



UNIVERSIDAD DE BELGRANO

# Las tesinas de Belgrano

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Licenciatura en Ciencias Biológicas**

Subclonado e identificación de una secuencia  
expresada en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

Nº 4

Gabriela Vanesa Levy

Tutor: Dr. Héctor N. Torres  
Directora: Dra. María Cristina Paveto

Departamento de Investigación  
Octubre 2001



A mis padres y a mi gran amor por recorrer conmigo este largo camino



## Indice

Resumen .....	9
Introducción .....	9
Genoma de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	13
Transducción de Señales vía AMP <sub>c</sub> .....	14
Materiales y Métodos .....	16
Resultados .....	22
Conclusiones .....	29
Referencias .....	30



## Agradecimientos

*Maxi D'angelo,*

*Cata Guida,*

*Dani Portal, y*

*Claudio Pereira*



## Resumen

La enfermedad de Chagas es una parasitosis que afecta a diferentes mamíferos, incluido el hombre. El agente etiológico de la enfermedad es un protozoo flagelado conocido como *Trypanosoma cruzi*, que tiene un ciclo de vida complejo involucrando a la vinchuca como insecto vector. El parásito tiene la propiedad de llevar a cabo la variabilidad antigénica, por lo cual elude el sistema inmunitario del huésped.

La lucha contra la enfermedad implica comprender el conocimiento del metabolismo del parásito para inhibir diferencialmente su desarrollo. Un camino posible es el diseño de drogas que interfieran con la vía de transducción de señales inhibiendo la actividad de enzimas claves para el desarrollo del parásito sin dañar las células del hospedador. En este trabajo se intentó clonar el gen correspondiente a la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de AMP<sub>c</sub> de *T. cruzi*, mediante el diseño de primers en regiones conservadas de secuencias ya identificadas de PKAs de distintos organismos taxonómicamente cercanos al mismo.

Si bien el o los genes para la PKA de *T. cruzi* no han podido ser identificados, la secuenciación del producto de PCR indica que es un fragmento que se expresa en epimastigotes y cuyo destino final es membrana plasmática.

## Introducción

En el norte de Brasil, en 1909 Carlos Chagas descubrió en la sangre periférica de ciertos monos numerosos protozoarios desconocidos, que identificó con el nombre de *Trypanosoma cruzi* en homenaje a Osvaldo Cruz, el entonces director del Instituto Meguinhos de Río de Janeiro. También identificó al *Triatoma infestans* como el insecto transmisor y luego al *Panstrongylus geniculatus*, de tamaño un poco mayor que vivía en las cuevas de los armadillos. Estudios posteriores revelaron la existencia de por lo menos 31 especies diferentes de insectos pertenecientes a la familia *Triatomidae* parasitados por tripanosomas.

*Trypanosoma cruzi* es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana que es una parasitosis producida por la infección de *Triatomidae* y de diferentes mamíferos. Afecta alrededor de 18 millones de personas, de las cuales 3 millones desarrollan severas complicaciones, causando 45000 muertes al año y constituyendo uno de los principales problemas de salud pública en diversos países latinoamericanos.

La infección puede ser adquirida o congénita implicando la transmisión del parásito de la madre al feto. La infección adquirida produce cardiopatías crónicas, desórdenes neurológicos y lesiones digestivas que incluyen la formación de un megacolon, un megaesófago y agrandamiento de otros órganos huecos. En cambio, el paso de *T. cruzi* al feto durante la gestación produce en el niño prematuridad, aumento de tamaño del hígado y del bazo y un compromiso variable del sistema nervioso central y del miocardio.

Los tripanosomas son parásitos protozoarios flagelados pertenecientes al orden *kinetoplastida*, que se caracterizan por poseer una única mitocondria llamada quinoplasto que contiene ADN y se encuentra ubicada cerca de la base del flagelo (Fig. 1). *T. cruzi* pertenece al género *Trypanosoma* (Cuadro 1), donde están comprendidos parásitos que cuentan, en alguno de sus estadios de desarrollo, con la forma de tripomastigote. El género se divide en *Salivaria* comprendiendo tripanosomas patógenos que se multiplican bajo la forma de tripomastigotes en el mamífero, completan su desarrollo en las glándulas salivales del vector y son inoculados por transmisión anterior, y *Stercoraria*, agrupándose especies no patógenas con excepción de *T. cruzi* que se multiplican bajo la forma de amastigotes en el mamífero, completan su desarrollo en el intestino posterior del insecto y son inoculados por sus heces mediante estación o transmisión posterior.

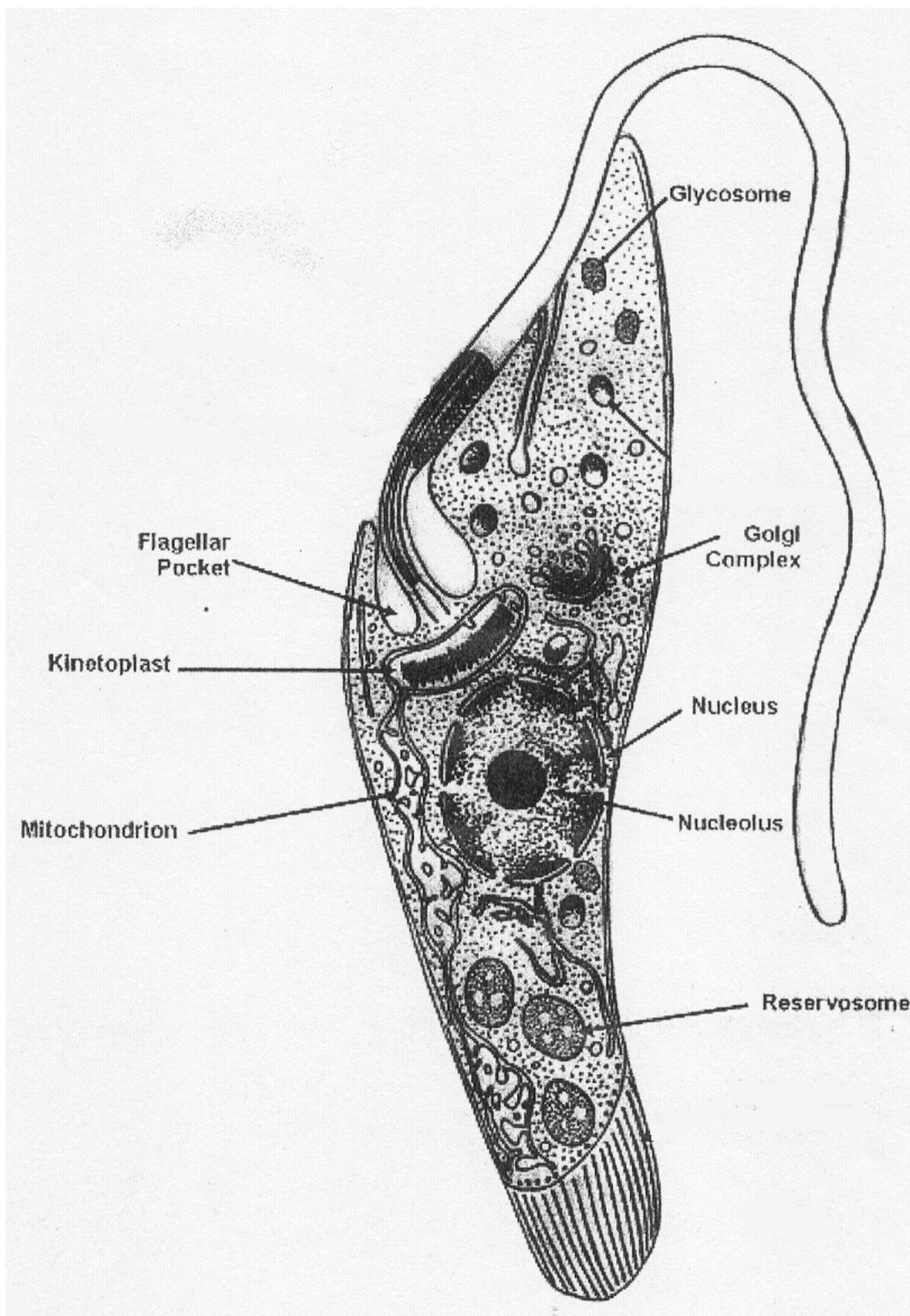


Fig. 1: Estructura interna de un epimastigote

Tipo	<i>Protozoa</i>	
Subtipo	<i>Sarcomastigophora</i>	
Clase	<i>Zoomastigophora</i>	
Subclase	<i>Mastigophora</i>	
Orden	<i>Kinetoplastida</i>	
Suborden	<i>Trypanosomatina</i>	
Familia	<i>Trypanosomatidae</i>	
Género	† <i>Leishmania</i>	<i>Leishmania</i> (subgénero) <b><i>Leishmania major</i></b> <b><i>Leishmania mexicana</i></b>
	† <i>Trypanosoma</i>	<i>Schizotrypanum</i> (subgénero) <b><i>Trypanosoma cruzi</i></b> <i>Trypanosoon</i> (subgénero) <b><i>Trypanosoma brucei</i></b> <i>Nannosomas</i> (subgénero) <b><i>Trypanosoma congolense</i></b>
	† <i>Crithidia</i>	<b><i>Crithidia fasciculata</i></b>

En sus diversos huéspedes y en medios de cultivo, presenta tres aspectos morfológicos fundamentales:

- † Tripomastigote: de aspecto fusiforme, de 20 µm de longitud, tiene un citoplasma granuloso y un núcleo central vesiculoso. Posee un quinetooplasto subterminal posterior al núcleo que es una mitocondria modificada, del cual emerge una membrana ondulante que recorre al parásito, en cuyo borde libre lleva un flagelo. Se lo encuentra en la sangre de mamíferos y en el intestino posterior de los triatomas. Si bien no se multiplica, constituye la forma infectiva circulante para los mamíferos y vectores (Fig.2 a).
- † Epimastigote: también de aspecto fusiforme y de 20 µm de longitud. Presenta un quinetooplasto localizado por delante del núcleo, con una corta membrana ondulante y un flagelo libre. Es la forma replicativa no infectiva dentro del intestino del triatoma y predominante en los medios de cultivo (Fig. 1 y 2 b)
- † Amastigote: presenta un aspecto redondeado de 2 µm de diámetro, en el cual se distingue el núcleo y el quinetooplasto. Carece de flagelo y es la forma replicativa no infectiva del parásito dentro de las células del huésped (Fig. 2 c)

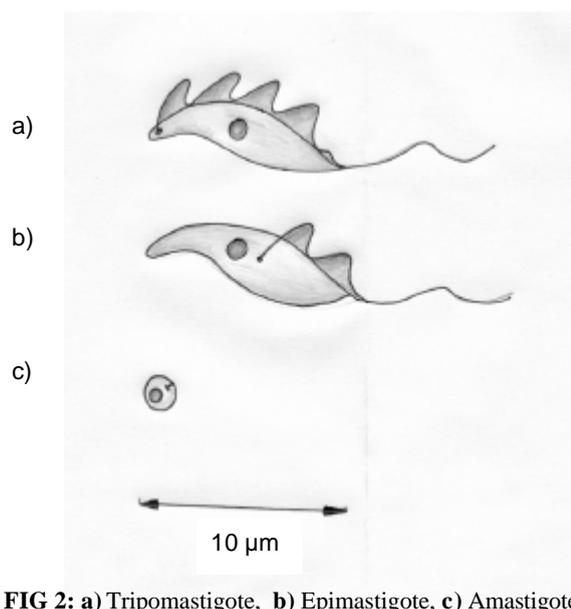


FIG 2: a) Tripomastigote, b) Epimastigote, c) Amastigote

Diversos estudios demuestran la existencia de formas intermedias de *T. cruzi*, como por ejemplo, epimastigotes en la diferenciación de amastigotes a tripomastigotes dentro del citoplasma de las células infectadas del huésped (Almeida, *et al*, 1999). También se clasificaron más de 18 formas diferentes dentro del vector. (Kollien & Schaub, 2000).

Los triatomas son hematófagos y comprenden casi un centenar de especies, la mayor parte de las cuales posee hábitat silvestre. Las de más importancia sanitaria son aquellas que se han habituado a colonizar la vivienda humana. Algunas especies se han transformado en estrictamente domiciliarias como ser *Triatoma infestans* ya que habita en las vigas y grietas de las paredes de barro de chozas y ranchos, convirtiéndolo en el insecto vector de mayor importancia en lo que se refiere a la transmisión de la enfermedad de Chagas.

