

De Lange, T; Berkvens, TM; Veerman, HJG; Frasch, ACC; Barry, JD; Borst, P. (1984). Comparison of the genes coding for the common 5' terminal sequence of messenger RNAs in three trypanosome species. Nucleic Acid Res. 12: 4431-4443.

Devereux, J., Haebberth, P., Smithies, O.(1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for VAX. Nucleic Acids Res. 8:5725-5737.

Docampo, R; Moreno, SNJ. (1990). The metabolism and mode of action of gentian violet. Drug. Metab. Rev. 22: 161-178.

Ellenberg, TE; Beverley, SM. (1987) Reductions in methotrexate and folate influx in methotrexate-resistant lines of *Leishmania major* are independent of R or H region amplification. J.Biol.Chem.262:13501-13506.

Ellenberg, TE; Wright, JE; Rosowsky, A; Beverley, SM. (1989) Wild-type and drug resistant *Leishmania major* hydrolyze methotrexate to N-10-methyl-4-deoxy-4-aminopteroate without accumulation of polyglutamates. J.Biol.Chem.264:15960-15966

Ellis, R.J. (1998). Steric chaperones. TIBS 23, 43-45.

- Enzor CM, Tai HH. Site-directed mutagenesis of conserved tyrosine 151 of human placental NAD⁽⁺⁾-dependent 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase yields a catalytically inactive enzyme. (1991) *Biochim Biophys Res Commun* 176:840-844
- Ewalt, K.L., Hendrick, J.P., Houry, W.A., Hartl, F.U.(1997). In vivo observation of protein flux through the bacterial chaperonin system. *Cell* 90, 491-500.
- Feinberg, AP; Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132, 6-13.
- Fenton, W.A., Kashi, Y., Furtak, K., Horwich, A.L.(1994). Residues in chaperonin GroEL required for polypeptide binding and release. *Nature* 371: 614-619.
- Filardi, LS; Brener, Z. (1987). Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81: 001-004.
- Gamarro, F., Chiquero M.J., Amador, M.V., Légarè, D., Ouellette, M., Castanys, S.(1994). P-glycoprotein overexpression in Methotrexate-resistant *Leishmania tropica*. *Biochemical Pharmacology* 47:1939-1947.
- Garvey, EP; Santi, DV. (1986). Stable amplified DNA in drug-resistant *Leishmania* exists as extrachromosomal circles. *Science* 233, 535-540.
- Gibson, W.C., Swinkels, B.S., Borst, P. 1988. Post-transcriptional control of the differential expression of phosphoglycerate kinase genes in *Trypanosoma brucei*. *J. Mol. Biol.* 201, 315-325.
- González, A; Lerner, TJ; Huecas, M; Sosa-Pineda, B; Nogueira, N; Lizardi, PM. (1985). Apparent generation of segmented mRNA from two separate tandem gene families in *Trypanosoma cruzi*. *Nucl. Acid. Res.* 13: 5789-5804.
- Gorla, NB; Ledesma, OS; Barbieri, G; Larripa, IB. (1988). Assessment of cytogenic damage in chagasic children treated with benznidazole. *Mutation Res.* 206: 212-220
- Gorla, NB; Ledesma, OS; Barbieri, G; Larripa, IB. (1989). Thirteenfold increase of chromosomal aberrations non-randomly distributed in chagasic children treated with nifurtimox. *Mutation Res.* 224: 263-267.
- Hajduk, SL; Harris, ME; Pollard, VW. (1993). RNA editing in kinetoplastid mitochondria. *FASEB J.* 7: 54-63.
- Hardy, L.W., Matthews, W., Nare, B., Beverley, S.M.(1997) Biochemical and genetic tests for inhibitors of *Leishmania* pteridine pathways. *Exp.Parasitol.* 87:157-169.
- Henriksson, J; Aslund, L; Macina, R; Franke, B; Cazzullo, JJ; Frasc, ACC; Pettersson, U.(1990) Chromosomal localization of seven cloned antigens provides evidence of diploidy and further demonstration of karyotype variability in *Trypanosoma* *Mol.Biochem.Parasitol.* 42:213-224.
- Henriksson, J; Aslund, L; Pettersson, U.(1996) Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today* 12:108-114.

