



Clonado y expresión de la enzima fumarato reductasa dependiente de NADH de *Trypanosoma cruzi*

María Florencia Mosquillo

Orientador: Dra. Leticia Pérez Díaz

Co-orientador: M. Sc. Lucía Pastro

Tesina de grado

Licenciatura en Bioquímica

Laboratorio de Interacciones Moleculares

Facultad de Ciencias - Universidad de la República

Febrero 2015

*"Nuestra recompensa se encuentra
en el esfuerzo y no en el resultado.
un esfuerzo total es una victoria completa"*

Mahatma Gandhi

Agradezco a toda mi familia, en especial a mis padres, por su amor y apoyo en cada momento y en cada decisión, especialmente por alentarme cuando decidí comenzar esta desafiante carrera. A Juan, mi compañero de todas las horas, por su amor incondicional y su palabra justa.

A mis amigos Lune, Caro y Feli, por estar en cada momento, por todas las charlas, consejos y aventuras.

A Mari, Maí, Cami y Piria por las tardes de estudio más divertidas, sin dudas hicieron este recorrido más ameno.

A todo el LIM. A Bea y a Leti por la oportunidad y por confiar en mí para este proyecto. Un especial gracias a Leti, por todo lo que me ha enseñado y todo lo que hizo para aprovechar cada oportunidad de crecimiento que se presentaba. A Lu, por hacerse cargo de mí, y por su guía certera. A Lore, por su ayuda y respuestas a todas mis preguntas. A Pablo, María Ana, Rafa, Chaveta, Santi y Caro, por todos sus consejos y buena onda de siempre, es un gusto trabajar con ustedes.

A todos los que formaron parte de este camino, ¡GRACIAS!

Índice

1. Abreviaturas	7
2. Resumen	8
3. Introducción y antecedentes	10
3.1 Introducción	10
3.1.1 Características de la enfermedad de Chagas	10
3.1.2 Epidemiología	11
3.1.3 Estado actual del tratamiento	14
3.1.4 Generalidades de <i>T. cruzi</i>	15
3.1.5 Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	17
3.1.6 Biología molecular de <i>T. cruzi</i>	20
3.1.7 Metabolismo energético de <i>T. cruzi</i>	22
3.1.8 Fumarato reductasa dependiente de NADH	24
3.2 Antecedentes	27
4. Hipótesis y objetivos	29
4.1 Hipótesis	29
4.2 Objetivo general	29
4.3 Objetivos específicos	29
5. Materiales y métodos	30
5.1 Soluciones y tampones	30
5.2 Medios de cultivo	31
5.3 Cepas, vectores y secuencias	31
5.3.1 Cepas	31
5.3.2 Vector de clonado	32
5.3.3 Vectores de expresión	33
5.3.4 Secuencias y análisis informático	35
5.4 Clonado de las secuencias codificantes de FRD	36
5.4.1 Diseño de oligonucleótidos cebadores	36
5.4.2 Extracción de ADN genómico de <i>T. cruzi</i>	36
5.4.3 Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	37
5.4.4 Electroforesis en geles de agarosa	38
5.4.5 Purificación de ADN a partir de geles de agarosa	39

5.4.6 Cuantificación de ADN.....	39
5.4.7 Clonado en vector-T y selección de transformantes.....	39
5.4.8 Clonado en vectores de expresión	40
5.4.9 Preparación de células competentes	42
5.4.10 Transformación de bacterias <i>E. coli</i>	42
5.4.11 Purificación de ADN plasmídico de bacterias.....	42
5.4.12 Secuenciación.....	43
5.5 Análisis de proteínas	43
5.5.1 Expresión de proteínas recombinantes en bacterias.....	43
5.5.2 Obtención de extractos proteicos de <i>E. coli</i>	44
5.5.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	44
5.5.4 Western blot.....	45
5.5.5 Purificación por cromatografía de afinidad.....	46
5.5.6 Cuantificación de proteínas.....	46
6. Resultados y discusión	47
6.1 Obtención de los marcos abiertos de lectura de las isoformas de FRD.....	47
6.2 Amplificación y clonado de las secuencias FRD	51
6.3 Expresión de FRD2 recombinante	58
6.4 Purificación por cromatografía de afinidad.....	62
7. Conclusiones y perspectivas.....	64
7.1 Conclusiones.....	64
7.2 Perspectivas.....	65
8. Referencias bibliográficas	66
9. Anexo.....	72
9.1 Secuencia de la isoforma FRD2	72
9.2 Secuencia de la isoforma FRDm1	72
9.3 Secuencia de la isoforma FRDg	73
9.4 Predicción de señal de localización mitocondrial	75
9.5 Secuenciación del vector pCR2.1-TOPO con la isoforma FRD2.....	76
9.6 Secuenciación del vector PGEX4T1 con la isoforma FRD2	80

1. Abreviaturas

°C	Grado Celsius
µm	Micrómetro
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AEBSF	4-(2-aminoetil)-benceno sulfonilo clorhidrato
APS	Persulfato de amonio
BLAST	del inglés <i>Basic Local Alignment and Search Tool</i>
BSA	Albúmina de suero bovino
Bz	Benznidazol
C-terminal	Carboxilo terminal
Da	Dalton
DTT	Ditiotreitol
dNTP	Desoxinucleósido -5' - trifosfato
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilén-diamino-tetracético
g	Aceleración de la gravedad terrestre
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactósido
Kb	Kilobases
kDa	kilodalton
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
mA	Miliamperio
N-terminal	Amino terminal
NADH	Nicotín adenín dinucleótido reducido
Nfx	Nifurtimox
nm	Nanómetro
ORF	Marco abierto de lectura (<i>Open Reading Frame</i>)
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida (<i>Poly Acrylamide Gel Electrophoresis</i>)
pb	Pares de bases
PBS	Tampón salino de fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
p/v	Relación peso a volumen
RNAsaA	Ribonucleasa A
SDS	Dodecil sulfato sódico
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil etilendiamina
V	Voltios
v/v	Relación volumen a volumen
TAE	Tris-acetato-EDTA
Tm	Temperatura de fusión

2. Resumen

La enfermedad de Chagas es una zoonosis potencialmente letal que afecta principalmente a la población rural y marginal de Latinoamérica. Su agente etiológico es el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*, un organismo unicelular digenético que se transmite al hospedero mamífero, en el que se desarrolla la patología, a través de insectos triatomíneos hematófagos que funcionan como vectores. No existen vacunas disponibles ni una farmacoterapia adecuada para el tratamiento de esta enfermedad que ha sido clasificada según la Organización Mundial de la Salud, dentro del grupo de enfermedades “descuidadas” debido a la baja inversión histórica por parte de la industria farmacéutica. Probablemente esto se deba al bajo nivel económico de los pacientes aquejados, lo que lleva a avizorar un bajo retorno de cualquier inversión al respecto. En consecuencia, los esfuerzos para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de esta enfermedad provienen principalmente del ámbito académico. Los tratamientos actuales se basan en dos fármacos desarrollados hace décadas y de amplio espectro, Benznidazol y Nifurtimox, con severos efectos secundarios por su alta toxicidad. La enzima fumarato reductasa NADH dependiente (FRD) resulta de gran interés como blanco terapéutico para el diseño de fármacos antichagásicos por catalizar un importante paso metabólico de *T. cruzi* y no estar presente en las células del mamífero hospedero. En este contexto, el grupo de la Dra. Gambino ha sintetizado complejos de paladio y platino que afectan la actividad FRD en extractos crudos de *T. cruzi*. La búsqueda en la base de datos TriTrypDB ha revelado la presencia de tres isoformas de FRD en *T. cruzi*. El objetivo de este trabajo consistió en la amplificación por PCR del marco abierto de lectura de una isoforma de la proteína FRD, el cual fue clonado en vector-T y en vectores de expresión bacterianos para su expresión en *Escherichia coli*. La proteína recombinante fue expresada de forma soluble y purificada por cromatografía de afinidad.

El trabajo aquí desarrollado ha dado lugar a las siguientes financiaciones y presentaciones:

Mosquillo, Florencia; Bentancor, Marcel; Pérez-Díaz, Leticia. **Generación de una herramienta para producción en bacterias de la enzima fumarato reductasa de *T. cruzi* para ser evaluada como blanco de drogas antichagásicas.** Programa de Apoyo a la Investigación Estudiantil (PAIE - CSIC). Edición 2013. Montevideo, Uruguay. Responsable: Florencia Mosquillo. Orientador: Leticia Pérez. Co-orientador: Marcel Bentancor.

Mosquillo, Florencia; Gambino, Dinorah; Pérez-Díaz, Leticia. **Expresión de fumarato reductasa de *Trypanosoma cruzi* para ser evaluada como blanco de agentes antichagásicos.** Beca de Iniciación en la Investigación - Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII). Edición 2013. Responsable: Florencia Mosquillo. Orientador: Leticia Pérez. Co-orientador: Dinorah Gambino.

Mosquillo, Florencia; Bentancor, Marcel; Garat, Beatriz; Gambino, Dinorah; Pastro, Lucía; Pérez-Díaz, Leticia. **Expresión de fumarato reductasa de *Trypanosoma cruzi* como posible blanco de agentes antichagásicos.** XV Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias. Setiembre, 2014. Piriápolis, Uruguay. Presentación de póster a cargo de Florencia Mosquillo.

Mosquillo, Florencia. **Expresión de la enzima fumarato reductasa de *Trypanosoma cruzi* como posible blanco de agentes antichagásicos.** Jornada conmemoración de los 15 años del Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, UdelaR. Noviembre, 2014. Montevideo, Uruguay. Presentación oral y de póster a cargo de Florencia Mosquillo.

3. Introducción y antecedentes

3.1 Introducción

3.1.1 Características de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas, también conocida como tripanosomiasis americana es una zoonosis descubierta por el doctor brasilero Carlos Ribeiro Justiniano Chagas en 1909 (Chagas, 1909). Es una enfermedad potencialmente letal causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), la cual tiene dos fases clínicas claramente diferenciadas. Una fase aguda que presenta una duración de 4 a 8 semanas, y una fase crónica que persiste durante la vida del afectado (WHO, 2014b). Una vez contraída la infección, dependiendo del sitio de la inoculación, el primer signo puede ser un chancro cutáneo (chagoma) o edema orbital púrpura unilateral (signo de Romaña) con linfadenopatías locales y fiebre. Durante la fase aguda se encuentran parásitos circulantes en sangre y se caracteriza por una sintomatología de intensidad y duración variables, entre las que se destacan dolores de cabeza, mialgias, disnea, edema en las extremidades inferiores o en la cara, dolor abdominal y/o torácico, hepatomegalia, erupción cutánea, nódulos dolorosos, esplenomegalia, edema generalizado, diarrea, múltiples linfadenopatías, miocarditis y más raramente meningoencefalitis. La muerte se produce ocasionalmente en la fase aguda (<5–10% de los casos sintomáticos) como resultado de la miocarditis o meningoencefalitis severa, o ambos, particularmente en niños, ancianos y pacientes inmunodeprimidos. Las manifestaciones de la enfermedad aguda se resuelven espontáneamente en alrededor del 90% de los individuos infectados, incluso si la infección no se trata con fármacos tripanocidas. Entre el 60-70% de estos pacientes nunca desarrollará la enfermedad clínicamente aparente; estos pacientes tienen la forma indeterminada de la enfermedad de Chagas crónica. El 30-40% restante de los pacientes posteriormente desarrolla una determinada forma de enfermedad crónica, por lo general de 10 a 30 años después de la infección inicial. En un 5–10% de los pacientes se ha registrado una progresión directa de la fase aguda a una forma clínica de la enfermedad (Rassi Jr, 2010). Durante la fase aguda, todos los tipos de células nucleadas en el huésped humano son objetivos potenciales para la infección. Con el desarrollo de la respuesta inmune, la parasitemia se reduce a bajas concentraciones y el número de parásitos en los tejidos disminuye sustancialmente, lo que indica el final de la fase aguda. Sin embargo, ya que el

parásito no se elimina completamente, la infección de tejidos específicos, tales como el músculo o ganglios entéricos, persiste indefinidamente para la vida del huésped (Rassi Jr, 2010). Precisamente, durante la fase crónica, los parásitos permanecen principalmente en células del músculo cardíaco y tracto digestivo y hay pocos parásitos en sangre. Hasta un 30% de los pacientes sufren trastornos cardíacos y hasta un 10% presentan alteraciones digestivas (típicamente, megaesófago y megacolon), neurológicas o mixtas. Con el paso de los años, la infección puede causar muerte súbita o insuficiencia cardíaca por la destrucción progresiva del músculo cardíaco (WHO, 2014a).