Su morfología es característica con un aspecto similar al de las grandes chinches vegetales, de forma alargada y con un abdomen ancho y generalmente aplanado. Presenta una cabeza alargada, cilíndrica o cónica, y una trompa picadora emergiendo del extremo anterior. Este órgano picador está compuesto por tres segmentos, está doblado bajo la cabeza durante el reposo y se extiende hacia delante cuando el insecto pica. Presenta ojos compuestos, grandes, redondeados y salientes y un par de antenas largas, finas y formadas por cuatro segmentos. El tórax es firme, duro y bien queratinizado, en el que se distinguen un segmento anterior (pronoto) de forma trapecoidal y uno posterior (escutelo) de aspecto triangular. Del tórax nacen dos pares de alas bien desarrolladas que cubren todo el abdomen, y tienen manchas características de gran importancia taxonómica (Fig. 3). Son principalmente nocturnos o al menos pican cuando hay oscuridad.

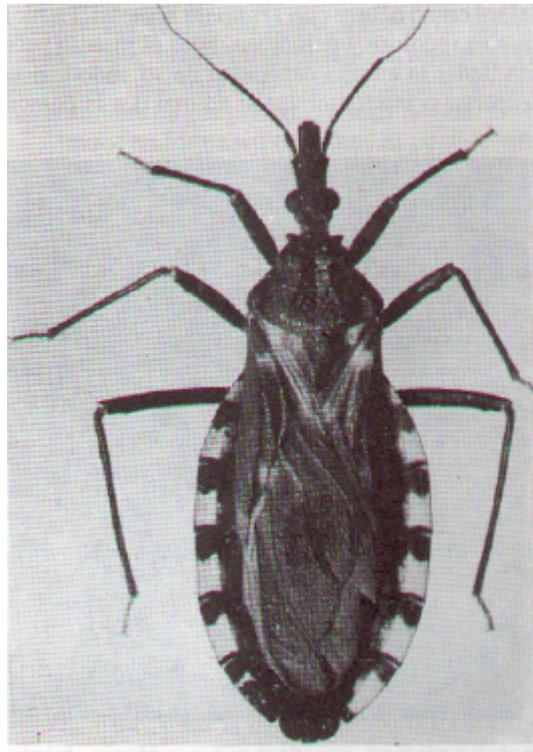


FIG. 3; *Triatoma infestans*

El insecto vector sano se infecta al ingerir sangre de un mamífero infectado que contiene *Trypanosoma cruzi* bajo la forma de tripomastigotes sanguíneos (Fig 4). En el lumen del intestino medio del insecto, los parásitos se multiplican activamente por fisión binaria bajo la forma de epimastigotes y luego de quince a treinta días se desarrollan los tripomastigotes metacíclicos infectivos en el intestino posterior del triatoma. El insecto es de estación posterior, por lo cual, cuando pica a un mamífero sano, rota y defeca, emitiendo deyecciones que contienen numerosos tripomastigotes metacíclicos infectivos, que favorecidos por el rascado, atraviesan la piel por el sitio de la picadura o a través de las mucosas.

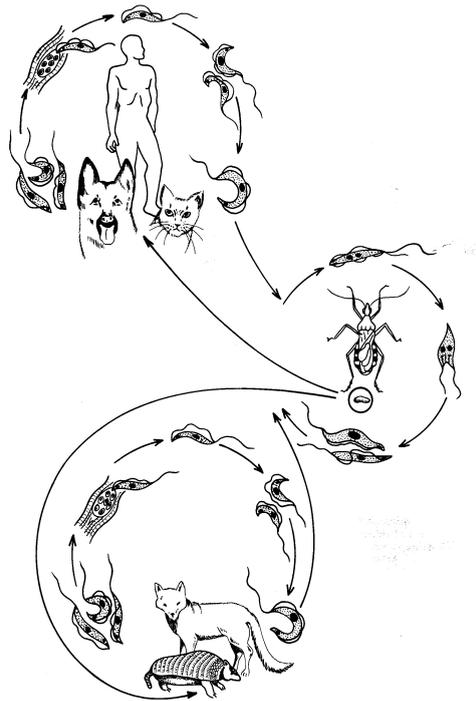


FIG 4: Ciclo evolutivo y mecanismos de transmisión de *Trypanosoma cruzi*

Los tripomastigotes metacíclicos son capaces de parasitar un amplio rango de células nucleadas del huésped. La infección se lleva a cabo por medio de un mecanismo único, en el cual los microtúbulos del citoesqueleto actúan atrayendo lisosomas hacia el lugar en el que el parásito se pegó a la membrana. Estos lisosomas se fusionan con la membrana plasmática, primero formando una unión con los parásitos y luego un compartimento celular que les permite la entrada. La acidificación de la vacuola que resulta de la fusión lisosomal, activa la secreción de una molécula del parásito que le facilita la salida. De esta manera, los tripomastigotes escapan de la vacuola y se diferencian en amastigotes, los cuales se replican por fisión binaria y forman pseudoquistes. A mayor densidad, hacen estallar la célula liberándose parásitos a la circulación bajo la forma de tripomastigotes que se diseminan por todo el organismo (Tyler & Engman, 2001). Estos tripomastigotes penetran nuevas células, se transforman en amastigotes para reproducirse y al romper las células vuelven a liberarse a la circulación bajo la forma de tripomastigotes, repitiendo muchas veces el ciclo.

El ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi* se completa cuando un triatómico sano pica al individuo infectado llevándose consigo tripomastigotes circulantes.

En un triatómico infectado se encuentran tripomastigotes en el intestino anterior y posterior y la forma de epimastigotes (replicativa) en el intestino medio. En el mamífero la infección es sanguínea y tisular, con tripomastigotes circulantes y amastigotes replicativos intracelulares. (Libro de la Vida, 1973; Atias & Neghme, 1991).

### Genoma de *Trypanosoma cruzi*

El genoma de *T. cruzi* tiene un tamaño 5 veces mayor al de *Escherichia coli* oscilando entre 300 kbp y 2 Mbp y una organización muy poco usual. Si bien no se asegura el número de cromosomas, diversos experimentos se acercan a la idea de que cuenta con:

- † un número variable de moléculas de ADN de diferentes tamaños, donde los cromosomas homólogos pueden variar hasta en un 20 % de su tamaño, debido a la presencia de elementos que se repiten en forma variable; y
- † minicromosomas de menor tamaño.

Diversos estudios revelaron que el cariotipo de *T. cruzi* parece variar entre diferentes cepas y entre diferentes clones de la misma cepa, ya que se observan diferencias en el tamaño y número de cromosomas y cambio de la ploidía de uno o más cromosomas (Macedo & Pena, 1998)

Los genes de *T. cruzi* se agrupan en repeticiones continuas o en tándem, separadas entre sí por peque-

ñas regiones intergénicas. Se ha encontrado poca cantidad de promotores, lo que es acorde con una distribución en tándem de los genes que codifican para proteínas y con la transcripción policistrónica.

En contraste con el genoma de eucariotas superiores, en estos parásitos la cromatina no se condensa, se conserva la membrana nuclear durante la división celular y no se presenta consenso de poliadenilación en el extremo 3'.

La transcripción policistrónica requiere que los transcriptos primarios inmaduros sean procesados a transcriptos maduros mediante el clivado y adición de un grupo 7-metil-guanosina (*Cap*) en el extremo 5' y una cola de poliadeninas en el extremo 3' a efectos de proteger los ARN<sub>m</sub> de la degradación. En los tripanosomátidos, la adición del *Cap* ocurre por un mecanismo denominado *trans splicing*. Este proceso es llevado a cabo mediante una maquinaria muy similar a la involucrada en el *cis splicing* en otros eucariotes, con la ausencia de los ARN<sub>s</sub> nucleares U1 y U5. En el extremo 5' del transcripto inmaduro, se agrega un oligorribonucleótido conocido como *Spliced leader* o miniexón que proviene del procesamiento de un ARN donante.

Aunque el ADN genómico usualmente se mantiene inalterado durante el desarrollo somático, en eucariotas inferiores se observan rearrreglos de ADN, que consisten en secuencias que son movidas dentro del genoma, modificadas, amplificadas o incluso perdidas, como un evento natural. En el caso de *T. brucei*, este mecanismo de rearrreglo de su ADN se utiliza para expresar nuevos antígenos de superficie. Además de los cambios morfológicos, durante su ciclo de vida se observan también cambios bioquímicos, dentro de los cuales el más significativo es el de la glicoproteína variable de superficie (VSG), el mayor componente de la superficie de la cubierta del parásito. La proteína VSG se encuentra unida a membrana plasmática por medio de un anclaje de glucosilfosfatidilinositol (*GPI*) y pueden ser liberadas de la célula en forma soluble, en respuesta a señales que activen una fosfolipasa de la membrana plasmática. (Alberts, 1996). La envoltura cubre la membrana plasmática y consiste en una monocapa de 5 a 10 x 10<sup>6</sup> moléculas de una sola especie de VSG, la cual es la única estructura antigénica expuesta en la superficie. Un tripanosoma expresa solo una especie de VSG por vez y su habilidad de cambiar la expresión de un VSG por otro es responsable de su supervivencia a través del ciclo biológico vector – mamífero. Cuando el tripomastigote entra en el intestino del vector pierde la cubierta de VSG y cuando se diferencia en tripomastigote metacíclico adquiere nuevamente la cubierta de VSG. Una vez que el mamífero fue infectado, y el tripanosoma se replica bajo la forma de amastigote, la progenie continua expresando el VSG metacíclico durante una semana. Luego se sintetiza una nueva especie de VSG y los cambios siguientes se producen cada una o dos semanas.

Como resultado, el antígeno presentado al sistema inmune del mamífero está en constante cambio. Este proceso es llamado variabilidad antigénica. La respuesta inmune del organismo siempre se encuentra deprimada con respecto a los cambios de los antígenos de superficie, por lo tanto, los tripanosomas eluden la vigilancia inmunológica y se perpetúan indefinidamente. (Lewin, 2000).

### Transducción de señales vía AMP<sub>c</sub>

El AMP<sub>c</sub> regula numerosas funciones biológicas: se observó que los cambios en los niveles del mismo parecen estar asociados con los eventos que disparan la diferenciación de *T. cruzi*. En *Trypanosoma brucei in vitro*, se observan dos picos de actividad de adenilil ciclasa; uno de 6 a 10 horas después de iniciada la diferenciación e inmediatamente después de la pérdida de VSG y antes de la primera replicación. El segundo pico tiene lugar antes de que las células comiencen a proliferar (Naula & Seebeck, 2000).

Los componentes básicos del camino de transducción de señales vía AMP<sub>c</sub> hasta ahora descritos en eucariotes superiores son: un receptor con 7 dominios transmembrana acoplado a una proteína adenilil ciclasa a través de la subunidad catalítica de una proteína G trimérica estimulante, y una proteína con actividad de kinasa dependiente de AMP<sub>c</sub> con la habilidad de fosforilar residuos de serina o treonina ubicados en una gran variedad de enzimas y de factores de transcripción.

Cuando un ligando se une a un receptor acoplado a proteína G (*GPCR*), la subunidad  $\beta$  de la proteína G trimérica se disocia del complejo  $\beta$ - $\gamma$  y activa a la adenilil ciclasa que es la responsable de la producción de AMP<sub>c</sub> a partir del ATP en presencia de Mg. La proteína kinasa dependiente de AMP<sub>c</sub> (*PKA*) se encuentra inhibida por dos subunidades regulatorias (Fig. 5) que luego, por unión al AMP<sub>c</sub> se disocian de las dos subunidades catalíticas dando lugar a una cascada de reacciones de fosforilación en residuos de serina y treonina de proteínas específicas (Fig. 6).

En algunos tipos de células, un incremento en los niveles de AMP<sub>c</sub> activa la transcripción de determinados genes: la región reguladora del gen que debe expresarse tiene una corta secuencia de ADN denominada CRE (*de cyclic AMP Response Element*). Esta secuencia es reconocida por una proteína específica reguladora de genes CREB (*de CRE binding*). Cuando CREB es fosforilada por la PKA activa la transcripción de ciertos genes.

La necesidad de la vía de transducción de señales vía AMP<sub>c</sub> para la diferenciación de las diversas formas

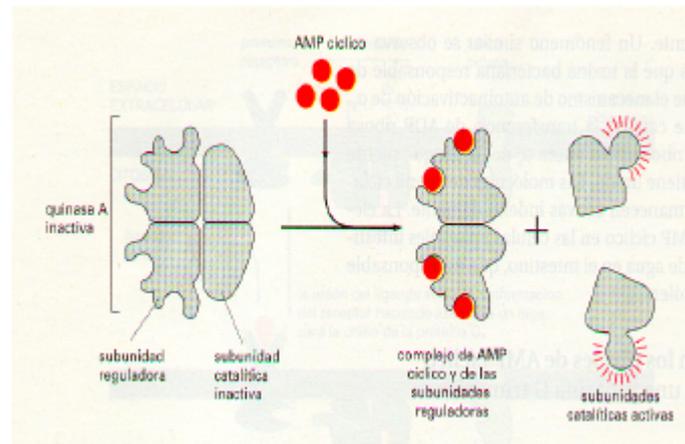


FIG. 5 Mecanismo de inhibición de las subunidades reguladoras de la PKA.

de *T. cruzi* ha sido evidenciada por un péptido derivado de la globina de pollo, extraído del intestino del triatoma y que promueve la metacicloogénesis (Flawiá, 1997).

