



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

ESTIMACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS DEL GEN CALRETICULINA, EN EL GENOMA DE *TRYPANOSOMA* *CRUZI*

ISMAEL MALDONADO FUENTES

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

NOTA FINAL:

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA	: DR. ARTURO FERREIRA
PROFESOR CONSEJERO:	DR. FERNANDO FREDES
PROFESOR CONSEJERO:	DR. ULISES VERGARA

SANTIAGO, CHILE
2009

*“Algún día en cualquier parte,
en cualquier lugar indefectiblemente te encontrarás a ti mismo, y ésa, sólo ésa,
puede ser la más feliz o la más amarga de tus horas”.*

Pablo Neruda.

Agradecimientos

A mi profesor guía Dr. Arturo Ferreira, por todo su apoyo e invaluable guía dentro y fuera del contexto de este trabajo.

Al Dr. Mario Galindo, por su indispensable ayuda en el desarrollo de esta Memoria.

A mis compañeras de trabajo: Carolina Ribeiro, Galia Ramírez, Nandy López, Carolina Valck, Lorena Aguilar, Margarita Rodríguez, Leonora Duaso, Francisca Coddou, Katherine Weinberger, Daniela Celedón y Mariana Osorio, por su amistad y preocupación.

A mis amigas más grandes: Juana Orellana, Ruth Mora, Gilda Soto y Oriana Córdoba por su ayuda desinteresada y buena voluntad.

A los miembros del Proyecto Anillos de Investigación (ACT29), y Programas de Biología Celular y Molecular y Disciplinario de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, por el apoyo intelectual y experimental.

A mis compañeros y amigos de la hermosa carrera de Medicina Veterinaria por su compañía y amistad.

A mis amigos, tíos, tías, primos, primas y abuelos por el constante apoyo y muestras de cariño.

A Alejandra, que espero me acompañe el resto de mi vida.

A mi hermano Claudio por su amor y preocupación.

A mis padres Domingo Maldonado M. y Pilar Fuentes B., por todo su amor, esfuerzo y sacrificio, indispensables en mi vida y en el desarrollo de este trabajo.

ÍNDICE

	Páginas
I. Resumen	2
II. Abstract	3
III. Introducción	4
IV. Revisión bibliográfica	
4.1 Enfermedad de Chagas	6
4.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	9
4.3 Calreticulina	13
V. Hipótesis	17
VI. Materiales y Métodos	
6.1 Preparación y Separación de cromosomas en <i>T. cruzi</i> mediante PFGE	18
6.2 Localización cromosómica del gen <i>TcCRT</i>	19
6.3 Análisis bioinformático de la secuencia genómica de <i>T. cruzi</i>	21
6.4 Estimación del número de copias del gen <i>TcCRT</i>	21
VII. Resultados	
7.1 Preparación y separación de cromosomas de <i>T. cruzi</i> por PFGE	23
7.2 Localización cromosómica del gen <i>TcCRT</i>	25
7.3 Análisis bioinformático de la secuencia genómica de <i>T. cruzi</i>	27
7.4 Estimación del número de copias del gen <i>TcCRT</i>	37
VIII. Discusión	55
IX. Conclusión	59
X. Bibliografía	60
XI. Anexos	66

I. Resumen

Calreticulina es una proteína con múltiples funciones presente en todas las células de organismos superiores, salvo eritrocitos. En protozoos parásitos, hemos demostrado que calreticulina de *Trypanosoma cruzi* (TcCRT) inhibe el sistema del complemento humano y la angiogénesis y promueve la infectividad parasitaria. Esta proteína se expresa en la superficie del parásito y en organelos citoplásmicos. Su gen posee una localización cromosómica variable, sugiriendo que TcCRT estaría codificada por múltiples copias génicas organizadas en “tandem” con posibles implicancias funcionales. Obtuvimos ADN cromosomal de cultivos *in vitro* de epimastigotes. Mediante Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE), seguido por hibridación con sonda radiactiva (correspondiente al dominio C-terminal de TcCRT) localizamos el gen *TcCRT* en las cepas Y, MF y Tulahuén y los clones DM28c y Cl Brener. Para evaluar el número de copias del gen *TcCRT* se realizó una cinética de digestiones parciales con la enzima BamH1 para generar fragmentos de ADN que contengan desde una a múltiples copias del gen. Los productos de digestión fueron separados por PFGE y el gen fue detectado con la sonda anterior. Nuestros resultados corroboran que *TcCRT* se encuentra en varios cromosomas de diferente tamaño, probablemente correspondan a pares homólogos donde *TcCRT* está presente en una sola copia. Estos datos concuerdan con la secuencia publicada del genoma de *T. cruzi*, Cl Brener, y sugieren que las múltiples funciones de TcCRT estarían controladas a nivel postranscripcional.

II. Abstract

Calreticulin is a multifunctional protein present in every cell of all higher organisms, except erythrocytes. We have demonstrated that *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) Calreticulin (TcCRT) inhibits the human complement system and angiogenesis, and promotes parasite infectivity. It is expressed on the parasite surface, as well as in cytoplasmic organelles. Its gene possesses a variable chromosomal location, suggesting that TcCRT is encoded by tandemly ordered multiple copies, with possible functional implications. We obtained chromosomal DNA from in vitro cultured epimastigotes. By pulsed field gel electrophoresis (PFGE), followed by hybridization with a radioactive probe (corresponding to the TcCRT C-terminal domain), we localized the *TcCRT* gene in the Y, MF and Tulahuén strains and in the Dm28c and Cl Brener clones. To evaluate the number of *TcCRT* gene copies, we used a digestion kinetics system to generate different gene fragments with BamH1. The digestion products were separated by PFGE and the gene was detected with the same probe. Our results corroborate that the *TcCRT* gene is found in various chromosomes of different sizes. Most likely they correspond to homologous pairs, bearing a single gene copy. These data are in agreement with the published sequence of *T. cruzi* genome (Cl Brener clone), and suggest that the multiple functions of TcCRT may be controlled at the post-translational level.

III. Introducción

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es una zoonosis producida por el parásito *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), descrito por Carlos Chagas en 1909. Estimaciones sugieren que 10 a 13 millones de personas están crónicamente infectadas con *T. cruzi* y aproximadamente 90 millones de individuos siguen en riesgo de contraer la infección (Franco-Paredes *et al.*, 2007). En Chile, se estima que hay alrededor de 142.000 seropositivos en las zonas endémicas (Rozas *et al.*, 2005). Aunque la enfermedad es transmitida por insectos triatominos, también se describen otras formas de contagio como transfusiones de sangre, transplantes de órganos, accidentes de laboratorio, infección congénita, leche materna y consumo de alimentos contaminados. Casos de contagio han sido asociados a transfusiones de sangre y transplante de órganos en Estados Unidos, Canadá y ciudades de Europa donde no se hace detección serológica de rutina (Maguire, 2006).

Además de su importancia por su impacto en patología humana, *T. cruzi* es un modelo de agresión microbiana intracelular, donde las estrategias, tanto parasitarias como del hospedero, alcanzan grados insospechados de sofisticación. El protozoo flagelado, *T. cruzi*, se transmite a través de vectores hematófagos infectados. En Chile, los principales son *Triatoma infestans* (*T. infestans*) y *Mepraia spinolai* (*M. spinolai*), conocidos comúnmente como vinchucas.

Se ha descrito una gran variedad de antígenos inmunogénicos, sin embargo, aún no se cuenta con un método inmunoprolífico adecuado para humanos. Por otro lado, sólo dos drogas son utilizadas para el tratamiento clínico de los pacientes chagásicos, exhibiendo generalmente baja eficacia farmacológica en los casos crónicos.

En el Laboratorio de Inmunología de la Agresión Microbiana (LIAM, Programa Disciplinario de Inmunología, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile) se aisló por primera vez el antígeno Tc45 de *T. cruzi* (Ramos *et al.*, 1991) posteriormente identificado como calreticulina (TcCRT). Tanto la proteína TcCRT, como su contraparte humana (HuCRT), participan en múltiples funciones celulares, son altamente conservadas y presentan una gran capacidad para unir calcio.

CRT de vertebrados está localizada en el retículo endoplásmico (RE), así como en otros compartimentos subcelulares, de todas las células con excepción de eritrocitos. CRT funciona como chaperona de tipo lectina y participa en procesos tales como el almacenamiento de calcio y señalización intracelular, modulación de la expresión génica, adhesión celular, fagocitosis de células apoptóticas, autoinmunidad, antiangiogénesis (Pike *et al.*, 1998), inhibición de crecimiento tumoral y de la actividad lítica de perforinas de células T y NK. TcCRT está localizado tanto en el compartimento intracelular y en la superficie de tripomastigotes vivos, donde interactúa con C1q humano, inhibiendo la activación de la ruta clásica del sistema del complemento (Ferreira *et al.*, 2004a). Esta capacidad se ejecuta en virtud de la habilidad de TcCRT para unirse a las porciones colagenosas de C1q. Algunas de estas funciones podrían modular *in vivo* mecanismos inmunes efectoros.

La proteína TcCRT ha sido aislada y caracterizada (Aguillón *et al.*, 1995) y su gen clonado, secuenciado y expresado *in vitro* (Aguillón *et al.*, 2000). CRTs de otras cepas de *T. cruzi* han sido también caracterizadas (Labriola *et al.*, 1999). Resulta interesante que algunas regiones dentro del dominio S de TcCRT (aminoácidos 159 - 281) tienen un 80% de identidad con HuCRT. TcCRT es un antígeno inmunodominante dimórfico, ya que diferentes clones del parásito presentan formas alternativas de 45 y 43 kDa, el gen de TcCRT está localizado en un número variable de cromosomas (Aguillón *et al.*, 2000; Marcelain *et al.*, 2000).

Dado el importante pleiotropismo funcional de TcCRT, existe la posibilidad que esta proteína parasitaria sea codificada por múltiples variantes alélicas o isotípicas del gen, generando así isoformas funcionales de TcCRT. Esta posibilidad se basa en el número variable de cromosomas portadores del gen *TcCRT* que apoya la hipótesis sobre la existencia de variantes génicas para TcCRT. Al respecto, en *T. cruzi* se ha descrito una organización en “tandem” para genes que se presentan en múltiples copias.

En el contexto de esta Memoria de Título nos preguntamos si el gen de TcCRT, en las distintas cepas en estudio, se encuentra en múltiples copias organizadas en “tandem”. Para ello se estudiará la organización genómica del gen *TcCRT* utilizando técnicas de biología molecular y bioinformática.

IV. Revisión Bibliográfica

4.1. Enfermedad de Chagas

La Tripanosomiasis Americana es reconocida como la más seria enfermedad parasítica humana de las Américas en términos de su impacto social y económico (Rojas *et al.*, 2006).

Epidemiología

El territorio en que prevalece la infección se extiende desde el sur de los EE.UU. de Norteamérica, en el paralelo 35 Latitud Norte, hasta Chile y Argentina. En Chile la infección chagásica ha sido detectada en áreas rurales y suburbanas, entre los 18°30 y 34°16, correspondientes a zonas áridas y semiáridas (Rozas *et al.*, 2005). El número estimado de individuos infectados con *T. cruzi*, en áreas endémicas en Latinoamérica, indican una alta prevalencia de la enfermedad de Chagas, aunque ha ido disminuyendo desde la década de los 80, donde se estimaba entre 16 y 18 millones, 11 millones a mediados de los 90 y 7,6 millones en el 2006 (Schmunis, 2007).

La mayoría de las infecciones humanas ocurren cuando la piel o mucosas toman contacto con las deyecciones de insectos triatomíneos infectados con *T. cruzi*. Sin embargo, avances significativos se han logrado al respecto, como es el caso del fortalecimiento en el control del vector domiciliario del cono sur (Schmunis, 2007).

Las transfusiones pueden ser consideradas la segunda forma más importante de transmisión por *T. cruzi*. En los últimos 15 años, la mayoría de los países latinoamericanos han implementado políticas para prevenir la transmisión de la enfermedad de Chagas vía transfusión, llegando a la actualidad a 8 países que hacen detección en sangre al 100% de los donantes. Otra vía de transmisión, es la transplacentaria. Aunque las tasas de infección por esta vía varían ampliamente, se estima que en los países del cono sur, 1 a 12% de los recién nacidos de madres infectadas estarían afectados (Schmunis, 2007).

Finalmente, la transmisión de la enfermedad de Chagas vía oral es una rara forma de infección y responsable de los brotes regionales. La ingestión de material contaminado está generalmente asociada con la transmisión masiva de parásitos, llevando en última

instancia a miocarditis agudas, con una presentación más severa en edades jóvenes y alta tasa de muerte (Benchimol, 2006).

Patología

La infección por *T. cruzi* tiene un período de incubación de cuatro a diez días, casi siempre sin síntomas. Posteriormente pueden presentarse tres fases:

- Fase Aguda: puede durar de uno a cuatro meses; cuando ocurre en niños puede ser desde asintomática hasta grave o letal, se caracteriza por fiebre variable, malestar general, irritabilidad, dolor de cabeza, hepato y esplenomegalia, y crecimiento ganglionar. En el sitio de inoculación es común encontrar una reacción inflamatoria local con crecimiento de los nódulos linfáticos regionales denominado chagoma de inoculación. Cuando ésta ocurre cercana al área ocular, se produce un edema unipalpebral, conocido como signo de Romaña. En la fase aguda también puede observarse meningoencefalitis y cardiomegalia. El período agudo se presenta en alrededor del 5% de los infectados chagásicos y entre los infectados cerca del 90% son niños (Atías, 1998).
- Fase indeterminada: transcurrido el período agudo, la sintomatología se detiene y entra en un estado de latencia, caracterizada por una lenta multiplicación intracelular de los parásitos, sin signos claros. La curación espontánea, con eliminación del parásito, es rara. Este período puede durar indefinidamente durante toda la vida o pasar a la forma crónica de la enfermedad (Atías, 1998).
- Fase crónica: las manifestaciones aparecen casi siempre en personas de 20 a 50 años o después de diez o más años desde la primoinfección. En esta fase, el compromiso se centra fundamentalmente en el miocardio y tubo digestivo. En este caso, se desarrollan enormes cardiomegalias, con zonas de adelgazamiento de la pared ventricular que puede ocasionar un verdadero aneurisma, sobre todo apical (Atías, 1998). La enfermedad cardíaca generalmente conduce a la muerte. También se observan otros órganos hipertróficos (visceromegalias o dilatación visceral), especialmente el esófago y el colon. Con menos frecuencia se encuentran formas que afectan el sistema nervioso central, o bien inflamación de mucosas o glándulas. Las lesiones inflamatorias de la fase crónica se producirían por mecanismos

inmunitarios. En efecto, en la fase crónica las lesiones del corazón y del tubo digestivo se caracterizan por la presencia de infiltrados linfocitarios difusos y son muy escasos los parásitos tisulares. En la cardiopatía crónica, es probable la existencia de una respuesta inmune, mediada por linfocitos, contra el tejido cardíaco, puesto que se puede observar una lisis de las células musculares vecinas a los linfocitos, sin la presencia de parásitos (Atías, 1998).

Diagnóstico

Durante la fase crónica o indeterminada de la enfermedad, es de gran importancia el diagnóstico de laboratorio ya que se puede demostrar la presencia de anticuerpos específicos generados por la infección. El xenodiagnóstico y las biopsias de ganglios son estudios que se realizan en esta fase. Las pruebas diagnósticas recomendadas por la OMS y OPS son: hemaglutinación, ELISA e inmunofluorescencia, todas indirectas. Es necesario realizar dos pruebas simultáneas, para incrementar la certeza diagnóstica.

En Chile se dispone de 2 tipos de métodos diagnósticos. El método directo incluye frotis sanguíneo, lamina/laminilla, gota gruesa, microstrout, xenodiagnóstico y reacción de polimerasa en cadena (PCR); el método indirecto es la detección de anticuerpos IgG e IgM por técnicas tales como la inmunofluorescencia indirecta y enzimoimmunoensayo (ELISA) (Chile, MINSAL, 2000).

Tratamiento

Sólo 2 drogas nitroheterocíclicas, 5-nitrofurano (Nifurtimox) y 2-nitroimidazol (Benznidazol), son usadas para el tratamiento clínico de los pacientes chagásicos. Ambas drogas reducen la duración y severidad clínica de la infección aguda con *T. cruzi* y lleva a la cura parasitológica en la mitad de los pacientes tratados en las etapas tempranas de la enfermedad de Chagas. Sin embargo, estas drogas exhiben una mucho más baja eficacia en el tratamiento de los infectados crónicamente o de los pacientes chagásicos inmunosuprimidos (Romanha *et al.*, 2002). En forma experimental, investigadores lograron recientemente la eliminación de *T. cruzi* de ratones, en fase crónica de infección,

tratados con benznidazole (Bustamante *et al.*, 2008). Otra aproximación incluye interferencia en la síntesis de tripanotión y metabolismos de oxidación y reducción, además de la inhibición de dihidrofolato-reductasa, biosíntesis de fosfolípidos, y prenilación y acilación de proteínas (Urbina *et al.*, 2003).

Control de la enfermedad en Chile

En 1982 el Ministerio de Salud en conjunto con los Servicios de Salud del área Chagásica estructuraron un programa de trabajo destinado a controlar la presencia de *T. infestans* de las viviendas rurales. El diagnóstico indicó que el 25,7% de las 47.511 viviendas fue positiva a la presencia de *T. infestans*. El tratamiento consistió en la fumigación de las viviendas, junto con un programa de educación a la comunidad afectada y posterior vigilancia.

En 1995 y de acuerdo a lo aprobado en 1991 en Brasilia por los Sres. Ministros de Salud del Conosur se modificó el programa de trabajo, en Chile se dictó la Circular N°4F/53 que dispuso que toda la sangre obtenida en los bancos de sangre de la 1ª a 6ª región, deben ser analizados mediante test de ELISA.

Por las medidas anteriores y teniendo en cuenta el bajo número de viviendas positivas, escasos insectos capturados, bajo índice de infección natural por *T. cruzi* y, principalmente por los estudios y descensos comprobados de la prevalencia serológica en grupos etéreos infantiles, es que la Comisión Evaluadora de INCOSUR estimó que Chile alcanzó la interrupción de la transmisión vectorial del *T. cruzi*. (OPS, 2003).

4.2. Trypanosoma cruzi

El agente causal de la enfermedad de Chagas es *T. cruzi*, protozoo flagelado, perteneciente a la familia Trypanosomatidae, en cuyo ciclo biológico intervienen mamíferos y un insecto vector. Los hospederos mamíferos pueden ser el hombre y algunos animales domésticos, como cánidos y félidos, o silvestres que incluyen diversos mamíferos, especialmente, roedores y carnívoros (Atías, 1998).

En sus diversos hospederos, *T. cruzi* presenta tres formas morfológicas: tripomastigote, epimastigote y amastigote.

El vector se infecta al ingerir sangre de los mamíferos que contienen tripomastigotes, forma no replicativa del parásito. Una vez en el lumen del intestino medio del insecto, los parásitos se diferencian en epimastigotes y se multiplican muy activamente, por fisión binaria y al cabo de quince a treinta días, se transforman en tripomastigotes metacíclicos en el intestino posterior del triatoma. El insecto infectado pica al mamífero y emite deyecciones con tripomastigotes que atraviesan la piel (Atías, 1998).

En el mamífero, los tripomastigotes metacíclicos se introducen en las células del tejido celular laxo, vecino al sitio de penetración y se transforman en amastigotes. Los amastigotes se reproducen por fisión binaria hasta repletar la célula infectada, que termina por romperse, saliendo los parásitos a la circulación bajo el aspecto de tripomastigotes, para diseminarse por todo el organismo. Estos tripomastigotes penetran en nuevas células y se transforman en amastigotes para reproducirse, romper las células repletas de parásitos y volver a circular como tripomastigotes, repitiendo muchas veces este ciclo, el cual se completa una vez que los tripomastigotes son ingeridos por triatomas hematófagos no infectados (Atías, 1998).

Características generales y Organización genética de *T. cruzi*

Trypanosoma cruzi emplea la diferenciación celular como estrategia de adaptación para los diversos ambientes representados por el hospedero y el vector. La diferenciación esta altamente controlada, afectando procesos fundamentales dentro de la célula, caracterizada por profundos cambios en la morfología, motilidad y metabolismo, en respuesta a estímulos externos. La diferenciación normalmente involucra un cambio en el patrón de expresión génica (Tyler *et al.*, 2003).

Trypanosoma cruzi forma complejas poblaciones multiclonales que difieren en su biología, genética, bioquímica y en su comportamiento en el hospedero vertebrado. Aislados de este protozoo difieren en características intrínsecas tales como composición

antigénica, susceptibilidad a quimioterapia, patrones isoenzimáticos y perfiles genómicos (Coronado *et al.*, 2006).

Con respecto a su ADN, *T. cruzi* es una especie extremadamente divergente y muestra una considerable variación intraespecífica a nivel de estructura y organización cromosomal. El genoma es diploide y su contenido nuclear fue estimado para Cl Brener entre 106,4 y 110,7 millones de pares de base (Mpb) (El-Sayed *et al.*, 2005). Los cromosomas de *T. cruzi* no se condensan durante la mitosis. Sin embargo, estudios del cariotipo, utilizando métodos de Biología Molecular como la electroforesis en campo pulsado y técnicas asociadas, indican que el genoma está organizado en al menos 20 pares de cromosomas que van desde 0,4 hasta 4,5 Mpb. Además los cromosomas homólogos a menudo tienen diferente tamaño sugiriendo la existencia de grandes inserciones y/o deleciones y/o amplificaciones en los cromosomas que contribuirían a estas variaciones (Henriksson *et al.*, 1996). Muchos genes "house-keeping" están organizados en grandes repeticiones en "tandem" (Requena *et al.*, 1988; Aslund *et al.*, 1994). Por ejemplo, los genes que codifican cruzipaina, la mayor cisteinoproteína, están organizados en grandes "tandem", con más de 100 copias en algunas cepas (Campetella *et al.*, 1991). Por otro lado, al menos el 50% del genoma de *T. cruzi* está hecho de secuencias repetitivas (El-Sayed *et al.*, 2005), esto incluye elementos "SIRE" (Short Interspersed Repetitive Element), minisatélites y secuencias de un origen retrotransposón.

En tripanosomátidos, los mecanismos de expresión génica y del proceso postranscripcional difieren en casi todas las vías de otros eucariotas. Promotores de Pol II todavía no son identificados en *T. cruzi* ni en otros tripanosomátidos. Genes ligados o en múltiple copia son co-transcritos en largas unidades policistrónicas, a menudo sobre varios cientos de miles de nucleótidos. Los niveles basales de ARNm derivados de los genes ligados pueden a menudo diferir en varios cientos de veces, lo que implica que la regulación debe ser predominantemente postranscripcional (Taylor *et al.*, 2003).