3.1.2 Epidemiología

Datos de la Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization*, WHO) estiman que entre 7 y 8 millones de personas en el mundo están afectadas por esta enfermedad potencialmente letal, con prevalencia en las regiones más pobres de América Latina, donde la enfermedad es endémica en 21 países (WHO, 2014a). De este gran número de personas afectadas, hay en promedio 12000 muertes anuales por complicaciones en las fases aguda y crónica de la enfermedad. De esta manera provoca más muertes por año que cualquier otra enfermedad transmitida por parásitos incluyendo la malaria (Moloney, 2009). Se estima que casi 100 millones de personas en las Américas viven en áreas de exposición y están en riesgo de contraer la enfermedad; la incidencia anual es de 56000 casos (PAHO, 2014).

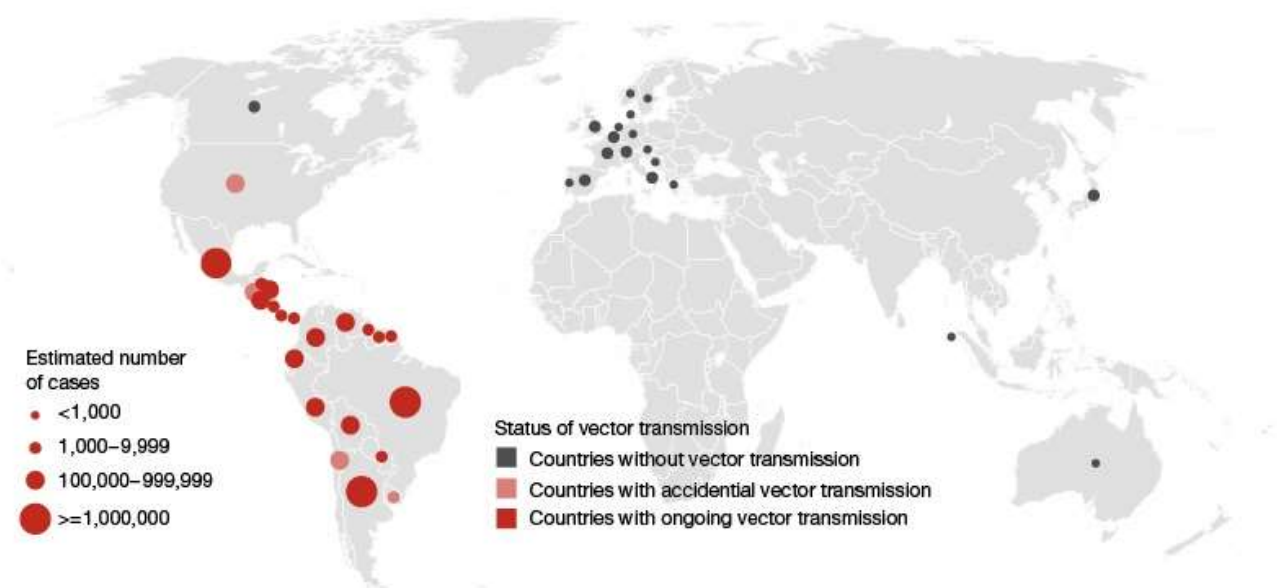


Figura 1. Distribución mundial de casos de infección con *Trypanosoma cruzi*, basados en estimados oficiales y el estatus de la transmisión vectorial. En rojo se muestran los 21 países endémicos de Latinoamérica. En gris los países donde la enfermedad de Chagas se disemina debido a las altas tasas migratorias hacia zonas no endémicas. Adaptado de (WHO, 2010b).

La infección, que en principio se limitaba a zonas rurales y marginales de Latinoamérica, no sólo pasó a ser urbana, sino que ya no está limitada a las zonas donde la transmisión es endémica. Debido a las altas tasas migratorias desde estas zonas hacia zonas no endémicas, el número de casos está aumentando en Europa, Estados Unidos y el oeste del Pacífico, planteando un problema de salud pública, incluso en países donde no hay transmisión vectorial del parásito (Figura 1). Este incremento se debe mayoritariamente a los riesgos adicionales de transmisión de la enfermedad a través de transfusiones sanguíneas y trasplante de órganos (Bern, 2011; Cantey, 2012).

Con el objetivo de disminuir la transmisión vectorial y transfusional, en el año 1991, la Organización Mundial de la Salud lideró un plan para eliminar el vector de la enfermedad de Chagas en áreas endémicas. Estas acciones de control permitieron que Uruguay se encuentre actualmente en un estado avanzado de control vectorial, con interrupción de la transmisión, certificada desde 1997 (OPS, 2002).

La enfermedad de Chagas es transmitida a seres humanos y más de 150 especies de animales domésticos y mamíferos silvestres por medio de insectos hematófagos de la subfamilia Triatominae conocidos como “vinchucas”, que funcionan como vectores (De Souza, 2002). Aunque se han identificado 140 especies de triatomíneos (Schofield, 2009), sólo unos pocos son vectores competentes para *T. cruzi*; particularmente *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, y *Triatoma dimidiata* son los vectores más importantes en la transmisión de *T. cruzi* al hombre (WHO, 2002) (Figura 2). Cada región posee un vector principal de la enfermedad: en el Cono Sur es *Triatoma infestans*, en Centroamérica *Rhodnius prolixus*, mientras que *Triatoma dimidiata* se encuentra diseminado desde el centro de México hasta Panamá, registrándose también focos en partes de Colombia, Venezuela, Ecuador y el norte de Perú (Cerecetto, 2012).

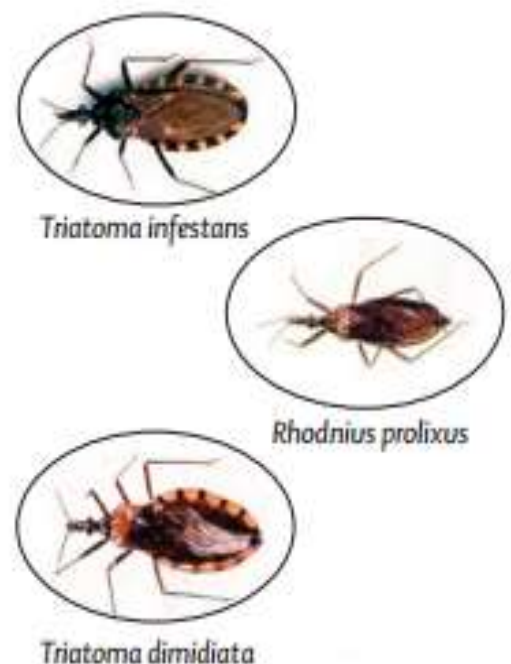


Figura 2. Principales especies de triatomíneos vectores en la transmisión de *T. cruzi* al hombre. Extraído de (Rassi Jr, 2010).

A causa del gran número de animales silvestres que sirven de reservorio a este parásito, no resulta fácil la erradicación total de la enfermedad. Las principales políticas de control consisten en eliminar la transmisión vectorial y lograr que la población infectada y enferma tenga acceso a la asistencia sanitaria. Dependiendo de la región, las herramientas principales para prevenir la enfermedad en América Latina son el control de vectores mediante fumigación con insecticidas, mejoramiento de la vivienda (por ejemplo, paredes de yeso, pisos de cemento, techos de hierro corrugado) y medidas preventivas personales, como el uso de mosquiteros. La transmisión con el vector se da principalmente por contacto con las heces infectadas de estos insectos con mucosas o una lesión. El insecto vector se alimenta con sangre del hospedero dejando una herida en la piel y defecando cerca de la herida. Los parásitos penetran en el organismo cuando la persona se frota instintivamente y empuja las heces contaminadas con parásitos hacia los ojos, la boca o alguna lesión cutánea abierta. Además de este mecanismo natural de transmisión, la infección puede ser congénita (de madre a hijo durante el embarazo o el parto), por transfusión sanguínea, trasplante de órganos, transmisión accidental en laboratorios, e incluso por transmisión oral por contaminación de la ingesta con heces del vector (Alarcon de Noya, 2010; Otero, 2012; Shikanai-Yasuda, 2012). El cribado de la sangre donada es necesario para prevenir la infección por transfusiones sanguíneas y donación de órganos. Las tasas de contaminación en los bancos de sangre de algunas ciudades del continente americano varían del 3% hasta casi el 53%, indicando que la prevalencia de sangre contaminada por *T. cruzi* puede exceder la prevalencia de los virus VIH y Hepatitis B y C en los stocks de bancos de sangre (WHO, 2010a). En cuanto a la transmisión congénita la prevención se da mediante un diagnóstico de las mujeres embarazadas infectadas y la detección de la posible infección del recién nacido en los análisis parasitológicos y serológicos después de ocho meses de edad (con ausencia de anticuerpos de la madre). En laboratorios pueden prevenirse accidentes a través de protocolos estándar de seguridad (bata de laboratorio, guantes, mascarilla, gorro, lentes), especialmente cuando se trata de la forma infectiva en humanos del parásito. Por su parte, puede prevenirse la transmisión oral mediante buenas prácticas de higiene en la preparación de alimentos, el transporte, almacenamiento y consumo.

3.1.3 Estado actual del tratamiento

La enfermedad de Chagas ha sido clasificada como una de las 17 enfermedades tropicales “descuidadas” (*neglected tropical disease*) (WHO, 2014b), caracterizada por su asociación con la pobreza y su proliferación en ambientes tropicales, además de la falta de una vacuna disponible y una farmacoterapia adecuada. Es así que a más de 100 años del descubrimiento de la enfermedad, los tratamientos disponibles aún se basan en dos drogas nitroaromáticas de amplio espectro: Nifurtimox y Benznidazol (Figura 3).

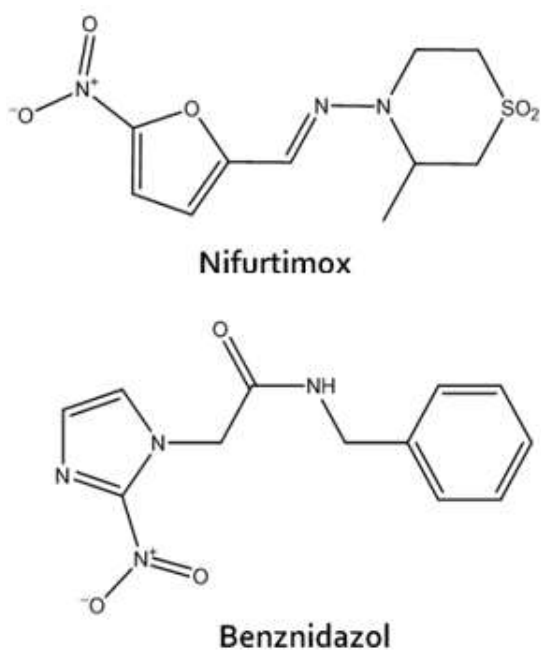


Figura 3. Estructura química de los dos fármacos disponibles para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

Nifurtimox (Nfx) es un 5-nitrofurano (3-metil-4-(5'-nitrofurfurilidenamina)tetrahydro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido) (Lampit[®], Bayer), mientras que Benznidazol (Bz) es un 2-nitroimidazol (N-bencil-2-nitroimidazolacetamida) (Rochagan[®], Radanil[®], Roche) (Rodrigues Coura, 2002). Se ha propuesto que Nfx podría inhibir la enzima tripanotona reductasa, que cataliza la eliminación de especies reactivas del oxígeno en *T. cruzi*, sin embargo aún hoy en día no existe consenso sobre el mecanismo de acción exacto por el que ejerce su efecto tóxico sobre el parásito (Boiani, 2010; Hall, 2011). La acción del Bz podría involucrar la formación de enlaces covalentes u otras interacciones de intermediarios de la nitrorreducción con los componentes del parásito (Polak, 1978), o uniones con el ADN, lípidos o proteínas (Diaz de Toranzo, 1988).