Si bien el o los genes para las subunidades catalítica y reguladora de PKA no han sido encontrados en *T. cruzi*, hay trabajos que demuestran que la holoenzima está formada por un tetrámero con la estructura  $R_2C_2$  con un tamaño de 200 kDa. (Ochatt, *et al*, 1993).

Por otro lado, no se encuentra un 100% de homología en la vía de transducción de señales a través del AMP<sub>c</sub> con la descrita en eucariontes superiores y se describen quinasas con características particulares, como es el caso de la PKB, que corresponde a un nuevo grupo de quinasas de serina – treonina, en las cuales el dominio catalítico muestra similitud con los dominios correspondientes a las proteínas quinasas A y C (Pascucci, *et al*, 1999).

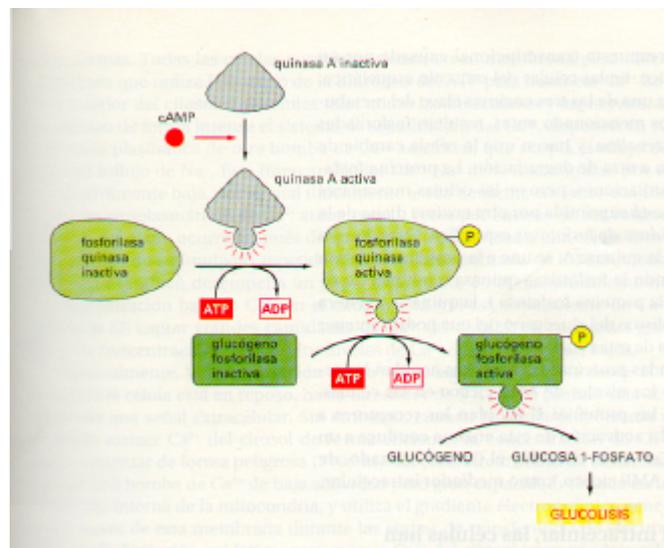


FIG. 6: Cascada de fosforilaciones resultante de la PKA

Debido a la importancia bioquímica de la cascada de fosforilaciones que se lleva a cabo vía AMP<sub>c</sub> en lo referente a la diferenciación de los diversos aspectos morfológicos de *T. cruzi*, ésta es una de las vías metabólicas claves para inhibir el desarrollo del parásito, ya que estudiando las características de las enzimas pueden encontrarse cinéticas diferenciales con las enzimas del hospedador.

## Materiales y Métodos

**Extracción y cuantificación de ADN de *Trypanosoma cruzi* cepa Tulahuen II:** 5 x 10<sup>8</sup> epimastigotes crecidos en medio LIT fueron centrifugados a 2500 rpm durante 5 minutos y resuspendidos en solución TES. Se realizó una incubación con 100 µg / ml de proteinasa K durante 2 horas a 37 °C. Se agregaron 20 ml de PIC y se centrifugó la muestra a 10000 rpm durante 10 minutos en rotor Sorval SS34. Se rescató la fase acuosa superior y fue incubada con RNAsa pancreática 40 µg / ml durante 5 minutos a 90 °C. Se repitió el procedimiento con un nuevo agregado de PIC para eliminar las RNAsas y restos de proteínas de la extracción anterior. Luego se agregó un volumen de cloroformo para extraer los restos de fenol. Se rescató nuevamente la fase acuosa. El ADN fue precipitado con el agregado de 2 ½ volúmenes de EtOH 100% y un 10% del volumen de Acetato de Potasio 3M pH=5.2. Se incubó durante 20 minutos a -70 °C. Luego se centrifugó a 10000 rpm (SS34) durante 10 minutos a 4 °C. Por volcado se eliminó el sobrenadante y el precipitado fue lavado con EtOH 70% y centrifugado a 10000 rpm (SS34) durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se eliminó por volcado y el precipitado fue secado en estufa a 37 °C durante 20 minutos. Una vez seco, el ADN fue resuspendido en solución TE 0.1x e incubado a 50 °C durante 10 minutos. Se realizó un gel de agarosa 1% para observar la calidad del ADN y se realizó la cuantificación mediante espectrofotometría por A<sub>260</sub> y A<sub>280</sub>.

**Medio LIT (para 1 litro):** 5 g de liver infusion, 5 g de triptosa, 68 ml de NaCl 1M, 5.3 ml de KCl 1M, 22 ml de HPO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub> 1M y 10 ml de glucosa 20%. Se autoclavó y se agregó 1 ml de Hemina, se filtró y se agregó Estreptomicina / Penicilina 100x y 10% de suero fetal bovino.

**Solución TES:** 10 mM Tris – HCl pH=8, 100 mM EDTA, 1% SDS y H<sub>2</sub>O para llevar a volumen.

**PIC:** fenol, cloroformo y alcohol isoamílico en relación 25 : 24 : 1.

**Acetato de Potasio 3M pH=5.2 (para 100 ml):** 60 ml de AcOK 5M, 28.5 ml de H<sub>2</sub>O y llevar a pH con aproximadamente 11.5 ml de ácido acético Glacial.

**Solución TE:** Tris – HCl 10 mM pH=8 y 1 mM EDTA.

**Diseño de Primers:** Diferentes secuencias aminoacídicas de PKAs conocidas y de organismos, en lo posible, taxonómicamente cercanos a *T. cruzi* fueron alineadas utilizando el programa Clustal W. Los primers fueron diseñados en base a secuencias conservadas de *Euglena gracillis*, *Plasmodium falciparum*,

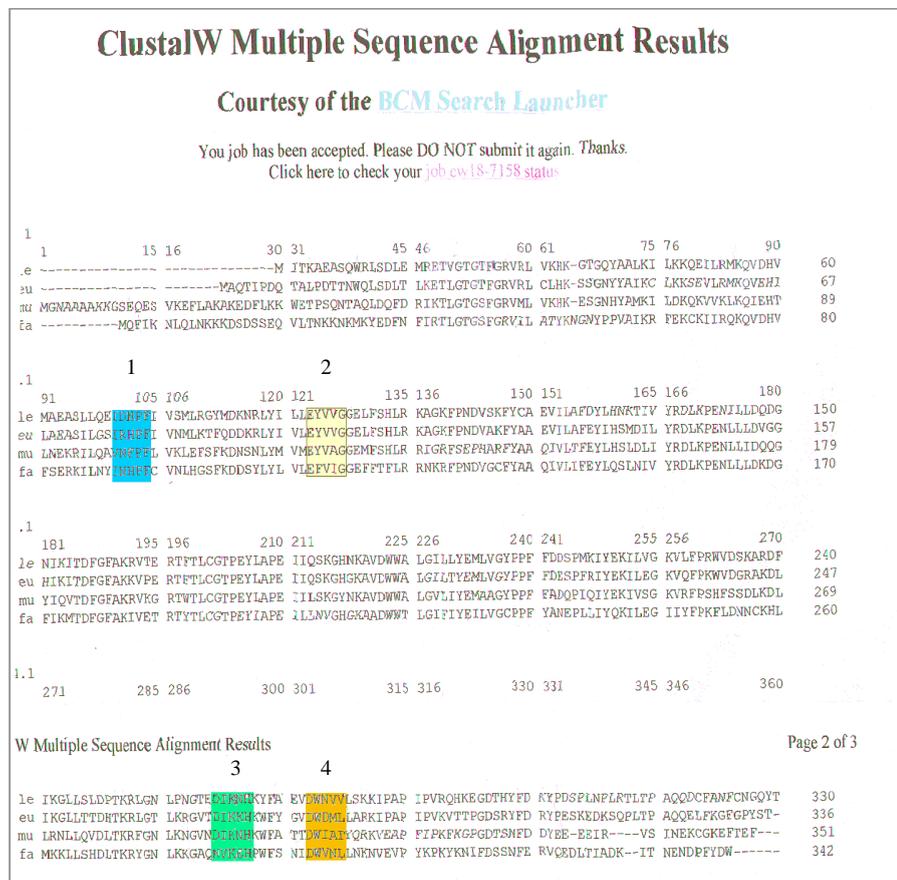


FIG. 7: Alineamiento de PKAs mediante el programa Clustal W de distintas especies: *Leishmania major*, *Euglena gracillis*, *Mus musculus* y *Plasmodium falciparum*. Se indican el primer par de primers (1 y 3) y el segundo par (2 y 4).

*Leishmania major* y *Mus musculus* (Fig. 7).

Para el diseño fue necesario consultar el "Usaje de Codones" de *T. cruzi* y de acuerdo a esto se degeneraron los primers. En los extremos 5' se agregaron sitios de restricción y los extremos 3' se mantuvieron sin ningún grado de degeneración. Se construyeron dos pares de primers.

- **Forward1:** 5' CA **GGATCC** ATT/C AAC CAC CCG/C TT 3'
- **Reverse1:** 5' AT **GAATTC** C/AAC CAC GTT CCA G/ATC 3'
- **Forward2:** 5' AA **GGATCC** GAG/A TAT GTG GTT GG 3'
- **Reverse2:** 5' GC **GAATTC** G/ATG GTT C/TTT G/AAT G/ATC 3'

Se indican en negritas los sitios de restricción para la enzima BamH1 y subrayados los de EcoR1. Los análisis de las temperaturas de melting y las posibilidades de formación de estructuras secundarias para cada oligonucleótido fueron tenidas en cuenta para el diseño. Los mismos primers fueron encargados a Cornell University (pares 3 y 4) pero solo con sitios EcoR1 para todos los extremos 5'. Una vez recibidos, todos los primers fueron cuantificados mediante espectrofotometría por  $A_{260}$ .

**PCR:** Se llevó a cabo con único paso inicial de 5 minutos a 95 °C, 35 ciclos compuestos por 1 minuto a 95 °C para permitir la *desnaturalización*, 1 minuto a 55 °C, para permitir el *annealing*, 1 ½ minuto a 72 °C para la *elongación* y una única etapa final de 10 minutos a 72 °C para que la polimerasa termine de sintetizar los extremos de los productos incompletos.

Se llevó a cabo un control negativo con un par de primers al azar sin ADN genómico y dos controles positivos: uno con el templado extraído de *T. cruzi* y con primers diseñados para la enzima nitrato sintasa, y otro con un par de primers al azar y ADN genómico proveniente de una extracción diferente.

La reacción se llevó a cabo con 10 mM dNTP, 50 pmoles de cada uno de los primers, 1 µg del ADN genómico, con 2,5 y 1,5 mM de  $Cl_2Mg$  según corresponda y 0.025 U por reacción de Taq polimerasa.

Para el caso de los pares de primers 3 y 4, se realizó una PCR en condiciones de alta astringencia con una temperatura de annealing de 57 °C para reducir la cantidad de bandas que se observaron como producto no específico.

**Subclonado en pGEM – t easy:** Como producto único de PCR, se subclonó el fragmento de 700 bp provenientes de la utilización de los primers correspondientes al par 2 y otro de aproximadamente 2000 bp provenientes del primer par de primers. Para la ligación se respetó la relación plásmido : inserto en 1 : 2 y se llevó a cabo con 5 µl de buffer  $T_4$  ligasa, 0.5 µl de pGEM – t easy, 0.5 µl del producto de PCR, 0.5 µl de  $T_4$  ligasa y  $H_2O$  para un volumen final de 10 µl. La incubación fue de 1 hora 20 minutos a temperatura ambiente.

**Preparación de bacterias competentes:** En LB agar se plaquearon bacterias DH5? directamente del stock de glicerol de manera de obtener colonias aisladas. Se las incubó toda la noche sin ampicilina. Una colonia aislada fue repicada en 7 ml de medio LB líquido; la incubación fue de 1 ½ hora a 37 °C con agitación hasta una  $D.O._{600} = 0.3$ . Se agregaron 5 ml del cultivo a 100 ml de medio LB líquido y se incubó hasta una  $D.O._{600} = 0.48$ . Se dejó enfriar el cultivo en agua hielo durante 10 minutos y luego se centrifugó a 3000 rpm (H400) durante 5 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el tubo se invirtió sobre una servilleta para eliminar el medio restante. El precipitado fue resuspendido en frío en 40 ml de Tfb1 pre enfriado evitando la formación de grumos de bacterias y se las dejó en agua hielo durante 5 minutos. La muestra fue centrifugada a 3000 rpm (H400) durante 5 minutos a 4 °C, el sobrenadante fue descartado y el precipitado resuspendido en frío en 4 ml de Tfb2 pre enfriado. Las bacterias fueron dejadas durante 15 minutos en hielo y luego fueron alicuotadas en 50 µl dentro de eppendorfs estériles y conservadas a –70 °C.