- Higgins, D.G., Sharp, P.(1989) Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *CABIOS* 5:151-153.
- Hugh, M; Carruthers, VB; Hartmann, C; Sherman, DS; Cross, GAM; Clayton, C. (1993). A possible role for the 3'-untranslated region in development regulation in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 61: 87-96.
- Jimenez-Ortiz, A; Guevara, DC, Osuna, A; Alonso, C. (1984). *Trypanosoma cruzi* induces changes in the nucleic acid content of host HeLa cells in vitro. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 59, 573-581.
- Jörnvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., González-Duarte, R., Jeffery, J., Ghosh, D.(1995). Short-chain dehydrogenases/reductases. *Biochemistry* 34:6004-6013.
- Juliano RL, Ling V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta* 455: 152-162).
- Katakura, K; Chang, K.P. (1989) H DNA amplification in *Leishmania* resistant to both arsenite and MTX. *Mol. Biochem. Parasitol.* 34:189-192.
- Kaur, K; Coons, T.; Emmett, K.; Ullman, B.(1988). Methotrexate-resistant *Leishmania donovani* genetically deficient in the folate-methotrexate transporter. *J.Biol.Chem.*263,7020-7028
- Kaufman, S.(1963). The structure of phenylalanine hydroxilation cofactor. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 50: 1085-1093.
- Kelly JM, Ward HM, Miles MA, Kendal G. A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. (1992) *Nucleic Acids Res* 20:3963-3969.
- Kelly, J. M., Taylor, M. C., Smith, K., Hunter, K. J. and Fairlamb, A. H. (1993). Phenotype of recombinant *Leishmania donovani* and *Trypanosoma cruzi* which over-express trypanothione reductase. *Eur. J. Biochem.* 218, 29-37.
- Kidder, G.W.; Dutta, B.N.(1958). The growth and nutrition of *Chritidia fasciculata*. *J.Gen.Microbiol.* 18, 621-638
- Kumar, S., Tamura, K., Neil, M.(1993) MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 1.0. The Pennsylvania State University, University Park, PA, USA.
- Laemmli, UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lario, A., González, A., Dorado, G.(1997) Automated Laser-induced fluorescence DNA sequencing: equalizing signal-to-noise ratios significantly enhances overall performance. *Anal. Biochem.* 247:30-33.
- LeBowitz, JH; Smith, HQ; Rusche, L;Beverley, SM. (1993). Coupling of poli(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. *Genes & Dev.* 7: 996-1007.
- Leibold, E.A., Laudiano, A., Yu, Y. (1990) Structural requirements of iron responsive elements for binding of the protein involved in both transferrin receptor and ferritin mRNA post-transcriptional regulation. *Nucleic Acids Res.* 18: 1819-1824.

- Levy-Favatier, F., Cuisset, L., Nedelec, B., Tichonicky, L., Kruh, J., Delpech, M. (1993). Characterization, purification and cDNA cloning of a rat perchloric acid soluble 23-kDa protein present only in liver and kidney. *Eur. J. Biochem.* 212, 665-673.
- Martin Sanchez, I. (1980). Estudio de plásmidos matadores presentes en estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis Doctoral Depto. Microbiología Fac. Ciencias, Universidad de Granada.
- Mattwes, K.R., Tschudi, C., Ullu, E. (1994) A common pyrimidine-rich motif governs *trans*-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. *Genes Dev.* 8:491-501.
- McDaniel, JP; Dvorak, JA. (1993). Identification, isolation and characterization of naturally-occurring of *Trypanosoma cruzi* variants. *Mol. Biochem. Parasitol.* 57:213-222.
- Miles, MA; Souza, A; Povia, M; Shaw, JJ; Lainson, R; Toyé, PJ. (1978). Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature*, 272:819-821.
- Morel, C., Simpson, L. (1980) Characterization of pathogenic tripanosomatidae by restriction endonuclease fingerprinting of kinetoplast DNA minicircles. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29:1070-1074.
- Mullner, E.W., Neupert, B., Kuhn, L.C. (1989) A specific mRNA binding factor regulates the iron-dependent-stability of cytoplasmic transferrin receptor mRNA. *Cell.* 58: 373-382
- Murta, SMF; Romanha AJ: (1998) *In vivo* selection of a population of *Trypanosoma cruzi* and clones resistant to benznidazol. *Parasitology*, 116:165-171.
- Nathan, H.A., Cowperthwaite, J. (1955). "Crithidia factor"-a new member of the folic acid group of vitamins. *J. Protozool.* 2:37-42.
- Nozaki, T; Engel, JC; Dvorak JA. (1996). Cellular and molecular biological analyses of nifurtimox resistance in *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55:111-117.
- Nare, B; Hardy, LW; Beverley, SM. (1997) The roles of pteridine reductase 1 and dihydrofolate reductase-thymidilate synthase in pteridine metabolism in the protozoan parasite *Leishmania major*. *J. Biol. Chem.* 272:13883-13891.
- Nare, B., Luba, J., Hardy, L.W., Beverley, S.M. (1997) New approaches to *Leishmania* chemotherapy: pteridine reductase 1 (PTR1) as a target and modulator of antifolate sensitivity. *Parasitology* 114:S101-S110.
- Nunes, LR; Carvalho, MRC; Buck, GA. (1997). *Trypanosoma cruzi* partition into two groups based on the structure and function of the spliced leader RNA and rRNA gene promoters. *Mol. Biochem. Parasitol.* 86:211-224.
- Oka, T., Tsuji, C.N., Sakai, K., Hong, Y., Suzuki, Y., Muñoz, S., Natori, Y. (1995). Isolation and characterization of a novel perchloric acid-soluble protein inhibiting cell-free protein synthesis. *J. Biol. Chem.* 50, 30060-30067.
- Ouellette, M; Fase-Fowler, F; Borst, P. (1990) The amplified H circle of methotrexate-resistant *Leishmania tarentolae* contains a novel P-glycoprotein gene. *EMBO J.* 9:1027-1033.