Estas drogas son básicamente efectivas sólo en los comienzos de la fase aguda, ya que son consideradas menos efectivas en pacientes crónicos por la resistencia desarrollada por parte del parásito (Nozaki, 1996). Los beneficios potenciales de la medicación para prevenir o retrasar el desarrollo de la enfermedad de Chagas deben sopesarse frente a la larga duración del tratamiento (hasta dos meses) y las posibles reacciones adversas (incidencia de hasta el 40% de los pacientes tratados). Tanto Bz como Nfx no pueden ser administrados a mujeres embarazadas

o personas con insuficiencia renal o hepática. El Nfx también está contraindicado en personas con antecedentes de trastornos neurológicos o psiquiátricos (WHO, 2014a). Además, se puede requerir un tratamiento específico para las manifestaciones cardíacas o digestivas. Adicionalmente, presentan severos efectos secundarios asociados con Bz y Nfx por su alta toxicidad, entre los que se destacan para Nfx la anorexia, pérdida de peso, alteraciones psíquicas, manifestaciones digestivas, entre otras. Las reacciones adversas del Bz involucran granulocitosis, dolor de garganta, ampollas hemorrágicas y hemorragias de las mucosas (Rodrigues Coura, 2002).

3.1.4 Generalidades de *T. cruzi*

El agente etiológico de esta enfermedad, *T. cruzi*, pertenece a la Clase *Zoomastigophora*, Orden *Kinetoplastidae*, Familia *Trypanosomatidae*, Género *Trypanosoma*, Subgénero *Schizotrypanuma*. El taxón *T. cruzi* constituye una población muy heterogénea que consiste en un gran número de cepas con diferentes características relacionadas con la morfología, la tasa de crecimiento, las curvas de parasitemia, virulencia, patogenicidad, sensibilidad a drogas y perfil antigénico (Buscaglia, 2003). La gran diversidad genética observada entre las diferentes cepas permitieron en un inicio agrupar a las poblaciones en dos grandes grupos: *T. cruzi* I y *T. cruzi* II. *T. cruzi* I asociado con el ciclo de transmisión selváticos e infección de los marsupiales. *T. cruzi* II consistía en cinco subgrupos relacionados, denominados Ila–e, asociado con el ciclo de transmisión interno y la infección de los mamíferos placentarios (El-Sayed, 2005a). Actualmente, existe un consenso internacional que reconoce la existencia de seis cepas principales: *T. cruzi* I–VI (Teixeira, 2012; Zingales, 2009).

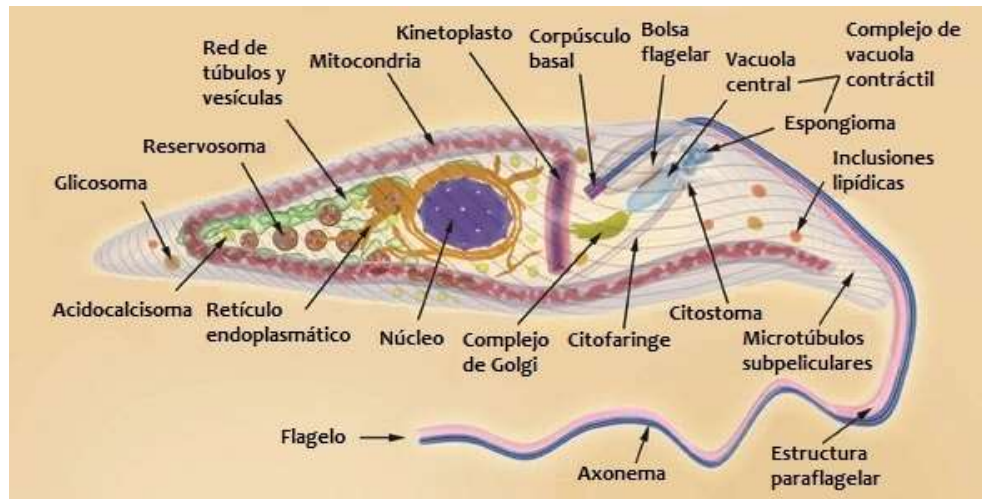


Figura 4. Vista esquemática de la forma epimastigota de *T. cruzi*. Se señalan las principales estructuras celulares. Adaptado de (Teixeira, 2014).

T. cruzi es un organismo unicelular que presenta al menos cuatro estadios bien diferenciados: amastigotas, tripomastigotas sanguíneos, epimastigotas y tripomastigotas metacíclicos (Ver 3.1.5 Ciclo de vida de *T. cruzi*). El **núcleo** presenta una organización estructural semejante al de las células eucariotas típicas, midiendo cerca de 2.5 μm de diámetro y conteniendo un nucléolo centralizado. En amastigotas y epimastigotas tiene forma redondeada; en tripomastigotas metacíclicos aparece como un organelo elongado con alto contenido de heterocromatina y carente de nucleolo. Presenta una membrana nuclear típica provista de poros. Los cromosomas son difíciles de distinguir ya que durante el ciclo celular la cromatina no se condensa (De Souza, 1974).

Presenta una **mitocondria** única que se extiende a lo largo del cuerpo celular del parásito (Figura 4). La matriz mitocondrial posee una región especializada formada por ADN extranuclear correspondiente al genoma mitocondrial, denominado kinetoplasto, el cual puede llegar a representar hasta el 25% del ADN total. Está formado por dos tipos de ADN circular, los maxi y mini círculos, concatenados entre sí, que se concentran cercanos al cuerpo basal. Existen varios miles de minicírculos, los cuales tienen un tamaño que va de 0,5 a 2,5 kb dependiendo de la especie, y unas pocas decenas de maxicírculos cuyo tamaño varía entre 20 – 40 kb (Shapiro, 1995).

Posee un **flagelo** responsable de la movilidad; en las formas epimastigota y tripomastigota el flagelo está adherido al cuerpo del parásito (Figura 4). También puede

observarse en amastigotas, pero presenta un tamaño muy corto. El flagelo muestra un arreglo típico de nueve pares de dobletes de microtúbulos periféricos y un par central.

Otra característica distintiva de los tripanosomátidos es la compartimentalización de la glicólisis en organelos llamados **glicosomas** (Hannaert, 2003; Hannaert, 1994; Michels, 2000; Moyersoen, 2004; Opperdoes, 1977; Opperdoes, 1987; Parsons, 2004). Los glicosomas son organelos que juegan un importante rol en la adaptación metabólica del parásito a los diferentes entornos a los que se expone durante su ciclo de vida. La glicólisis se organiza de tal forma que las siete enzimas que convierten la glucosa en 3-fosfoglicerato están dentro del glicosoma, mientras que las últimas tres se ubican en el citosol (Figura 7).

3.1.5 Ciclo de vida de *T. cruzi*

El ciclo de vida de *T. cruzi* es complejo, con varias etapas de desarrollo en el insecto vector y en el hospedero mamífero. Entre estos estadios se encuentran formas de vida replicativas y no replicativas, así como formas infectivas y no infectivas. En el hospedero mamífero se encuentran las formas amastigotas y tripomastigotas sanguíneos, mientras que las formas tripomastigota metacíclico y epimastigota se desarrollan en el insecto vector. Los tripomastigotas son infectivos, no replicativos, mientras que los amastigotas y los epimastigotas son formas replicativas, estos últimos no infectivos. Por su parte, estudios realizados con amastigotas obtenidos de diferentes fuentes han mostrado que también pueden ser infectivos para las células de vertebrados (De Carvalho, 1986).

Durante el proceso de transición de una etapa del ciclo de vida a otra el parásito exhibe cambios profundos en morfología (tamaño celular, forma celular, posición de núcleo y kinetoplasto, y longitud del flagelo) y metabolismo (Figura 5).

Los tripomastigotas metacíclicos tienen el núcleo cercano a la parte posterior de su cuerpo. Tienen además, un flagelo libre anclado a una membrana ondulante en el cuerpo y el kinetoplasto tiene una ubicación posterior al núcleo. Estos tripomastigotas tienen un tamaño aproximado de 20 μm de largo y 3 μm de diámetro.

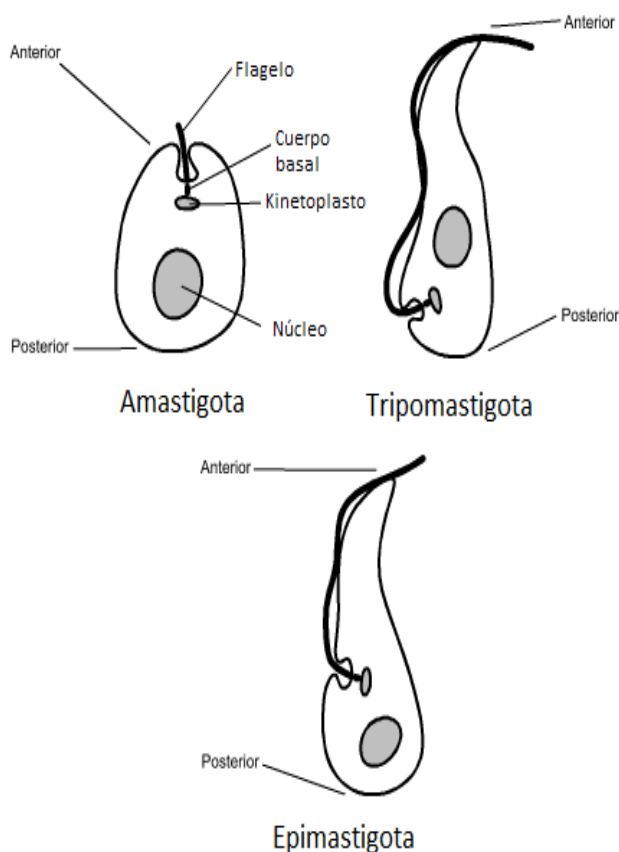


Figura 5. Esquema de tres de los estadios del parásito. Pueden distinguirse la ubicación del núcleo, kinetoplasto, cuerpo basal y flagelo.

Los amastigotas son intracelulares, de forma oval o redondeada, no tienen flagelo protuberante y el kinetoplasto se encuentra anterior al núcleo. Pueden alcanzar un tamaño de entre 1,5 y 5 μm de largo.

Los tripomastigotas sanguíneos están expuestos a las moléculas efectoras del sistema inmune del huésped, incluyendo anticuerpos específicos. Estas formas celulares expresan en su superficie múltiples miembros de una gran familia de moléculas, las más caracterizadas son las mucinas y las transsialidasas, asociadas a protección y evasión del sistema inmune del hospedero (De Pablos, 2012; Frasch, 2000). Si bien los tripomastigotas metacíclicos y los sanguíneos son casi indistinguibles morfológicamente, existen diferencias a nivel de su biología molecular que permiten su identificación.

Los epimastigotas tienen un flagelo anclado cerca del centro del cuerpo del parásito. El kinetoplasto se ubica anterior al núcleo y tiene forma de disco. En principio miden de 10 a 20 μm de largo, pero crecen otros 10 μm a medida que viajan por el intestino del insecto donde se transforman en tripomastigotas metacíclicos.