*Medio LB líquido (para 1 litro):* 10 g de bacto triptona, 5 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl. Se autoclavó.

*LB – agar:* al medio LB líquido se le agregó 2% agar. Se autoclavó.

*Tfb1:* 30 mM AcOK, 100 mM KCl o  $RbCl_2$ , 10 mM  $CaCl_2$ , 50 mM  $MnCl_2$  y 15% glicerol. Se esterilizó por filtración.

*Tfb2:* 10 mM MOPS, 75 mM  $CaCl_2$ , 10 mM KCl o  $RbCl_2$  y 15% glicerol. Se llevó a pH = 6,5 con KOH. Se esterilizó por filtración.

**Transformación de bacterias DH5? :**  $10^6$  bacterias competentes fueron incubadas con 20 – 100 ng de plásmido ligado durante 15 minutos en hielo y luego 5 minutos a 37 °C. Se agregó 1 ml de medio LB líquido para que se recuperen y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Las bacterias fueron centrifugadas a 5000 rpm en microcentrífuga durante 5 minutos, resuspendidas en 100 µl de medio LB y plaqueadas en LB – agar 2% – ampicilina con 50 µl de IPTG 0.1M y 30 µl de X – Gal 2%. Fueron incubadas toda la noche en estufa

a 37 °C.

**Minipreparación del plásmido:** Se seleccionaron 10 colonias blancas que llevan el inserto, se repicaron en 3 ml de medio LB líquido con ampicilina y fueron incubadas más de 16 horas a 37 °C con agitación. Las muestras fueron centrifugadas a 3500 (H400) durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante, cada precipitado fue resuspendido en 150 µl de Solución 1 y se agregaron 300 µl de Solución 2. Luego se agitó por inversión y se colocaron las muestras en hielo durante 5 minutos. Se agregaron 225 µl de Solución 3 fría, se agitaron las muestras y se las colocó nuevamente en hielo por 5 minutos. Luego, fueron centrifugadas a 10000 rpm en microcentrífuga durante 5 minutos y los sobrenadantes fueron transferidos a eppendorfs limpios. Después del agregado de RNAsa pancreática a una concentración final de 40 µg / ml se dejaron incubando durante 30 minutos a 37 °C. Se agregó un volumen de PIC y se centrifugaron las muestras a 10000 rpm durante 5 minutos. La fase orgánica fue descartada y la acuosa superior colocada en un tubo limpio. Se agregaron 2 ½ volúmenes de EtOH 100% frío, se dejaron a -20 °C durante 20 minutos. Se centrifugaron los tubos a 10000 rpm en microcentrífuga durante 10 minutos para que precipite el ADN y el sobrenadante fue descartado con pipeta Pasteur. El pellet fue lavado con EtOH 70%, centrifugado a 10000 rpm durante 5 minutos y secado en estufa a 37 °C. El ADN plasmídico fue resuspendido en 40 µl de TE 1x.

Se realizaron digestiones para observar el tamaño del inserto. 8 µl de la minipreparación con EcoR1 5 U/ tubo y buffer EcoR1 10x y fueron incubados durante 2 horas a 37 °C. El producto de la digestión se visualizó en un gel de Agarosa 1% con 1 µl de EtBr (10 µg/µl). Como buffer de corrida se utilizó TAE 1x. Para el fragmento de 2000 también se realizó una digestión con Not1 durante 16 horas.

*Solución 1: 25mM Tris – HCl pH=8, 10mM EDTA pH=8 y 50 mM glucosa. Se autoclavó.*

*Solución 2: 0.2N NaOH y 1% SDS. Se preparó en el momento.*

*Solución 3: 60 ml de AcOK 5M, 11.5 ml de ácido acético Glacial 100% y 28.5 ml de H<sub>2</sub>O.*

*TAE 50x (para 1 litro): 242 g de Tris Base, 57.1 ml de ácido acético Glacial y 100 ml de EDTA 0.5M pH=8.*

**Secuenciación manual:** Se llevó a cabo la secuenciación de la minipreparación de la colonia número 3 mediante el método de Sanger.

Debido a que pGEM –t easy cuenta con la secuencia promotora del fago T<sub>7</sub> (fig. 11), la marcación fue realizada en extremo 5' del primer T<sub>7</sub>, mediante la enzima Polinucleótido kinasa (PNK). La reacción fue realizada con 10 pmoles del primer T<sub>7</sub>, 10 pmoles de ATP-γ-<sup>32</sup>P (6000 Ci / mmol), buffer de T<sub>4</sub> 10x, PNK de T<sub>4</sub> 5 – 10 U / µl y H<sub>2</sub>O para un volumen final de 10 µl. La incubación se llevó a cabo a 37 °C durante 30 minutos. Luego, se calentaron las muestras a 90 °C durante 2 minutos para inactivar la PNK.

Se utilizó un kit de secuenciación de Promega llamado Fentomol. Se rotularon 4 tubos con A, G, C, T y se colocaron en cada uno respectivamente, una mezcla de los dideoxynucleótidos (dideoxiterminadores) y los dNTPs. Se preparó una solución madre con 100 ng de templado (minipreparación de la colonia número 3), buffer de secuenciación 5x, 1,5 pmoles del primer T<sub>7</sub> marcado, H<sub>2</sub>O hasta un volumen final de 16 µl y se agregó 1 µl de Taq polimerasa (5 U / µl). Se agregaron 4 µl de la solución madre a cada uno de los tubos rotulados con A, G, C y T. Se realizó una PCR para secuenciación comenzando con 2 minutos a 95 °C, 30 ciclos de 30 segundos a 95 °C para la desnaturalización, 30 segundos de annealing a 42 °C y 1 minuto a 70 °C para la elongación. La reacción finalizó con el agregado de 3 µl de Stop Solution.

Los oligonucleótidos obtenidos como producto de la reacción anterior fueron resueltos en un gel desnaturante de poliacrilamida al 8%. Como buffer de corrida se utilizó TBE 1x. Se realizaron dos descargas de 3 µl del material. En ambos casos el orden de siembra fue A, C, G y T. El gel fue secado durante 1 ½ hora y se realizó una autorradiografía durante 24 horas a -70 °C.

*Gel de poliacrilamida 8%: Urea 7 M, 38% acrilamida / 2% bisacrilamida, TBE 10x y H<sub>2</sub>O para llevar a volumen. Para la gelificación se agregaron 0.1% TEMED y 0.1% de persulfato de amonio.*

*Buffer TBE 10x: 54g de Tris base, 27.5 g de ácido Bórico y 20 ml EDTA 0.5 M pH=8.*

**Secuenciación automática (Cornell University):** Se envió a Cornell el precipitado bacteriano (con el inserto de 700 pb) con una D.O<sub>600</sub> = 1,5 – 2, y se indicó el uso del primer de T<sub>7</sub> para llevar a cabo la secuenciación. También se enviaron las minipreparaciones del plásmido resuspendidas en H<sub>2</sub>O con una cantidad de masa indicada de 100 ng / µl.

También se envió un precipitado bacteriano que contiene el fragmento de 2000.

**Análisis de secuencias:** Los fragmentos secuenciados fueron introducidos en una base de datos de quinetoplastidos de WU – blast que alinea la secuencia introducida con las de la base brindando un puntaje máximo o score en aquellas secuencias en las que el alineamiento tiende a ser perfecto. También junto al resultado aparece un valor P que representa la probabilidad de que esa secuencia esté alineada al azar. Por

lo tanto, los mejores resultados tendrán un valor de P mínimo y un score máximo. Para la predicción de estructura secundaria se utilizaron los programas PSORT, SMART (Simple Modular Architecture Research Tools), Predict Protein, PROSITE, entre otros. También fueron de gran utilidad los programas de ExPasy.

**Marcación del producto de PCR de 700:** El producto de PCR de 700 bp fue utilizado como sonda para el screening de una library, para el Southern y Northern Blot. La marcación se llevó a cabo por el método de Random Priming para lograr una alta actividad específica. El kit utilizado fue de New England Biolabs. 25 ng del templado fueron disueltos en H<sub>2</sub>O libre de nucleasas para luego, completar un volumen final de 50 µl. La muestra fue desnaturalizada en agua hirviendo durante 5 minutos. Luego se la dejó en hielo por otros 5 minutos. Se agregaron el buffer de marcación que contiene los octanucleótidos al azar, la mezcla de dATP, dGTP y dTTP, 50 µCi de dCTP-<sup>32</sup>P y 5 U del fragmento Klenow de la enzima DNA polimerasa. Se incubó durante 1 hora a 37 °C y la reacción finalizó con el agregado de 0.2 M EDTA pH=8.

La sonda fue purificada de los dCTP radiactivos no incorporados por medio de un kit de purificación de QUIAGEN que consiste en el agregado de 250 µl de buffer PB. Todas las centrifugaciones se llevaron a cabo en microcentrífuga. Los 300 µl totales fueron transferidos a una columna de cromatografía provista por el kit, que consiste en una resina en la que se adhiere el ADN y solo se eluye con el buffer de elución. Se centrifugó a 6000 rpm durante 1 minuto y el eluyente fue descartado como corresponde para las muestras radiactivas. La columna fue lavada con buffer PE (80% EtOH) dos veces y centrifugada a máxima velocidad. El eluyente fue nuevamente descartado. Se agregaron dos veces 100 µl del buffer de Elución EB, se centrifugó a máxima velocidad y se midieron las cpm correspondientes con un contador portátil (Geiger), dando un resultado de 3,5 K en la escala 100x.

La sonda fue desnaturalizada a 95 – 100 °C durante 5 minutos y se la dejó en hielo por otros 5 minutos antes de cualquier experimento de hibridación.

**Screening de una Biblioteca Genómica de *T. cruzi* construida en el fago  $\phi$  fix:** El fago recombinante fue gentilmente cedido por el laboratorio del Dr. Mariano Levin. Alrededor de 30000 ufp fueron screeneadas por placa para evitar la superposición. El genoma se representó 4 – 5 veces para tener una probabilidad del 99% de encontrar el gen. El cálculo realizado fue el siguiente:  $N = \ln(1 - p) / \ln(1 - x / y)$ , siendo *N* el número de playas, *p* la probabilidad deseada de encontrar un gen, *x* el tamaño promedio del inserto de la library y *y* el tamaño del genoma. Para esta library el tamaño del inserto es de 13 kbp y el tamaño total del genoma de  $8,7 \times 10^7$  bp. Se obtuvo como resultado una cantidad total de 30820 playas de lisis para obtener representado 4 – 5 veces el genoma o sea una placa de Petri grande. El screening se realizó por triplicado: se prepararon 3 placas de Petri grandes.

Se utilizó un cultivo de bacterias XL1 blue competentes para fagos crecidas hasta una D. O.<sub>600</sub> de 0.5 en 3 ml de medio LB líquido con 10 mM MgSO<sub>4</sub> y 0.2% maltosa. Las bacterias fueron precipitadas por centrifugación a 5000 rpm (H400) durante 5 minutos y resuspendidas en 3 ml de solución SM.

Para el *screening primario*, la infección fue llevada a cabo con 600 µl de bacterias y 30 µl de una dilución 1 en 100 de manera de colocar 150 ufp. La mezcla fue incubada 10 minutos a temperatura ambiente y 20 minutos a 37 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, se agregaron 7 ml de Top Agarosa a 45 – 48 °C con 10 mM MgSO<sub>4</sub>, se agitó vigorosamente en vortex y se volcó sobre cada una de las 3 placas con medio LB – agar 2% a 37 °C. Fueron incubadas en estufa hasta que aparecieron las playas de lisis (aproximadamente 5 horas) y luego, dejadas O. N. en heladera a 4°C. La transferencia fue llevada a cabo con membranas de NENT™ Life Science Products, apoyando las mismas sobre la Top Agarosa durante 3 minutos en un ambiente estéril. Para una posterior orientación, fueron marcadas de manera asimétrica con una aguja, pinchando Top Agarosa y membrana. Una vez retiradas, fueron secadas 10 minutos invertidas sobre Whatman para optimizar las condiciones de la transferencia. Luego, las membranas invertidas fueron apoyadas sobre Whatman embebidos en Solución desnaturalizante durante 7 minutos, luego en solución neutralizante 3 minutos y finalmente 3 minutos en SSC 2x. Invertidas sobre un Whatman fueron secadas al aire durante 10 minutos y unidas irreversiblemente a la membrana de nylon con luz U. V.