Cariotipo Molecular de *T. cruzi*

La electroforesis en gel en campo pulsado (PFGE), es una técnica descrita inicialmente por Schwartz y Cantor (Schwartz y Cantor, 1984 citado por Galindo *et al.*,

1998) para la separación de grandes moléculas de ADN (1 a 10.000 Kpb) de tamaño cromosomal. La electroforesis en gel en campo eléctrico de contorno homogéneo (CHEF), ocupada en este estudio, es una formulación particular de PFGE que permite una mejor separación de las moléculas de ADN y que emplea una disposición de los electrodos en forma hexagonal alrededor del gel. La dirección del campo eléctrico es cambiada periódicamente por la reorientación electrónica de los potenciales de voltaje en los electrodos. De esta forma, la molécula de ADN se mueve en el gel (micromovimientos) describiendo una trayectoria zigzagueante, lo cual permite una óptima separación. PFGE y CHEF han sido utilizados con éxito en la separación electroforética de cromosomas de variadas especies, tanto unicelulares como metazoos (Galindo *et al.*, 1998).

En *T. cruzi*, la técnica de CHEF ha permitido visualizar los cromosomas, lo que no es posible hacer por técnicas de citogenética convencional debido a que este parásito no condensa su cromatina en cromosomas durante la mitosis. Esta forma de obtener un cariotipo molecular ha permitido el análisis taxonómico de las cepas y especies de distintos tripanosomátidos, la localización cromosomal de diversos genes y un gran aporte al estudio del genoma de *T. cruzi*.

La técnica de PFGE, aparte de permitir la identificación de los cromosomas por un criterio distinto al morfológico, los separa por tamaño molecular permitiendo diferenciar tanto tripanosomátidos que pertenecen a distintas especies como a variantes dentro de la misma especie.

Los tripanosomátidos poseen genomas muy variables ya que se obtienen distintos perfiles de cromosomas en diferentes clones de *T. cruzi*, *T. rangeli*, *T. brucei*, *Leishmania* sp, etc. En *T. cruzi* entre 20 y 25 bandas cromosomales han sido identificadas por tinción con bromuro de etidio (BrEt), pero es probable que el número sea considerablemente mayor, ya que algunas de estas bandas muestran diferentes intensidades sugiriendo la presencia de más de un cromosoma (Henriksson, 1995). Utilizando ensayos de hibridación con sondas de ADN para algunos genes clonados, es posible encontrar una alta variabilidad en el tamaño de cromosomas particulares que contienen estos genes en las distintas cepas del parásito. A pesar de la alta variabilidad que presentan estos perfiles de “cariotipo molecular” en *T. cruzi*, se ha encontrado que existen grupos de ligamiento

para varios de los marcadores genéticos que permite identificar, a pesar de su polimorfismo, cromosomas específicos en distintos clones y cepas del parásito (Henriksson *et al.*, 1996). Es así posible estudiar la variabilidad que presentan distintas cepas de *T. cruzi*, *L. mexicana*, *C. fasciculata* y otros tripanosomátidos mediante PFGE, tinción con BrEt y empleo de alguna sonda de ADN correspondiente a un gen de *T. cruzi* que permita detectar el o los cromosomas donde se encuentre ubicado el gen (Henriksson *et al.*, 1996).

4.3. Calreticulina

CRT vertebrada fue aislada por primera vez por Ostwald y MacLennan en 1974 (Ostwald y MacLennan, 1974), y luego, clonada en 1989 por Smith y Koch (Smith y Koch, 1989), y Fliegel y colaboradores (Fliegel *et al.*, 1989). Originalmente, la proteína fue identificada como una molécula ligante de calcio localizada principalmente en el RE (Nakhasi *et al.*, 1998). CRT ha sido identificada en humanos, insectos, nemátodos, protozoos y plantas, detectándose una alta conservación de sus secuencias genómicas aminoacídicas a lo largo de la evolución (Ferreira *et al.*, 2004b). Además, CRT tiene importantes roles en la regulación de la funcionalidad celular, y se localiza en varios compartimentos sub-celulares (Michalak *et al.*, 1999).

Calreticulina es una proteína residente en el lumen del RE, donde tiene dos funciones principales: chaperona y proteína reguladora de la homeostasis del calcio. CRT es una chaperona tipo lectina, altamente versátil y participa durante la síntesis de una variedad de moléculas, incluyendo canales iónicos, receptores de superficie, integrinas y transportadores. CRT también afecta la homeostasis intracelular del calcio, modulando el almacenamiento y transporte de éste (Michalak *et al.*, 1999).

Otras importantes y sorprendentes funciones de esta proteína son participar en procesos tales como la señalización intracelular, modulación de la expresión génica, adhesión celular, fagocitosis de células apoptóticas, autoinmunidad, angiogénesis, crecimiento tumoral, actividad lítica de perforinas en células T y NK. Por otro lado, calreticulina está presente en variados compartimentos sub-celulares. A pesar de contar con una señal de retención para el RE en su dominio C-terminal (KEDL). CRT tiene otras localizaciones, las que incluyen: gránulos citotóxicos en células T, superficie

celular, saliva de garrapatas, suero sanguíneo, núcleos, citoplasma, acrosoma de espermatozoides, y el espacio extracelular de varios tipos celulares estimulados *in vitro* (Michalak *et al.*, 1999).

Además, CRT humana (HuCRT) se une a las regiones colagenosas de C1q y otros miembros de la familia de las colectinas, tales como, “mannan binding lectin” (MBL), proteína A del surfactante pulmonar, conglutinina bovina y la colectina 43 (Malhotra *et al.*, 1990). Así, CRT participa en la inhibición, C1q dependiente, de la actividad del complemento *in vitro*. Algunas de esas funciones podrían modular mecanismos inmunes efectores.

Por otro lado, un péptido de CRT (aminoácido 120-180), una molécula más larga (aminoácidos 1-180), llamado vasostatina, así como CRT completa, son potentes inhibidores de la angiogénesis, tanto *in vitro* como *in vivo* (Pike *et al.*, 1998).

Calreticulina de *T. cruzi*

Calreticulina de *T. cruzi* (TcCRT) fue descrita originalmente como Tc45 (Aguillón *et al.*, 1991). Fue purificada (Aguillón *et al.*, 1991), para luego ser clonada y secuenciada (Aguillón *et al.*, 2000).

Experimentos en PFGE revelaron una heterogeneidad intraespecífica respecto a la localización cromosómica del gen de TcCRT. Además, se observó una variabilidad en la intensidad de la señal de hibridación para los distintos cromosomas, con la sonda de TcCRT (Aguillón *et al.*, 2000).

Además, una serie de antecedentes recientemente descritos en nuestro laboratorio, identifican a TcCRT como una molécula importante en la relación hospedero / parásito, en particular cumpliendo roles en la modulación del sistema del complemento, la infectividad parasitaria, la angiogénesis y la promoción de autoinmunidad.

TcCRT, el sistema del complemento y la infectividad parasitaria

TcCRT está presente en la superficie de tripomastigotes, donde interactúa con C1 humano, inhibiendo la activación de la ruta clásica del sistema del complemento (Ferreira *et al.*, 2004a). TcCRT también interactúa con otros módulos moleculares del complemento, tales como MBL y ficolinas, inhibiendo así otras formas de iniciación de la vía clásica.

En tripomastigotes infectantes, TcCRT es translocada desde el retículo endoplásmico a la superficie parasitaria, específicamente en la zona de emergencia flagelar (Ferreira *et al.*, 2004a), reclutando C1 (“eat me signal”), un ligando importante para células fagocíticas, en una estrategia de “simulación apoptótica” (“apoptotic mimicry strategy”), (Ribeiro *et al.*, 2008).

TcCRT y angiogénesis

Al igual que HuCRT, TcCRT tiene un interesante efecto antiangiogénico demostrado en una variedad de ensayos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. Así, sus efectos antiangiogénicos se manifiestan *in vivo* en un ensayo de membrana corioalantoidea (ICAM) de pollos (*Gallus gallus*) (Molina *et al.*, 2005). En estos ensayos, TcCRT manifestó actividad biológica incluso a concentraciones de picogramos, siendo en términos equimolares, más potente que la proteína humana (Toledo, 2008). En otra serie de ensayos *in vitro* y *ex vivo*, TcCRT manifiesta potentes efectos relacionados con angiogénesis. Así, TcCRT inhibe la proliferación y migración de células endoteliales venosas de cordón umbilical humano (HUVECs) y también la organización de estas células en estructuras tipo capilar en matrigel. En ensayos *ex vivo*, TcCRT inhibe la generación de nuevos capilares arteriales, a partir de anillos aórticos de rata (*Rattus norvegicus*). Finalmente, en células HUVECs, TcCRT modula la expresión de varios genes relacionados con angiogénesis (López, 2008).

TcCRT y autoinmunidad

La infección con *T. cruzi*, en humanos (Aguillón *et al.*, 1997) y modelos ratones, genera anticuerpos anti-TcCRT (Ramos *et al.*, 1991). Por otra parte, esta infección genera daños multisistémicos (circulatorio y digestivo, pudiendo llegar a un mega síndrome), en una fracción importante de los infectados. La naturaleza de la patología,

sin embargo, es altamente controversial (Kierszembraum, 2005) y se desconoce si TcCRT participa en ella. Recientemente se ha determinado en nuestro laboratorio que la inmunización murina con TcCRT genera anticuerpos IgG específicos que reaccionan con cardiomiocitos murinos. Por otra parte, el análisis histopatológico del corazón de animales inmunizados muestra infiltración linfocitaria CD3 positiva, presumiblemente T. Estos hechos son compatibles con la noción que señala que la inmunogenicidad de TcCRT podría participar en la patogenia autoinmune de la infección con *T. cruzi* (Ribeiro *et al.*, 2008).

Es posible, entonces, que TcCRT al igual que cruzipaína, sea codificada por múltiples copias génicas (Campetella *et al.*, 1991). En resumen, TcCRT se encuentra ubicada en distintos compartimentos subcelulares (Souto-Padrón *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2004b), donde cumple múltiples funciones biológicas, lo que es compatible con la existencia de isoformas. Además, se han encontrado dos o más genes que codifican isoformas de CRT en *Zea mays*, *Xenopus laevis*, *Bos taurus*, *Mus musculus* y *Homo sapiens sapiens* (Persson *et al.*, 2002).

La posibilidad que TcCRT sea codificada por múltiples genes, generando isoformas, es consecuente con el hecho de que las distintas localizaciones cromosomales para el gen *TcCRT* podrían representar distintas variantes génicas que codifiquen distintas isoformas además de la evidencia de organización genética en “tandem”, como ya se ha demostrado para otros genes de *T. cruzi*. (histonas, cruzipaína, etc.)

Así, es importante conocer las bases genéticas que subyacen a la expresión de esta molécula parasitaria.

En esta Memoria de Título, exploraremos la posibilidad que esta proteína parasitaria sea codificada por múltiples variantes alélicas o isotópicas del gen, generando isoformas de TcCRT. Para ello se utilizarán cultivos axénicos de 3 cepas y 2 clones de *T. cruzi*. Dado que la secuencia del genoma de *T. cruzi* para el clon CI Brener ha sido recientemente completada, se compararán los resultados obtenidos en esta Memoria de Título con aquellos de esa secuencia.

V. Hipótesis

El genoma de *T. cruzi* contiene múltiples copias del gen *TcCRT* organizadas en “tandem”.

Objetivo General

Contribuir al conocimiento de la relación hospedero / parásito, en el modelo *T. cruzi*, definiendo bases genéticas de la expresión de TcCRT.

Objetivos Específicos

1. Preparar y separar cromosomas de *T. cruzi* por PFGE.
2. Localizar el gen *TcCRT* en los distintos cromosomas.
3. Analizar bioinformáticamente la secuencia genómica de *T. cruzi*.
4. Estimar el número de copias del gen *TcCRT*.

VI. Materiales y Métodos

6.1 Preparación y Separación de cromosomas en *T. cruzi* mediante PFGE

Cultivos de *T. cruzi*:

Epimastigotes de *T. cruzi*, cepas MF, Y y Tulahuén y los clones Dm28c y Cl Brener, fueron cultivados a 28°C en medio Diamond (Tryptosa, Triptona, extracto de levadura, NaCl 0,106 M, PO₄H₂K 29 mM, PO₄HK₂ 23mM, pH 7,2) enriquecido con Suero Fetal (10%) y hemina (7,5 µM), se ocuparon como antibióticos penicilina (100 UI) y estreptomycinina (100 µg).

Botellas de cultivo con medio Diamond fueron inoculadas con 1 o 2 ml de medio conteniendo aproximadamente 1x10⁶, bajo campana de flujo laminar. Las botellas inoculadas se colocaron en posición horizontal (para aumentar la superficie de contacto con los gases atmosféricos), en incubador a 28°C por aproximadamente 7 días (Jaramillo, 1993).

Preparación de los cromosomas:

Los cultivos fueron colectados en tubos cónicos, por centrifugación a 2.100 g por 10 minutos y luego se descartó el sobrenadante y se lavó tres veces el sedimento celular por resuspensión en PBS (NaH₂PO₄ 2 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KCl 2,7 mM, NaCl 137 mM, pH, 7,2) y centrifugación a 2.100 g. Los parásitos fueron contados en cámara de Neubauer y 100x10⁶ células fueron resuspendidas en 110 µl de PBS y mezcladas con 110 µl de agarosa fundida (agarosa 1% p/v, de bajo punto de fusión, en PBS). Posteriormente, la suspensión de parásitos se depositó en un molde de plástico a 4°C para obtener bloques de agarosa sólida (Galindo *et al.*, 1998).

Los bloques de agarosa, conteniendo los parásitos, fueron incubados en 4 ml de solución de lisis (N-Laurilsarcosinato de Sodio 1%, EDTA 0,5 M, proteinasa K 2 mg/ml, pH 9,5), por 48 horas a 50°C. Luego, los bloques de agarosa fueron lavados 5 veces durante 5 minutos, en 5 ml de una solución de lavado (EDTA 0,05 M, pH 8,0), con el fin de eliminar los restos celulares. Finalmente los bloques de agarosa conteniendo el ADN

del parásito fueron guardados en 5 ml de solución de almacenamiento (EDTA 0,05 M, pH 8,0 a 4°C) (Galindo *et al.*, 1998).

Separación de los cromosomas por PFGE:

Los bloques de agarosa que contenían ADN fueron cortados en trozos de 8 mm de longitud, correspondiente a 40 millones de epimastigotes, aproximadamente, y cargados en geles de agarosa grado cromosomal (Sigma- Aldrich, USA) al 1% en solución 0,5x TBE (90 mM Tris base, 90 mM ácido Bórico, 2 mM EDTA, pH 8,0)

La separación electroforética de los cromosomas se realizó en solución TBE 0,5x a 180 volt, 14°C, y en dos etapas en un aparato CHEF DR II (Bio-Rad, USA), con pulsos de 70 segundos, por 18 hrs., seguidos por pulsos de 150 segundos, por 24 hrs. ADN cromosomal de *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Hansenula wingei* (Bio-Rad, USA) fueron utilizados como estándar de peso molecular. Una vez terminada las electroforesis, los geles fueron teñidos por una hora en solución de bromuro de etidio (BrEt, 1µg/ml en TBE 0,5x). Los geles se destiñeron en H₂O destilada durante media hora y se visualizaron las bandas de ADN cromosomal en un transiluminador U.V., tomando las respectivas fotografías en cámara digital.

6.2 Localización cromosómica del gen *TcCRT*

Generación de una sonda radiomarcada *TcCRT*:

Un fragmento de ADN codificante para el extremo C-terminal del gen de calreticulina de *T. cruzi* (*C-rTcCRT*) de la cepa Miranda (AF162779), fue amplificado por PCR, a partir de la secuencia de *TcCRT* clonada en el plasmidio pET 28b(+), usando Taq polimerasa platinum (Invitrogen, USA) y los partidores “forward” (*C-rTcCRT*) (5'-gaattcggactctgagctccacaagg-3') y “reverse” (*C-rTcCRT*) (5'-ctcgagatcacggtcaccctttt-3'). La reacción de PCR fue hecha con 2 µg de ADN, 3,5 mM de MgSO₄, 0.2 µM de cada partidor, 200 µM de mezcla de dNTPs y 1,0 U de polimerasa. La amplificación se realizó en un termociclador (Bio Rad, USA), utilizando un programa configurado por 1 ciclo de 3 min a 95°C, 35 ciclos de 30 seg. a 95°C, 30 seg. a 68°C y 30 seg. a 74°C, 1 ciclo de 10 min a 74°C y 1 ciclo de 10 min a 4°C.

Luego, los productos de la amplificación fueron resueltos en electroforesis en gel de agarosa al 1%, y purificados por medio de un “Kit” de purificación de ADN “PureLink Quick Gel Extraction Kit” (Invitrogen, USA), mediante los siguientes pasos: se cortó el trozo del gel conteniendo el producto de PCR, luego se le adicionaron 30 μ l de Buffer de solubilización de gel por cada 10 mg del mismo y se incubó por 15 minutos a 50°C. La suspensión se cargó en una columna y se centrifugó a 12.000 g por un minuto. Posteriormente, se adicionaron a la columna 700 μ l de Buffer de lavado con etanol, se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos y se centrifugó a 12.000 g por un minuto. Finalmente, se adicionó a la columna 50 μ l de buffer TE (10 mM de Tris HCl, pH 8, 1mM EDTA) a 65°C, se incubó por un minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 1.200 g por 2 minutos. La solución conteniendo el ADN purificado fue almacenada a -20°C. En este proceso se obtuvo un volumen aproximado de 150 μ l a una concentración de 30 ng ADN / μ l.

250 ng de ADN en 45 μ l de buffer TE fueron denaturados por 5 minutos a 95-100°C, incubados por 5 minutos a 4°C y traspasados a un tubo de reacción “REDIPRIME™ II Random Prime Labelling System”(Amersham Biosciences, USA), al que se adicionaron 5 μ l de dCTPs “Redivue™³²P GE” (Amersham Biosciences, USA). Se incubó por 1 hora a 37°C y se detuvo la reacción con 5 μ l de EDTA (0.2 M).

Hibridación cromosomal con la sonda *C-rTcCRT*:

Los geles de PFGE fueron tratados con 0,25 N HCl, por 30 minutos, para producir cortes en las moléculas de ADN de alto peso molecular y favorecer así su posterior transferencia a la membrana. Luego, los geles se incubaron secuencialmente por 1 hora en una solución de denaturación (NaCl 1,5 M y NaOH 0,5 M) y de neutralización (1 M de Tris Cl y 1,5 M de NaCl), con agitación constante. Los geles se sometieron a procedimientos estándares de “southern blot” (Maniatis *et al.*, 1982). Todos los geles se transfirieron por más de 36 hrs. Posteriormente las membranas se sometieron a “crosslinking” en un horno ultra violeta a 120.000 μ J/cm² por un minuto.

Posteriormente, las membranas se introdujeron en tubos de hibridación conteniendo 8 ml de una solución de hibridación comercial “Rapid-hyb buffer” (Amersham, USA) y se incubaron en horno de hibridación a 65 °C por 8 hrs., en rotación

constante. Luego se agregó 20 µl de la sonda radiomarcada (^{32}P -C-*TcCRT*), previa denaturación por 5 minutos a 100°C, premezclada con 2 ml de “Rapid Hyb” y se incubaron a 65°C por 15 hrs. con rotación constante. Desechada la solución de hibridación, las membranas fueron lavadas con solución de alta estrictez (SSC 2x: 0,15 M Citrato de Sodio, 1,5 M de NaCl, pH 7,0 y SDS 0.1% p/v) 2 veces con 100 ml por 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se lavó con 100 ml de una solución de baja estrictez (SSC 1x y SDS 0.1% p/v) por 15 minutos a 65°C. La señal radiactiva en la membrana fue monitoreada, con un contador “Geiger”. Las membranas húmedas, se envolvieron en papel “Alusaplast” ® y se sometieron a autorradiografía, por tiempos variables, las imágenes fueron analizadas en un equipo “Molecular Imager FX System” (Bio-Rad, USA).

6.3 Análisis bioinformático de la secuencia genómica de *T. cruzi*

Se realizó una búsqueda de secuencias genómica para el gen *TcCRT* dentro del banco de secuencias “GeneBank”. Las secuencias fueron analizadas mediante el programa “NEBcutter V2.0”, con el fin de encontrar sitios de restricción comunes y seleccionar adecuadamente las enzimas de restricción.

Por otro lado, se realizó una búsqueda exhaustiva de secuencias del gen *TcCRT* en el banco de datos del genoma de *T. cruzi*, clon Cl Brener, y *T. brucei* (J. Craig Venter Institute, 2006) encontrándose 2 secuencias putativas de *TcCRT*, ambas de 1.206 nucleótidos (Tc00.1047053509011.40 y Tc00.1047053510685.10).

6.4 Estimación del número de copias del gen *TcCRT*

Muestras de ADN de *T. cruzi* embebido en agarosa, fueron cortados en trozos de 6 mm, conteniendo aproximadamente 10 µg de ADN parasitario y sometidos a digestión con enzimas de restricción, utilizando distintas concentraciones enzimáticas, tiempos y temperaturas para estandarizar las condiciones óptimas para la digestión.

Se realizaron incubaciones con las enzimas BamH1 y BsrG1 (“New England BioLabs, USA”) para lograr una máxima digestión del ADN. Las muestras se lavaron con el respectivo buffer de la enzima a utilizar (“New England BioLabs, USA”) por 15 minutos bajo agitación. Luego las muestras fueron tratadas con 20 μ l de buffer de enzima, 2 μ l BSA (Albúmina de Suero Bovino), 158 μ l H₂O bidestilada y una concentración final de enzima de 10 a 40 U/ μ g de ADN. Los tubos se incubaron a 37°C o 4°C por 20 hrs. alternativamente, seguido por una incubación por 24 hrs. a 37°C, la reacción se detuvo con buffer TE. Se preparó un gel de agarosa grado cromosomal al 1% en buffer TBE 0,5x, donde se depositaron los bloques de agarosa con el ADN digerido y se sometió a electroforesis en campo pulsado en buffer TBE 0,5x a 180 volts, a 14°C en modalidad “ramp” desde 1 hasta 12 segundos por 5 hrs., ocupándose el marcador de ADN “Low Range PFGE Marker” (“New England BioLabs, USA”). El gel se tiñó de la misma forma descrita anteriormente.

Para las digestiones parciales se realizaron 3 lavados previos, dos de 5 minutos con H₂O bidestilada y uno de 5 minutos con el buffer de la enzima. Los tiempos de digestión para ambas enzimas fueron: 0, 15, 30 minutos, 1, 6, 12 y 24 hrs. a 4°C para las distintas cepas en estudio. Cada reacción se detuvo con varios lavados de buffer TE. Con estas muestras se realizaron electroforesis en campo pulsado, bajo las mismas condiciones anteriormente descritas. Posteriormente, el ADN contenido en los geles fue transferido a filtros de nylon, hibridados con la sonda de ADN ³²P-C-TcCRT y analizados por autorradiografía, según se ha descrito previamente.

VII. Resultados

7.1 Preparación y separación de los cromosomas de *T. cruzi* por PFGE

En este estudio se analizaron por PFGE las muestras de ADN de *T. cruzi* obtenidas de cultivos axénicos de epimastigotes de las cepas Y, Tulahuén, MF y los clones Dm28c y Cl Brener. Las condiciones utilizadas para la preparación del material genético de los parásitos permitió la obtención de moléculas intactas de ADN de tamaño cromosomal, que fueron separadas por PFGE para el análisis del cariotipo molecular. Siguiendo el consenso aceptado en publicaciones internacionales, en esta Memoria se utilizará el término “cromosoma” o “banda cromosomal” para referirnos al ADN no fragmentado de tamaño cromosomal separado por PFGE. El término “cariotipo molecular” será utilizado para hacer referencia al conjunto de bandas cromosomales separadas por este método.