El comienzo del ciclo de vida se da cuando los tripomastigotas metacíclicos se desarrollan en la ampolla rectal del insecto triatomineo y contenidos en las heces del vector inician la infección en vertebrados. Una vez dentro del hospedero penetran en células cercanas al sitio de inoculación (como ser macrófagos, fibroblastos y células epiteliales) por fagocitosis o endocitosis. Una vez dentro de la célula hospedera, los tripomastigotas se convierten en amastigotas que residen en el citoplasma de las células infectadas. Luego de múltiples rondas de fisión binaria, los amastigotas se diferencian en tripomastigotas flagelados que finalmente se

liberan al torrente sanguíneo luego de romper la célula hospedera. Desde allí, los tripomastigotas sanguíneos pueden invadir otras células dada su alta capacidad infectiva. Alternativamente pueden ser ingeridos por un insecto vector cuando se alimenta de la sangre del mamífero infectado, convirtiéndose luego en epimastigotas, los cuáles se replican en la luz del intestino del insecto, y en última instancia, se convierten en la forma infectiva tripomastigota metacíclico para cerrar el ciclo de vida (Figura 6).

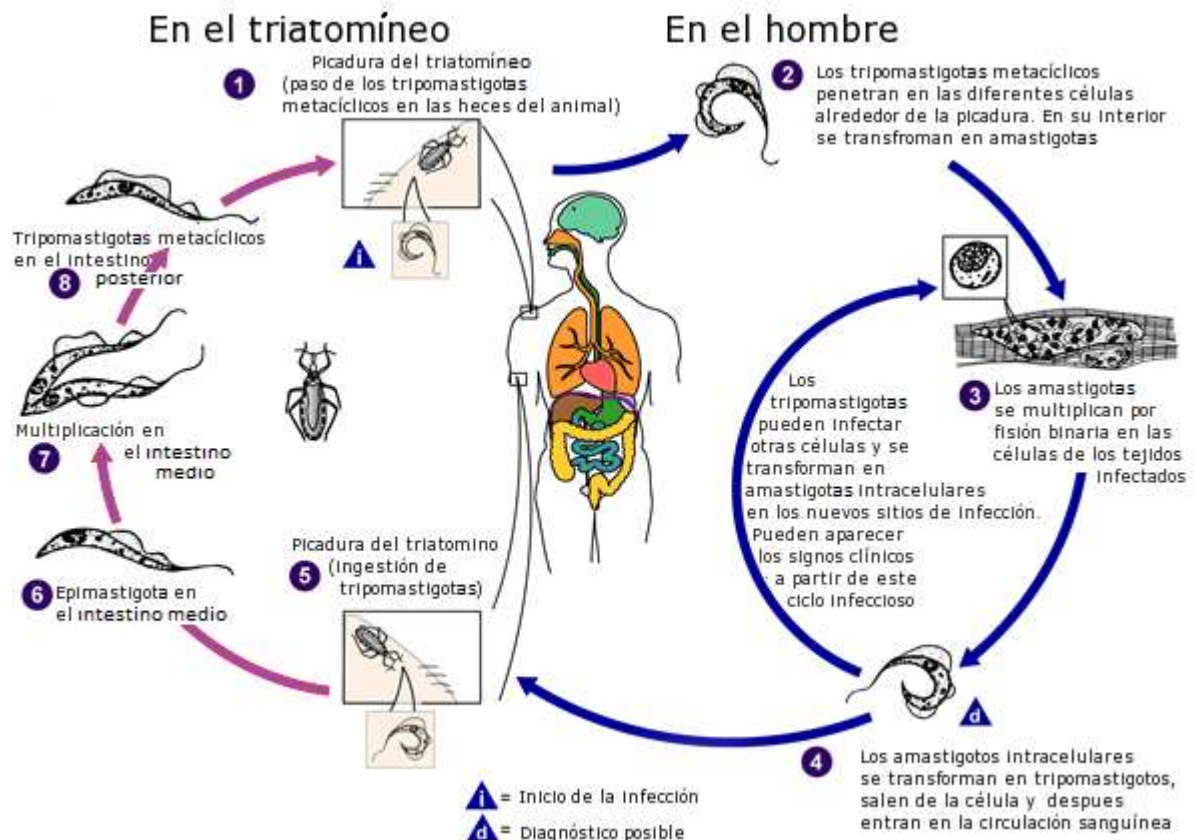


Figura 6. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Un insecto triatomíneo infectado que funciona como vector ingiere sangre y libera tripomastigotas en sus heces cerca del sitio de la herida. Los tripomastigotas entran a través de la herida o a través de membranas mucosas intactas, como la conjuntiva (1). Una vez dentro del hospedero, los tripomastigotas invaden las células cerca del sitio de la inoculación, donde se diferencian en amastigotas intracelulares (2). Los amastigotas se multiplican por fisión binaria (3) y se diferencian en tripomastigotas, que luego de romper la célula se liberan en el torrente sanguíneo (4). Los tripomastigotas infectan las células de una variedad de tejidos y se transforman en amastigotas intracelulares en nuevos sitios de infección. Las manifestaciones clínicas pueden resultar de este ciclo infeccioso (d). Los tripomastigotas sanguíneos no se replican. La replicación se reanuda sólo cuando los parásitos se introducen en otra célula o son ingeridos por otro vector diferenciándose en epimastigotas cuando el insecto se alimenta de sangre humana o animal que contiene parásitos circulantes (5). Los tripomastigotas ingeridos se transforman en epimastigotas en el intestino del vector (6). Los parásitos se multiplican y se diferencian en el intestino medio (7) y se diferencian en tripomastigotas metacíclicos infecciosos en el intestino posterior (8). Adaptado de (CDC, 2014).

3.1.6 Biología molecular de *T. cruzi*

La secuenciación del genoma de *T. cruzi* publicada en 2005 por el grupo de El-Sayed y cols., reveló que el genoma haploide de *T. cruzi* contiene 55 Mb distribuidas en aproximadamente 28 cromosomas; el número exacto se desconoce y los homólogos pueden diferir sustancialmente en tamaño. Se estima que el genoma haploide contiene 12000 genes y que más del 50% del genoma consiste en secuencias repetidas como ser retrotransposones y familias de moléculas de superficie, que incluyen trans-sialidasas y mucinas. Se evidenció un promedio de 57% de identidad aminoacídica entre *T. cruzi* y *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*), y un 44% de identidad entre *Leishmania major* (*L. major*) y los otros dos tripanosomátidos. Cada proteoma contiene miembros específicos de cada especie, presentando *T. cruzi* (32%) y *T. brucei* (26%) una proporción mucho mayor que la de *L. major* (12%). Debido a que la mayoría de las proteínas específicas de las especies parecen ser miembros de las familias de antígenos de superficie, los diferentes números pueden relacionarse con diferentes estrategias de supervivencia y evasión inmune utilizadas en cada organismo. Por su parte, de 1617 dominios proteicos identificados en el genoma de los TriTryp, menos de un 5% es exclusivo de una sola especie (El-Sayed, 2005a; El-Sayed, 2005b).

Una particularidad de estos patógenos es que parecen no presentar regulación a nivel transcripcional. Esto es consecuencia de su inusual organización del genoma: los genes que codifican para proteínas se disponen en *tándem* y se transcriben como largos policistrones de 10–100 genes, los cuales en su mayoría no están relacionados funcionalmente entre sí (Kramer, 2012). Dada esta organización genómica y que todos los precursores de ARN policistrónico se transcriben aproximadamente a la misma tasa, se ha propuesto que la regulación de la expresión de genes ocurre básicamente a nivel post-transcripcional (Clayton, 2002; Gomez, 2010; Ouellette, 2009). Otra evidencia de la falta de regulación al inicio de la transcripción es la falta de elementos canónicos conservados como promotores de la ARN polimerasa II (Clayton, 2002; Gomez, 2010). En este contexto se han evidenciado algunos mecanismos para aumentar el nivel de expresión de ciertos genes en tripanosomátidos. Una estrategia consiste en aumentar el número de copias del gen en el genoma resultando en arreglos de repetidos en *tándem* para ciertos genes. Otra estrategia es el uso de promotores fuertes para transcribir genes de alta expresión. La casi ausencia de control transcripcional tiene consecuencias como la subrepresentación de las enzimas modificadoras de la cromatina (Figueiredo, 2009; Janzen, 2006; Mandava, 2007). Las

modificaciones de la cromatina juegan un importante rol, ya que los inicios y finales de la transcripción de las unidades de transcripción policistrónicas están marcados epigenéticamente por variantes de histonas/histonas modificadas post-traduccionalmente (Respuela, 2008; Siegel, 2009; Thomas, 2009).

Estos ARNs policistrónicos son procesados por mecanismos intermoleculares de *trans*-splicing y poliadenilación para dar lugar a los ARNs mensajeros individuales (De Lange, 1984). El *trans*-splicing es un proceso mediante el cual maduran los ARN mensajeros transcritos primarios al agregarse una secuencia de ARN (“spliced leader” o “SL” o “miniexón”) de 39 nucleótidos al extremo 5’ en una posición ubicada unos nucleótidos antes del sitio de inicio de un marco abierto de lectura (Pays, 1994). La secuencia del miniexón proviene del extremo 5’ de un ARN nuclear pequeño (snRNA), el ARN SL, que está compuesto por 120 nucleótidos y no está poliadenilado (Agabian, 1990). La adición del miniexón se produce en un sitio consenso constituido por un dinucleótido AG localizado corriente arriba del codón de iniciación a distancias variables (Agabian, 1990), y generalmente está precedido por un tracto de polipirimidinas. Este fenómeno ocurre co-transcripcionalmente (Ullu, 1993) y es fundamental para la traducción correcta de los mensajeros.

Previo al proceso de *trans*-splicing, el miniexón adquiere en su extremo 5’ una estructura CAP necesaria para el procesamiento del miniexón (Ullu, 1991). Se sugiere que una función de la secuencia del miniexón o “spliced leader” es la de proveer la estructura CAP a los ARNm (Lenardo, 1985). En tripanosomátidos esta estructura, denominada CAP 4, consiste en una 7-metilguanosa y los cuatro primeros nucleótidos modificados por adición de grupos 2’O-metilo (Bangs, 1992).

El proceso de poliadenilación en *T. cruzi* es similar al resto de los eucariotas superiores. En el mismo participa una endonucleasa de restricción específica que corta el pre-mensajero en su extremo 3’ y la enzima poliA polimerasa que incorpora adenosinas a expensas de ATP. A diferencia con los eucariotas superiores, para los cuáles se ha descrito una secuencia conservada AAUAAA que actúa como señal de poliadenilación (Wahle, 1992), en tripanosomátidos, no se ha podido describir una secuencia consenso. Sin embargo, se ha demostrado la importancia del trecho de polipirimidinas que interviene en el *trans*-splicing de los genes en el extremo 5’ en la poliadenilación del extremo 3’ del gen previo (Schurch, 1994).

Los transcritos mitocondriales requieren una maduración que involucra la adición, o menos frecuentemente, la delección de residuos de ribonucleótidos (particularmente uridinas) en un proceso denominado “*editing*” (Shaw, 1988). El “*editing*” resulta en cambios de la secuencia codificante del ARNm no dirigidos por el ADN molde sino por ARN guías codificados por los minicírculos.

Una característica distintiva de los tripanosomátidos es la ausencia de intrones, las excepciones documentadas son los genes de la poliA polimerasa (Mair, 2000), el gen del ARNt-Tyr (Tan, 2002), y mediante el análisis del genoma se proponen otros dos genes que podrían contener intrones, los cuales codificarían para proteínas hipotéticas con motivos de unión al ARN (Ivens, 2005).

3.1.7 Metabolismo energético de *T. cruzi*

Con excepción de las formas sanguíneas de *T. brucei*, que presentan un metabolismo energético muy simple basado en la oxidación de la glucosa de la sangre del hospedero, los demás estadios parasitarios de los diferentes tripanosomátidos presentan un metabolismo de la glucosa complejo, como se encuentra esquematizado en la Figura 7. El parásito degrada glucosa sólo parcialmente hasta dióxido de carbono, excretando hacia el medio el carbono de la glucosa como ácidos carboxílicos. Se estima que aproximadamente el 70% de la glucosa consumida por estos parásitos es convertida en succinato, posicionándolo como su principal producto de excreción (Besteiro, 2002; Bringaud, 2006; Cazzulo, 1992; Coustou, 2005; van Weelden, 2003; van Weelden, 2005). En estos parásitos el fosfoenolpiruvato (PEP) proveniente de la oxidación de la glucosa se condensa con CO₂ para finalmente producir succinato (fermentación de succínico) (Figura 7). La producción de succinato a partir del PEP comienza con la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (paso 14) y la malato deshidrogenasa (paso 16) que convierten PEP en malato, el cual es convertido en fumarato por dos isoformas de la fumarasa, una citosólica (paso 17) y otra mitocondrial (paso 19). El fumarato es finalmente reducido a succinato por dos enzimas oxido-reductasas dependientes de NADH: la **fumarato reductasa glicosomal** (paso 18) (Besteiro, 2002; Opperdoes, 1981), y la **fumarato reductasa mitocondrial** (paso 19) (Coustou, 2005).