La prehibridación fue llevada a cabo con 10 ml en cada botella de hibridación de solución Church durante 3 horas a 55 °C. Como sonda, se utilizó el producto de PCR de 700 bp. La marcación se realizó con dCTP radiactivo y se purificó como anteriormente se menciona. Una vez finalizada la prehibridación, 100 µl de la sonda marcada se agregaron a los 10 ml de solución de Church de cada botella. La hibridación del screening primario fue llevada a cabo en horno de hibridación durante 16 horas a 55 °C. Para evitar el annealing no específico, las membranas fueron lavadas dos veces con 10 ml de solución SSC 2x / 0.1% SDS, dos veces con solución SSC 0.2x / SDS 0.1% y en función de la marca remanente, una o dos veces en condiciones de alta astringencia con SSC 0.1x / 0.1% SDS. Las membranas fueron autorradiografiadas durante 2 – 4 días a – 70 °C.

Los clones positivos fueron ubicados en las placas de Petri. Los tacos de agarosa fueron levantados con un sacabocado de plástico descartable y colocados en un eppendorf con 500  $\mu$ l de solución SM en condiciones de esterilidad. 20  $\mu$ l de cloroformo fueron agregados a cada eppendorf y luego se vortexeó. Los tacos de agarosa fueron dejados en heladera a 4 °C durante 16 horas y luego centrifugados a 5000 rpm en microcentrífuga durante 5 minutos. Se rescató el sobrenadante y se realizaron diluciones 1 en 100 para colocar hasta 100 ufp por placa chica.

El *screening secundario* y los subsiguientes fueron realizados en placas de Petri chicas en condiciones similares. La infección se llevó a cabo con 150  $\mu$ l de bacterias XL1 blue provenientes de un cultivo fresco de 3 ml de LB líquido con 10 mM  $MgSO_4$  y 0.2% maltosa. La cantidad de Top Agarosa en este tipo de screenings fue reducida a 3 ml. La transferencia se llevó a cabo en iguales condiciones que para las placas grandes del screening primario. A partir del screening secundario, la prehibridación, la hibridación y los lavados se realizaron a 60 °C. Se continuó con los screenings hasta que todas las playas de lisis dieron clones positivos.

*MgSO<sub>4</sub>*: Se preparó 1M y se autoclavó.

*Maltosa*: Se preparó 20% y se filtró.

*Solución SM*: 50 mM Tris – HCl pH=7.5, 100 mM NaCl y 10 mM  $MgSO_4$ . Se autoclavó.

*Top Agarosa*: 50 ml de LB y 0.3 g de Agarosa. Se autoclavó. En el momento de utilizarla se agregó 10 mM de  $MgSO_4$ .

*Solución desnaturalizante*: 0.5N NaOH – 1.5 M NaCl.

*Solución neutralizante*: 0.5 M Tris – HCl pH=7.5.

*SSC 20x*: 3M NaCl y 0.3M Citrato de Sodio pH=7.

*Solución de Prehibridación Church*: 0,26 M Buffer fosfato de sodio pH=7, 1 mM EDTA, 1% BSA y 7% SDS.

**Amplificación de dos clones positivos de la library de ? fix:** De los screenings cuaternarios se seleccionaron dos clones positivos. Los tacos de agarosa fueron extraídos de las placas de Petri como anteriormente se menciona, y colocados en 500 ml de SM con 20  $\mu$ l de cloroformo. Se los dejó durante 16 horas a 4 °C y fueron centrifugados para rescatar el sobrenadante que contiene los fagos. 600  $\mu$ l de un cultivo crecido durante toda la noche a 37 °C de XL1 blue en LB – 10 mM  $MgSO_4$  – 0.2% maltosa, fueron infectados con 150  $\mu$ l de fago de cada uno de los clones, incubando 10 minutos a temperatura ambiente para permitir que el virus se adsorba a la bacteria y 20 minutos a 37 °C. Luego, se agregaron 70  $\mu$ l de  $MgSO_4$  10 mM y 7 ml de Top Agarosa a 48 °C. Se agitó vigorosamente y se volcó sobre una placa de Petri grande con LB – agar 2%. Las placas se incubaron durante 16 horas a 37 °C hasta ver confluencia de las playas de lisis. Una vez finalizada la incubación, se agregaron 5 ml de SM a cada una de las placas para rescatar el fago de la Top agarosa, y se las dejó 15 horas a 4 °C. El SM se recuperó de cada una de las placas. Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm en microcentrífuga durante 5 minutos y el sobrenadante fue transferido a un eppendorf limpio. Se agregaron 500  $\mu$ l de cloroformo y se mezcló por inversión. La biblioteca parcial fue guardada a 4 °C. Si bien no se tituló, la cantidad de fago esperada fue de  $10^{10}$  ufp / ml.

**Purificación y extracción de ADN del bacteriófago ? fix:**  $10^7$  ufp de los fagos anteriormente amplificados fueron incubados con  $10^9$  bacterias XL1 blue provenientes de un cultivo fresco en LB con 10 mM  $MgSO_4$  y 0.2% maltosa que fueron precipitadas y resuspendidas en SM. La incubación se realizó durante 10 minutos a temperatura ambiente y 20 minutos a 37 °C. La muestra total fue agregada a 250 ml de LB – 10 mM  $MgSO_4$  – 0.2% maltosa. La incubación se llevó a cabo a 37 °C con agitación durante 8 horas. Luego se agregaron 10 ml de cloroformo y se dejó 15 minutos a 37 °C con agitación. A cada muestra se agregaron 60 ml de NaCl 5 M y se dejaron 15 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron centrifugadas 10 minutos a 6000 rpm a 4 °C en rotor GS3. El sobrenadante fue rescatado y se agregaron 60 g de polietilenglicol MW = 8000 (PEG 8000). Se dejaron las muestras a 4 °C durante 16 horas y luego centrifugadas a 6000 rpm (GS3) durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante se eliminó por volcado y el precipitado se resuspendió en 17 ml de solución SM. Se realizaron 4 extracciones con un volumen de cloroformo isoamílico en tubos cónicos, centrifugando durante 5 minutos a 3000 rpm (H400) y rescatando la fase acuosa superior. Las muestras fueron transferidas a tubos especiales y se completaron los volúmenes con solución SM. Luego fueron cuidadosamente equilibradas y centrifugadas en rotor SW28 en ultracentrífuga durante 2 horas a 25000 rpm a 4 °C en vacío. El precipitado fue resuspendido en 500  $\mu$ l de SM y se lo dejó durante 16 horas a 4 °C. Las muestras fueron incubadas con 50  $\mu$ l de RNAsas (10 mg / ml) durante 1 hora a 37 °C y luego con 100  $\mu$ g / ml de proteinasa K con 20 mM EDTA y 0,5% SDS durante 2 horas a 68 °C. Luego se realizaron dos extracciones con un volumen de PIC y dos con cloroformo isoamílico, centrifugando en cada caso 30 segundos a 13200 (microcentrífuga) para separar las fases. Se agregó un volumen de isopropanol,

se mezclaron por inversión y se dejaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Las muestras fueron centrifugadas 15 minutos a 13200 rpm. El precipitado fue lavado con 500 µl de EtOH 70% y se centrifugó 5 minutos a 13200 rpm en microcentrífuga. Una vez eliminado el sobrenadante, el precipitado fue secado con lámpara y resuspendido en 100 µl de H<sub>2</sub>O.

Para observar la calidad y cantidad de ADN extraído del fago, ambas muestras se corrieron en un gel de agarosa 0.7% con BrEt. Como marcadores de masa se utilizaron muestras con 250 ng, 100 ng y 50 ng.

*Cloroformo isoamílico: 24 partes de cloroformo y 1 de alcohol isoamílico.*

**Southern blot:** 3,75 µg del ADN extraído previamente fueron digeridos con diferentes enzimas de restricción (New England Biolabs). Para las digestiones simples, se utilizaron 5 µl de templado con 15 U de EcoR1 y 15 U de Xho1. Cada digestión se llevó a cabo con el buffer adecuado para cada enzima y provisto por el laboratorio. Para la digestión con la enzima Xho1 fue necesario el agregado de BSA para optimizar las condiciones de digestión. Se realizó también, una doble digestión con 7,5 U de EcoR1 y 7.5 U de Xho1. Las digestiones se incubaron a 37 °C durante 16 horas y luego se dio medio pulso de enzima durante 2 horas. Se preparó un gel de agarosa 0.8% con BrEt. El orden de siembra de las digestiones fue EcoR1, Xho1 y finalmente la digestión doble EcoR1 – Xho1. El gel fue lavado durante 15 minutos con HCl 0.25 N. La transferencia se realizó por capilaridad. Como buffer de transferencia se utilizó 0.4N NaOH. La pirámide se construyó poniendo de abajo hacia arriba: 3 Whatman, el gel, papel de autorradiografías, la membrana de Nylon, 5 Whatman, esponja, torre de papel absorbente de 4 cm y peso. Se dejó durante 16 horas y se aseguró que la cantidad del buffer de transferencia fuera suficiente. El dispositivo de transferencia se desarmó y la membrana fue lavada con SSC 2x. La prehibridación se realizó con 10 ml de solución de Church durante 3 horas y la hibridación se llevó a cabo con 100 µl de la sonda marcada. Se incubó toda la noche a 60 °C. La membrana fue lavada y autorradiografiada como anteriormente se explicó.

**Extracción y cuantificación de ARN de *Trypanosoma cruzi* cepa Tulahuen II:** Para la extracción de ARN se utilizó un kit de Life Technology "TRIzol<sup>®</sup> Reagent" que consiste en una solución que desnaturaliza proteínas y que confiere propiedades químicas que permiten separar el ARN del resto de los componentes celulares. Todos los materiales fueron tratados con 0.4N NaOH y autoclavados. Siempre se utilizaron guantes y material estéril para evitar la contaminación con RNAsas. Todas las soluciones necesarias para la extracción fueron libres de RNAsas. Para la preparación de las soluciones para la corrida de ARN se utilizó agua DEPC.

4 x 10<sup>8</sup> epimastigotes crecidos en medio LIT fueron precipitados por centrifugación. Las células fueron lisadas con 1 ml, 5 ml y 10 ml de TRIzol<sup>®</sup>, para evaluar el rendimiento, y varios pipeteos sucesivos. La incubación fue realizada en eppendorf para el caso de 1ml de reactivo y en tubos corex para 5 y 10 ml, a temperatura ambiente durante 5 minutos para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos. Se agregaron 0.2 ml de cloroformo; la muestra fue agitada vigorosamente durante 15 segundos, incubada a temperatura ambiente durante 2 – 3 minutos y centrifugada a 12000 x g durante 15 minutos a 4 °C. La muestra fue separada en dos fases: una orgánica rojiza inferior de fenol – cloroformo, una interfase y una fase superior acuosa rosada en donde permanece exclusivamente el ARN. La fase orgánica en donde se encontraban el ADN y las proteínas fue descartada. La acuosa fue transferida a un tubo eppendorf libre de RNAsas en donde se agregaron 0.5 ml de alcohol isopropílico para precipitar el ARN. La muestra fue incubada a temperatura ambiente durante 10 minutos y centrifugada a 12000 x g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue descartado y el pellet se lavó con EtOH 75%, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 7500 x g durante 5 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado fue secado a temperatura ambiente con lámpara. El ARN fue resuspendido en agua libre de RNAsas e incubado a 55 °C durante 10 minutos. La cuantificación se llevó a cabo mediante espectrofotometría con una dilución 1 en 100 por A<sub>260</sub> y A<sub>280</sub> para observar contaminantes.

**Northern blot:** Camas, cubas y peines fueron lavados con NaOH 0.4N durante 15 minutos. Las puntas de pipetas fueron limpiadas con NaOH 0.2N y 10% SDS. Los materiales de vidrio necesarios para la preparación del gel fueron autoclavados.

Se preparó un gel de agarosa 1% con agua DEPC. Una vez fundida la agarosa, se agregaron MOPS 10x y formaldehído 13% v / v. El buffer de corrida MOPS 1x se preparó con MOPS 10x, 4.4 % v / v de formaldehído y agua DEPC. El loading buffer se preparó en el momento con 50 µl de formamida deionizada, MOPS 10x, formaldehído 20% v / v, 1 µl de BrEt (10 mg / ml).