Las condiciones para PFGE utilizadas fueron similares a las descritas previamente en nuestro laboratorio (Aguillón *et al.*, 2000). Al aplicar estas condiciones se logró una adecuada separación de los cromosomas de *S. cerevisiae* (marcador de peso molecular para PFGE), en el rango de 750 a 2.200 Kpb (Figura 1). Con el fin de validar estas condiciones en las muestras de *T. cruzi*, se procedió a separar cromosomas de epimastigotes de las cepas Y, Tulahuén, MF y los clones Dm28c y Cl Brener. Como se observa en la Figura 2, los cromosomas de *T. cruzi* fueron adecuadamente resueltos en el rango de 680 a 2.200 Kpb, apreciándose un marcado polimorfismo en los patrones de bandas cromosomales entre las distintas cepas y clones. Esta condición de PFGE permite la separación de cromosomas en el rango de peso molecular descrito para los cromosomas de *T. cruzi* y será utilizada para determinar la localización cromosomal del gen *TcCRT*.

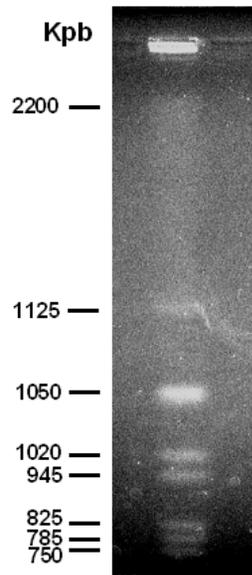


Figura 1. Separación del estándar de peso molecular *Saccharomyces cerevisiae*. Carril, corresponde a ADN de *S. cerevisiae* separado mediante PFGE, con pulsos de 70 seg. por 18 hrs., seguidos de 150 seg. por 24 hrs. Gel teñido con BrEt.

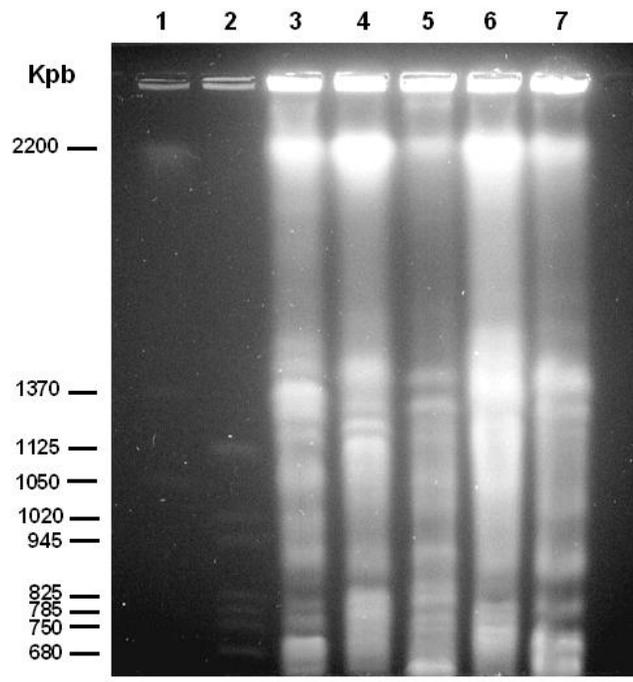


Figura 2. Polimorfismo en el cariotipo de cepas y clones de *T. cruzi*. Los cromosomas de la cepa Tulahuén, clones Cl Brener y Dm28c, cepas Y y MF, carriles 3, 4, 5, 6 y 7 respectivamente, fueron separados mediante PFGE, con pulsos de 70 seg. por 18 hrs., seguidos de 150 seg. por 24 hrs. Gel teñido con bromuro de etidio. Carriles 1 y 2: marcadores de DNA de *H. wingey* y *S. cerevisiae* respectivamente.

7.2 Localización del gen *TcCRT* en los cromosomas de *T. cruzi*

Para asignar la localización del gen *TcCRT* en los cromosomas de *T. cruzi*, se fabricó una sonda de ADN a partir de un fragmento clonado que codifica el dominio C-terminal de TcCRT (*C-TcCRT*). En la Figura 3, se observa el producto de 302 pb amplificado por “PCR”, correspondiente al fragmento C-TcCRT. Este producto de “PCR” fue extraído del gel, purificado y finalmente marcado radiactivamente con ^{32}P ($^{32}\text{P-C-TcCRT}$).

La Figura 4A, muestra el patrón de bandas cromosomales para las distintas cepas y clones estudiados. Nuevamente, se aprecia la variabilidad del cariotipo molecular en *T. cruzi*, con una distribución de bandas cromosomales en un rango de peso molecular de 600 a 2.200 Kpb. Posteriormente, los cromosomas fueron transferidos desde el gel a una membrana de nylon y luego hibridados con la sonda $^{32}\text{P-C-TcCRT}$. En la Figura 4B se muestra la localización cromosomal del gen *TcCRT*, la que resultó ser variable entre las distintas cepas y clones de *T. cruzi* analizados en este estudio. A pesar del evidente polimorfismo, *TcCRT* se localiza en algunos cromosomas con similar peso molecular. El gen *TcCRT* se localiza en 3-4 cromosomas en las cepas Tulahuén e Y, en 2 cromosomas en el clon Cl Brener y la cepa MF y en 3 cromosomas en el clon Dm28c. Datos publicados previamente por otros investigadores muestran que las diferencias en tamaño para cromosomas homólogos pueden llegar hasta un 70% (Henriksson, 1995). Así, nuestros resultados sugieren que el gen *TcCRT* podría estar localizado en uno o dos pares de cromosomas homólogos en las distintas cepas y clones analizados.

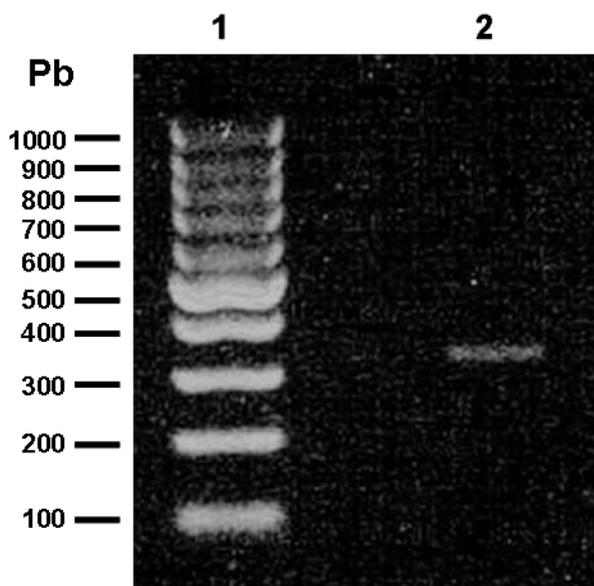


Figura 3. Producto "PCR" correspondiente al extremo C terminal de *TcCRT* (*C-TcCRT*).

Gel de agarosa teñido con BrEt.

1.- Marcador de ADN.

2.- *C-TcCRT*

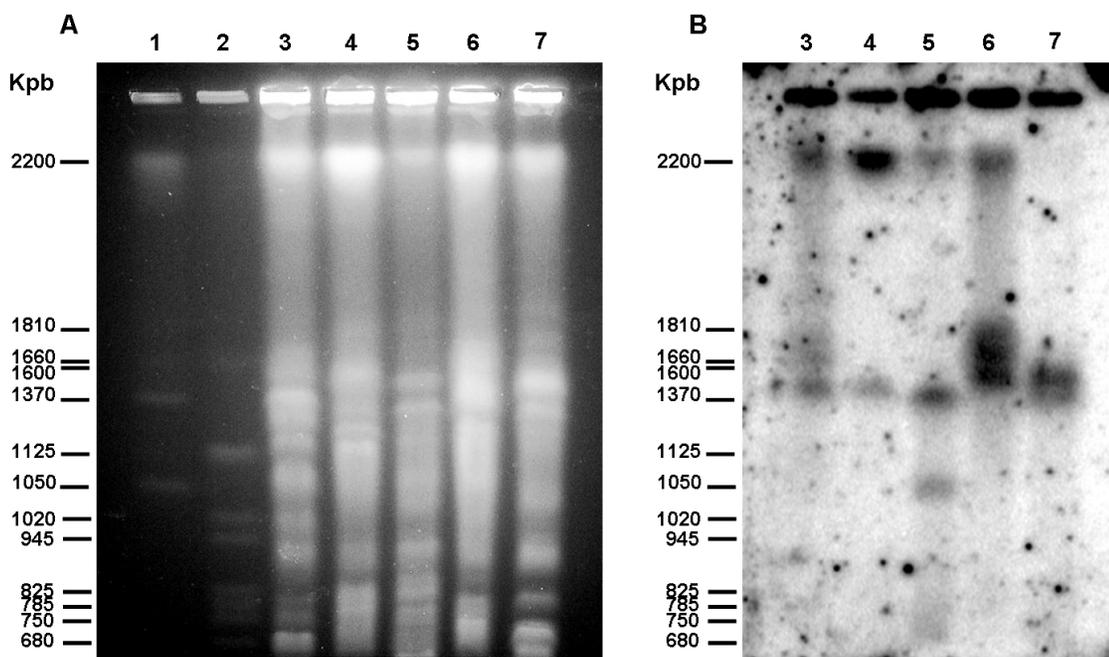
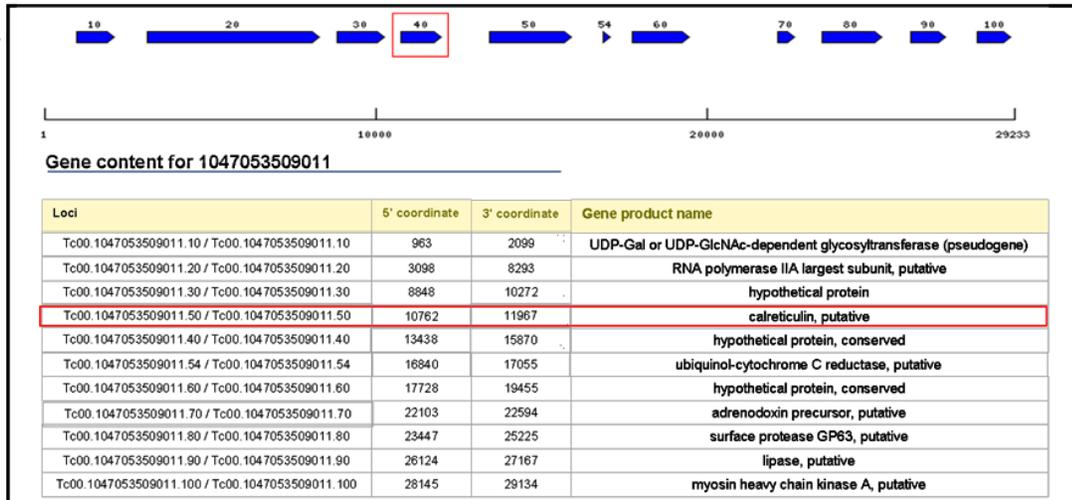


Figura 4. El gen *TcCRT* tiene una distribución cromosómica variable entre cepas y clones de *T. cruzi*. Los cromosomas de la cepa Tulahuén, clones Cl Brener y Dm28c, cepas Y y MF, carriles 3, 4, 5, 6 y 7 respectivamente, fueron separados en gel de agarosa mediante PFGE, con pulsos de 70 seg. por 18 hrs., seguidos de 150 seg. por 24 hrs. (A). Carriles 1 y 2 corresponden a los cromosomas de *H. wingey* y *S. cerevisiae* respectivamente. El gel fue teñido con bromuro de etidio y los cromosomas fueron transferidos a una membrana de nylon e hibridados con la sonda ^{32}P -*C-TcCRT* (B).

7.3 Análisis bioinformático de las secuencias del gen *TcCRT* de *T. cruzi*.

Con el objetivo de obtener la mayor información respecto al gen *TcCRT*, se procedió a la búsqueda de la región genómica que contiene *TcCRT* en la base de datos correspondiente al proyecto del genoma de *T. cruzi* (J. Craig Venter Institute, 2006). Los datos de secuencia de este proyecto fueron generados a partir del genoma del clon CI Brener. Se encontraron dos secuencias del gen *TcCRT*, contenidas en regiones genómicas de 29233 y 5409 pb (Figura 5). La estrategia de secuenciación utilizada en el proyecto del genoma de este organismo, “Whole Genome Shotgun”, no permite una asignación de las secuencias de *TcCRT* a cromosomas particulares. Sin embargo, los datos muestran que *TcCRT* sería un gen de copia única. Dada la disponibilidad de los datos generados para el proyecto del genoma de *T. brucei* (J. Craig Venter Institute, 2006), una especie perteneciente al género *Trypanosoma*, se realizó una búsqueda del gen calreticulina en su contexto genómico. En la Figura 6, se observa que este gen está presente como copia simple en los cromosomas 4 y 8 de *T. brucei*.

A



B

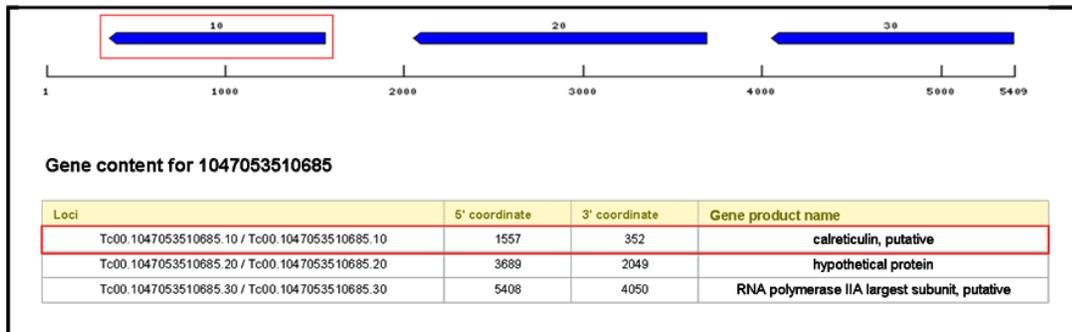


Figura 5. Localización del gen *TcCRT* en el genoma del clon CI Brener. Análisis de dos regiones genómicas portadoras del gen *TcCRT*, mostradas en A y B. En azul se muestra la ubicación de los genes descritos en las tablas respectivas. En rojo se destaca el gen *TcCRT* y su localización genómica (J. Craig Venter Institute, 2006).

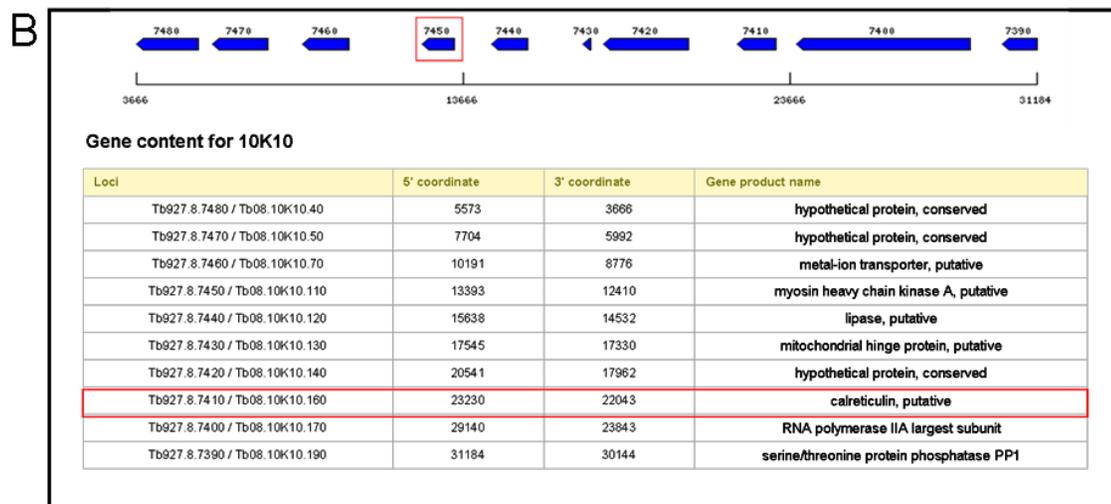
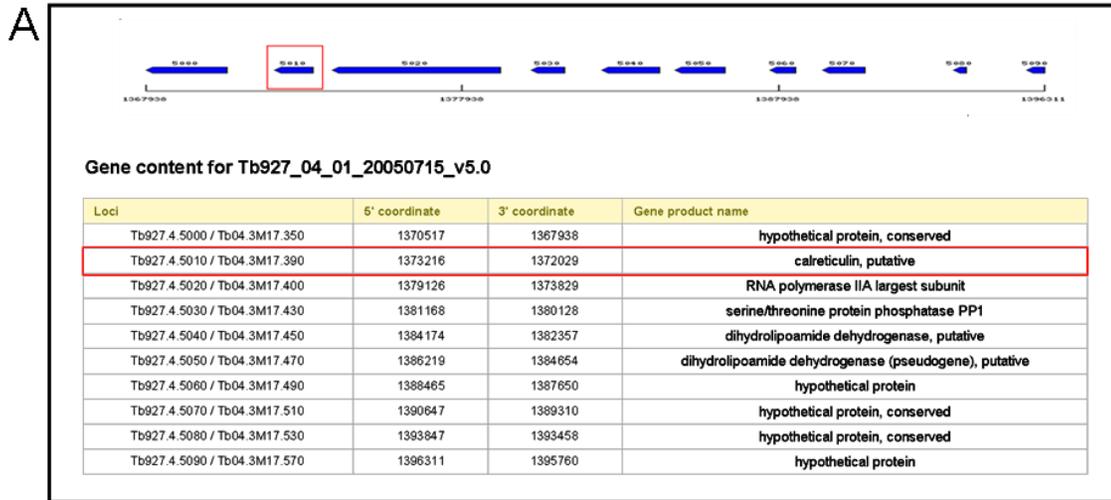


Figura 6. Localización del gen *TbCRT* en el genoma de *T. brucei*. Análisis de dos regiones genómicas portadoras del gen *TbCRT*, mostradas en A y B. En azul se muestra la ubicación de los genes descritos en las tablas respectivas. En rojo se destaca el gen *TbCRT* y su localización genómica (J. Craig Venter Institute, 2006).

El alineamiento de las secuencias aminoacídicas para la proteína calreticulina descritas en *T. cruzi* y *T. brucei*, muestra que estas son muy conservadas entre ellas (Figura 7). En particular, para las dos secuencias de *TcCRT* de CI Brener, se observan 10 diferencias aminoacídicas. Esto último, sumado a los datos de localización cromosómica del gen *TcCRT* (Figura 4), sugiere que las dos secuencias corresponden a alelos que estarían localizados en cromosomas separados.

Con el fin de validar la identificación de genes organizados en “tandem” basados en el proyecto del genoma de *T. cruzi*, se procedió a la búsqueda de los genes para HSP70, cruzipaína e histonas, los que fueron previamente reportados por estar organizados en múltiples repeticiones consecutivas con un variable número de copias. Empleando un método similar al utilizado en esta Memoria de Título, se describió en distintas cepas y clones la organización en “tandem” para los genes HSP70 (más de 10 copias) (Requena *et al.*, 1988), cruzipaína (más de 10 copias en la cepa Tulahuén 2) (Campetella *et al.*, 1991), histona H1 (15-20 copias en la cepa Tulahuén 2) (Aslund *et al.*, 1994) e histona H2B (más de 18 copias en la cepas Y) (Garcia Salcedo *et al.*, 1994).

El resultado de la búsqueda de estos genes en un contexto genómico, utilizando la base de datos del proyecto del genoma de *T. cruzi*, son mostrados en las Figuras 8-11. Los datos muestran que los genes *HSP70* (1-2 copias), *H2A* (1-5 copias) y *H2B* (1-2 copias) están presentes en un número de copias variable y en “tandem”, pero con un número de repeticiones ostensiblemente menor al descrito en otras cepas y clones. Más aún, en el gen de histona H1 (Figura 9), los datos obtenidos no muestran más de una copia. Estos resultados claramente evidencian que los datos obtenidos respecto al número de copias de un gen en una cepa o clon particular, ya sea a través de métodos bioquímicos o de secuencia genómica, no son extensivos a otras cepas o clones de *T. cruzi*.

Así, se procedió a examinar el número de copias del gen *TcCRT* y su posible organización en “tandem” en distintas cepas y clones de *T. cruzi*, teniendo como referencia los datos del proyecto genoma.

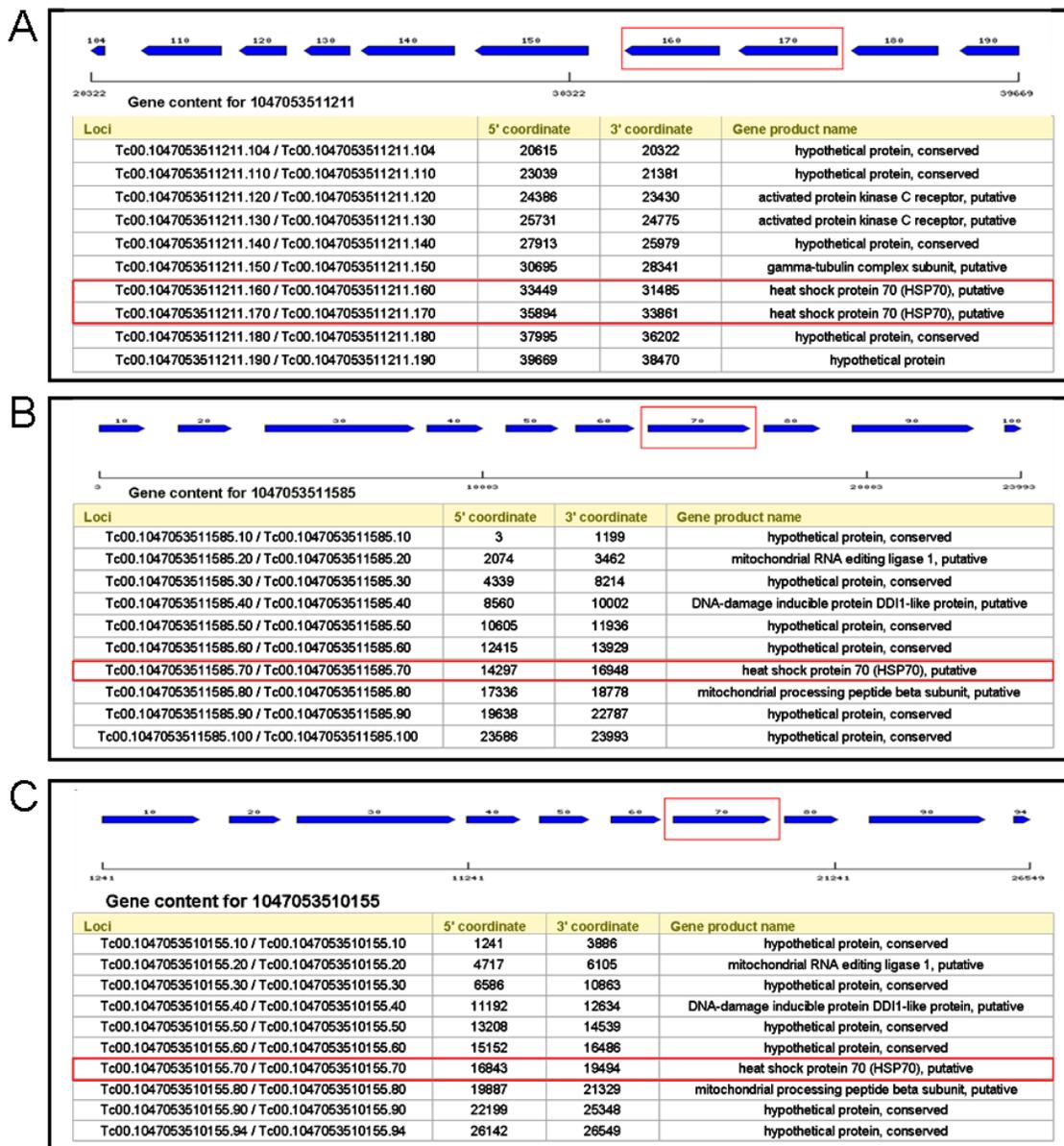


Figura 8. Localización del gen *HSP70* en el genoma del clon CI Brener. Análisis de tres regiones genómicas portadoras del gen *HSP70*, mostradas en A, B y C. En azul se muestra la ubicación de los genes descritos en las tablas respectivas. En rojo se destaca el gen *HSP70* y su localización genómica (J. Craig Venter Institute, 2006).