Por su parte, el piruvato está localizado en un punto metabólico que lleva a la excreción de varios productos finales como acetato, alanina y lactato. El acetato es el producto final que se forma mayoritariamente en la mitocondria y es excretado por difusión simple a través de la membrana citoplasmática. La mayoría de los tripanosomátidos producen también lactato a partir de glucosa como un producto final minoritario (Bringaud, 2006; Cazzulo, 1992).

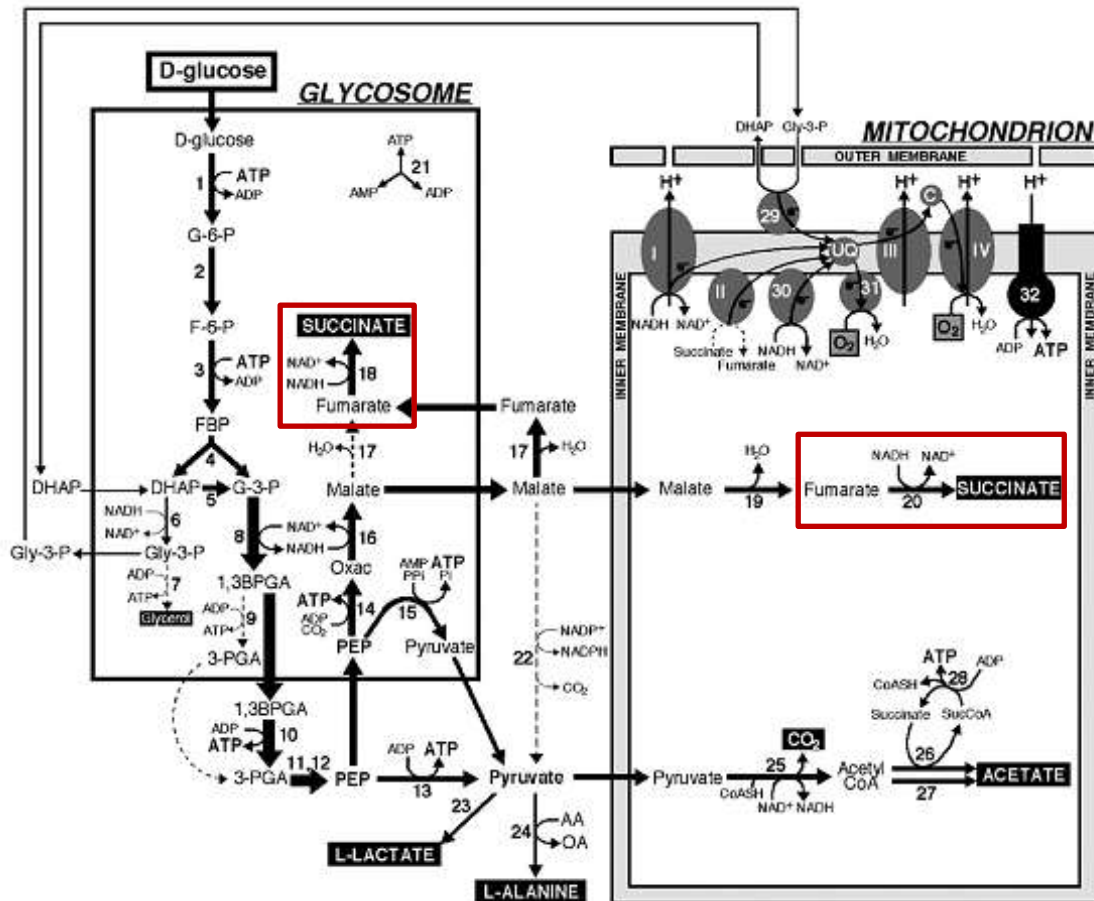


Figura 7. Representación esquemática del metabolismo de la glucosa en tripanosomátidos. Se resaltan en recuadros negros los productos finales de excreción (acetato, L-alanina, glicerol, L-lactato, succinato y CO₂). Las flechas con diferente grosor representan el flujo metabólico de cada paso enzimático. Las flechas punteadas indican pasos que posiblemente ocurren en un bajo nivel o no ocurren. Las enzimas involucradas en la formación de succinato como producto de excreción son: 14 fosfoenolpiruvato carboxiquinasa; 16 malato deshidrogenasa glicosomal; 17 fumarasa citosólica y glicosomal; 19 fumarasa mitocondrial; **18 fumarato reductasa dependiente de NADH glicosomal**; **20 fumarato reductasa dependiente de NADH mitocondrial** (recuadros rojos). Extraído de (Michels, 2006).

La maquinaria enzimática para el metabolismo oxidativo está completa en la mayoría de los estadios parasitarios. Esto incluye una cadena respiratoria funcional capaz de generar un gradiente de protones, así como también dos oxidases terminales independientes (la citocromo oxidasa y la oxidasa alternativa). En un medio rico en glucosa, la mayoría del ATP es producido

por fosforilación a nivel del sustrato (pasos 10, 13 y 28), mientras que en medios pobres en glucosa pero ricos en aminoácidos, la fosforilación oxidativa se convierte en la principal fuente de energía. Tal es el caso de los estadios de los parásitos de *T. brucei*, *T. cruzi*, *Leishmania spp.* y *Crithidia spp.* que viven en un ambiente rico en L-prolina dentro de los insectos (Bringaud, 2006).

3.1.8 Fumarato reductasa dependiente de NADH

Los organismos anaeróbicos y microaerófilos (incluyendo muchas especies de bacterias, protozoarios, hongos y helmintos) utilizan una variedad de aceptores de electrones, a veces en adición al oxígeno y otras en lugar de éste. Estos aceptores de electrones alternativos pueden ser inorgánicos (nitrato, nitrito, sulfito, entre otros) u orgánicos (varios compuestos incluido el fumarato). Los organismos que utilizan el fumarato como sumidero de electrones reducen este compuesto a succinato ($\Delta E^\circ = 0.52 \text{ V}$) en la reacción catalizada por la enzima fumarato reductasa dependiente de NADH (FRD) (Turrens, 2012):

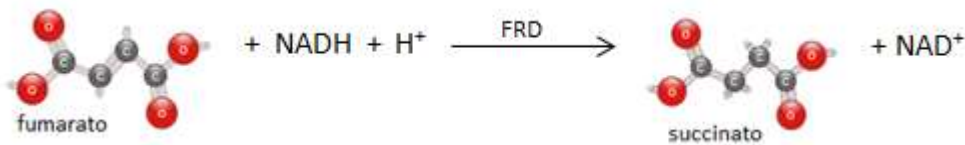


Figura 8. Reacción de reducción de fumarato a succinato, a expensas de NADH, catalizada por la enzima FRD.

Esta enzima revierte la reacción del ciclo del ácido cítrico catalizada por la succinato deshidrogenasa (SDH), en la que el succinato se oxida a fumarato. Las FRDs son importantes oxido-reductasas responsables de la eliminación del exceso de equivalentes de reducción bajo condiciones anaeróbicas o microaerófilas y del mantenimiento del balance redox intracelular en condiciones normales (Turrens, 2012).

Las FRDs pueden dividirse en dos clases, por un lado los complejos multiméricos asociados con la cadena respiratoria y transferencia de electrones del quinol al fumarato y por otro las enzimas solubles, las cuales transfieren electrones de un cofactor de unión no covalente (NADH o $\text{FADH}_2/\text{FMNH}_2$) al fumarato. La mayoría de las FRD caracterizadas en procariontes y helmintos pertenecen a la primera clase y son estructuralmente similares a la SDH. Se presentan pocos ejemplos en la literatura de FRDs solubles: en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que expresa una FRD citosólica y una mitocondrial, con FADH_2 como donador de electrones

(Enomoto, 1996; Muratsubaki, 1994), en la bacteria *Hydrogenobacter thermophilus TK-6*, con NADH como donador de electrones (Miura, 2008), y en los tripanosomátidos que expresan FRDs dependientes de NADH localizadas en el glicosoma y en su única mitocondria (Coustou, 2005).

La actividad fumarato reductasa fue primero detectada en dos especies de tripanosomátidos: en epimastigotas de *T. cruzi* y en formas procíclicas de *T. brucei* (Boveris, 1986; Turrens, 1989). En estos últimos, el grupo de Coustou y cols. ha caracterizado tres genes codificantes para FRD en el genoma, que dan lugar a la FRD glicosomal (FRDg), la FRD mitocondrial (FRDm1) y una FRD2 cuyo producto no pudo ser detectado en este modelo, pero que posee secuencia de localización mitocondrial. Mediante el uso de ARN interferente (RNAi) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de D-[1-¹³C] en el metabolismo de la glucosa, evidenciaron que FRDm1 es responsable del ~30% de la actividad fumarato reductasa celular y de la producción del ~25% (entre el 14 y el 44%) del succinato excretado por el metabolismo de la glucosa (Coustou, 2005). El conocimiento básico de las proteínas FRD surge de este trabajo en *T. brucei*, donde se ha reportado que la FRDm1 y FRD2 son 52.3% idénticas entre ellas y presentan a su vez 56.2 y 67.5% de identidad aminoacídica con la FRDg, respectivamente. FRDm1 y FRDg son proteínas multifuncionales compuestas por tres dominios diferentes. El dominio N-terminal es homólogo a las proteínas ApbE involucradas en la biosíntesis de tiamina, el dominio central es homólogo para las fumarato reductasas (Número de acceso PRK06175), y el dominio C-terminal es homólogo a las citocromo b5 reductasas (Figura 17). FRD2 sólo contiene los dominios central y C-terminal. De manera interesante, el dominio fumarato reductasa es el más conservado con un 99% de identidad a nivel aminoacídico entre FRDg y FRD2, y de 71.7% entre FRDm1 y cualquiera de las otras dos FRDs (Coustou, 2005).

En cuanto al metabolismo energético, para mantener funcionando el sistema glicolítico debe existir un sistema eficiente para la reoxidación del NADH generado en la reacción de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (paso 8, Figura 7). En condiciones aeróbicas este sistema es usualmente la cadena respiratoria y en condiciones anaeróbicas existen varias vías fermentativas posibles, las más conocidas, en otros sistemas, son la producción de lactato por el músculo esquelético y la producción de etanol por las levaduras. Comparado con la típica fermentación del ácido láctico, la cual involucra sólo la enzima lactato deshidrogenasa, la fermentación succínica ofrece la ventaja que requiere sólo la mitad del PEP producido para mantener el balance NAD^+/NADH . Esto es así porque, como se observa en la Figura 7,

teóricamente producir una molécula de succinato consume dos moléculas de NADH, cuando la formación de PEP sólo produce una (Michels, 2006). El PEP remanente es entonces convertido en acetato, lactato, alanina y/o etanol dependiendo de la especie. Esta ramificación de la vía catabólica de la glucosa puede proporcionar una importante flexibilidad de adaptación a rápidos cambios del medio (Bringaud, 2006). Por lo tanto, en tripanosomátidos, la FRD podría cumplir este rol de mantenimiento del balance redox por oxidación de NADH a NAD^+ , mediante la reducción de fumarato a succinato y eliminación de este producto al espacio extracelular (Turrens, 2012). Este procedimiento es claro en glicosomas, donde el PEP producido en el citosol es requerido para reoxidar todo el NADH producido por la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa. En el caso de la mitocondria de tripomastigotas procíclicos de *T. brucei* la explicación es más discutida, debido a la presencia de al menos dos NADH deshidrogenasas en la cadena respiratoria, una rotenona-sensible y otra rotenona-insensible, (Complejo I y paso 30 de la Figura 7, respectivamente). De todas maneras, la contribución relativa de estas enzimas en mantener el balance redox es desconocida. De hecho, se evidenció que la cantidad de succinato derivado de glucosa producido en la mitocondria está en el mismo rango que el acetato derivado del mismo sustrato en ese compartimento. La mitocondria produce un NADH por acetato (por el complejo piruvato deshidrogenasa), mientras una molécula de NADH es consumida por molécula de succinato producido (por la FRD), pudiendo concluirse que el balance redox mitocondrial debido al metabolismo de la glucosa puede ser mantenido por una producción equimolar de succinato y acetato (Coustou, 2005).