El gel fue precorrido a 5 v / cm durante 15 minutos. A la muestra se le agregó un volumen de loading buffer y se incubó a 65 °C durante 5 minutos para desnaturalizar el ARN. Se sembraron 23 µg de ARN (el máximo posible por el método) y en otra calle, solo loading buffer con los colorantes xilencianol y azul de bromofenol

para observar el frente de corrida. Las muestras se corrieron a 50 v hasta que el frente de corrida llegó a  $\frac{3}{4}$  del gel. La transferencia se realizó en condiciones similares al Southern blot. Se utilizó como buffer de transferencia la solución SSC 10x y se dejó durante toda la noche. La membrana fue lavada con SSC 2x y unida irreversiblemente a la membrana con luz U. V. La prehibridación, la hibridación y los lavados se realizaron a 50 °C en iguales condiciones anteriormente mencionadas. Al observar annealing inespecífico, los lavados llegaron a ser de alta astringencia a 65 °C y con solución SSC 0.1x / 0.1% SDS. La membrana fue autorradiografiada a -70 °C durante 24 horas.

*Agua DEPC:* Se preparó una dilución 1 en 10 de Dietilpirocarbonato (DEPC) en EtOH 100%. Se agregó al H<sub>2</sub>O a tratar diluyendo nuevamente 1 en 10. Se dejó a temperatura ambiente durante 16 horas y se autoclavó.

*MOPS 10x (para 1 litro):* 41.9 g de MOPS, 17 ml de AcNa 3M pH=5.2 autoclavado y 20 ml de EDTA 0.5M pH=8. Se llevó a pH=7 con NaOH y se agregó H<sub>2</sub>O para un volumen final de 1 litro. Se trató con DEPC 0. N. y se autoclavó.

Para la realización de las prácticas anteriormente mencionadas se consultaron los siguientes manuales de laboratorio: Current Protocols in Molecular Biology (1997), Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1989) y PCR Primer: A Laboratory Manual (1995).

## Resultados

**Extracción y cuantificación de ADN de *Trypanosoma cruzi* cepa Tulahuen II:** En el gel de agarosa 1% (Fig. 8) se observa una única banda de ADN lo que significa que es de alta calidad sin digestiones. También puede observarse contaminación con ARN por lo cual volvió a hacerse un tratamiento con RNAsas durante 20 minutos a 37 °C seguido de una nueva extracción fenol – cloroformo, precipitación con EtOH 100% y lavado con EtOH 70%.

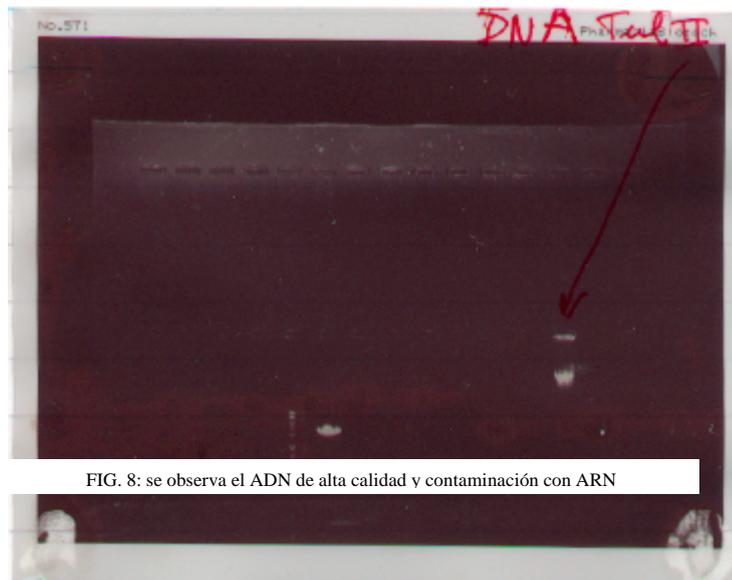


FIG. 8: se observa el ADN de alta calidad y contaminación con ARN

Se cuantifican dos diluciones por absorbancia a 260 nm.

$A_{260}$  dilución 1:50 = 0.307

$A_{260}$  dilución 1:100 = 0.146

Por lo tanto, aplicando la fórmula  $A_{260} \times \text{dilución} \times 50 = \mu\text{g} / \text{ml}$ , se concluye que el ADN extraído se encuentra en una concentración de 0.75  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ .

**PCR:** En el gel (Fig. 9) se observan:

- Calle 1: marcador de peso molecular 100 bp ladder,
- Calle 2 (primer par de primers): se observa una banda neta de tamaño un poco mayor a 2000 pares de bases. Este fragmento se lo clonó en pGEM – t easy y se envió a Cornell para ser secuenciado.
- Calle 3 (segundo par de primers): se observa una banda neta con un tamaño de 700 pares de bases que se aproxima al valor esperado en base al tamaño de las secuencias que se encontraban en el lugar en que fueron diseñados los primers.
- Calle 4, control positivo (primers de NOS): se observan las bandas esperadas, entre ellas las de mayor intensidad corresponden a un tamaño de 700 y 2000 bp que ya han sido identificadas en este laboratorio.

- Calle 5 control positivo (segundo par de primers con ADN proveniente de otra extracción): se observa la misma banda de 700 bp que en la calle 3.
- Calle 6 (tercer par de primers, con 1.5 mM Mg): no se observa producto.
- Calle 7 (tercer par de primers, con 2.5 mM Mg): se observa una banda de tamaño ligeramente mayor a 700 bp y bandas de menor tamaño.
- Calles 8 y 9 (cuarto par de primers con 1.5 y 2.5 mM Mg respectivamente): se observan las mismas bandas que en la calle 7 solo que con mayor intensidad.
- Calles 10 y 11 **no** corresponden a este experimento.
- Calle 12 control positivo (primers NOS con ADN genómico proveniente de otra extracción): se observa menor cantidad de bandas debido quizás a la pureza del la preparación del templado.
- El control negativo no figura en este gel.

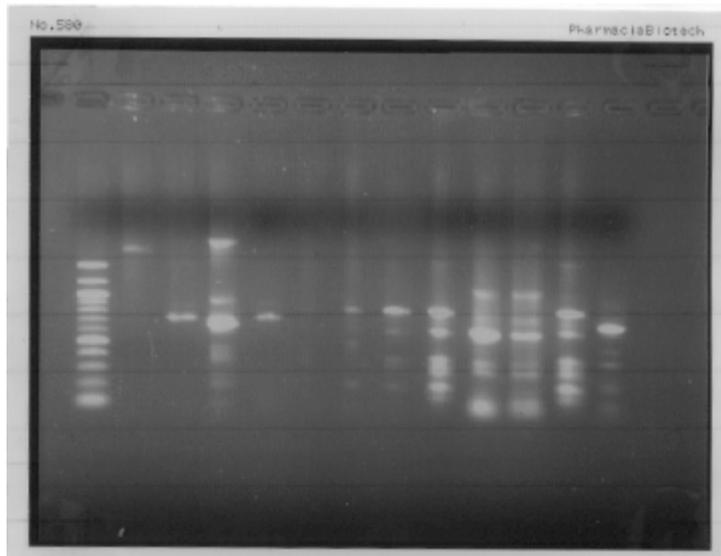


FIG. 9: Productos de la PCR llevada a cabo a 55 °C para el annealing.

Por el gran número de bandas en las calles 7, 8 y 9 se decidió hacer una PCR con mayor astringencia a 57 °C como temperatura de annealing (Fig. 10).

- Calle 1: marcador de peso molecular 100 bp
- Calles 2, 3, 6, 8, 9, 10 y 11 **no** corresponden a este experimento.
- Calle 4 (tercer par de primers)
- Calle 5 (cuarto par de primers)
- Calle 7: control negativo

Al no poder reducir el número de bandas, se decidió continuar solo con el fragmento de 700 bp (Fig. 9, calle 3) proveniente del segundo par de primers ya que era el que más se acercaba al tamaño del producto esperado y con el de 2000 para secuenciar (Fig. 9, calle 2).

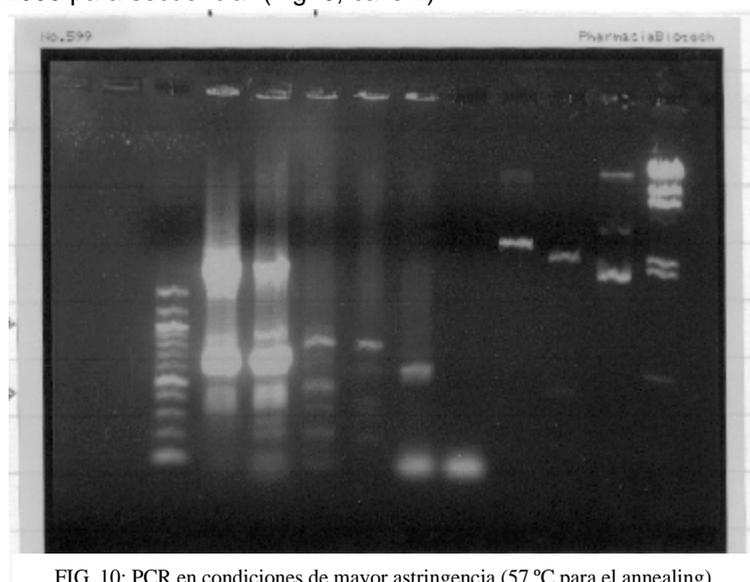


FIG. 10: PCR en condiciones de mayor astringencia (57 °C para el annealing)

**Transformación de bacterias DH5<sup>+</sup>:** El fragmento de 700 bp obtenido como único producto de la primer reacción de amplificación (Fig. 9, calle 3) y el de 2000 bp (Fig.9 calle 2) fueron subclonados en el plásmido pGEM – t easy (Fig. 11). El plásmido cuenta con un polylinker o sitio de clonado múltiple, el gen de betalactamasa que le confiere la resistencia a ampicilina, un promotor para la RNA polimerasa del fago T<sub>7</sub> y otro de SP<sub>6</sub>.

Una vez transformadas y plaqueadas las bacterias competentes, la selección se hizo en base al color de las colonias debido a que aquellas que han recibido plásmido con inserto, tienen interrumpido el gen *lacZ* y no brindan color azul en presencia de X – Gal e IPTG. Las colonias azules son el resultado de haber sido transformadas con plásmido recircularizado sin inserto.

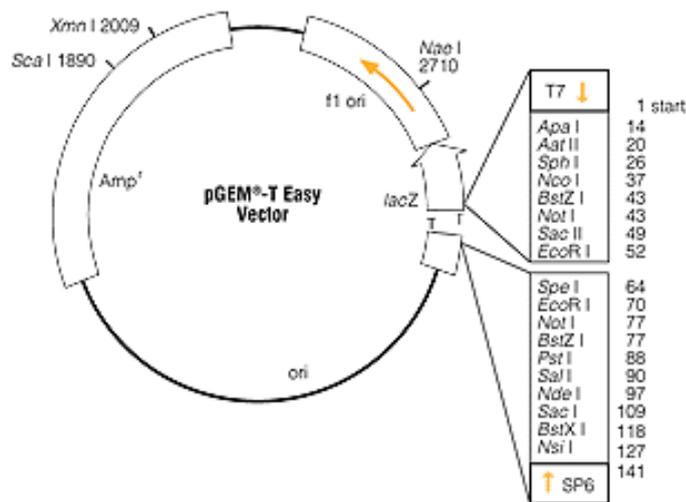


FIG. 11: Mapa de Restricción de pGEM - T easy.

**Minipreparación del plásmido:** Las minipreparaciones de las 10 colonias de las bacterias transformadas con el fragmento de 700 pb fueron repicadas en medio LB líquido y analizadas por digestión con EcoR1 (Fig. 12).

El orden de siembra fue

- Calles 1 y 9: marcador de peso molecular 100 bp ladder.
- Calles 8 y 16: al ? – hind utilizado como marcador de masa. En ambas calles se sembraron 250 µg.
- Calles 2 y 3: colonias 1 y 2 respectivamente. No se observan bandas.
- Calles 4, 5, 6, 11, 13, 14 y 15 correspondientes a las colonias 3, 4, 5, 7, 8, 9 y 10 respectivamente, se observan dos bandas que corresponden al plásmido y al inserto de 700 bp.
- Calles 7 y 12 corresponden a las colonias 5 y 7 sin digerir.
- Calle 10: corresponde a la colonia número 6 que contiene un inserto de tamaño distinto al esperado y se descarta.