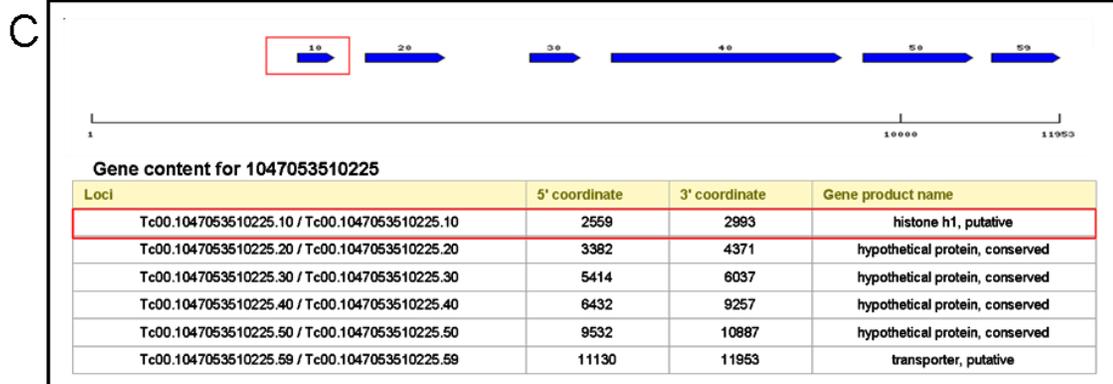
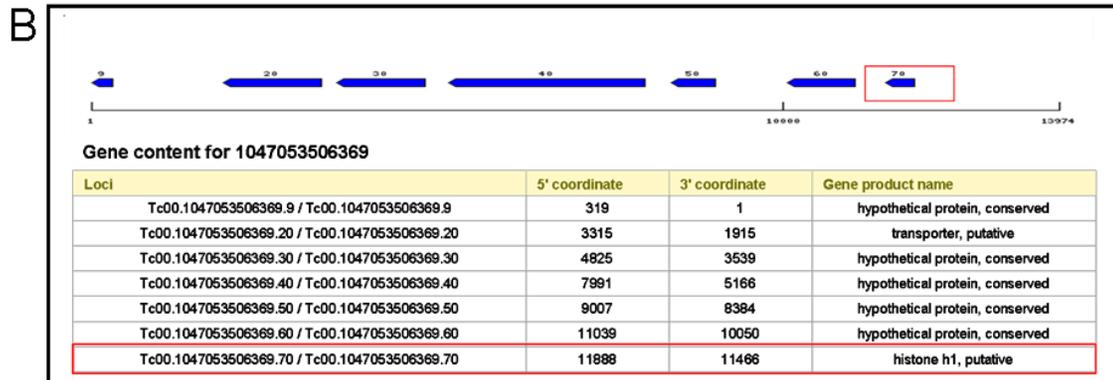
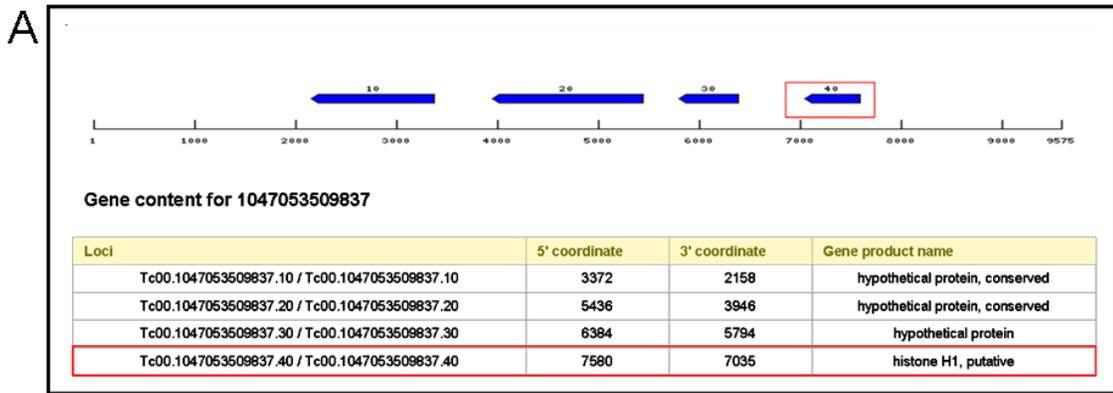
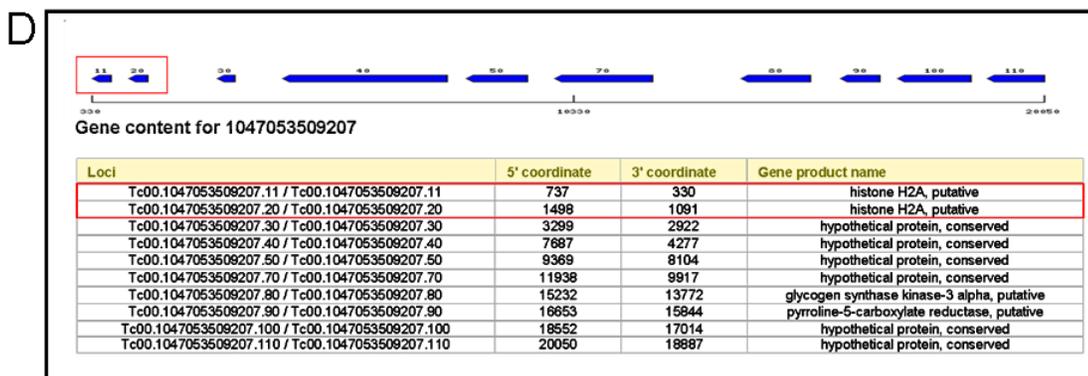
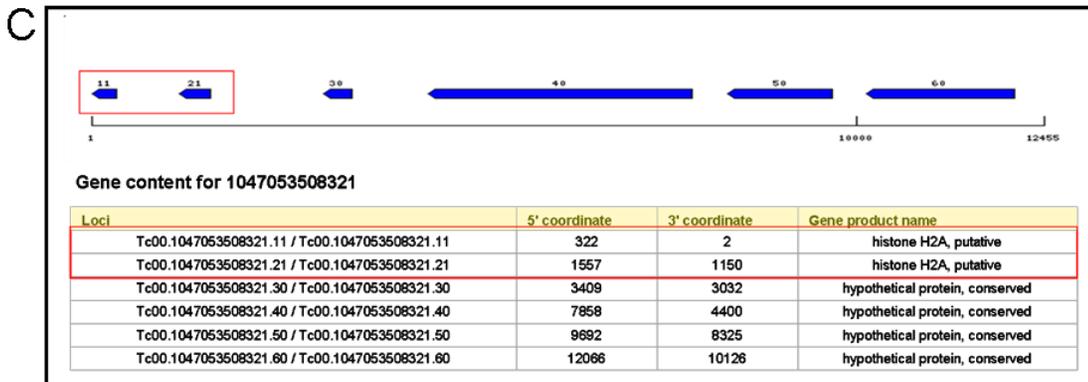
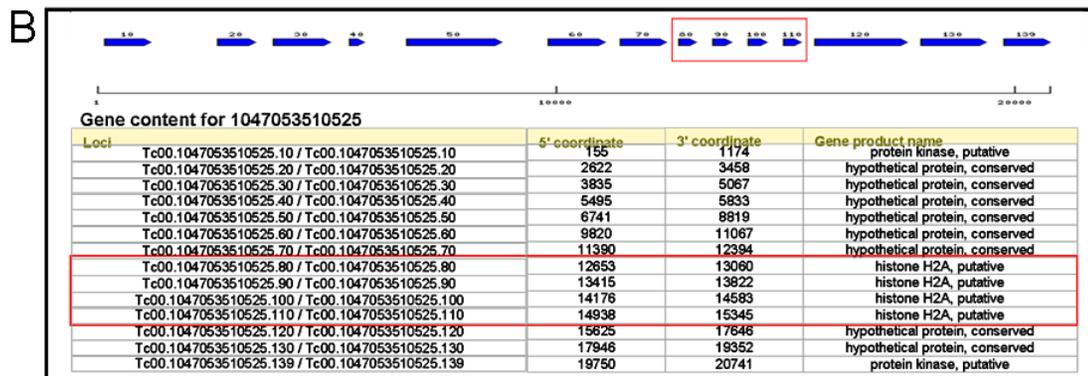
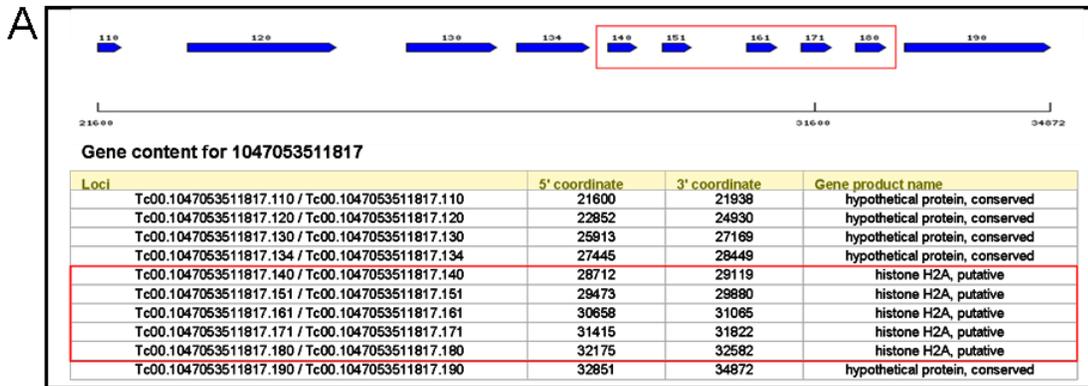


Figura 9. Localización del gen *Histona H1* en el genoma del clon CI Brener. Análisis de tres regiones genómicas portadoras del gen *Histona H1*, mostradas en A, B y C. En azul se muestra la ubicación de los genes descritos en las tablas respectivas. En rojo se destaca el gen *Histona H1* y su localización genómica (J. Craig Venter Institute, 2006).



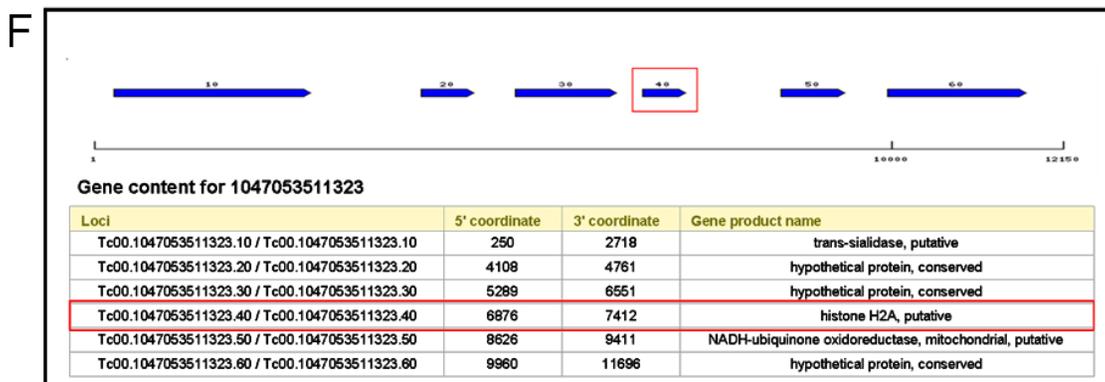
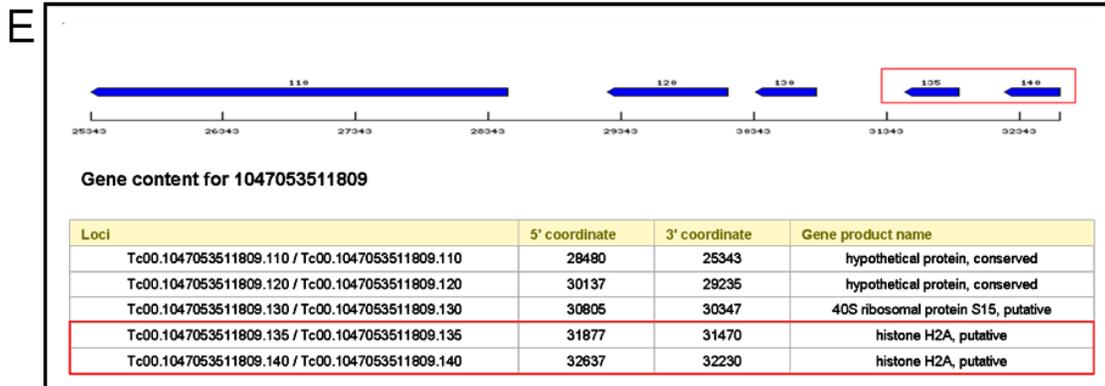


Figura 10. Localización del gen *Histona H2A* en el genoma del clon C1 Brener. Análisis de seis regiones genómicas portadoras del gen *Histona H2A*, mostradas en A, B, C, D, E y F. En azul se muestra la ubicación de los genes descritos en las tablas respectivas. En rojo se destaca el gen *Histona H2A* y su localización genómica (J. Craig Venter Institute, 2006).

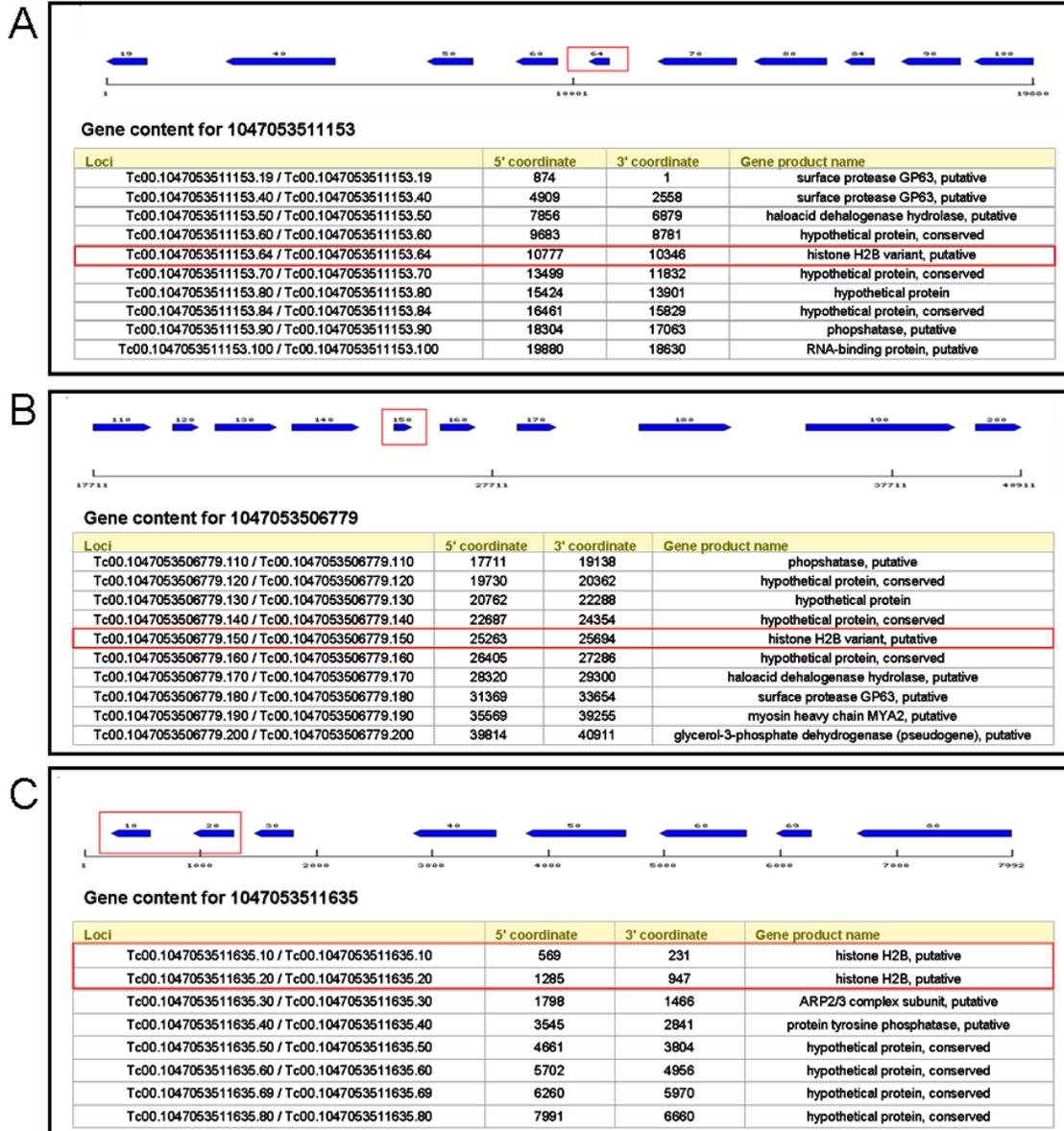
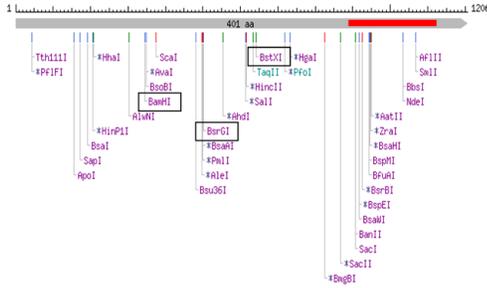


Figura 11. Localización del gen *Histona H2B* en el genoma del clon C1 Brener. Análisis de dos regiones genómicas portadoras del gen *Histona H2B*, mostradas en A y B. En azul se muestra la ubicación de los genes descritos en las tablas respectivas. En rojo se destaca el gen *Histona H2B* y su localización genómica (J. Craig Venter Institute, 2006).

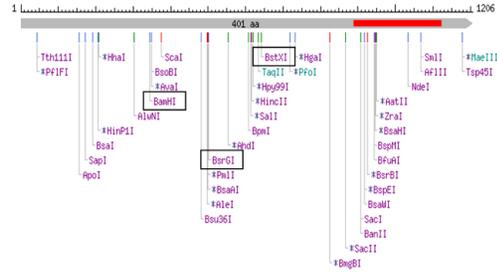
7.4 Estimación del número de copias del gen *TcCRT*

Con el objetivo de iniciar los estudios experimentales de la organización genómica del gen *TcCRT* en diferentes clones y cepas de *T. cruzi*, se procedió en una primera etapa al análisis de los sitios de corte para enzimas de restricción presentes en las secuencias genómicas de *TcCRT*, previamente descritas en “GenBank”. Se encontraron 4 secuencias del gen, dos de ellas corresponden al clon Cl Brener (XM807478 y XM799098), una a la cepa Tulahuén (AF107115) y otra a la cepa Miranda (AF162779), esta última obtenida y descrita por nuestro grupo (Figura 12). En una primera aproximación, el análisis de los sitios de restricción para estas secuencias nos permitió seleccionar 3 enzimas con un sitio único de corte que excluye la secuencia reconocida por la sonda. Además, estas enzimas tienen la característica de digerir ADN embebido en agarosa y su actividad no es afectada por metilación del ADN en el sitio de corte.

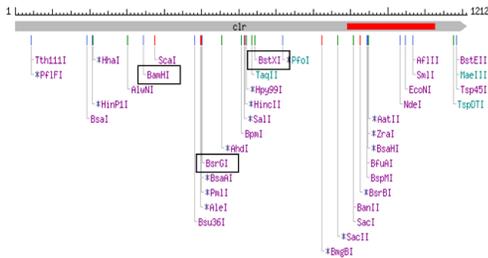
**Linear Sequence: XM 807478
CL BRENER**



**Linear Sequence: XM 799098
CL BRENER**



**Linear Sequence: AF107115
TULAHUEN**



**Linear Sequence: AF162779
MIRANDA**

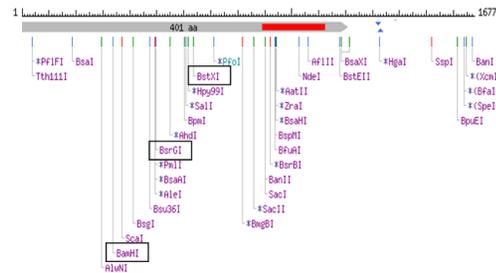


Figura 12. Mapa de restricción del gen *TcCRT*. Las secuencias nucleotídicas del gen *TcCRT* (rectángulos grises) fueron sometidas a un análisis de búsqueda de sitios de corte de enzimas de restricción de corte único (en morado). Se seleccionaron tres enzimas de restricción (BamH1, BsrG1 y BstX1) para ser utilizadas en los estudios de análisis genómico (enmarcadas en negro). La región del gen donde hibrida la sonda ³²P-C-*TcCRT* se muestra en rojo.

Finalmente, el análisis de restricción de la región genómica de Cl Brener que contiene el gen *TcCRT* muestra, para la enzima BamH1 la generación de un fragmento de 2999 Pb, que se considerará hipotéticamente como la unidad mínima de corte, conteniendo una copia del gen *TcCRT* (Figura 13).