- Ouellette, M; Hettema, E; Wüst, D; Fase-Fowler, F; Borst, P. (1991) Direct and inverted DNA repeats associated with P-glycoprotein gene amplification in drug resistant *Leishmania*. EMBO J. 10: 1009-1016.
- Papadopoulou, B; Gaétan, R; Ouellette, M. (1992) A novel antifolate resistance gene on the amplified H circle of *Leishmania*. EMBO J. 11:3601-3608.
- Papadopoulou, B; Gaétan, R; Ouellette, M. (1993) Frequent amplification of a short chain dehydrogenase gene as part of circular and linear amplicons in methotrexate resistant *Leishmania*. Nucleic Acids Res. 21: 4305-4312.
- Persson B, Krook M, Jornvall H. (1991) Characteristics of short-chain alcohol dehydrogenases and related enzymes. Eur J Biochem;200:537-543.
- Petrillo-Peixoto, M; Beverley, SM. (1988) *In vitro* activity of sulfonamides and sulfones against *L. major* promastigotes. Antimicrob. Agents Chemoter. 31,1575-1578
- Pinto Dias, JC; Deane, MP; Brener, Z.(1991). *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas: A doença. Cap 12 en "Parasitologia. Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Americas e na Africa. De. Luis Rey. Guanabara Koogan S:A: Rio de Janeiro.
- Pizzi, TP; Rubio, MD; Prager, R; Silva, C. (1952). Acción de la cortisona en la infección experimental por *Trypanosoma cruzi*. Boletín Chileno de Parasitología 7, 22-24.
- Pollard, VW; Rohrer, SP; Michelotti, EF; Hancock, K; Hajduk, SL. (1990). Organization of minicircle genes for guide RNAs in *Trypanosoma brucei*. Cell 63: 783-790.
- Porath J, Carlsson J, Olsson I. Belfrage G. (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. Nature, 258, 598-599
- Ramamoorthy, R., Swihart, K.G., McCoy, J.J., Wilson, M.E., Donelson, J.E., (1995). Intergenic regions between tandem gp63 genes influence the differential expression of gp63 RNAs in *Leishmania chagasi*. J. Biol. Chem. 270: 12133-12139
- Ready, PD, Miles, MA (1980) Delimitation of *Trypanosoma cruzi* zymodemes by numerical taxonomy. Trans.R.Soc.Trop.Med,Hyg. 74, 238-242.
- Revelard, P., Lips, S., Pays, E. 1993. Alternative splicing within and between alleles of the ATPase gene 1 locus of *Trypanosoma brucei*. Mol. Biochem. Parasitol. 62, 93-101.
- Revollo, S; Oury, B; Laurent, JP; Barnabé, C; Quesney, V; Carrière, V; Noel, S; Tibayrenc, M. (1998). *Trypanosoma cruzi*: impact of clonal evolution of the parasite on its biological and medical properties. Exp.Parasitol. 89: 30-39.
- Sambrook, J; Fritsch, EF; Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed.). Cold Spring Harbour, NY. Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463-5467.
- Sather, S; Agabian, N. (1985). A 5' spliced leader is added in trans to both alfa and beta-tubulin transcripts in *Trypanosoma brucei*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 5695-5699.
- Schurch, N., Hehl, A., Vasella, E., Braun, R., Roditi, Y.(1994) Accurate polyadenylation of procyclin mRNAs in *Trypanosoma brucei* is determined by pyrimidine-rich element in the intergenic regions. Mol. Cell. Biol. 14:3668-3675.