La característica que destaca a las enzimas FRD dependientes de NADH es que se encuentran en helmintos, tripanosomátidos y algunas bacterias, pero no en células normales de mamíferos (Lohmeier, 1981; Miura, 2008; Turrens, 2012). Además, en *T. cruzi* está presente en todas las etapas del ciclo de vida (amastigota, tripomastigota y epimastigota) (Boveris, 1986; Denicola-Seoane, 1992; Turrens, 1989). Esto, aunado al hecho de que estas enzimas son requeridas para mantener el balance redox en tripanosomátidos a través de la producción de succinato catalogan a estas enzimas como interesantes blancos terapéuticos para diseño racional de agentes antichagásicos.

3.2 Antecedentes

En la búsqueda de nuevas herramientas terapéuticas contra la enfermedad de Chagas, los complejos metálicos aparecen como un nuevo enfoque prometedor. Una exitosa estrategia se basa en la síntesis de complejos que combinan la actividad de ligandos anti-tripanosomas y metales farmacológicamente activos, llevando a un efecto sinérgico o por lo menos un efecto aditivo (Sanchez-Delgado, 2004a; Sanchez-Delgado, 2004b). El desarrollo de agentes individuales que proporcionan la máxima actividad antiprotozoaria al actuar contra procesos específicos del parásito, podría disminuir los efectos tóxicos para el huésped mediante la reducción de la dosis terapéutica y/o por evasión del desarrollo de resistencia a los fármacos (Chibale, 2002).

El Grupo Química Inorgánica Medicinal, dirigido por la Dra. Gambino (Facultad de Química, UdelaR), en colaboración con los Laboratorios de Interacciones Moleculares, Química Orgánica y Química Teórica y Computacional de Facultad de Ciencias, ha demostrado un interés particular en la enzima FDR como blanco de agente antichagásicos. Particularmente, ha sintetizando complejos del ligando bioactivo de piridina-2tiol N-óxido (2-mercaptopiridina N-óxido, mpo), de paladio [Pd(mpo)₂] y platino [Pt(mpo)₂], los cuales fueron exhaustivamente caracterizados y evaluados *in vitro* (Vieites, 2008). Estos mpo, como otros N-óxidos de amina heterocíclicos, podrían liberar por biorreducción especies de radicales en la célula, principalmente el radical hidroxilo, que podrían causar daño celular (Cerecetto, 2001; Tobin, 2002). Algunos compuestos de paladio y platino han mostrado actividad anti *T. cruzi* actuando a través de diferentes mecanismos, como la interacción de ADN y la inhibición irreversible de la flavoenzima tripanotiona reductasa (Bonse, 2000; Lowe, 1999), lo que convierten a esta enzima en un interesante blanco posible de acción. Además, se ha demostrado que varios agentes anti-tripanosomas (incluyendo Benznidazol) mostraban una fuerte correlación entre el efecto inhibitorio de estos compuestos sobre la FRD y la inhibición del crecimiento celular *in vitro*, usando extractos totales de epimastigotas de *T. cruzi* y procíclicos de *T. brucei* (Turrens, 1996).

La evaluación *in vitro* realizada por Vieites y cols. reveló que ambos compuestos mostraron ser potentes inhibidores del crecimiento del parásito (valores de IC₅₀ en el rango de nanomolar); y resultaron ser 39–115 veces más activos que el Nfx. Además mostraron baja citotoxicidad inespecífica, evidenciando una capacidad antiparasitaria altamente selectiva, con muy baja citotoxicidad para células normales. Particularmente el complejo de platino muestra ser

preferentemente tóxico hacia los parásitos, además de ser menos tóxico para las células normales que el ligando libre y el complejo de paladio análogo (Vieites, 2008). Se analizó el efecto de los complejos metal-mpo en la actividad fumarato reductasa a una dosis única en extractos proteicos crudos de epimastigotas de *T. cruzi*. En las condiciones ensayadas, el ligando libre y los complejos de metal-mpo inhibieron la actividad fumarato reductasa de *T. cruzi*. Con el fin de caracterizar aún más la inhibición de la enzima por estos complejos, se estudió la dependencia del efecto inhibitor con la concentración para el inhibidor más potente, que resultó ser Pd(mpo)₂, y los resultados mostraron que este compuesto inhibe la actividad enzimática de una manera dependiente de la dosis (Vieites, 2008), en ensayos realizados también con extractos proteicos crudos de *T. cruzi*. La suplementación del medio de cultivo con succinato, el producto de la actividad de la FRD, para disminuir la inhibición del crecimiento producido por los compuestos en los epimastigotas de *T. cruzi* se ha utilizado para demostrar la participación de la FRD en su mecanismo de acción (Turrens, 1999). Con el fin de demostrar que la inhibición del crecimiento producida por Pd(mpo)₂ y Pt(mpo)₂ fue causada, al menos en parte, por su efecto sobre la actividad de la FRD, se cultivaron epimastigotas de *T. cruzi* durante 5 días en la presencia o ausencia de succinato y se observó una clara disminución de la inhibición del crecimiento producido por los complejos de metal-mpo en presencia de succinato. Los resultados muestran inhibición en la actividad fumarato reductasa, pero al tratarse de ensayos en extractos proteicos existe la posibilidad de que estos complejos puedan estar afectando otros procesos que contribuyen a la obstrucción del crecimiento del parásito, además del efecto inhibitorio sobre la FRD (Vieites, 2008). Recientemente, se han realizado estudios de modelado de la enzima y *docking* con los compuestos de paladio y platino estudiados experimentalmente para conocer detalles de su modo de unión *in silico* (Merlino, 2014). Surge entonces la idea de reforzar estos estudios realizando ensayos con los compuestos sobre la enzima FRD recombinante purificada, para determinar que efectivamente es esta enzima el blanco de los compuestos. Una vez obtenida la enzima purificada, y corroborado su funcionalidad en ensayos *in vitro*, se dispondrá de una valiosa herramienta que permita caracterizar en detalle el mecanismo y cinética de inhibición de los diferentes compuestos sobre la misma.

4. Hipótesis y objetivos

4.1 Hipótesis

Dado que la enzima fumarato reductasa de *Trypanosoma cruzi* carece de ortólogos en las células del mamífero hospedero, y además, cataliza un importante paso metabólico, imprescindible para la viabilidad del parásito, es catalogada como un interesante blanco terapéutico para el diseño racional de agentes antichagásicos.

4.2 Objetivo general

Clonar, expresar y purificar la enzima fumarato reductasa dependiente de NADH de *Trypanosoma cruzi* en un sistema heterólogo a fin de generar una herramienta biológica que permita la evaluación de potenciales agentes antichagásicos.

4.3 Objetivos específicos

- (i) Búsqueda *in silico* de las secuencias codificantes para enzimas FRD en *T. cruzi*.
- (ii) Amplificación y clonado de las secuencias codificantes de las isoformas de FRD de *T. cruzi* en vector-T.
- (iii) Clonado de las isoformas de FRD en vectores de expresión bacterianos.
- (iv) Monitoreo de las condiciones óptimas de expresión en bacteria de las versiones recombinantes de FRD.
- (v) Purificación por cromatografía de afinidad de las versiones recombinantes de FRD.

5. Materiales y métodos

5.1 Soluciones y tampones

Solución de CaCl_2 : CaCl_2 60 mM; glicerol 15%; PIPES 10 mM, pH 7. Se esteriliza con filtro de 0,22 μm .

Solución de mezcla lítica: SDS 1%; NaOH 0,2 N.

Tampón de carga para ADN: azul de bromofenol 0,25 %; xylene cyanol 0,25%; glicerol 30%.

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

Tampón SET: sacarosa 20%; Tris-HCl 50 mM, pH 7,6; EDTA 6,5 mM.

Tampón de carga para SDS-PAGE: 25 ml Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; SDS 0,4%; 4 g SDS; 20 mL glicerol; 2 ml β -mercaptoetanol o 3,1 g DTT; 1 mg azul de bromofenol.

Gel separador 10%: poliacrilamida:bisacrilamida 29:1 10%; Tris-HCl pH 8,8 390 mM; SDS 0,1%; APS 0,1%; TEMED 0,05%.

Gel separador 12%: poliacrilamida:bisacrilamida 29:1 12%; Tris-HCl pH 8,8 390 mM; SDS 0,1%; APS 0,1%; TEMED 0,05%.

Gel concentrador 5%: poliacrilamida:bisacrilamida 29:1 5%; Tris-HCl pH 6,8 125 mM; SDS 0,1%; APS 0,1%; TEMED 0,05%.

Tampón de corrida 5X: 15,15 g Tris-base; 72 g glicina; 5 g SDS.

Solución de tinción: 0,4 g Azul de Coomassie R; 80 mL ácido acético glacial; 250 mL etanol.

Solución de desteñido: Igual a la Solución de tinción sin Azul de Coomassie R.

PBS 1X: 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na_2HPO_4 ; 0,24g KH_2PO_4 .

PBS-Tween 0,1%: PBS 1X; 0,1% Tween 20.

Tampón de transferencia: Tampón de corrida 1X; 10% etanol.

Solución de Bloqueo: 5% leche en polvo descremada; PBS 1X.

Tampón AP: 100 Mm Tris-Hcl pH9,5; 100 mM NaCl; 5mM MgCl_2 .

5.2 Medios de cultivo

Para crecimiento de bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*) se usó el medio de cultivo Luria-Bertani (LB) (*Invitrogen*): triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L y NaCl 5 g/L. Para la preparación de medios sólidos se agregó agar 1,5%. La esterilización se realizó por autoclavado durante 20 minutos a 121 °C. En los casos requeridos se utilizó el antibiótico ampicilina (0,1 mg/mL).

5.3 Cepas, vectores y secuencias

5.3.1 Cepas

Los plásmidos empleados en el presente trabajo se propagaron en células XL1-Blue y BL21 Star (DE3)pLysS, ambas cepas de *E. coli*.

Las células XL1-Blue presentan el genotipo supE hsdR lac⁻ F' proAB⁺ lacI_q lacZΔM15. Estas células son endonucleasa (endA) deficiente, lo que mejora en gran medida la calidad de las minipreparaciones de ADN, y mejora de la estabilidad de inserción. La mutación hsdR impide la escisión de ADN clonado por el sistema de endonucleasa de EcoK. Estas células presentan resistencia a tetracicilina.

La cepa BL21 Star (DE3)pLysS de *E. coli*, presenta el genotipo F- ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm rne131 (DE3) pLysS (Cam^R). La designación DE3 significa que la cepa contiene el lisógeno λDE3 que lleva el gen para la ARN polimerasa de T7 bajo el control del promotor *lacUV5*. Esta cepa tiene también el gen RNE mutado que codifica la enzima RNasa E truncada, por lo que carece de la capacidad para degradar ARNm, lo que resulta en un aumento de la estabilidad del ARNm. La cepa es deficiente en la proteasa lon y también en la proteasa de la membrana externa, OmpT. La falta de estas proteasas reduce la degradación de proteínas heterólogas expresadas en las cepas.

5.3.2 Vector de clonado

El vector de clonado empleado fue el pCR2.1-TOPO (*Invitrogen*) (Figura 9). Este es un vector diseñado para el clonado y secuenciación de fragmentos de ADN amplificados por PCR.