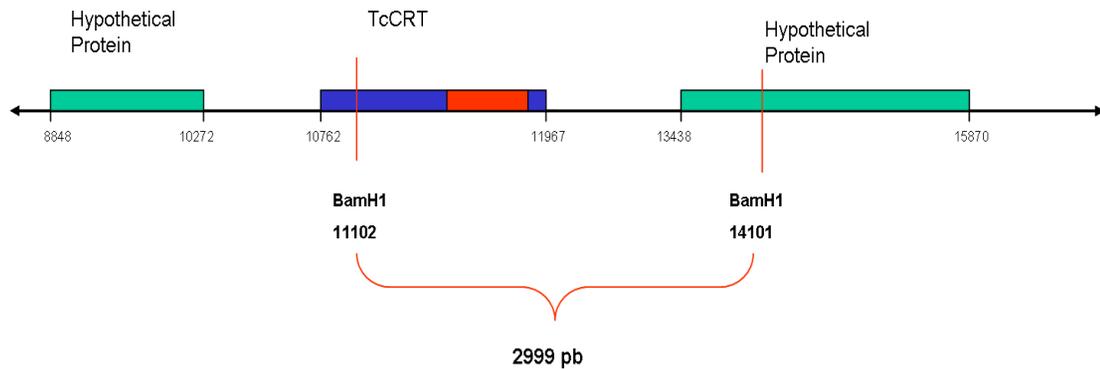


Figura 13. Análisis de los sitios de restricción para la enzima BamH1 en el locus genético del gen *TcCRT* de *Cl Brener*. El esquema incorpora el gen *TcCRT* (azul), sonda ^{32}P -*C-TcCRT* (rojo), dos genes codificantes para otras proteínas (verde) y los sitios de restricción para la enzima BamH1, que genera un fragmento de 2999 Pb.

Para determinar en forma experimental el número de copias y la organización genómica del gen *TcCRT* se intentó aislar y digerir específicamente los cromosomas portadores del gen con las enzimas de restricción anteriormente seleccionadas. Para ello fue necesario utilizar geles de agarosa “low melting point” (LMP), que permite la digestión específica del ADN embebido en una banda del gel. En la Figura 14, se muestra que la técnica de PFGE en geles de agarosa LMP no permitió una adecuada separación y discriminación de los cromosomas tanto de *T. cruzi* como de *S. cerevisiae*, estos últimos utilizados como marcador de peso molecular.

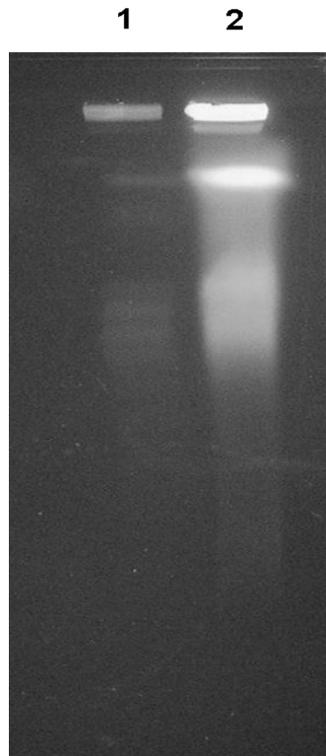


Figura 14. PFGE en gel de agarosa LMP no resuelve cromosomas de *T. cruzi*. Los cromosomas del clon CI Brener, fueron separados en un gel de agarosa LMP por PFGE con pulsos de 77 seg., por 18 hrs. y 165 seg., por 24 hrs. (carril 2). Los cromosomas de *S. cerevisiae* fueron usados como marcador de peso molecular (carril 1).

Basados en estos resultados, se decidió realizar las digestiones ocupando ADN total de *T. cruzi* embebido en agarosa (LMP). Primero se realizó una estandarización de las digestiones, con el fin de obtener una máxima digestión esperando encontrar así, la unidad mínima (una copia) del gen *TcCRT*. Para realizar estas digestiones se utilizaron las enzimas BamH1, BsrG1 y BstX1. En la Figura 15, se muestra la digestión de ADN de CI Brener (10 µg) con BamH1, a una concentración de 40 U/µg de ADN, por 10 minutos y hasta por 2 hrs. de incubación a 37°C, no viéndose digestión del ADN en el gel de PFGE. En concordancia con lo recomendado por el fabricante de las enzimas, se decidió realizar una incubación previa de la muestra con la enzima, a 4°C por 20 hrs., facilitando así la interacción enzima / sustrato. Los resultados de este procedimiento se observan en la Figura 16, donde se aprecia una mayor digestión con las 3 enzimas probadas (BamH1 20 U/µg, BsrG1 10 U/µg y BstX1 10 U/µg) cuando las muestras fueron previamente incubadas por 20 hrs. a 4°C (Figura 16, carriles 3, 5 y 7), en comparación a una simple incubación con las enzimas a 37°C (Figura 16, carriles 4, 6 y 8). Por otro lado, esta condición de PFGE permite separar fragmentos de ADN digerido en un rango de alto peso molecular (mayor a 194 Kpb.) hasta 9,42 Kpb. (Figuras 15 y 16), excluyendo del análisis fragmentos de menor tamaño que pudiesen contener una copia del gen *TcCRT* equivalente a 3 Kpb. Así, se procedió a ensayar una condición de PFGE que sea capaz de

discriminar fragmentos de ADN de tamaño menor a 3 Kpb, necesario para reconocer la unidad mínima de *TcCRT* (Figura 17).

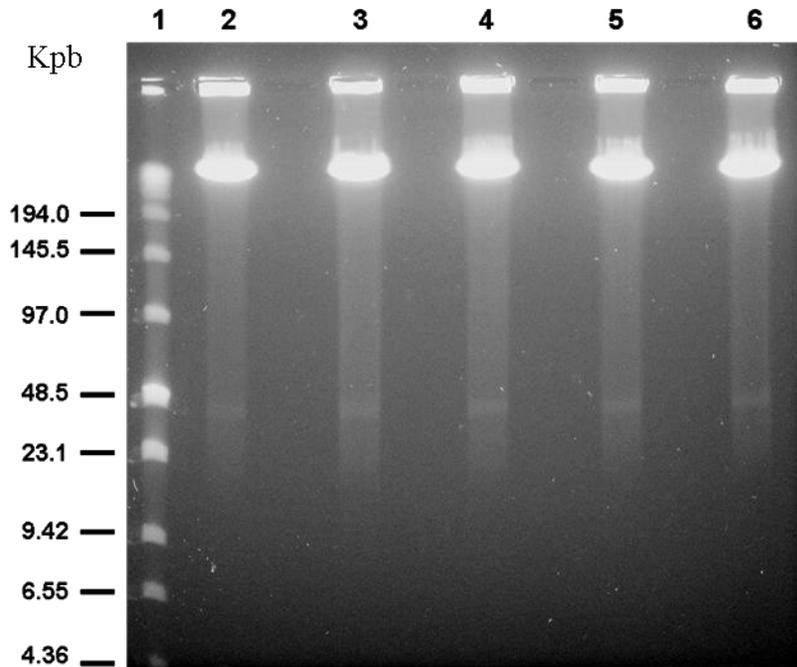


Figura 15. 2 horas de incubación a 37°C con BamH1, no promueven la digestión de ADN en *Cl Brener*. 10 µg de ADN fueron incubados con 40 U BamH1/µg ADN a 37°C por distintos tiempos y separados por PFGE. Gel teñido con BrEt. Carriles 3-6 corresponden a 10, 30 minutos, 1 y 2 horas de incubación respectivamente. Carriles 1 y 2 marcador de ADN “Low Range PFGE Marker” y ADN sin enzima, respectivamente.

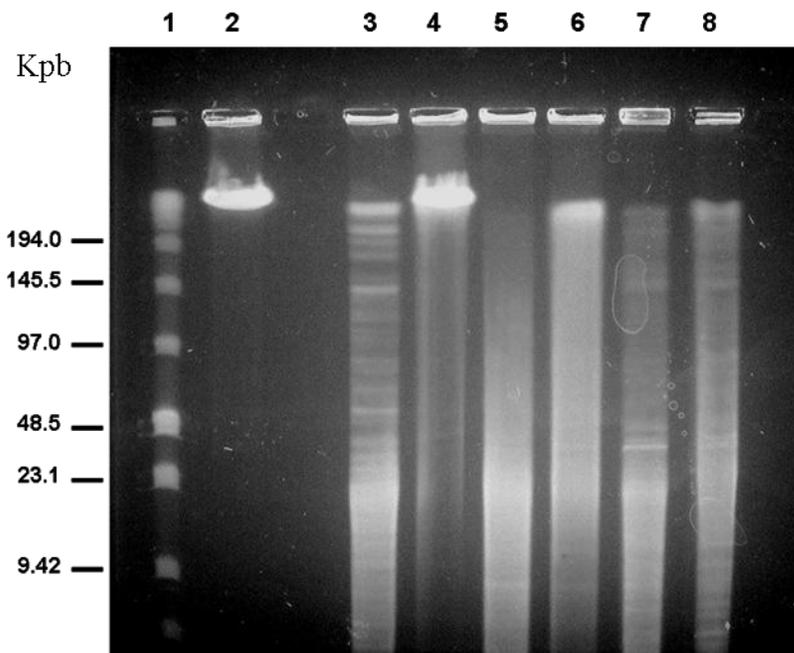


Figura 16. La adición de 20 hrs. de incubación a 4°C, aumenta la digestión de ADN en *Cl Brener*. 10 µg ADN de *Cl Brener* fueron incubados con 20 U BamH1/µg (3 y 4), 10 U BsrG1/µg (5 y 6) y 10 U BstX1/µg (7 y 8) a 37°C por 24 hrs. (4, 6 y 8) y por 20 hrs. a 4°C más 24 hrs. a 37°C (3, 5, 7) y separados por PFGE. Gel teñido con BrEt. Carriles 1 y 2 marcador de ADN “Low Range PFGE Marker” y ADN sin enzima, respectivamente.

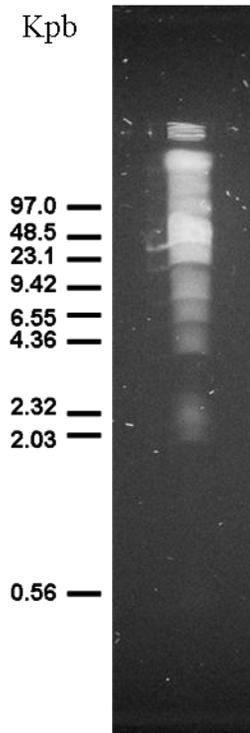


Figura 17. Separación por PFGE del estándar de peso molecular de ADN, de amplio rango. Carril, corresponde a 20 μ l de ADN del estándar de peso molecular “Low Range PFGE Marker” separado mediante PFGE, con pulsos de 1 a 12 seg. en modalidad “ramp” por 5 hrs. Gel teñido con BrEt.

Finalmente, para optimizar las reacciones de digestión de ADN, se procedió a variar los parámetros de concentración de enzima y temperatura. En la Figura 18, se observa la digestión de ADN total de *T. cruzi* con las enzimas BamH1, BsrG1 y BstX1, donde se aprecia una mayor digestión del ADN con BamH1 y BsrG1 durante un período de incubación de 20 hrs. a 4°C seguido por 24 hrs. a 37°C y a concentraciones de 40 U y 10 U, respectivamente. Así, estas fueron las condiciones seleccionadas para lograr una digestión máxima del ADN con BamH1 y BsrG1 (carriles 5 y 6 respectivamente). Para la enzima BstX1 solo se aprecia una digestión parcial del ADN. Sin embargo, a una concentración mayor de enzima (40 U), se observa una digestión total del ADN (Figura 19). No obstante, esta última enzima se excluyó de los estudios posteriores por su mayor costo económico.

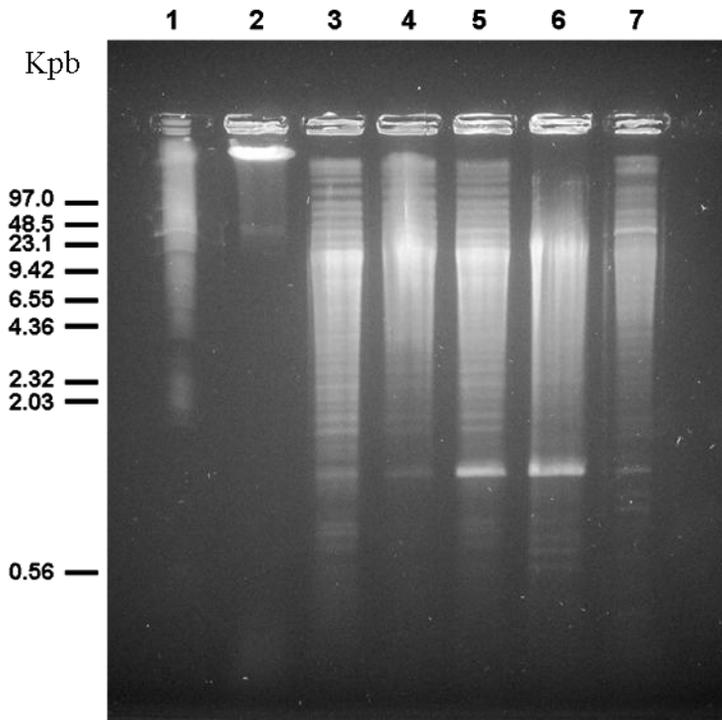


Figura 18. Estandarización de condiciones de máxima digestión de ADN total en *T. cruzi*. 10 μ g de ADN de la cepa MF fueron incubados con 20 U BamH1/ μ g (3 y 4), 40 U BamH1/ μ g (5), 10 U BsrG1/ μ g (6) y 20 U BstX1/ μ g (7), por 20 hrs. a 4°C (3), 20 hrs. a 4°C más 24 hrs. a 37°C (4, 5 y 6) y 20 hrs. a 4°C más 24 hrs. a 55°C (7) y separados por PFGE. Gel teñido con BrEt. Carriles 1 y 2 marcador de ADN “Low Range PFGE Marker” y control sin enzima, respectivamente.

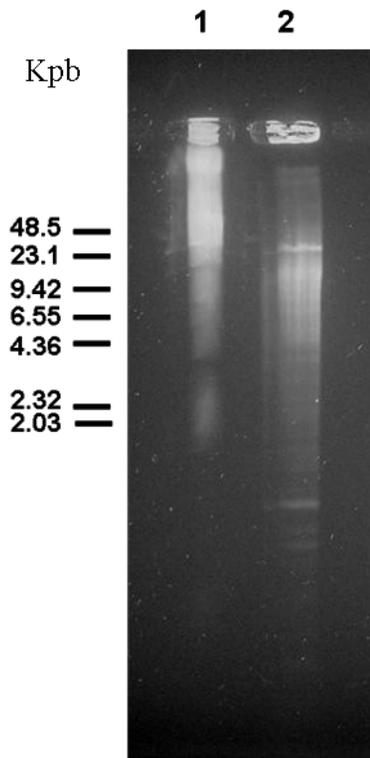


Figura 19. Estandarización de la digestión de ADN de *T. cruzi* por BstX1. 10 μ g de ADN de la cepa Tulahuén fueron incubados con 40 U/ μ g de BstX1 por 20 hrs. a 4°C más 24 hrs. a 55°C y separados por PFGE (carril 2). Gel teñido con BrEt. Carril 1 marcador de ADN “Low Range PFGE Marker”.

La Figura 20, muestra la digestión con la enzima BamH1 bajo las condiciones anteriormente seleccionadas (40 U/μg, incubación 20 hrs. a 4°C + 24 hrs. a 37°C) y el patrón de hibridación con la sonda ³²P-C-TcCRT. Se observa digestión del ADN en todas las cepas y clones (Figura 20A) y una señal de hibridación común de aproximadamente 2,4 Kpb, pero de diferente intensidad asociado a las diferentes cepas o clones (Figura 20B). En las cepas Y y Tulahuén (Figura 20B, carriles 3 y 6 respectivamente) se observa una 2ª banda de hibridación de aproximadamente 1.1 Kpb.

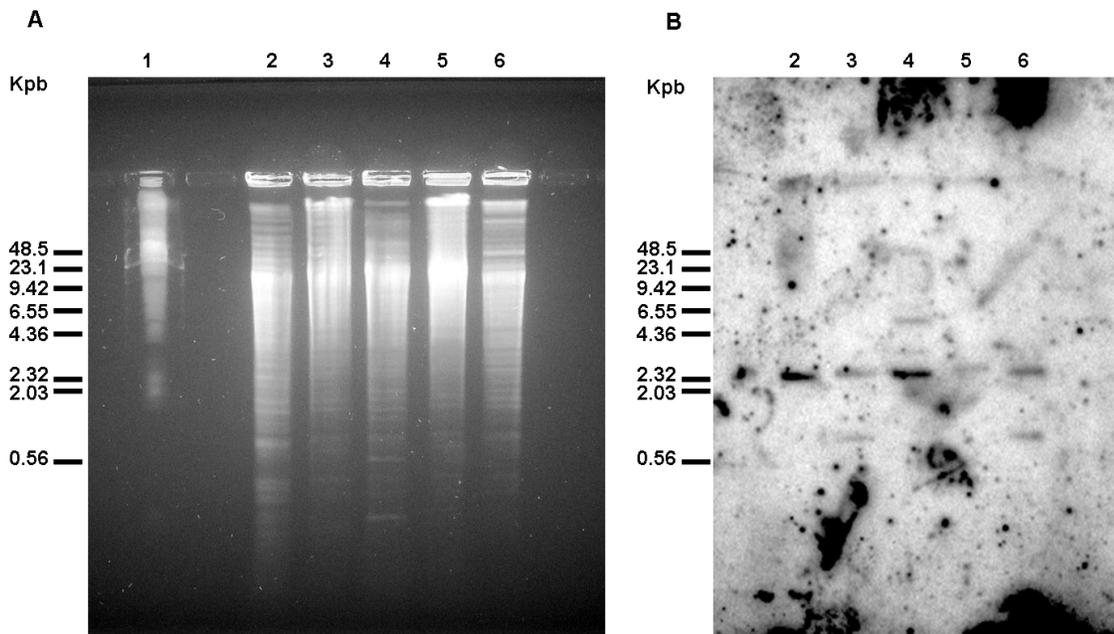


Figura 20. Determinación de la unidad mínima de digestión con BamH1 en cepas y clones de *T. cruzi*. ADN de *T. cruzi* cepas MF, Y, clones Dm28c, Cl Brener y cepa Tulahuén carriles 2, 3, 4, 5 y 6 respectivamente digeridos con BamH1 (40 U/μg ADN) por 20 hrs. a 4°C más 24 hrs. a 37°C. Los fragmentos fueron separados mediante PFGE con pulsos de 1 a 12 seg. por 5 hrs. Los carriles 2-6, en las Figuras A y B corresponden a un gel, detectado primero con BrEt y a su réplica en membrana de nylon, detectada con ³²P-C-TcCRT, respectivamente. Carril 1: Marcador ADN “Low Range Marker”.

En la Figura 21, se muestra la digestión del ADN de todas las cepas y clones con la enzima BsrG1, bajo las condiciones anteriormente seleccionadas (Figura 21A) y las señales de hibridación generadas con la sonda ^{32}P -C-TcCRT (Figura 21B), observándose varias bandas: 2 en el clon Dm28c de aproximadamente 3,3 y 9,1 Kpb (carril 5), 2 bandas en la cepa Tulahuén de 3,3 y 7,4 Kpb (carril 7), en la cepa Y (carril 4) se observa una sola banda de un tamaño 7,4 Kpb similar a Tulahuén. En esta figura no se aprecia una clara señal en la cepa MF y el clon Cl Brener (carriles 3 y 6 respectivamente). El carril 2 de la Figura 21, muestra una repetición del resultado de la Figura 20B (carril 2) donde se incubó ADN de la cepa MF con la enzima BamH1, obteniéndose en forma clara y reproducible la misma señal de hibridación con un tamaño aproximado de 2,5 Kpb (Figura 20B).

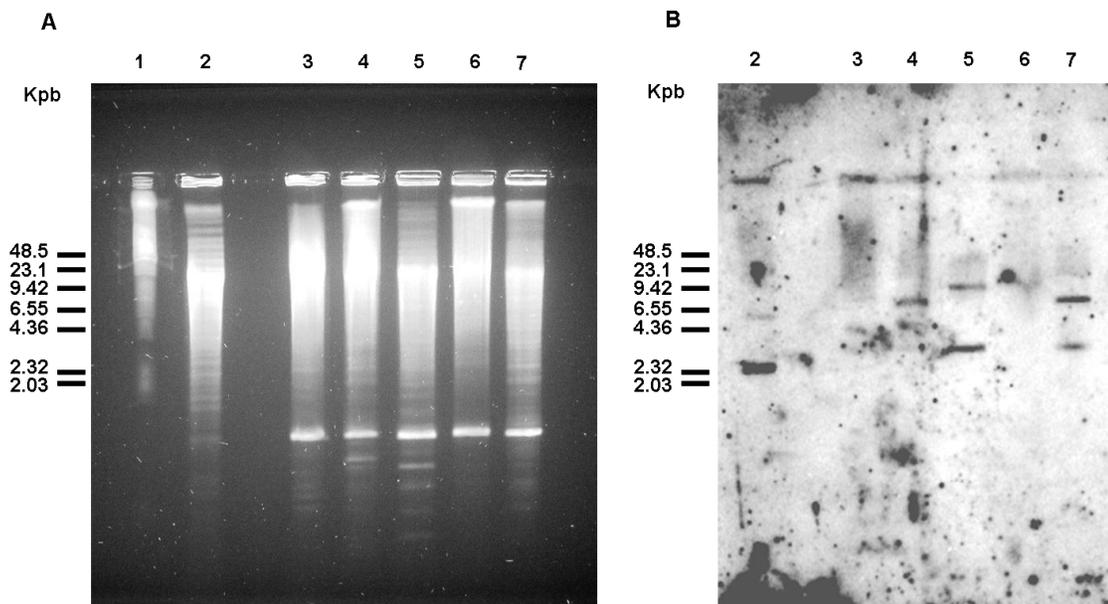


Figura 21. Determinación de la unidad mínima de digestión con BsrG1 en cepas y clones de *T. cruzi*. ADN de *T. cruzi* cepas MF, Y, clones Dm28c, Cl Brener y cepa Tulahuén carriles 3, 4, 5, 6 y 7 respectivamente digeridos con BsrG1 (10 U/ μ g ADN) por 20 hrs. a 4°C más 24 hrs. a 37°C. Carril 2 cepa MF digerida con BamH1 (40 U/ μ g ADN). Los fragmentos fueron separados mediante PFGE con pulsos de 1 a 12 seg. por 5 hrs. Los carriles 2-7, en las Figuras A y B corresponden a un gel, detectado primero con BrEt y a su réplica en membrana de nylon, detectada con ^{32}P -C-TcCRT, respectivamente. Carril 1: Marcador ADN "Low Range Marker".

Estos resultados indican que la digestión del ADN de *T. cruzi* con la enzima BamH1 generó, en todas las cepas y clones analizados, un fragmento esperado de aproximadamente 3 Kpb, que contiene una copia del gen *TcCRT*. Por lo tanto, esta enzima de restricción se utilizará en los siguientes experimentos, diseñados para determinar el número de copias en “tandem” para el gen *TcCRT*.

Teniendo las condiciones de incubación para una digestión completa del ADN de *T. cruzi*, se procedió a buscar las condiciones óptimas, para lograr digestiones parciales del ADN de las cepas y clones del estudio. Así, el ADN, de la cepa MF fue incubado entre 3 a 24 hrs. con BamH1 a 37°C (Figura 22). En este caso no hubo digestión, observándose en todos los carriles (Figura 22, carriles 2-6) una banda superior correspondiente, a ADN de alto peso molecular no digerido (flecha roja), también se probó con ADN de la cepa Y y con la enzima BsrG1, obteniéndose los mismos resultados (Figuras 23 y 24).