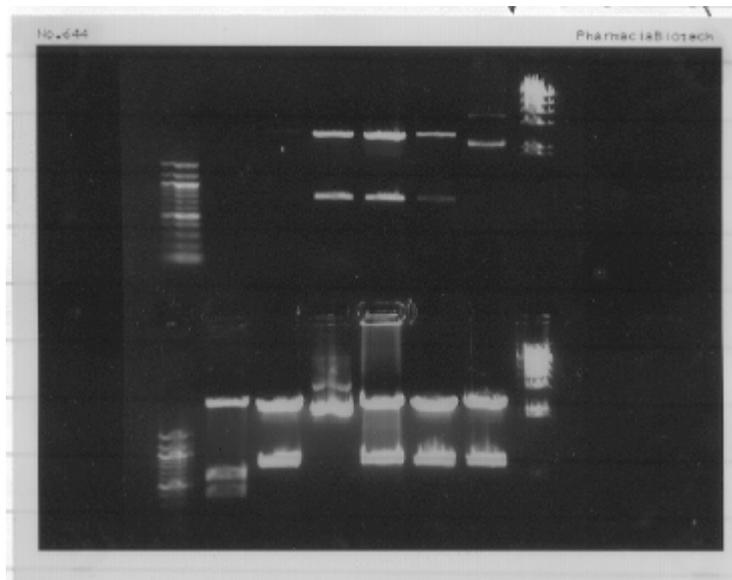


FIG. 12: Digestiones de las 10 colonias seleccionadas.

Para las transformaciones correspondientes al fragmento de 2000, solo pudieron repicarse 7 colonias blancas. Luego de las minipreparaciones, se realizaron digestiones con 10 U totales EcoR1 y con 10 de Not1 (Fig. 13).



FIG. 13: Digestiones de las minipreparaciones del fragmento de 2000 bp con EcoR1 y con Not1.

- Calle 1: marcador de peso molecular 1 KB.
- Calles 2, 3, 4 y 5: digestiones con EcoR1 de las minipreparaciones 2, 4, 5 y 8, respectivamente. Se sospecha que el fragmento contiene dentro de su secuencia un sitio de restricción para la enzima y que la digestión fue parcial.
- Calles 7, 9, 10, 11 y 12: digestiones con Not1 de las minipreparaciones de las colonias 1, 4, 5, 6 y 8, respectivamente. No se observan las dos bandas del tamaño esperado correspondientes al fragmento de 2000 bp y al plásmido sin inserto.
- Calle 8: digestión con Not1 de la minipreparación de la colonia 2. Se observan las bandas esperadas. Se envió a secuenciar.

**Secuenciación Manual:** La autorradiografía fue bañada en revelador, en ácido acético y en fijador y finalmente enjuagada con agua. El orden de siembra fue A, C, G y T.

La lectura de la autorradiografía (Fig. 14) permitió identificar la siguiente secuencia:

```
GAAGTATGTGGTTGGCCCCGTACCATTGNNTTCACGCACCTTA  
ATCAGGTTTAATCATNAAAAATNTCCACACACGAATCGGCGGAG  
TAAGAAACGAATACATGTATCAGAACGCGTCTTATCAATCATCAC  
TCACATACTTCGCATAACTCGAAGTTACATCTATCCTACTCTACTC  
ATACC
```

En negritas se indica una parte del primer forward.

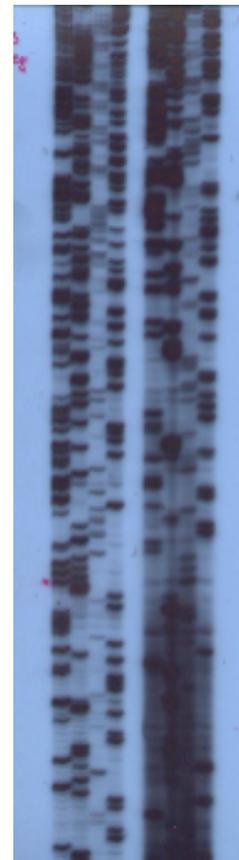


FIG. 14: Secuenciación manual del fragmento de 700 bp.

**Secuenciación automática:** la secuenciación de la minipreparación no pudo llevarse a cabo. Sin embargo, la del pellet bacteriano de la colonia número 3 con el fragmento de 700 bp fue exitosa, dando como resultado:

GGCCCCGCGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTAAAGGA  
TCCGAATATGTGGTTGGGCCCCCTACCATTGGTTCACGCACCTTGATCAGTTTAATCA  
**TGAAAAATGTCCACACACGAACGGCGGAGTAAGAAAACGAAATACATGTATCAGA**  
**AACGACGTTCCCTGTATCCCAGATGCAAATTGCACCTTCCCAACAAATTTTACCTC**  
**GATCGCGAACATGGGCACGTCGGGAAGAAGTAGATTCACCA**CAATACCATAAATTC  
GGCGCCTTCTTGACACCTCTTCGGGTTCTGGAAAGCGCCATGCCACATGTAAAAG  
ACAGAAGCTACAAATAAATAGAAAAGGGTGGCCACAATGGACATGCCAAGGTAAG  
CCTGCACCAATGACTCCCCCAGCACGGGCACCTGGTAGCACACCCAGCCACAGTAG  
TTAGCGATACAGAAGAGCGGATGAATGAAGTGAATAAAGAAGGTTAGACATGTAA  
TGAACCGGCTTGTGCCGCCATCCAATCTATGATATTGCAGTCAACCATTTCTCTCGT  
TGTTACAATTTCTTTTCGTTTCCCCCTTCTTCCCCTTTTTTTGTATTTACCGTTATTT  
TGTTTTTTTAAAAGGTCAGTCANGAAACACAACACCCCCCTTACAAGCAGCAAC  
TTTGTTCGCACGCCTAACGACAGGAGACTGGAAAGACTATCGTAAAAAAAAAAAAAN  
GGAACATGGNAAAAAATTAATGGAAATCCCNTATTAATGGNNGGCCAAACCAAT  
CATGACCAACCCATTACTCGGATCCTTNATCACTAGTGAATTCGGCCGCCTGCAG  
GTCGACCATATGGANGCTCCCACGCGTTGGATGCTAGCTTGGNNTTTTTATGNNCCT  
AATAGCTGGNGAACATGGGNTNGTGTTCNNNGNAATGGTTTCGGTNCATTCCCCA  
NNTCNCCGAGCTTAAGGNAAGCCNNGGGGGCCTANNAGNGCTATTNATANTTGGN  
TGNNCCTGCGCTTCNNTGGAANCTNTTGCCTGATATAATCGNNCCNNGGGAGGG  
NGGGTGGGCCTTCCCTCNCTNTACTCTGNTGGGGTGNNGGGGGTNANCNNAGGGTC  
GGTCCCANTGGGACCGAAAATGTNAGNCNAGGCGACNAAGGNGNNGGTTTGGCC  
CCGANANAAANNAGAG

Recuadrado y en itálicas se indica el primer forward con los sitios de restricción subrayados, recuadrados se observan los sitios EcoR1 del plásmido pGEM – t easy y en negritas, las secuencias identificadas por la secuenciación manual. La secuencia reveló que en la PCR, el primer forward actuó también como reverse.

El pellet bacteriano para la secuenciación del fragmento de 2000 bp, ha sido enviado en el momento de la escritura del presente trabajo, por lo tanto, los resultados serán presentados en el momento de la defensa.

**Análisis de la secuencia:** Se utilizó el programa WU – Blast que identificó un Expressed Sequence Tag (EST) de 697 bp identificado como *A1664768 TENG0726 T. cruzi epimastigote normalised cDNA Library clone n1129. R 5', mRNA sequence* (Gonzalez Rey, et al, 1998, sin publicar), con un 93% de identidad, un score de 2468 y una  $p=3.0 \times e^{-107}$ . Se hace referencia a una library construida RNA<sub>m</sub> de epimastigotes de *T. cruzi* cepa CI – Brenner realizada a partir de primers oligo dT y clonados en pT7318D.

Con respecto a la nomenclatura TENG de los EST, la primera letra corresponde *T. cruzi*, la segunda al estadio del ciclo de vida de las células de las que se obtuvieron los clones como ser Epimastigote, la tercera está asociada con la clase de library genómica que fue construida (Normalised) y la cuarta designa al laboratorio que obtuvo la secuencia de ese clon (Granada).

Mediante el programa Expasy – translate, se tradujo el EST, se eligió el mejor marco de lectura y una vez obtenida la secuencia aminoacídica, se intentó predecir la estructura secundaria.

**MGGTSR FITCLTFFIHFIHPLFCI**↓AANYCGWVCYQVPVLGESLVQAYL  
GMSIVATLFYLFVASFVYMWAWRFPEPEEVSRRRIYGIVVNLLFSDVPM  
FAIEVKICWDVQFASGIQGTSFLITCISFSYSAVRVWTFEMIIKLIKVREPMV  
GAQPQFAGSVMYAADSRRRGPPSYFYNGNLCTHVMDRPRMVAKLEYQK  
TLAFHLPERPPTPID

En negritas se observa el péptido señal y se indica con una flecha el sitio de clivaje del mismo identificado por el programa SMART (Simple Modular Architecture Research Tool). PROSITE indicó al menos 4 sitios consenso de fosforilación por PKC, dos por Casein Kinasa y cuatro sitios potenciales de N – miristoilación. Subrayados se muestran los motivos transmembrana predichos por SMART, que indicó también, que el carboxilo – terminal estaría ubicado en el interior de la célula..

Por otro lado, PSORT indica que no posee señal SKL para transportarse a peroxisomas, no tiene señal KDEL de retención en membrana del retículo, tampoco señal de retención en vacuolas ni de transporte de superficie a Golgi. Los resultados indican que la secuencia aminoacídica en sí misma, tiene un 33% de

características de pertenecer al retículo endoplásmico y 22% de membrana plasmática, Pero al no encontrarse señales de ningún tipo, en este trabajo se asumió que su destino final es membrana plasmática.

Con respecto a la estructura terciaria el programa Maxhom encontró cierta homología con un transportador ABC<sub>3</sub> humano.

**Screening de una Biblioteca Genómica de *T. cruzi* construida en el fago I fix:** De las cada una de las tres placas screeneadas a 55 °C se extrajeron 5 tacos de Top Agarosa, y se pasó a un screening secundario.

Del screening secundario realizado a 60 °C se extrajeron alrededor de 6 clones positivos. De los seis, en el screening terciario solo fueron positivos 4. Se hizo luego un screening cuaternario (Fig. 15).

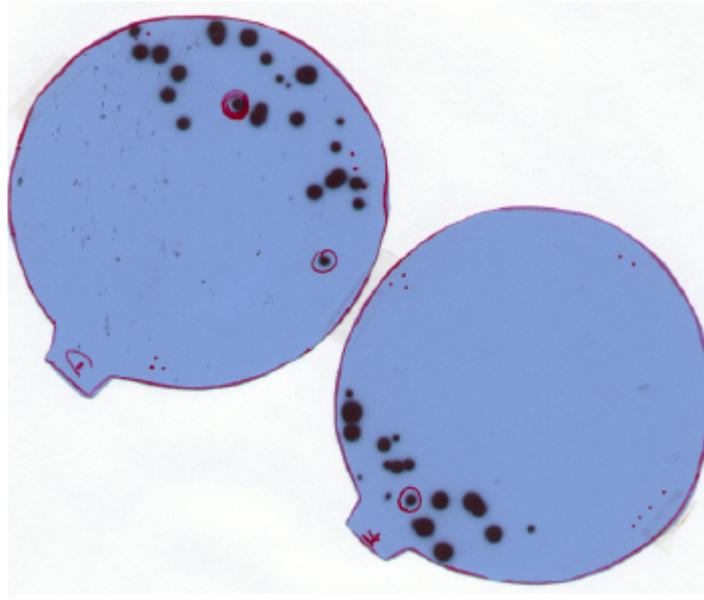


FIG. 15: De las placas positivas solo se eligieron dos clones para ser amplificados.

**Southern Blot:** En el gel se observan las digestiones con enzimas de restricción. El orden de siembra es EcoR1, Xho1 y la digestión doble EcoR1 – Xho1 (Fig. 16).

En la autorradiografía pueden observarse bandas nítidas, con la misma movilidad para el caso de ambas digestiones simples y como una molécula de menor peso molecular para el caso de la doble digestión. Al observarse bandas nítidas, resulta como conclusión que la sonda utilizada no posee sitios de corte para las enzimas de restricción EcoR1 y Xho1. Extrapolando la distancia de las bandas con respecto a la zona de siembra desde la autorradiografía al gel, puede decirse que las bandas autorradiografiadas tienen un tamaño promedio de 8 kbp para las digestiones con EcoR1 y para Xho1 y de 2 kbp para la digestión doble.