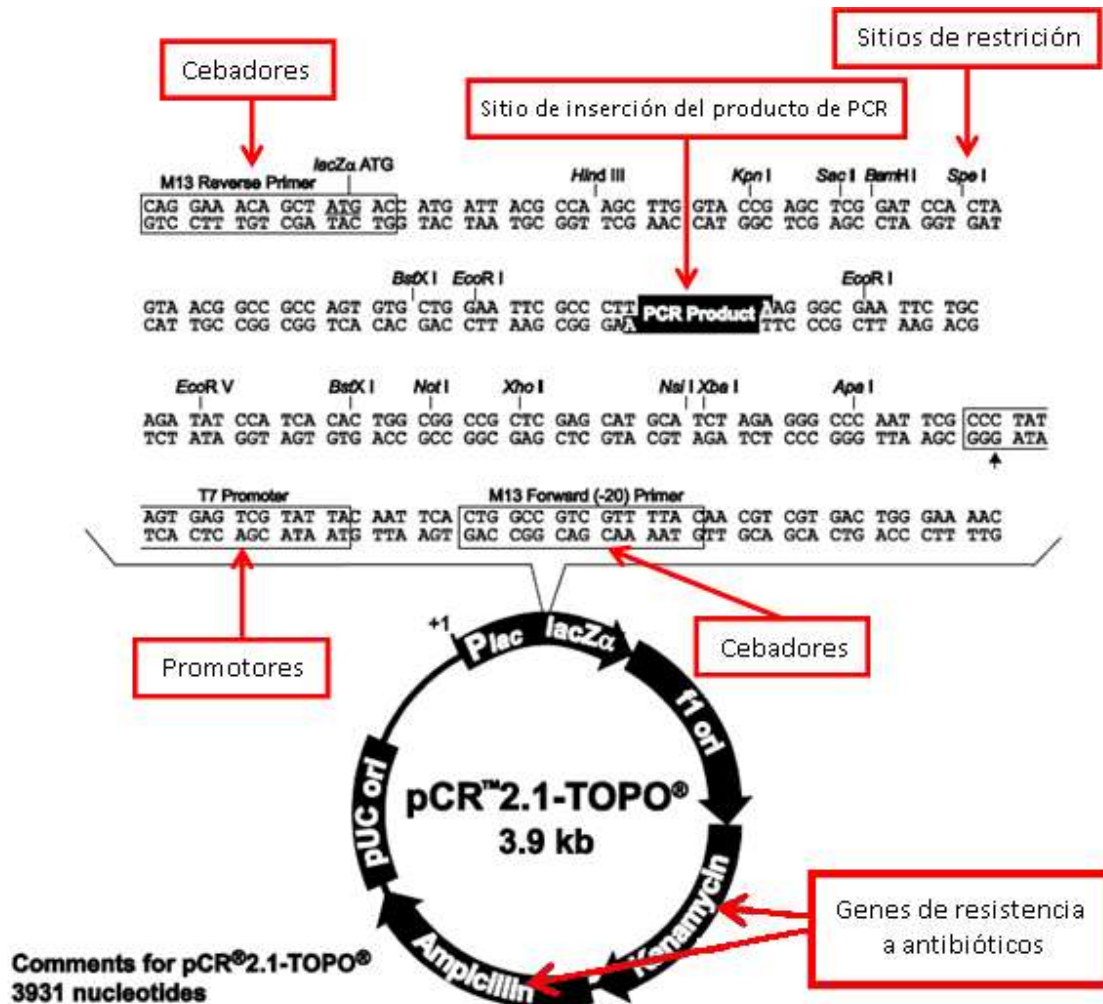


Figura 9. Mapa del vector-T pCR2.1-TOPO (*Invitrogen*). Se muestran las principales características: el fragmento *LacZα* codifica para la región N terminal de la β galactosidasa (bases 1-547), el sitio de hibridación del cebador M13 reverso (bases 205-221); el sitio de clonado múltiple (bases 234-357); el promotor T7 (bases 364-383); el sitio de hibridación del cebador M13 forward (-20) (bases 391-406); el origen de replicación del plásmido f1ori (bases 548-985); el gen de resistencia a kanamicina (bases 1319-2113); el gen de resistencia a ampicilina (2131-2991); el sitio de origen de replicación del plásmido pUC Cole:1 (bases 3136-3809). Extraído de (*Invitrogen*, 2006).

Este sistema de TOPO TA Cloning Kit, está diseñado para clonar productos de PCR generados por la *Taq* polimerasa ya que posee un nucleótido de timina 3' protuberante. El clonado es muy eficiente gracias a la presencia de una topoisomerasa I, la cual está covalentemente unida al vector porque cliva el esqueleto fosfodiéster luego de 5'-CCCTT en una

hebra, y esa energía liberada se conserva en la formación de un enlace covalente entre el fosfato 3' de la cadena rota y un residuo tirosina (Tyr-274) de la topoisomerasa I, como se muestra en la Figura 10 (Shuman, 1991).

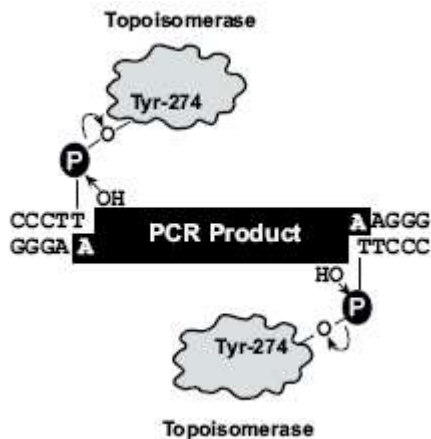


Figura 10. Clonación de un fragmento de ADN en el vector pCR[®] 2.1-TOPO[®]. El enlace fosfotirosil entre el ADN y la topoisomerasa I puede ser atacado por el 5' hidroxilo de la cadena original clivada, liberando así la enzima (Shuman, 1994). Extraído de (Invitrogen, 2006).

5.3.3 Vectores de expresión

Para expresar las proteínas recombinantes se testaron dos vectores de expresión bacterianos: pQE (*Qiagen*) y pGEX (*GE-Healthcare*). Estos vectores de expresión permiten generar proteínas fusionadas a una secuencia conocida como *tag* lo que permite su purificación por cromatografías de afinidad. En el caso del vector pGEX el *tag* es la proteína GST y en el caso del vector pQE el *tag* consiste en un trecho de 6 histidinas.

El vector de la línea pQE empleado en la expresión en bacterias fue pQE-30 (Figura 11). Este vector está diseñado para la expresión y purificación de proteínas recombinantes fusionadas a seis residuos de histidinas consecutivos. Es un vector de alto nivel de expresión y bajo número de copias, basado en el sistema de transcripción-traducción a partir del promotor del fago T5 reconocido por la ARN polimerasa de *E. coli*. En la región del promotor se encuentran dos operadores *lac* que aumentan la represión del sistema por unión del represor *lac*. Además cuenta con el sitio de unión del ribosoma (RBSII), para una alta tasa de traducción. El *tag* de seis histidinas se encuentra en el extremo 5' de la región de clonado y permite que la proteína fusionada al *tag* en su región N terminal pueda ser purificada mediante una cromatografía de afinidad usando columnas de Níquel. Cuenta con sitio múltiple de clonado, codones stop traducionales en todos los marcos abiertos de lectura, dos terminadores transcripcionales

fuertes t_0 del fago lambda y T1 del *rrnB* del operón de *E. coli*, evitando el *read-through* en la transcripción y asegurando la estabilidad de la construcción de expresión. El gen de β -lactamasa (*bla*) le confiere resistencia a ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (QIAexpressionist™, 2006).

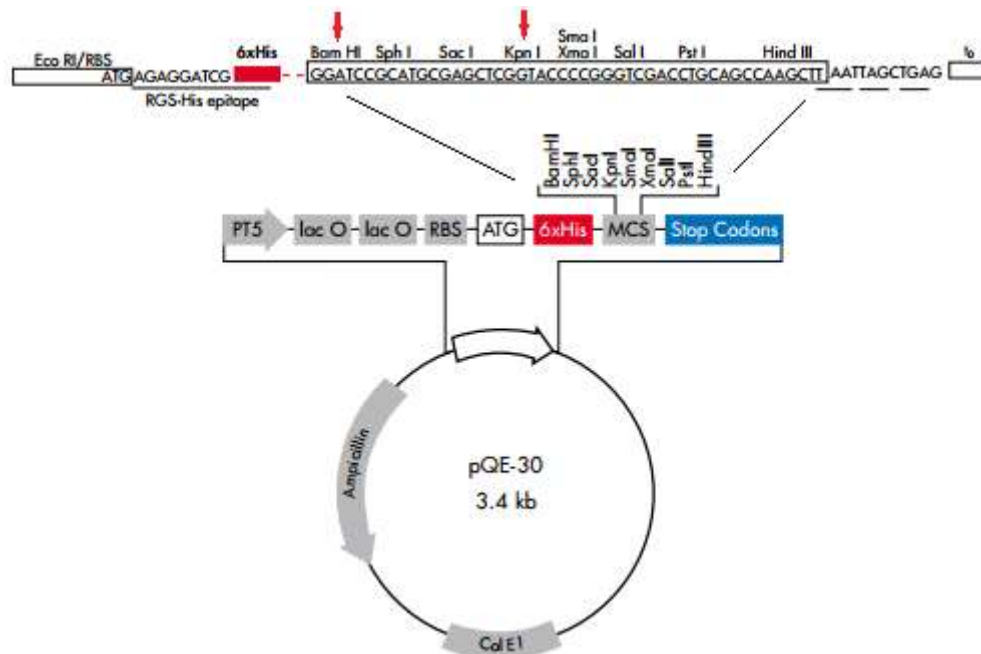


Figura 11. Mapa del vector de expresión pQE-30 (Qiagen). Se ilustran las principales características. PT5: Promotor T5; lac o: Operador lac; RBS: Sitio de unión a ribosoma; ATG: Codón de inicio; 6xHis: Secuencia codificante para *tag* de histidinas; MSC: Sitio de clonado múltiple con sitios de restricción indicados y los sitios BamHI y KpnI destacados; Stop codons: codones stop en los tres marcos de lectura; Col E1: Origen de replicación Col E1; Ampicilin: Gen de resistencia a ampicilina. Extraído de (QIAexpressionist™, 2006).

El otro vector de expresión empleado fue pGEX4T-1 (Figura 12). Este es un vector útil para la expresión de polipéptidos y proteínas fusionadas a la proteína glutatión S transferasa (GST). Las proteínas de fusión, al igual que en el vector pQE, son construidas insertando el gen de interés en el sitio de clonado múltiple en fase con la proteína *tag* del vector pGEX. La expresión está bajo el control del promotor *laq*, conteniendo también un sitio de unión para el represor lac, lo que lo convierte en un sistema inducible, al igual que en el caso del vector pQE. El vector también contiene un gen *lacI^q* interno cuyo producto génico es la proteína represora que se une a la región operadora del promotor del gen manteniendo el sistema reprimido. Además, el vector contiene un sitio de clivaje con trombina lo que permite obtener la proteína recombinante sin la fusión GST.