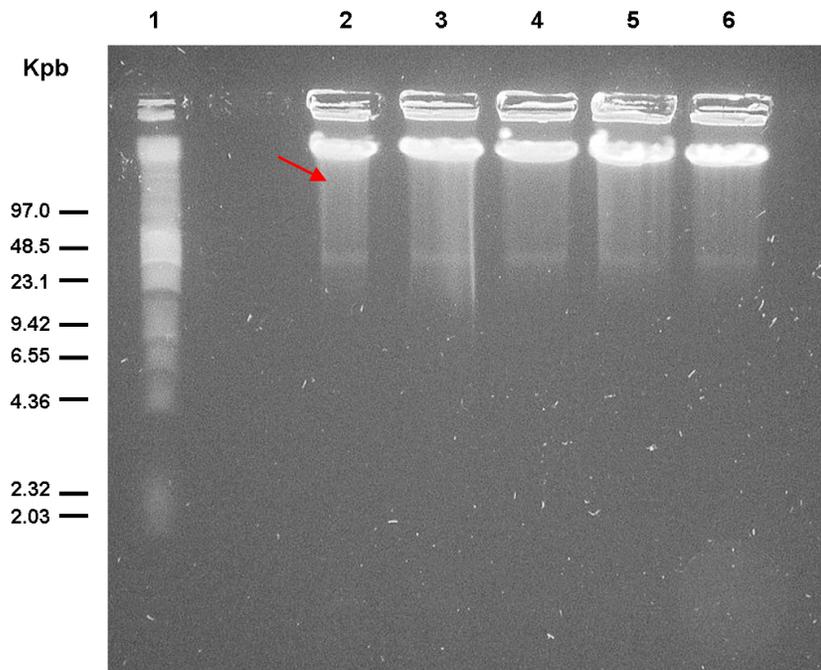


Figura 22. La incubación a 37°C con BamH1 no promueve la digestión de ADN en la cepa MF. ADN de la cepa MF fue digerido con 40 U/μg BamH1 e incubado a 37°C por 0, 3, 6, 12 y 24 hrs., carriles 2 a 6 respectivamente. La flecha roja indica ADN no digerido. Gel teñido con BrEt. Carril 1 marcador de ADN “Low Range Marker”.

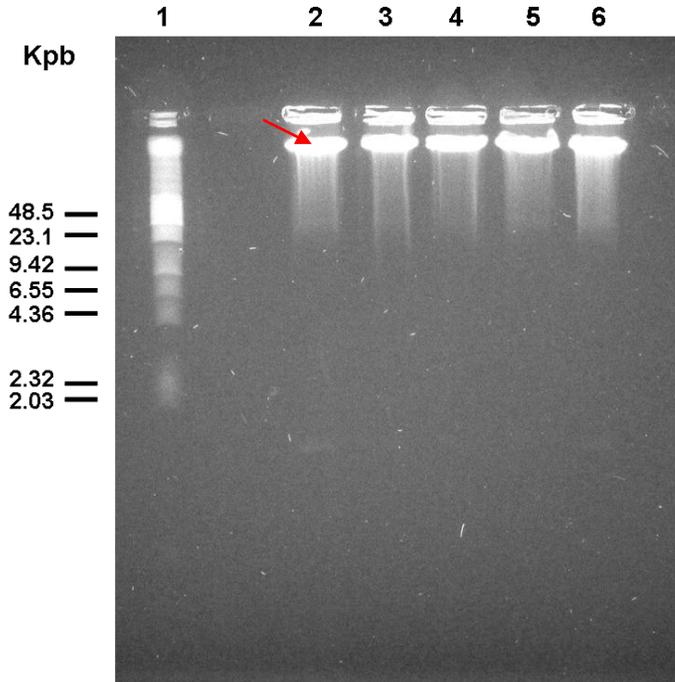


Figura 23. La incubación a 37°C con BamH1, no promueve la digestión de ADN en la cepa Y. ADN de la cepa Y fue digerido con 40 U/ μ g BamH1 e incubado a 37°C por 0, 3, 6, 12 y 24 hrs., carriles 2 a 6 respectivamente. La flecha roja indica ADN no digerido. Gel teñido con BrEt. Carril 1 marcador de ADN “Low Range Marker”.

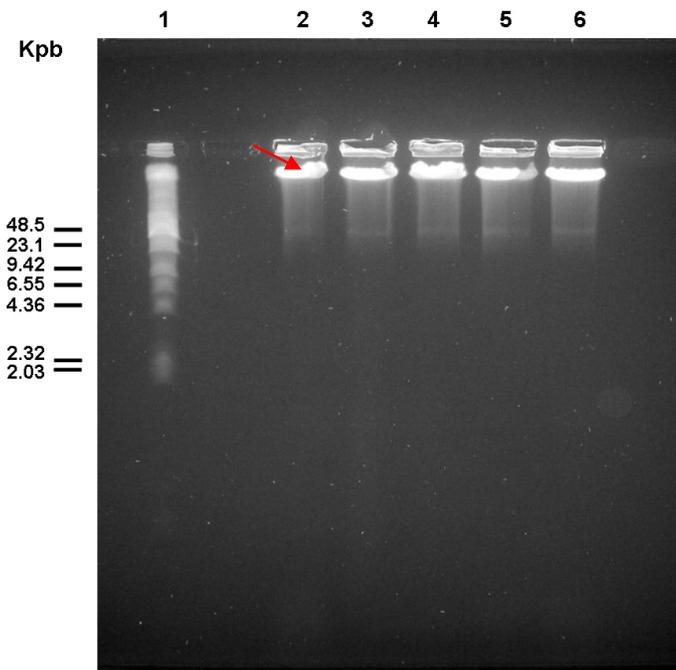


Figura 24. La incubación a 37°C con BsrG1, no promueve la digestión de ADN en la cepa MF. ADN de la cepa MF fue digerido con 10 U/ μ g BsrG1 e incubado a 37°C por 0, 3, 6, 12 y 24 hrs., carriles 2 a 6 respectivamente. La flecha roja indica ADN no digerido. Gel teñido con BrEt. Carril 1 marcador de ADN “Low Range Marker”.

Considerando los resultados anteriores, donde no se logró digestión, se decidió aumentar el tiempo de incubación con la enzima de restricción hasta 48 hrs. y comparar temperaturas de digestión de 37° v/s 4°C. Esto último basado en el resultado mostrado en la Figura 16 (carril 3), donde se aprecia digestión del ADN, cuando la muestra se incubó solo a 4°C. En la Figura 25, se observa digestión del ADN de la cepa MF cuando se incubó con BamH1 por 24 hrs. a 4°C o por 12 hrs. a 4° más 12 hrs. a 37°C (carriles 1 y 2 respectivamente). Sin embargo, no se observó digestión del ADN a 37°C por 24, 36 o 48 hrs. (Figura 25, carriles 3 a 5). Estos resultados nos indican que bajo nuestras condiciones experimentales la digestión del ADN ocurre a 4°C y no a 37°C. Es probable que las muestras de ADN embebidas en agarosa contengan proteasas que se activarían a 37°C digiriendo las enzimas de restricción, estas proteasas no se activarían a 4°C permitiendo así la acción de las enzimas de restricción, que se encuentran en una alta concentración. Tomando en cuenta estos resultados, los siguientes experimentos de digestión fueron realizados a 4°C.

La Figura 26A muestra una cinética de digestión de ADN del clon Cl Brener con la enzima BamH1 en tiempos que van desde 1 a 24 hrs., observándose una digestión gradual del ADN. En todos los tiempos de incubación, la hibridación con la sonda ³²P-C-TcCRT (Figura 26B) reveló una única banda de tamaño aproximado de 2,6 Kpb. En la misma figura, el tiempo mínimo de digestión (1 hora) mostró una digestión considerable. Así, en experimentos posteriores se consideraron tiempos de incubación menores, desde 15 minutos.

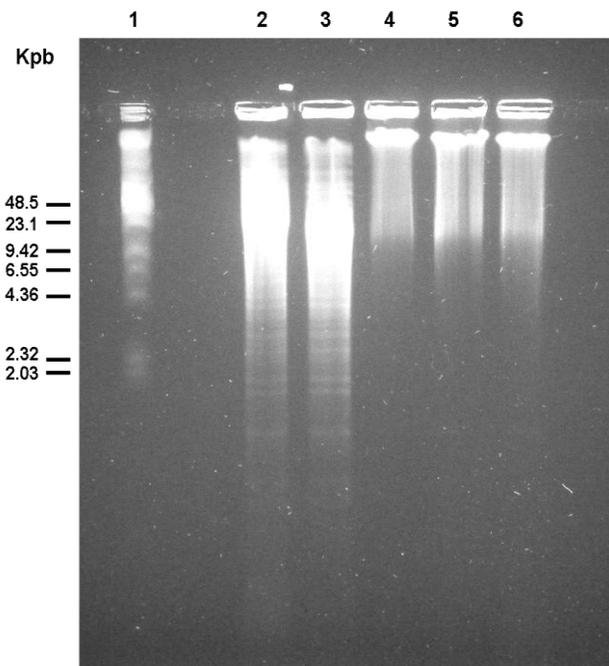


Figura 25. La incubación con BamH1 a 4°C promueve la digestión de ADN de la cepa MF en *T. cruzi*. ADN de *T. cruzi* cepa MF fue digerido por 24 hrs. a 4°C (2), 12 hrs. a 4°C más 12 hrs. a 37°C (3), 24, 36 y 48 hrs. a 37°C, con BamH1 (40 U/μg ADN) a 37°C, carriles 4, 5 y 6 respectivamente. Los fragmentos fueron separados mediante PFGE con pulsos de 1 a 12 seg. por 5 hrs. Gel teñido con BrEt. Carril1: marcador de ADN "Low Range PFGE Marker".

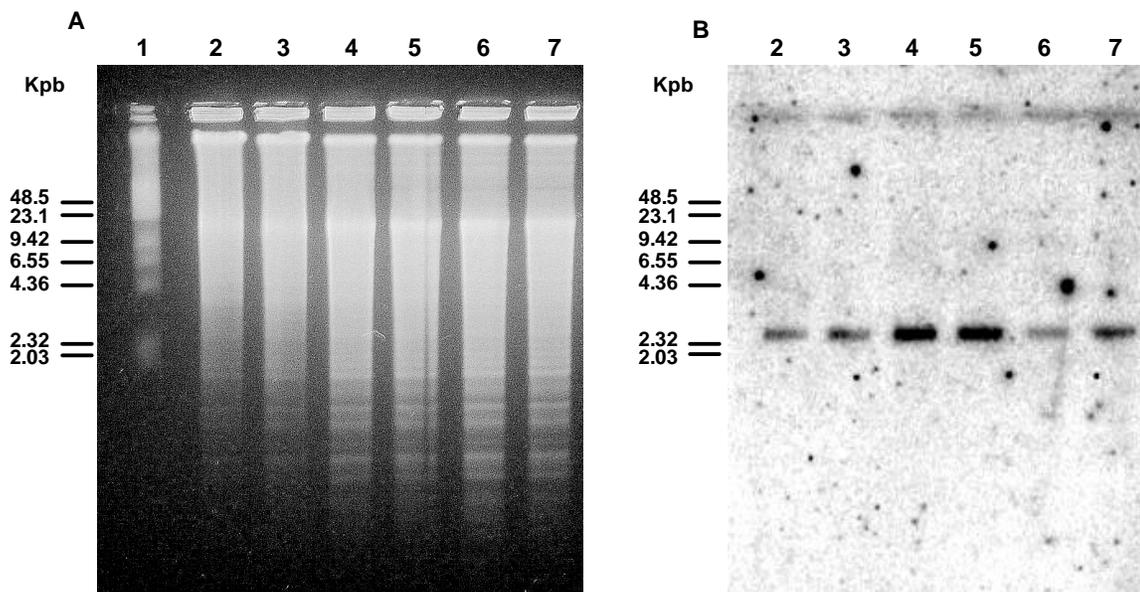


Figura 26. La incubación a 4°C con BamH1, permite la digestión de ADN en Cl Brener y la hibridación con la sonda ^{32}P -C-TcCRT. ADN (10μg) del clon Cl Brener fue digerido con 40 U/μg de BamH1 e incubado a 4°C por 1, 3, 6, 9, 12 y 24 hrs., carriles 2 a 7 respectivamente y separados mediante PFGE. Los carriles 2-7, en las Figuras A y B corresponden a un gel, detectado primero con BrEt y a su réplica en membrana de nylon, detectada con ^{32}P -C-TcCRT respectivamente. Carril 1: Marcador ADN "Low Range PFGE Marker".

La Figura 27A, muestra una cinética de digestión de ADN de la cepa MF utilizando la enzima BamH1. En ausencia de la enzima no se aprecia digestión del ADN (Figura 27A, carril 2) observándose una gran banda muy cerca del pozo de carga (ADN no digerido de alto tamaño molecular, flecha roja). A tiempos de digestión menores, 15 a 30 minutos (carriles 3-4), intermedios, 1 a 6 hrs. (carriles 5-6) y mayores, 12 a 24 hrs. (carriles 7-8) se observa un incremento en la digestión del ADN llegando a un patrón de máxima digestión con un aumento en la señal de hibridación de las bandas de menor tamaño. La Figura 27B muestra la hibridación del ADN digerido con la sonda ³²P-C-TcCRT, apreciándose una señal intensa, en el pocillo de carga correspondiente al ADN de alto peso molecular no digerido (carril 2), esta señal disminuye a partir de los primeros tiempos de digestión (carriles 3-8). Consecuentemente, se observa una señal de aproximadamente 2,9 Kpb (carriles 3-8, flecha azul) similar a lo descrito en la Figura 26, en términos generales la migración de esta banda en los experimentos siguientes se mantuvo dentro del rango esperado. En la misma figura, no se observan otras bandas de mayor tamaño que nos indiquen que el gen se encuentra en mas de una copia, la señal poco definida apreciable en todos los carriles (flecha púrpura) corresponde a una señal de hibridación inespecífica, ya que incluso se observa en el control negativo (carril 2).

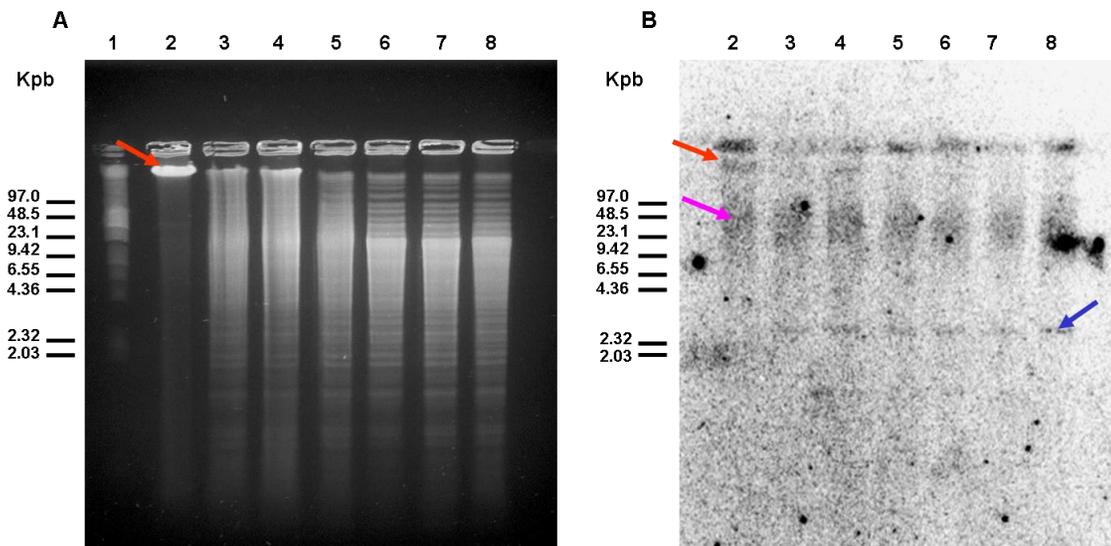


Figura 27. *TcCRT* no se encuentra organizado en “tandem” y está presente en copia única en la cepa MF. ADN de *T. cruzi* cepa MF (10 µg) incubado por 0, 15 y 30 minutos, 1, 6, 12 y 24 hrs. con enzima BamH1 (40 U/µg ADN), carriles 2 a 8 respectivamente. Los fragmentos de ADN fueron separados mediante PFGE, con pulsos de 1 a 12 seg. por 5 hrs. Los carriles 2-8, en las Figuras A y B corresponden a un gel, detectado primero con BrEt y a su réplica en membrana de nylon, detectada con ³²P-*C-TcCRT*, respectivamente. Flecha azul indica: señal específica de *TcCRT*, flecha roja: ADN de alto peso molecular, flecha púrpura: hibridación inespecífica. Carril 1: marcador de ADN “Low Range PFGE Marker”.

Las Figuras 28 y 29 muestran experimentos similares al anterior, en este caso la muestra corresponde al ADN de los clones Cl Brener y Dm28c respectivamente, digeridos con la enzima BamH1. Se observa un patrón de digestión, similar al mostrado por la cepa MF (Figura 27), que va en aumento dependiendo del tiempo de incubación (Figuras 28A y 29A). Además, se observa una única señal de hibridación de tamaño aproximado 3,2 Kpb (Figuras 28B y 29B, flecha azul). Esto indicaría que el gen *TcCRT* no está organizado en “tandem” en el genoma de los clones Cl Brener y Dm28c, validando nuestros resultados predichos a partir de los datos del proyecto del genoma de *T. cruzi*, en el caso del clon Cl Brener.

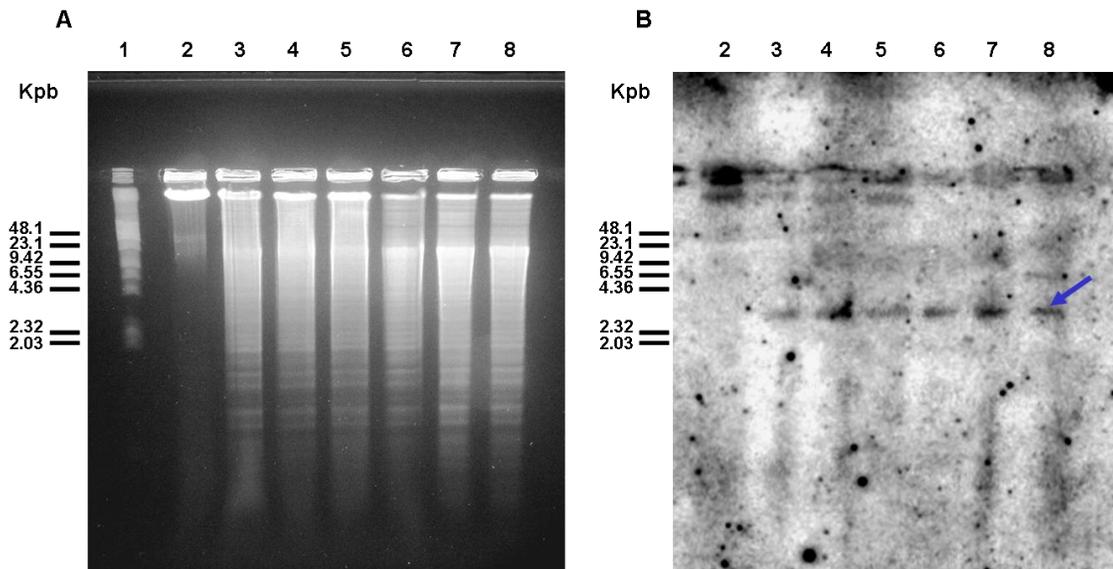


Figura 28. *TcCRT* no se encuentra organizado en “tandem” y está presente en copia única en el clon CI Brener. ADN de *T. cruzi* clon CI Brener (10 µg) fue incubado por 0, 15 y 30 minutos, 1, 6, 12 y 24 hrs. con enzima BamH1 (40 U/µg ADN), carriles 2 a 8 respectivamente. Los fragmentos de ADN fueron separados mediante PFGE, con pulsos de 1 a 12 seg. por 5 hrs. Los carriles 2-8, en las Figuras A y B corresponden a un gel, detectado primero con BrEt y a su réplica en membrana de nylon, detectada con ³²P-*C-TcCRT*, respectivamente. La flecha azul indica la señal de hibridación. Carril 1: marcador de ADN “Low Range Marker”.

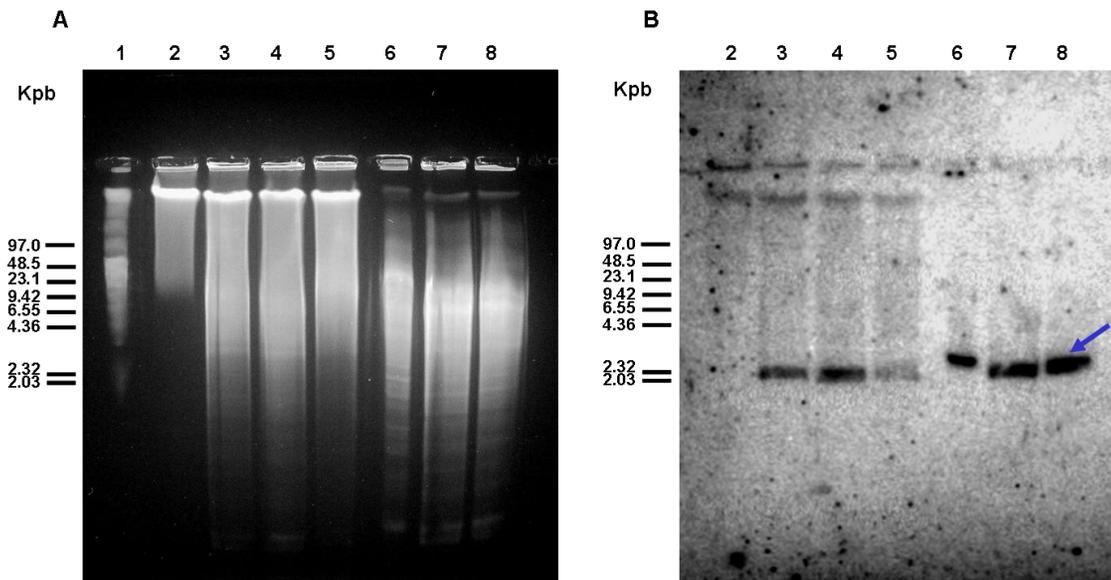


Figura 29. *TcCRT* no se encuentra organizado en “tandem” y está presente en copia única en el clon Dm28c. ADN de *T. cruzi* del clon Dm28c (10 µg) fue incubado por 0, 15 y 30 minutos, 1, 6, 12 y 24 hrs. con enzima BamH1 (40 U/µg ADN), carriles 2 a 8 respectivamente. Los fragmentos de ADN fueron separados mediante PFGE, con pulsos de 1 a 12 seg. por 5 hrs. Los carriles 2-8, en las Figuras A y B corresponden a un gel, detectado primero con BrEt y a su réplica en membrana de nylon, detectada con ³²P-C-*TcCRT*, respectivamente. La flecha azul indica la señal de hibridación. Carril 1: marcador de ADN “Low Range Marker”.