- **Silhary, T. J., Berman, M. L. and Enquist, L. W.** (1984). Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbour Laboratory N. Y., pp XI-XII.

Silva, LPH; Nussenzweig, V. (1953). Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. Folia Clinica e Biologica, 20, 197-233.

Scott, DA; Coombs, GH, Sanderson, BE. (1987) Folate utilization by *Leishmania* species and the identification of intracellular derivatives and folate-metabolising enzymes. Mol. Biochem.Parasitol., 23, 139-149

Simpson, L. (1987). The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication and evolution. Annu. Rev. Microbiol. 41, 363-382.

Simpson, L. (1987). The genomic organization of guide RNA genes in kinetoplastid protozoa: several conundrums and their solutions. Mol. Biochem. Parasitol. 86:133-141.

- **Southern, E.** (1975). Detection of specific genes among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98, 503-517.

Stuart, K. (1991). RNA editing in tripanosomatid mitochondria. Annu. Rev. Microbiol. 45: 327-344.

Sturm, NR; Simpson, L. (1990). Kinetoplast DNA minicircles encode guide RNAs for editing of cytochrome oxidase subunit III mRNA. Cell 61: 879-884.

Swofford, D.(1990) PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony, version 3.0. Illinois Natural History Survey, Champaign,USA.

Tayeh, M.A., Marletta, M.A. (1989). Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite and nitrate. J.Biol.Chem. 264:19654-19658.

TDR news. (Tropical Disease Research). (1994). UNDP/WORLD BANK/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). No. 44.

Tibayrenc, M; Ward, P; Moya, A; Ayala, FJ.(1986). Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease, have a complex multiclonal structure. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83, 115-119.

Tibayrenc, M; Ayala, FJ.(1988) Isozyme variability of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance. Evolution, 42:277-292.

Tibayrenc, M; Neubauer, K; Barnabé, C; Guerrini, F; Sarkeski, D; Ayala, FJ (1993). Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity of random primer DNA typing and multilocus isoenzyme electrophoresis. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90, 1335-1339.

Tibayrenc, M. (1995) Population genetics of parasitic protozoa and other organisms. Adv. Parasitol. 36, 47-115.

Tibayrenc, M. (1996). Towards a unified evolutionary genetics of microorganisms. Annu.Rev.Microbiol. 50:401-429.

Tietz, A., Lindberg, M., Kennedy, E.P. (1964). A new pteridine-requiring enzyme system for the oxidation of glyceryl-ethers.J.Biol.Chem. 239:4081-4090.

Ullu, E; Tschudi, C. (1991). *Trans-splicing* in trypanosomes requires methylation of the 5' end of the spliced leader RNA. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 88: 10074-10078.

Ullu, E; Matthews, KR; Tschudi, C.(1993). Temporal order of RNA-processing reactions in trypanosomes: rapid trans splicing precedes polyadenylation of newly synthesized tubulin transcripts. Mol.Cell.Biol. 13: 720-725

Villalta, F., Kierszenbaun, F.(1982) Growth of isolated amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. J.Protozool. 29:570-576.

Wahler, E; Keller, W. (1992). The biochemistry of 3'-end cleavage and polydenylation of messenger RNA precursors. Annu. Rev. Biochem. 61: 419-440.

Walder, JA; Elder, PS; Engman, DM; Brentano, ST; Walder, RY; Knutzon, DS; Doreman, DM; Donelson, JE. (1986). The 35-nucleotide spliced leader is common to all trypanosome messenger RNA's. Science 233: 569-571.

Wang, J., Leblanc, E., Chang, C-F., Papadopoulou, B., Bray, T., Whiteley, J.M., Lin, S-X., Ouellette, M.(1997). Pterin and folate reduction by *Leishmania tarentolae* H locus short-chain dehydrogenase/reductase PTR1. Arch. Bioch.Biophys. 342:197-202.

Widmer, G., Marinkelle, C:J., Guhl, F, Miles, MA (1985) Isozyme profiles of *Trypanosoma cruzi* stocks from Colombia and Ecuador. Ann. Trop. Med. Parasitol. 79, 253-257.

World Health Organization.(1991) Control of Chagas' disease. Geneva.

Zingales y col., 1995)