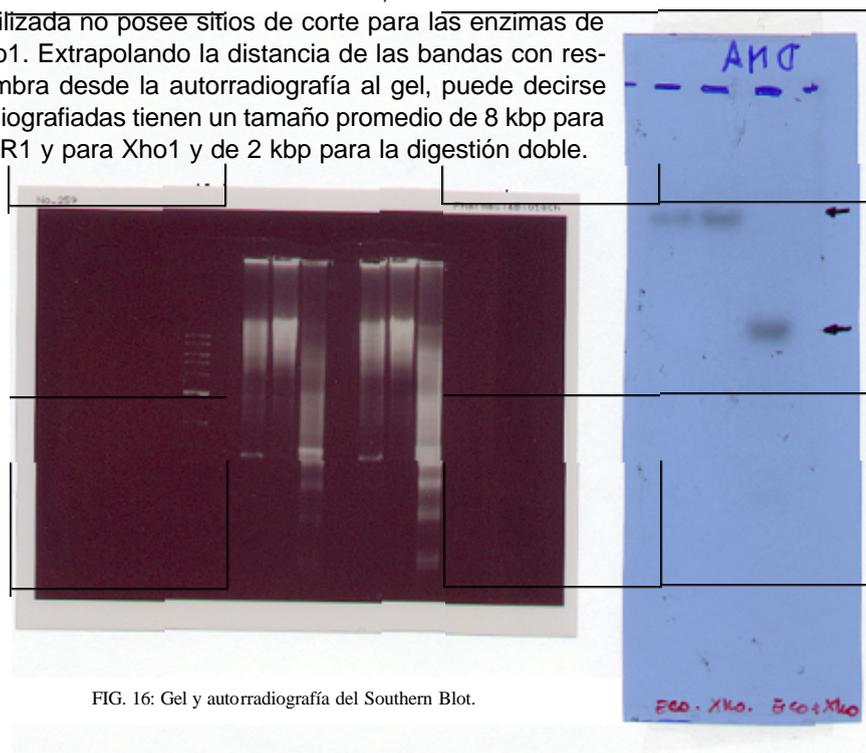


FIG. 16: Gel y autorradiografía del Southern Blot.

**Extracción y cuantificación de ARN de *Trypanosoma cruzi* cepa Tulahuen II:** Luego de la resuspensión del ARN de H<sub>2</sub>O libre de RNAsas, se prosiguió con la cuantificación de una dilución 1 en 100 mediante espectrofotometría por A<sub>260</sub> y A<sub>280</sub>. Mediante la relación A<sub>260</sub> / A<sub>280</sub> se midieron los contaminantes.

Primer muestra: extracción de ARN con 1 ml de Trizol.

$$A_{260} = 0.575$$

$$A_{280} = 0.282$$

$A_{260} / A_{280} = 2$ , lo que significa que el ARN se encuentra puro.

Segunda muestra: extracción de ARN con 5 ml de Trizol.

$$A_{260} = 0.175$$

$$A_{280} = 0.088$$

$$A_{260} / A_{280} = 2$$

Tercer muestra: extracción de ARN con 10 ml de Trizol.

$$A_{260} = 0.118$$

$$A_{280} = 0.055$$

$$A_{260} / A_{280} = 2$$

Se aplicó la fórmula  $A_{260} \times \text{dilución} \times 40 = \mu\text{g} / \text{ml}$ , que dio como resultado que el ARN se encuentra en una concentración de 2.3  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$  en la primer muestra, 0.7  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$  en la segunda y 0.47  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$  en la tercera.

En todos los casos se obtuvo ARN de alta pureza y calidad; de todas maneras, se prefirió el uso de la primer muestra por haber sido más eficiente la extracción y por encontrarse en una mayor concentración.

**Northern Blot:** Como se observa en el gel (Fig. 17) el ARN se encuentra en buen estado y es resultado de haber evitado exhaustivamente la contaminación con RNAsas. El Northern Blot dio positivo. A pesar de los lavados de alta astringencia a 65 °C, no pudieron eliminarse posibles annealings no específicos. Como resultado, se acepta la idea de que ese gen de donde proviene la sonda, se expresa en la forma de epimastigotes y se corrobora con los resultados de bioinformática.

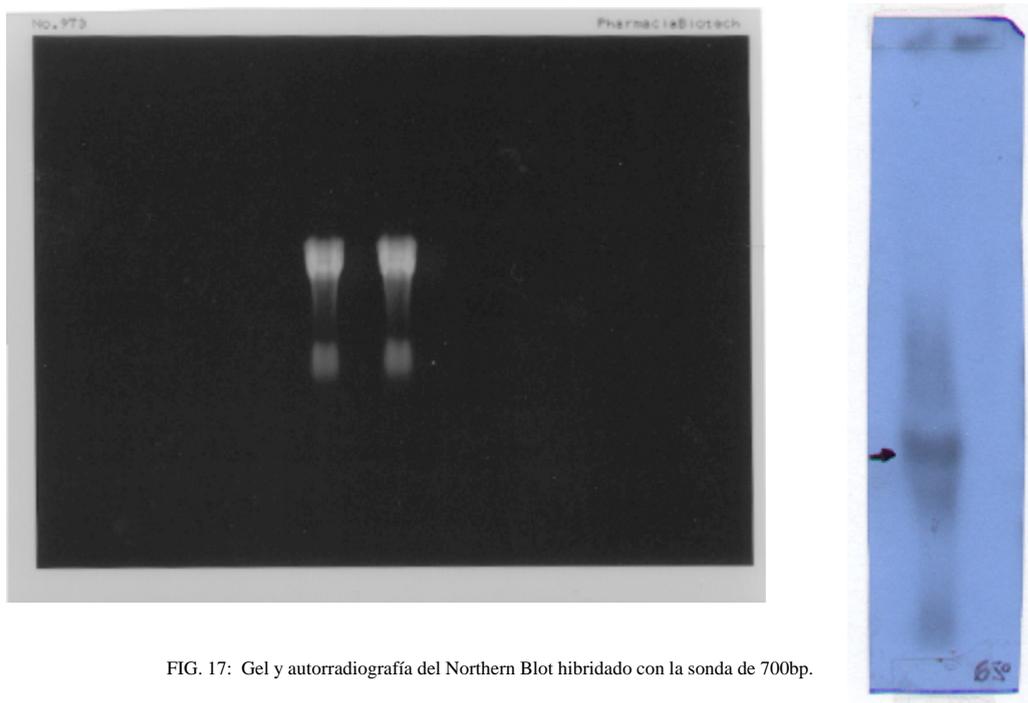


FIG. 17: Gel y autorradiografía del Northern Blot hibridado con la sonda de 700bp.

**Purificación y extracción de ADN del bacteriófago ? fix:** Terminada la extracción del ADN del fago, se prosiguió con un gel de electroforesis 0.7% (Fig. 18)

- Calle 1: marcador de masa correspondiente a 250 ng.
- Calle 2: marcador de masa de 100 ng.
- Calle 3: marcador de masa de 50 ng.
- Calle 4: se sembraron 2  $\mu\text{l}$  del ADN extraído del clon 1. Como resultado se observa muy poca cantidad de ADN.
- Calle 5: se sembraron 2  $\mu\text{l}$  del ADN del clon 2. Puede observarse su similitud con la siembra del marcador de 50 ng, por lo cual se concluye que la concentración es de 25 ng /  $\mu\text{l}$ .

- Calles 6 y 7 **no** corresponden a esta línea de investigación.

El clon 1 se descarta por tener muy poca concentración de ADN. El clon 2 tiene 50 ng / 2  $\mu$ l y se mandó a secuenciar; los resultados serán presentados en la defensa del presente trabajo.

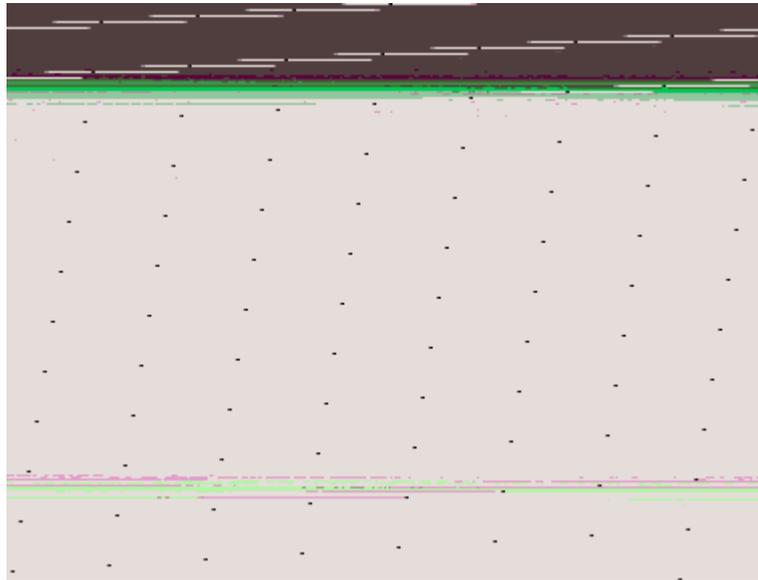


FIG. 18: Cuantificación por gel de Agarosa 0.7%.

## Conclusiones

Los tripanosomátidos en general tienen la capacidad de eludir eficientemente el sistema inmune del huésped, hecho que se atribuye a la peculiaridad de su genoma y a las características de su expresión génica.

Allí nace la dificultad de identificar genes por medio de un abordaje convencional y metodologías comúnmente utilizadas.

La dificultad aún persiste cuando el objetivo es la identificación de genes correspondientes a enzimas cuya actividad ha podido ser medida y parcialmente caracterizada.

El conocimiento del metabolismo, de los procesos involucrados en la diferenciación y en la infectividad, así como de la particularidad de su genoma, aportan valiosos elementos para la lucha contra la enfermedad, puesto que se constituyen en herramientas para interferir en dichos procesos, reduciendo el número de muertes que hoy se registran y la parasitemia de enfermos crónicos, resolviendo uno de los problemas de salud pública más importante de América Latina.

El proyecto genoma de *Trypanosoma cruzi* y los bancos de secuencias que se expresan construirán en el futuro, una fuente de información esencial acerca de secuencias correspondientes a enzimas homólogas o con funciones análogas a caminos metabólicos ya descritos en otros organismos.

Si bien no se han encontrado los genes de la proteína quinasa dependiente de AMP<sub>c</sub> propuestos en el presente trabajo, el análisis bioinformático del fragmento de 700 bp obtenido, que indica que es una proteína de membrana plasmática, junto a la búsqueda del resto del gen al que corresponde en una biblioteca genómica, contribuirán con información útil a los Bancos de datos y al proyecto genoma, y tal vez, a una proteína que pueda ser funcional o estructuralmente importante para el desarrollo del parásito.

## Referencias

- Alberts, B., Bray, E. Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J. D. (1996) *Biología Molecular de la Célula*. Tercera Edición. Ed. Omega S. A. Barcelona, España. pp 632.
- Almeida de Faria, M., Freymüller, E., Colli, W. and Alves, M. J. M. (1999). *Trypanosoma cruzi*: Characterization of an Intracellular Epimastigote – like form. *Experimental Parasitology*. **92**, 263 – 274.
- Atías, A. Neghme. (1996). *Parasitología Clínica*. Tercera Edición. Editorial Mediterráneo. Santiago, Chile. 255 – 268.
- Ausubel, F. M., Brent, R. Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. (1997). *Current Protocols in Molecular Biology*. Ed. John Wiley & Sons Inc. Vol: 1, 2 y 3.
- Clustal W: <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>
- Dieffenbach, C. W. and Dveksler, G. S. (1995). *PCR Primer: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Flawiá, M. M., Téllez – Iñón, M. T. and Torres, H. N. (1997). Signal Transduction Mechanisms in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today*. **13**:1, 30 – 33.
- <http://www.ebi.ac.uk/>
- <http://www.tigr.org/tdb/mdb/mdbcomplete.html>
- Kollien, A. H. and Schaub, G. A. (2000). The Development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. *Parasitology Today*. **16**:9, 381 – 387.
- Lewin B., (2000), *Genes VII*. Oxford University Press. New York, EEUU. pp 519 – 540 / 520 – 524.
- Libro de la vida, 1971, Tomo VI. Editor César Civita. Abril Educativa y cultural S. A.
- Macedo, A. M. and Pena, S. D. J. (1998). Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. *Parasitology Today* **14**:3, 119 – 124.
- Naula, C. and Seebeck, T. (2000). Cyclic AMP Signaling in Trypanosomatids. *Parasitology Today*. **16**:1, 35 – 38.
- NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Ochatt, C. M., Ulloa, R. M., Torres, H. N. and Téllez – Iñón, M. T. (1993). Characterization of the catalytic subunit of *Trypanosoma cruzi* cyclic AMP – dependent protein kinase. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **57**, 73 – 82.
- Pascucci, V., Labriola, C., Téllez – Iñón, M. T. and Parodi, A. J. (1999). Molecular and biochemical characterization of a protein kinase B from *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **102**, 21 – 33.
- Pedro's Biomolecular Research: [http://www.public.iastate.edu/~pedro/rt\\_1.html](http://www.public.iastate.edu/~pedro/rt_1.html)
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Tyler, K. M. and Engman, D. M. (2001). The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology*. **31**, 472 – 481.
- Wu – Blast: <http://www.ebi.ac.uk/blast2/parasites.html>