Las Figuras 30A y 31A, muestran la cinética de digestión del ADN de las cepas Tulahuén e Y con la enzima BamH1. La hibridación con la sonda ³²P-C-*TcCRT* reveló la presencia de dos bandas de 2,4 Kpb y 1,5 Kpb aproximadamente (flecha azul). Estas 2 bandas indicarían, que en las cepas Tulahuén e Y, el gen *TcCRT* tendría un polimorfismo, generando un nuevo sitio de corte para BamH1, explicando así la banda de menor tamaño. Sin embargo, y al igual que en los casos anteriores, estos resultados indicarían que el o los genes que codifican *TcCRT* no se encuentran organizados en “tandem”. Así, *TcCRT* estaría presente en distintos cromosomas de *T. cruzi*, pero en copia única.

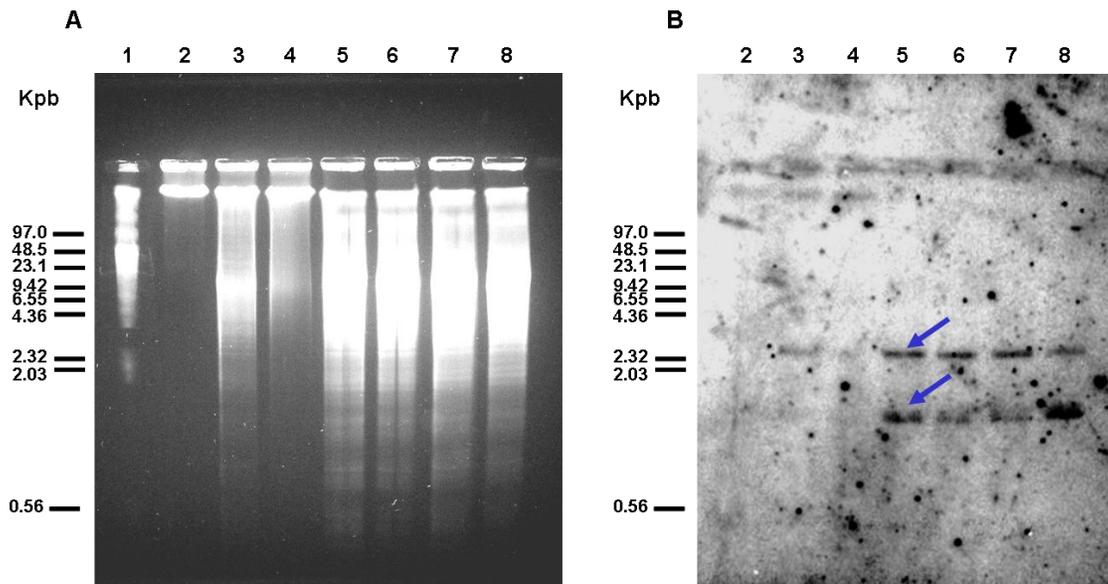


Figura 30. *TcCRT* no se encuentra organizado en “tandem” y presenta un polimorfismo en la cepa Tulahuén. ADN de *T. cruzi* cepa Tulahuén (10 µg) fue incubado por 0, 15 y 30 minutos, 1, 6, 12 y 24 hrs. con enzima BamH1 (40 U/µg ADN), carriles 2 a 8 respectivamente. Los fragmentos de ADN fueron separados mediante PFGE, con pulsos de 1 a 12 seg. por 5 hrs. Los carriles 2-8, en las Figuras A y B corresponden a un gel, detectado primero con BrEt y a su réplica en membrana de nylon, detectada con ^{32}P -*C-TcCRT*, respectivamente. Las flechas azules indican señales de hibridación. Carril 1: marcador de DNA “Low Range Marker”.

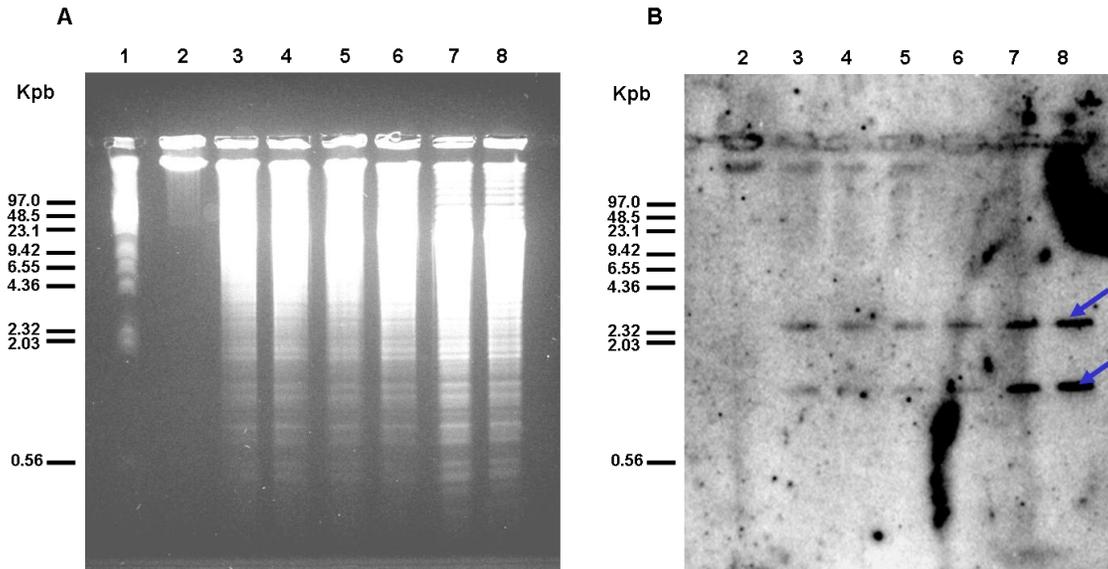


Figura 31. *TcCRT* no se encuentra organizado en “tandem” y presenta un polimorfismo en la cepa Y. DNA de *T. cruzi* cepa Y (10 µg) fue incubado por 0, 15 y 30 minutos, 1, 6, 12 y 24 hrs. con enzima BamH1 (40 U/µg ADN), carriles 2 a 8 respectivamente. Los fragmentos de ADN fueron separados mediante PFGE, con pulsos de 1 a 12 seg. por 5 hrs. Los carriles 2-8, en las Figuras A y B corresponden a un gel, detectado primero con BrEt y a su réplica en membrana de nylon, detectada con ^{32}P -*C-TcCRT*, respectivamente. Las flechas azules indican señales de hibridación. Carril 1: marcador de ADN “Low Range Marker”.

VIII. Discusión

Calreticulina es una proteína presente en todas las células de organismos superiores, salvo eritrocitos, con múltiples funciones descritas. Se han encontrado isoformas de esta proteína en varias especies, desde plantas como el maíz hasta humanos. Calreticulina de *T. cruzi* (*TcCRT*) presenta propiedades moduladoras del sistema del complemento humano (Ferreira *et al.*, 2004a) y de la angiogénesis (Molina *et al.*, 2005). Esta proteína posee una localización intracelular y también en la superficie del parásito. Su gen posee una localización cromosómica variable, existiendo la posibilidad que *TcCRT* sea codificada por múltiples copias de genes organizados en “tandem”, con posibles implicancias funcionales. Por otro lado el cariotipo de *T. cruzi* posee un extenso polimorfismo en su tamaño cromosomal, además de la ausencia de condensación de su cromatina. Así, el cariotipo de *T. cruzi* puede ser evaluado por PFGE y no por técnicas de citogenética convencional (Henriksson *et al.*, 1996).

Antecedentes previos, derivados de los proyectos del genoma de *T. cruzi* y *T. brucei* muestran que *TcCRT* está presente como copia única (Figuras 5 y 6 respectivamente). Sin embargo, en *T. cruzi* este análisis está restringido a un solo clon (Cl Brener). Así, debido al alto grado de polimorfismo presente en el cariotipo de sus distintas cepas o clones es necesario conocer si esta organización, es aplicable a otras cepas de *T. cruzi*.

En consecuencia, nos hemos preguntado si el gen *TcCRT* se encuentra codificado en múltiples copias organizadas en “tandem”. Así, se procedió a realizar un análisis del cariotipo de *T. cruzi* (clones Dm28c, Cl Brener y cepas Y, MF y Tulahuén) por PFGE para localizar el gen de *TcCRT*.

En una segunda etapa se procedió a estimar el número de copias de *TcCRT* utilizando una estrategia que asume que si *TcCRT* está en el genoma organizado en múltiples copias en “tandem”, entonces a tiempos cortos de digestión se debiese observar fragmentos de ADN de alto peso molecular que contengan varias copias del gen y conforme progresa el tiempo de digestión disminuye el tamaño del fragmento de ADN y el número de copias del gen *TcCRT* contenidas en él, hasta llegar a un fragmento pequeño de aproximadamente 3 Kpb que contiene una sola copia del gen.

Nuestros resultados muestran un marcado polimorfismo en el cariotipo de las distintas cepas y clones del estudio (Figura 4A). El gen *TcCRT* se encuentra localizado en varios cromosomas al parecer homólogos de distinto tamaño. *TcCRT* se localiza en 2 cromosomas en el clon Cl Brener y la cepa MF, 3-4 cromosomas en la cepa Tulahuén e Y, en el clon Dm28c *TcCRT* se encuentra en 3 cromosomas. Lo anterior nos muestra la heterogeneidad en el número de cromosomas portadores del gen *TcCRT*. Concordantemente, este polimorfismo observado en la localización de *TcCRT*, ha sido descrito para otros genes de *T. cruzi* y se ha demostrado la presencia de variantes alélicas ubicadas en diferentes cromosomas (Porcile *et al.*, 2003). Así, la ubicación de *TcCRT* en diferentes cromosomas sugiere que podría tratarse de cromosomas homólogos o de un gen móvil o de duplicaciones y translocaciones de la región que contiene el gen, lo cual ha sido demostrado para otros marcadores de *T. cruzi* (Henriksson *et al.*, 1996).

Por otra parte, en *T. cruzi* se han descrito varios genes que se organizan en “tandem” con un número variable de copias y localizados en más de un cromosoma.

Para dilucidar si en las bandas cromosomales portadoras del gen *TcCRT* (Figura 4B), existe una organización en “tandem” se procedió a digerir los cromosomas portadores de *TcCRT*.

Para realizar las digestiones se seleccionaron endonucleasas que pudieran cortar ADN embebido en agarosa LMP, para ello fue necesario aumentar la concentración enzimática logrando así una digestión similar al ADN digerido en solución, para esto se trabajó con enzimas “New England Biolabs” (NEB). Específicamente en este trabajo se ocuparon las enzimas BamH1, BsrG1 y BstX1 (esta última solo se utilizó en experimentos preliminares), las cuales fueron seleccionadas según mapa de restricción de las 4 secuencias de *TcCRT* publicadas (Figura 12). Cada una de estas enzimas posee un solo sitio de corte dentro del gen *TcCRT* y otro fuera de la región codificante, esto último con el objetivo de generar un solo fragmento que contenga el gen.

La estandarización del proceso de digestión se realizó modificando variables como temperatura, cantidad de ADN a digerir, enzima, concentración enzimática y tiempos de incubación (Figuras 14-19 y 22-25). Un resultado paradójico nos reveló que, la enzima BamH1 digiere el ADN cuando se incuba a una temperatura de 4°C, y no lo hace cuando la temperatura es 37°C como lo recomienda el fabricante (Figura 27).

Nuestra explicación a este fenómeno implicaría la presencia de proteasas existentes en las muestras de ADN, que se activarían a 37°C provocando la hidrólisis de las enzimas utilizadas en la reacción, mientras que a 4°C las proteasas no se activarían.

Luego de encontrar las mejores condiciones de digestión, se realizaron incubaciones con menores tiempos con el fin de obtener digestiones parciales que nos permitieran estimar el número de copias de *TcCRT* en las cepas y clones del estudio (Figuras 27-31). Las Figuras 27B a 31B, corresponden a membranas provenientes de cinéticas de digestión en las que se observan señales correspondiente al gen *TcCRT*. Esta señal está presente en todas las muestras, en tamaños que oscilan entre 2,3 y 3,2 Kpb dependiendo de la cepa, clon o PFGE. Si bien los tamaños de las bandas son diferentes, estos son estimativos y relativos. Cabe destacar que en la Figura 22, se encuentran en la misma membrana todas las muestras del estudio, observándose que las señales de hibridación coinciden en tamaño entre ellas con un tamaño aproximado de 2,3 Kpb. Lo anterior nos deja que independiente del tamaño exacto de las bandas, estas se encuentran en el rango esperado (3 Kpb).

Por lo anterior podemos concluir que el gen *TcCRT* se encuentra en una sola copia (una sola banda) ya que no se observan, en tiempos menores de digestión, otras bandas mayores correspondientes a múltiplos de la unidad mínima (en este caso un tamaño cercano a los 3 Kpb). Las cepas Tulahuén e Y (Figuras 30B y 31B respectivamente) poseen una segunda banda cuyo tamaño se estima entre 1,1 a 1,5 Kpb, en este caso podemos decir que existiría un polimorfismo en los sitios de restricción ubicados en la región intergénica y no en el gen *TcCRT*, esto último corroborado en la secuencia génica de *TcCRT* (cepas Tulahuén, Miranda y el clon Cl Brener). Cabe señalar que este polimorfismo, de las cepas Tulahuén e Y, coincide con los experimentos en campo pulsado que señalan una mayor cantidad de cromosomas portadores del gen específicamente en estas cepas (Figura 4).

Las condiciones de digestión utilizadas para la enzima BsrG1 no fueron las ideales, ya que no se aprecia digestión en el gel ni señal de hibridación en la membrana correspondiente, Figuras 1 a 6 (Anexo).

Los datos generados a partir del genoma de *T. cruzi* (clon Cl Brener) respaldan nuestros resultados indicando, según el estudio bioinformático realizado, que en Cl

Brener el gen *TcCRT* se encuentra en copia única (Figura 5). Coincidentemente, el gen de CRT también se encuentra en copia única en *T. brucei* (Figura 6).

Hay que recordar que en tripanosomátidos, los mecanismos de expresión génica y del proceso postranscripcional difieren de otros eucariotas en casi todas las vías. Así, empleando varias vías de regulación, estos parásitos pueden asegurar los rápidos cambios asociados con la transmisión entre insecto-vector y hospedero mamífero, a través de una reprogramación instantánea de expresión genética (Teixeira *et al.*, 2003). Además, promotores de la enzima ARN Polimerasa II todavía no son identificados en *T. cruzi* ni en otros tripanosomátidos. Genes ligados son co-transcritos en largas unidades policistrónicas, a menudo sobre varios cientos de miles de nucleótidos y el sitio de inicio de la transcripción y la regulación de su extensión todavía no son determinadas. Los niveles basales de ARNm derivados de los genes ligados pueden a menudo diferir en varios cientos de veces (Taylor *et al.*, 2003). Lo que implica que la regulación debe ser predominantemente postranscripcional. Así, la atención se ha desviado hacia el estudio de elementos regulatorios, derivados de regiones no traducidas de varios genes sometidos a control pos-transcripcional. La región 3'UTR ha sido el principal sitio relacionado a mecanismos controladores de la estabilidad de ARNm de varios genes (Teixeira *et al.*, 2003). En este caso, *TcCRT* se encontraría en copia única por cromosoma en todas las cepas del estudio, indicando que sus múltiples funciones y sus variadas ubicaciones subcelulares estarían dadas por un número reducido de isoformas génicas no superior al número de cromosomas en que se localiza el gen, y por su regulación a nivel postranscripcional.

IX. Conclusión

En síntesis, los resultados de esta Memoria de Título ratifican que *TcCRT* se encuentra en varios cromosomas dependiendo de la cepa o clon, encontrándose en 2 cromosomas en la cepa MF y el clon Cl Brener, 3 en el clon Dm28c y 3-4 en las cepas Tulahuén e Y. Por las características de *T. cruzi* estos cromosomas serían homólogos. Los resultados de digestión nos indican que el gen *TcCRT* se encuentra en una sola copia por cada cromosoma. Estos datos concuerdan con la secuencia publicada del genoma para Cl Brener de *T. cruzi*. Nuestros resultados indican que las múltiples funciones y las variadas ubicaciones subcelulares de *TcCRT* estarían dadas por un número reducido de isoformas génicas no superior al número de cromosomas en que se localiza el gen, y por una regulación a nivel postranscripcional.

Los resultados también orientan nuestros esfuerzos en curso a la factibilidad de inactivar (“knoquear”) el gen de TcCRT, con el objetivo de verificar su rol en procesos de infectividad parasitaria, en modelos murinos. Estos esfuerzos (realizados en colaboración con el Laboratorio del Prof. Miguel Basombrío, Universidad Nacional de Salta), parten de la suposición que la ausencia de TcCRT en los parásitos no afectará severamente su viabilidad en cultivos celulares. De ser así, restará definir su infectividad *in vivo*.

X. Bibliografía

- **AGUILLÓN, J. C.; RAMOS, R.; CHABALGOITY, A.; NIETO, A.; MORELLO, A.; REPETTO, Y.; FERREIRA, A.** 1991. Tc45, un antígeno inmunogenéticamente definido de *Trypanosoma cruzi*: Estrategias cromatográficas para su purificación. Parasitol. al Día 15: 79-86.
- **AGUILLÓN, J. C.; BUSTOS, C.; VALLEJOS, P.; HERMOSILLA, T.; MORELLO, A.; REPETTO, Y.; HELLMAN, U.; ORN, A.; FERREIRA, A.** 1995. Purification and preliminary sequencing of Tc45, an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen: absence of homology with cruzipain, cruzain, and a 46-Kilodalton protein. Am. J. Trop. Med. Hyg. 53(2): 211-215.
- **AGUILLÓN, J. C.; HARRIS, R.; MOLINA, M. C.; COLOMBO, A.; CORTES, C.; HERMOSILLA, T.; CARREÑO, P.; ORN, A.; FERREIRA, A.** 1997. Recognition of an immunogenetically selected *Trypanosoma cruzi* antigen by seropositive chagasic human sera. Acta. Trop. 63: 159-166.
- **AGUILLÓN, J. C.; FERREIRA, L.; PEREZ, C.; COLOMBO, A.; MOLINA, M. C.; WALLACE, A.; SOLARI, A.; CARVALLO, P.; GALINDO, M.; GALANTI, N.; ORN, A.; BILLETTA, R.; FERREIRA, A.** 2000. Tc45, a dimorphic *Trypanosoma cruzi* immunogen with variable chromosomal localization, is calreticulin. Am. J. Trop. Med. Hyg. 63(5, 6): 306-312.
- **ASLUND, L.; CARLSSON, L.; HENRIKSSON, J.; RYDAKER, M.; TORO, G.; GALANTI, N.; PETTERSSON, U.** 1994. A gene family encoding heterogeneous histone H1 proteins in *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 65:317-330.
- **ATIAS, A.** 1998. Enfermedad de Chagas *In*: Parasitología Médica. Publicaciones Técnicas Mediterráneo. Santiago, Chile. pp. 251-264.
- **BENCHIMOL, P.** 2006. The oral transmission of Chagas disease: An acute form of infection responsible for regional outbreaks. International Journal of Cardiology. 112: 132-133.
- **BUSTAMANTE, J.; BIXBY, L.; TARLETON, R.** 2008. Drug-induced cure drives conversion to a stable and protective CD8⁺ T central memory response in chronic Chagas disease. Nat. Med. 14 (5): 542-550.

- **CAMPETELLA, O.; HENRIKSSON, J.; ASLUND, L.; FRASCH, A.; PETERSON, U.; CAZZULO, J.** 1991. The major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* is encoded by multiple polymorphic tandemly organized genes located on different chromosomes. *Molec. and Biochem. Parasitol.* 50: 225-234.

- **CHILE. MINISTERIO DE SALUD. DIVISIÓN DE LAS PERSONAS. DEPARTAMENTO DE EPIDEMIOLOGÍA.** 2000. Normas técnicas de vigilancia de enfermedades transmisibles; Enfermedad de Chagas. Santiago, Chile. MINSAL. 144p.

- **CORONADO, X.; ZULANTAY, I.; ALBRECHT, H.; ROZAS, M.; APT, W.; ORTIZ, S.; RODRÍGUEZ, J.; SÁNCHEZ, G.; SOLARI, A.** 2006. Variation in *Trypanosoma cruzi* clonal composition detected in blood patients and xenodiagnosis triatomines: implications in the molecular epidemiology of Chile. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 74(6): 1008-1012.

- **EL-SAYED, N.; MYLER, P.; et al.** 2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas' disease. *Science* 309: 409-415.

- **FERREIRA, V.; VALCK, C.; SÁNCHEZ, G.; GINGRAS, A.; TZIMA, S.; MOLINA, M. C.; SCHWAEBLE, W.; FERREIRA, A.** 2004(a). The classical activation pathway of the human complement system is specifically inhibited by calreticulin from *T. cruzi*. *J. Immunol.* 172: 3042-3050.

- **FERREIRA, V.; MOLINA M. C.; VALCK, C.; ROJAS, A.; AGUILAR, L.; RAMIREZ, G.; SCHWAEBLE, W.; FERREIRA, A.** 2004(b). Role of calreticulin from parasites in its interaction with vertebrate host. *Mol. Immunol.* 40: 1279-1291.

- **FLIEGEL, L.; BURNS, K.; MACLENNAN, D., REITHMEIER, R.; MICHALAK, M.** 1989. Molecular Cloning of the High Affinity Calcium-binding Protein (Calreticulin) of Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum. *J. Biol Chem* 264 (36): 21522-21528.

- **FRANCO-PAREDES, C.; VON, A.; HIDRON, A.; RODRÍGUEZ, A.; TÉLLEZ, I.; BARRAGÁN, I.; JONES, D.; NÁQUIRA, C.; MENDEZ, J.** 2007. Chagas disease: an impediment in achieving the Millennium Development Goals in Latin America. *BMC International Health and Human Rights.* 7 (7).

- **GALINDO, M.; GALANTI, N.; ORTÍZ, S.; SOLARI, A.** 1998. Estudios genéticos en tripanosomátidos mediante electroforesis en gradiente de campo pulsado. *In: Tecnologías aplicadas al diagnóstico e investigación de enfermedades parasitarias.* Ferreira, A; Galanti, N; Lorca, M; Morello, A; Solari, A; Vergara, U. (Eds). U. Chile; Instituto de Ciencias Biomédicas, Fac. Medicina. Santiago, Chile. Pp. 10-14.

- **GARCÍA-SALCEDO, J.; OLIVER, J.; STOCK, R.; GONZALES, A.** 1994. Molecular characterization and transcription of the histone H2B gene from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Microbiol.* 13 (6): 1033-43.

- **HENRIKSSON, J.** 1995. Genomic Variation in American Trypanosomes. Doctoral thesis. Sweden. Uppsala University. Department of Medical Genetics, Biomedical Center. 58 p.

- **HENRIKSSON, J.; ASLUND, L.; PETTERSON, U.** 1996. Karyotype Variability in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Today.* 12: 108-114.

- **JARAMILLO, N.** 1993. Acetilación cotraduccional y postraduccional en histonas extraídas de la cromatina de *Trypanosoma cruzi*. Tesis Magíster en Ciencias. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Fac. Medicina. 97p.

- **J. CRAIG VENTER INSTITUTE. THE INSTITUTE FOR GENOMIC RESEARCH.** 2006. The *Trypanosoma cruzi* Genome Project. [en línea]. <http://www.tigr.org/tdb/e2k1/tca1> [consulta: 08-10-2008].

- **J. CRAIG VENTER INSTITUTE. THE INSTITUTE FOR GENOMIC RESEARCH.** 2006. The *Trypanosoma brucei* Genome Project. [en línea]. <http://www.tigr.org/tdb/e2k1/tba1> [consulta: 08-10-2008].

- **KIERSZEMBAUM F.** 2005. Where do we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease? autoimmunity hypothesis of Chagas disease? *Trends. Parasitol.* 21: 513-516.

- **LABRIOLA, C.; CAZZULO, J. J.; PARODI, A. J.** 1999. *Trypanosoma cruzi* Calreticulin is a lectin that binds monoglucosylated oligosaccharides but not protein moieties of glycoproteins. *Mol. Biol. Cell.* 10: 1381-1394.

- **LÓPEZ, N.** 2008. Mecanismos Antiangiogénicos de Calreticulina de *Trypanosoma cruzi*. Tesis Doctorado en Química. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Fac. Medicina. 107 p.

- **MAGUIRE, J.** 2006. Chagas' Disease-Can Stop the Deaths? N. Engl. J. Med. 355(8): 760-61.

- **MALHOTRA, R.; THIEL, S.; REID, K. B.; SIM, R. B.** 1990. Human leukocyte C1q receptor binds other soluble proteins with collagen domains. J. Exp. Med. 172(3):955-9.

- **MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROOK, J.** 1982. Analysis of Recombinant DNA Clones. *In: Molecular Cloning a Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. P. 382-386.

- **MARCELAIN, K.; COLOMBO, A.; MOLINA, M. C.; FERREIRA, L.; LORCA, M.; AGUILLÓN, J. C.; FERREIRA, A.** 2000. Development of an immunoenzymatic assay for the detection of human antibodies against *Trypanosoma cruzi* calreticulin, an immunodominant antigen. Acta Trop. 75: 291-300.

- **MICHALAK, M.; CORBETT, E. F.; MESAELI, N.; NAKAMURA, K.; OPAS, M.** 1999. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. Biochem. J. 344: 281-292.

- **MOLINA, M.; FERREIRA, V.; VALCK, C.; AGUILAR, L.; ORELLANA, J.; ROJAS, A.; RAMIREZ, G.; BILLETTA, R.; SCHWAEBLE, W.; LEMUS, D.; FERREIRA, A.** 2005. An in vivo role for *Trypanosoma cruzi* calreticulin in antiangiogenesis. Mol. Biochem. Parasitol. 140 133–140.

- **NAKHASI, H. L.; POGUE, G. P.; DUNCAN, R. C.; JOSHI, M.; ATREYA, C. D.; LEE, N. S.; DWYER, D. M.** 1998. Implications of Calreticulin function in parasite biology. Parasitol. Today. 14 (4): 157-160.

- **ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD.** 2003. Informe Final: XIIa Reunión de la Comisión Intergubernamental del Cono Sur para la Eliminación de *Triatoma infestans* y la Interrupción de la Transmisión Transfusional de la Tripanosomiasis Americana (INCOSUR/Chagas). [en línea].

<<http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/dch-incosur-xii-inf-final.htm>>
[consulta: 07-03-2008].

- **OSTWALD, T.; MACLENNAN, D.** 1974. Isolation of a High Affinity Calcium-binding Protein for Sarcoplasmic Reticulum. *J. Biol. Chem.* 249: 974-979.

- **PERSSON, S.; ROSENQUIST, M.; SOMMARIN, M.** 2002. Identification of a novel calreticulin isoform (Crt2) in human and mouse. *Gene* 294: 151-158.

- **PIKE, S.; YAO, J.; JONES, K.; CHERNEY, B.; APELLA, E.; SAKAGUCHI, N.; NAKHASI H.; TERUYA-FELDSTEIN J.; WIRTH P.; GUPTA G.; TOSATO, G.** 1998. Vasostatin, a calreticulin fragment, inhibits angiogenesis and suppresses tumor grow. *J. Exp. Med.* 188, 2349-2356.

- **PORCILE, P.; SANTOS, M.; SOUZA, R.; VERBISCK, N.; BRANDAO, A.; URMENYI, T.; SILVA, R.; RONDINELLI, E.; LORENZI, H.; LEVIN, M.; DEGRAVE, W.; DA SILVEIRA J.** 2003. A refined molecular karyotype for the reference strain of the *Trypanosoma cruzi* genome proyect (clone Cl Brener) by assingment of chromosome markers. *Gene* 308: 53-65.

- **RAMOS, R.; JURI, M. A.; RAMOS, A.; HOECKER, G.; LAVANDERO, S.; PENA, P.; MORELLO, A.; REPETTO, Y.; AGUILLÓN, J. C.; FERREIRA, A.** 1991. An immunogenetically defined and immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44: 314-322.

- **REQUENA, J.; LÓPEZ, M.; JIMENEZ-RUIZ, A.; DE LA TORRE, J.; ALONSO, C.** 1988. A head-to-tail tandem organization of hsp70 gene in *Trypanosoma cruzi*. *Nuc. Acids. Res.* 16: 1393-1406.

- **RIBEIRO, C.; LÓPEZ, N.; RAMIREZ, G.; VALCK, C.; MOLINA, M.; AGUILAR, L.; RODRIGUEZ, M.; MALDONADO, I.; MARTINEZ, R.; GONZALEZ, C.; TRONCOSO, R.; LAVANDERO, S.; WINGRAS, A.; SCHWAEBLE, W.; FERREIRA, A.** 2008. Does *Trypanosoma cruzi* calreticulin have a role in Chagas' disease autoimmunity? *Mol. Immunol.* In press.

- **ROJAS, M.; PINHO, A.; CUERVO, P.; ALFARO, F.; SOLANO, M.; XAVIER, S.; D'ANDREA, P.; FERNÁNDEZ, O.; TORRICO, F.; NOIREAU, F.; JANSEN, A.** 2006. *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida Trypanosomatidae): Ecology

of the transmission cycle in the wild environment of the Andean valley of Cochabamba, Bolivia. *Experimental Parasitology* 114: 305-313.

- **ROMANHA, A. J.; ALES, R. O.; MURTUA, S. M. F.; SILVA, J. S.; ROPERT, C.; GAZZINELLI, R. T.** 2002. Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection: essential role of endogenous interferon in mediating parasitologic cure. *J. Infect. Dis.* 186: 823-828.

- **ROZAS, M.; BOTTO-MAHAN, C.; CORONADO, X.; ORTIZ, S.; CATTAN, P.; SOLARI, A.** 2005. Short report: *Trypanosoma cruzi* infection in wild mammals from a chagasic area of Chile. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73(3): 517-519.

- **SCHMUNIS, G.** 2007. Epidemiology of Chagas disease in non endemic countries: the role of international migration. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102: 75-85.

- **SMITH, M.; KOCH, G.** 1989. Multiple zones in the sequence of calreticulin (CRP55, calregulin, HACBP), a major calcium binding ER/SR protein. *EMBO J.* 8 (12): 3581-3586.

- **SOUTO-PADRÓN, T.; LABRIOLA, C.; DE SOUZA, W.** 2004. Immunocytochemical localisation of calreticulin in *Trypanosoma cruzi*. *Histochem. Cell. Biol.* 122: 563-569.

- **TAYLOR, M.; KELLY, J.** 2003. Functional dissection of the *Trypanosoma cruzi* genome: New approaches in a new era. *In: World Class Parasites: Volume 7 American Trypanosomiasis.* Tyler, K.; Miles, M. (Eds). Pp. 57-60.

- **TEIXEIRA, S.; DA ROCHA, W.** 2003. Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae. *Genet. Mol. Res.* 2 (1): 148-158.

- **TYLER, K.; OLSON, C.; ENGMAN, D.** 2003. The Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*. *In: Tyler, K; Miles, M. (Eds). World Class Parasites: Volume 7 American Trypanosomiasis* Pp. 3-9.

- **TOLEDO, V.** 2008. Calreticulina de *Trypanosoma cruzi* y de *Homo sapiens sapiens*. Estudio comparativo de sus propiedades antiangiogénicas. Tesis Magister Ciencias

Biológicas, mención Fisiopatología. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Fac. de Medicina. 46 p.

- **URBINA, J.; DOCAMPO, R.** 2003. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. Trends Parasitol. 19(11): 495-501.

XI. Anexo

Los experimentos con la enzima BsrG1, se muestran en las Figuras 1 a 5, apreciándose en los geles (Figuras 1-5 A) una nula o mala digestión del ADN en las cepas del estudio, bajo las condiciones de incubación propuestas (4°C, 10 U/ug ADN, incubación 0 a 24 hrs.), la flecha roja indica ADN de alto peso molecular no digerido. Como era esperado, en las membranas respectivas (Figuras 1-5 B) no se visualizan señales de hibridación correspondientes a *TcCRT*, solo se observan señales correspondientes a ADN no digerido (flecha roja). En la Figura 3B, se observa hibridación inespecífica de ^{32}P -*C-TcCRT* en la cepa MF (flecha púrpura).

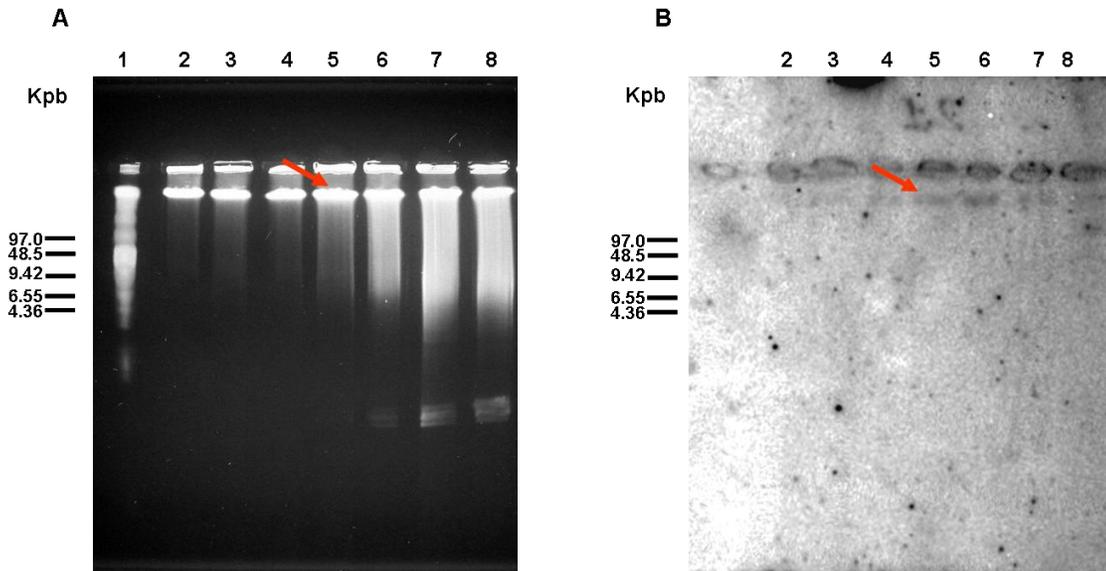


Figura 1. Incubación a 4°C por 24 hrs. con BsrG1 no promueve la digestión de ADN, en el clon CI Brener. ADN de *T. cruzi* clon CI Brener (10 µg) fue incubado por 0, 15 y 30 minutos, 1, 6, 12 y 24 hrs. con enzima BsrG1 (10 U/µg ADN), carriles 2 a 8 respectivamente. Los fragmentos de ADN fueron separados mediante PFGE, con pulsos de 1 a 12 seg. por 5 hrs. Los carriles 2-8, en las Figuras A y B corresponden a un gel, detectado primero con BrEt y a su réplica en membrana de nylon, detectada con ^{32}P -*C-TcCRT*, respectivamente. La flecha roja indica ADN no digerido. Carril 1: marcador de ADN “Low Range PFGE Marker”.

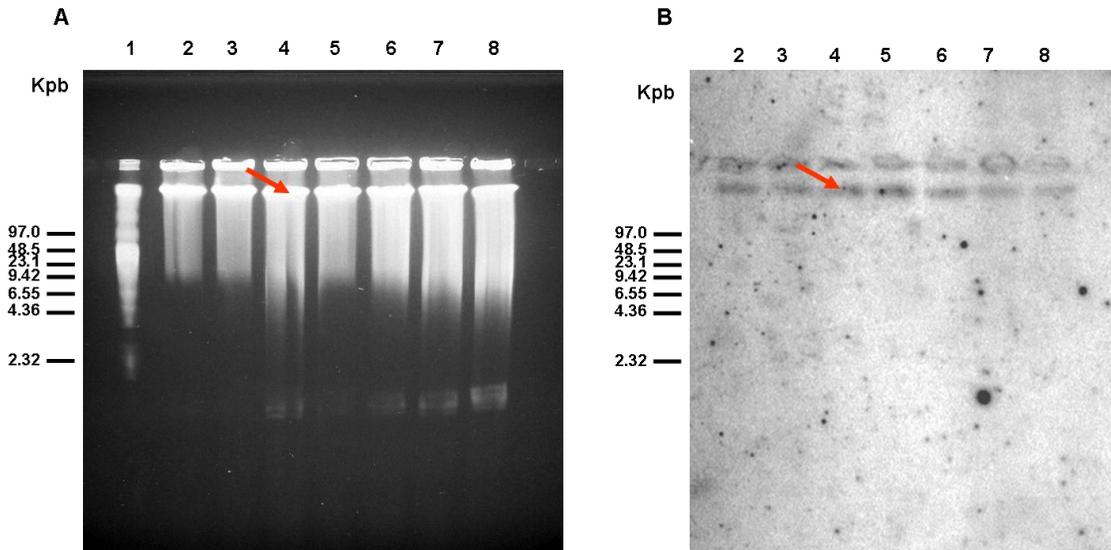


Figura 2. Incubación a 4°C por 24 hrs. con BsrG1 no promueve la digestión de ADN, en el clon Dm28c. ADN de *T. cruzi* clon Dm28c (10 µg) fue incubado por 0, 15 y 30 minutos, 1, 6, 12 y 24 hrs. con enzima BsrG1 (10 U/µg ADN), carriles 2 a 8 respectivamente. Los fragmentos de ADN fueron separados mediante PFGE, con pulsos de 1 a 12 seg. por 5 hrs. Los carriles 2-8, en las Figuras A y B corresponden a un gel, detectado primero con BrEt y a su réplica en membrana de nylon, detectada con ³²P-C-TcCRT, respectivamente. La flecha roja indica ADN no digerido. Carril 1: marcador de ADN “Low Range PFGE Marker”.

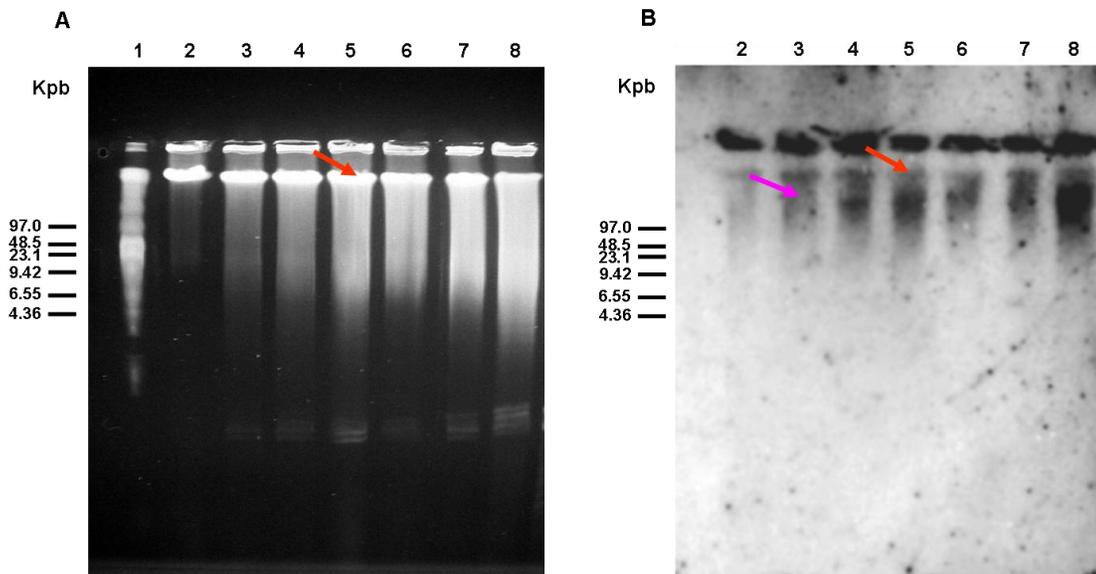


Figura 3. Incubación a 4°C por 24 hrs. con BsrG1 no promueve la digestión de ADN, en la cepa MF. ADN de *T. cruzi* cepa MF (10 µg) fue incubado por 0, 15 y 30 minutos, 1, 6, 12 y 24 hrs. con enzima BsrG1 (10 U/µg ADN), carriles 2 a 8 respectivamente. Los fragmentos de ADN fueron separados mediante PFGE, con pulsos de 1 a 12 seg. por 5 hrs. Los carriles 2-8, en las Figuras A y B corresponden a un gel, detectado primero con BrEt y a su réplica en membrana de nylon, detectada con ^{32}P -C-TcCRT, respectivamente. La flecha roja indica ADN no digerido, flecha púrpura indica hibridación inespecífica. Carril 1: marcador de ADN "Low Range PFGE Marker".

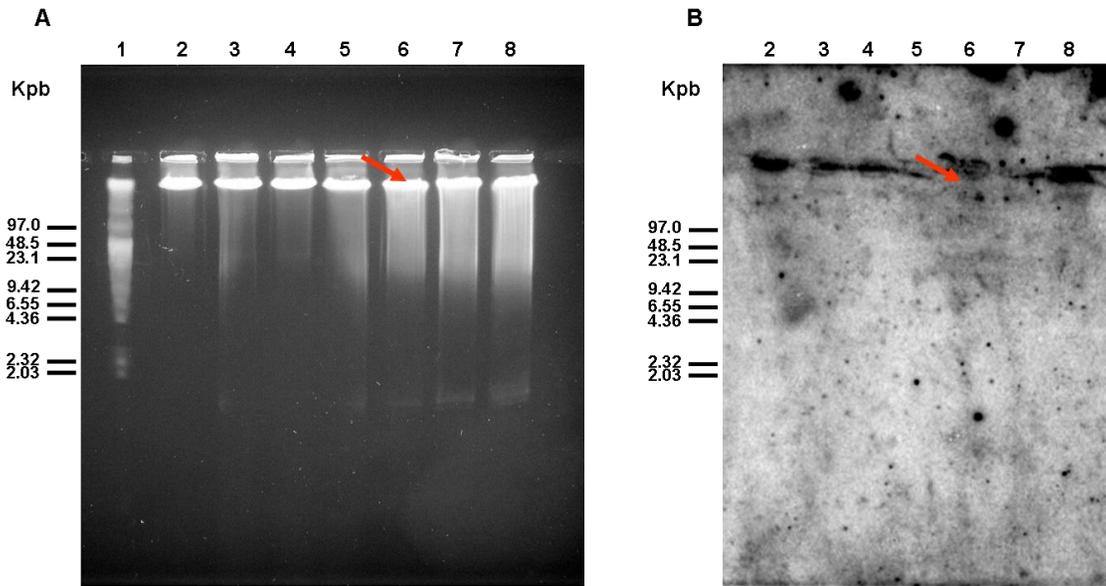


Figura 4. Incubación a 4°C por 24 hrs. con BsrG1 no promueve la digestión de ADN, en la cepa Y. ADN de *T. cruzi* cepa Y (10 µg) fue incubado por 0, 15 y 30 minutos, 1, 6, 12 y 24 hrs. con enzima BsrG1 (10 U/µg ADN), carriles 2 a 8 respectivamente. Los fragmentos de ADN fueron separados mediante PFGE, con pulsos de 1 a 12 seg. por 5 hrs. Los carriles 2-8, en las Figuras A y B corresponden a un gel, detectado primero con BrEt y a su réplica en membrana de nylon, detectada con ^{32}P -C-TcCRT, respectivamente. La flecha roja indica ADN no digerido. Carril 1: marcador de ADN “Low Range PFGE Marker”.

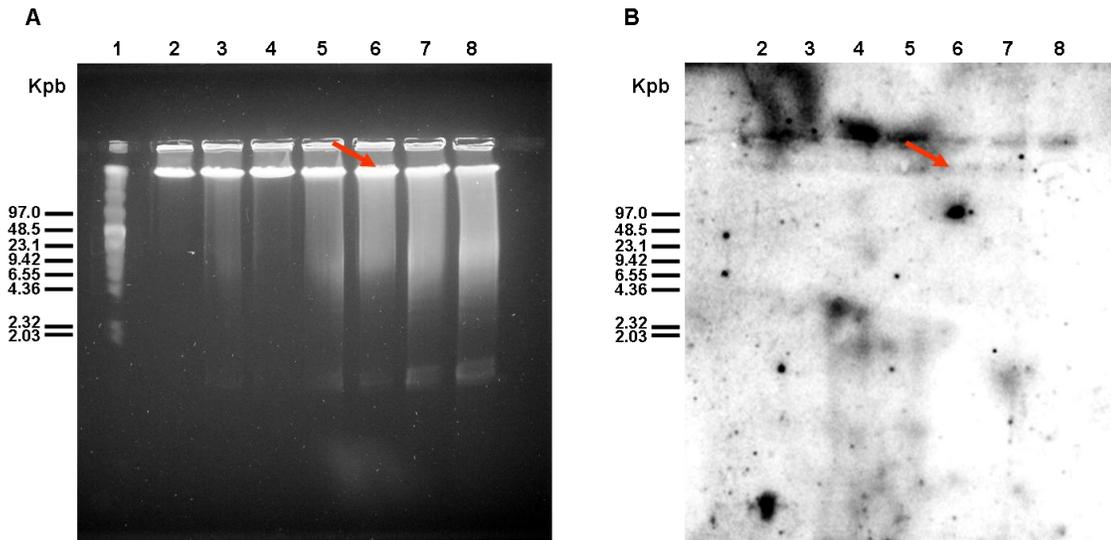


Figura 5. Incubación a 4°C por 24 hrs. con BsrG1 no promueve la digestión de ADN, en la cepa Tulahuén. ADN de *T. cruzi* cepa Tulahuén (10 µg) fue incubado por 0, 15 y 30 minutos, 1, 6, 12 y 24 hrs. con enzima BsrG1 (10 U/µg ADN), carriles 2 a 8 respectivamente. Los fragmentos de ADN fueron separados mediante PFGE, con pulsos de 1 a 12 seg. por 5 hrs. Los carriles 2-8, en las Figuras A y B corresponden a un gel, detectado primero con BrEt y a su réplica en membrana de nylon, detectada con ^{32}P -C-TcCRT, respectivamente. La flecha roja indica ADN no digerido. Carril 1: marcador de ADN “Low Range PFGE Marker”.