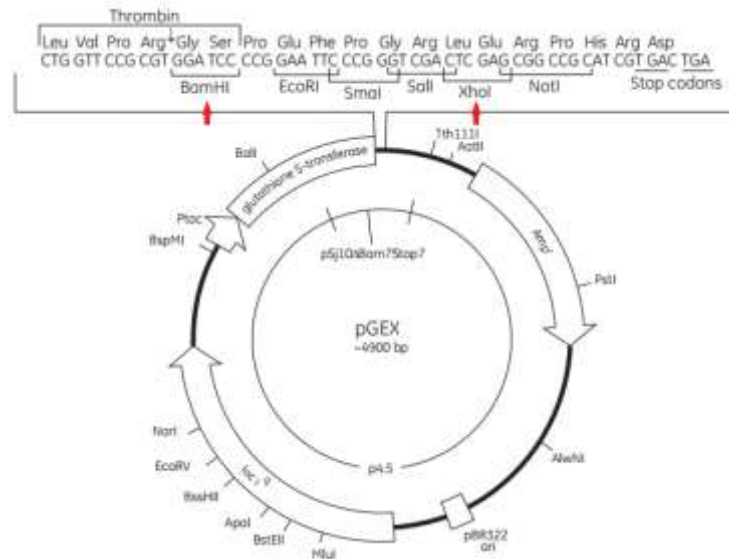


Figura 12. Mapa del vector de expresión pGex4T1 (*GE Healthcare*). Se muestran las principales características: el gen de resistencia a ampicilina, el gen de la *GST*, el promotor *taq* inducible por IPTG, el gen *lacI*, el sitio de replicación del plásmido y el sitio de clonado múltiple, donde se destacan los sitios BamH I y Xho I. Extraído de (*GE Healthcare Life Sciences*).

En ambos vectores la inducción de la expresión se llevó a cabo utilizando el inductor gratuito isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido o IPTG, de función análoga a la alolactosa: el IPTG se une al represor *lac*, inhibiendo su acción. Una vez que el represor es inactivado, la ARN polimerasa puede comenzar a transcribir las secuencias codificadas corriente abajo del promotor, en este caso FRD. Las proteínas de fusión se obtienen insertando la secuencia del gen a expresar en el sitio de clonado múltiple del vector de expresión en fase con una cola de histidinas o con la proteína *GST*.

5.3.4 Secuencias y análisis informático

Las secuencias genómicas de las tres isoformas de la enzima FRD de *T. cruzi* usadas en el presente trabajo se obtuvieron de la información disponible en la base de datos TriTrypDB (*Kinetoplastid Genomics Resource*) disponible en <http://tritrypdb.org/>. Se buscaron secuencias que fueran ortólogas a las FRD de *T. brucei*, parásito relacionado donde estas enzimas han sido descritas (Coustou, 2005). El análisis informático de las secuencias se realizó con el software BioEdit. Los alineamientos múltiples se realizaron con la herramienta *ClustalW* (Thompson, 1994). La búsqueda de motivos conservados se realizó usando la herramienta *Sequence Search* en el sitio de Pfam (<http://pfam.xfam.org/>). Las secuencias de localización mitocondrial se buscaron usando el software MitoProt II v1.101.

5.4 Clonado de las secuencias codificantes de FRD

5.4.1 Diseño de oligonucleótidos cebadores

Debido a que los tripanosomátidos no presentan intrones, se diseñaron cebadores específicos para el clonado de las tres isoformas de FRD a partir de sus secuencias genómicas. Los oligonucleótidos específicos fueron diseñados utilizando la herramienta OligoPerfect Designer de *Life Technologies*. Las propiedades fisicoquímicas, las posibles estructuras secundarias y heterodímeros no deseados, fueron evaluados mediante el uso de la herramienta OligoAnalyzer 3.1 de *Integrated DNA Technologies*, disponible en el sitio web <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>. A su vez, para clonar en los vectores de expresión se adicionó a los cebadores los sitios de restricción adecuados para permitir el clonado de los marcos abiertos de lectura de interés en fase en los distintos plásmidos. La Tabla 1 resume los nombres de los oligonucleótidos diseñados, así como también su secuencia y características.

Tabla 1. Detalle de los oligonucleótidos cebadores sintetizados. Se subrayan los sitios de restricción. FRD2 (TcCLB.503849.60), FRDm1 (TcCLB.508535.10) y FRDg (TcCLB.510215.10) hacen referencia a ortólogos de las proteínas en *T. brucei* (Números de acceso: AY880989, AY880988 y AF457132, respectivamente).

Nombre	Secuencia (5'-3')	Tamaño (pb)	Tm (°C)
FRD2_fw_BamHI	<u>GGA TCC</u> ATG CAG CCA CAA CGA GAC G	25	70.7
FRD2_rev_XhoI	CTC <u>GAG</u> CTA TTC TAC AGT CGC GAT GGT GG	29	73.3
FRD2_rev_KpnI	<u>GGT ACC</u> CTA TTC TAC AGT CGC GAT GGT GG	29	67.4
FRDm1_fw_BamHI	<u>GGA TCC</u> ATG AGG GGA CTG GAG CAC AC	26	72.6
FRDm1_rev_XhoI	CTC <u>GAG</u> TTA CAG TGC GGC TTG CAT G	25	69.1
FRDm1_rev_KpnI	<u>GGT ACC</u> TTA CAG TGC GGC TTG CAT G	25	71.0
FRDg_fw_BamHI	<u>GGA TCC</u> ATG ATT GGC AGG CTT CCA GTT	27	71.6
FRDg_rev_XhoI	CTC <u>GAG</u> TTA CAT CTT GGA TGA GTT CTG GGT TTC	33	72.7
FRDg_rev_KpnI	<u>GGT ACC</u> TTA CAT CTT GGA TGA GTT CTG GGT TTC	33	65.9

5.4.2 Extracción de ADN genómico de *T. cruzi*

Para la purificación de ADN genómico total de *T. cruzi* se utilizó el reactivo DNAzol (*Invitrogen*) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El ADN se resuspendió en agua destilada estéril y fue almacenado a -20°C hasta su utilización. La cuantificación del ADN obtenido se realizó con un espectrofotómetro de microvolúmenes (*ACTGene Asp-3700*).

5.4.3 Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las condiciones de PCR se pusieron a punto probando diferentes concentraciones de cebadores, diferentes temperaturas de hibridación y número de ciclos hasta llegar a optimizar el procedimiento. Dadas las dificultades que se fueron presentando para amplificar el gen para la FRD, se decidió emplear la ADN polimerasa KAPA HiFi HotStart (*KAPA Biosystems*). La misma es una ADN polimerasa de la familia B, con una alta procesividad intrínseca que resulta en una mejora significativa en el rendimiento, velocidad y sensibilidad en comparación con los tipos de ADN polimerasas de la familia B (*Biosystems*, 2013). Es una polimerasa de alta fidelidad (1 error por 3.6×10^6 nucleótidos incorporados), debido a que además de la actividad polimerasa $5' \rightarrow 3'$, presenta actividad exonucleasa (*proofreading*) $3' \rightarrow 5'$, que mejora notablemente la precisión durante la amplificación de ADN. De esta manera la fidelidad es aproximadamente 100 veces mayor que la *wild-type Taq* ADN polimerasa y 10 veces mayor que la otras ADN polimerasas de la familia B.

Para la amplificación de la secuencia FRD2 (TcCLB.503849.60) la combinación de cebadores empleada fue FRD2_fw_BamH I con FRD2_rev_Xho I o FRD2_rev_Kpn I, para clonar posteriormente en el vector de expresión pGEX4T1 o pQE-30, respectivamente (Figura 13). Como molde se usaron 50 ng de ADN genómico de CL Brener. Las condiciones de reacción y de ciclado para esta secuencia son especificadas en las Tablas 2 y 3.



Figura 13. Esquema del ensayo de PCR realizado. A partir del ADN genómico de *T. cruzi* de la cepa CL Brener se utilizaron cebadores específicos para amplificar el gen de interés; la flecha azul corresponde al cebador directo con el sitio de restricción BamH I adicionado y la flecha verde el cebador reverso con el sitio de restricción Xho I o Kpn I, según sea para el clonado posterior en pGEX4T1 o pQE-30.

Tabla 2. Concentraciones y volúmenes de los reactivos utilizados en las reacciones de PCR.

Reactivo	Concentración stock	Concentración final	Volumen (μL)
Buffer HiFi	5X	1X	10
HiFi Taq Pol	1 U/ μL	1 U/reacción	1
dNTPs	10 mM	0,3 mM	1.5
Cebador directo	10 μM	0,5 μM	2.5
Cebador reverso	10 μM	0,5 μM	2.5
ADN molde	50 ng/ μL	50 ng	1
Agua destilada	-	-	c.s.p 50 μL

Tabla 3. Características de ciclado optimizado para la reacción de PCR de la secuencia FRD2 con sitios de restricción BamH I y Xho I.

Etapas	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 min	1
Desnaturalización	98	20 seg	
Hibridación	62	15 seg	10
Extensión	72	90 seg	
Desnaturalización	98	20 seg	
Hibridación	65	15 seg	25
Extensión	72	60 seg	
Extensión final	72	5 min	1

5.4.4 Electroforesis en geles de agarosa

La visualización de ADN genómico, productos de PCR, ADN plasmídico y fragmentos de restricción se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa 1%. Los geles fueron preparados en tampón TAE 1X, el cual también fue utilizado como tampón de corrida. Las muestras se prepararon adicionando tampón de carga para ADN 1X. Las corridas electroforéticas se realizaron a intensidad de corriente constante de 8 V/cm de gel. Como marcador de peso molecular se empleó GeneRuler 1 Kb DNA Ladder (*Thermo Scientific*) (Figura 14). La visualización de ADN se realizó mediante tinción con Good View (*SBS Genetech*), alternativo al bromuro de etidio, y se observó en transiluminador de luz ultravioleta MacroVue 2011 LKB, con el programa Careastrem MI SE.

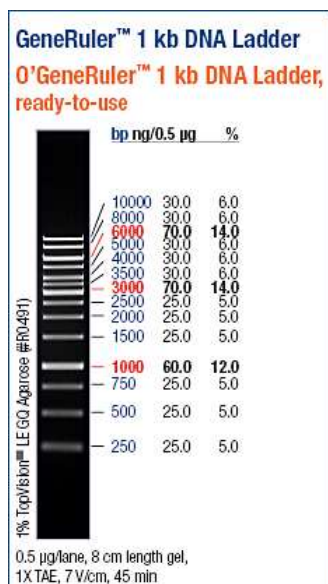


Figura 14. Marcador de peso molecular GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder 250 a 10000 pb empleado en las electroforesis en geles de agarosa 1%. Extraído de *Thermo Scientific*.

5.4.5 Purificación de ADN a partir de geles de agarosa

Los productos de amplificación obtenidos fueron purificados a partir de geles de agarosa mediante el kit comercial Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (*Zymo Research*) siguiendo instrucciones del comerciante. Brevemente, se incubó la porción de gel con 3 volúmenes de tampón de disolución de agarosa a 45°C por 5 minutos. Se lavó la columna dos veces con buffer de lavado y se eluyó el ADN en 10 µL de buffer de elución.

5.4.6 Cuantificación de ADN

La cuantificación de ácidos nucleicos se realizó midiendo la absorbancia a 260 nm utilizando un espectrofotómetro de microvolúmenes (*ACTGene Asp-3700*). Para determinar la pureza de la muestra se tuvo en cuenta el cociente Abs_{260}/Abs_{280} , considerando la muestra como pura cuando esta relación es mayor o igual a 1,8 por tratarse de ADN. Para determinar la integridad de los ácidos nucleicos se corrieron geles de agarosa.

5.4.7 Clonado en vector-T y selección de transformantes

Dado que la ADN polimerasa empleada para amplificar los genes para FRD no es una *Taq* polimerasa por lo que no posee actividad nucleótido terminal transferasa, para el clonado del marco abierto de lectura en vectores-T, al producto de PCR se le adicionó desoxinucleótidos de

adenina (dATP) en el extremo 3'OH. Para ello se incubó el producto de PCR obtenido con KAPA HiFi HotStart con una enzima *Taq* polimerasa (*Invitrogen*), la cual transfiere un nucleótido al 3'OH terminal del fragmento de ácido nucleico generado por PCR. Se adicionó entonces 1U de *Taq* polimerasa, 1X tampón de reacción, 1 mM de MgCl₂ y 0,1 mM de dATP. La reacción se realizó a 72°C con una duración de 10 minutos. Una vez adenilado el producto de PCR, se clonó en el vector pCR2.1-TOPO, haciendo reaccionar 4 µL de este producto, 1 µL de vector y 1 µL de solución salina, a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Como primer paso para seleccionar los clones transformantes se corroboró la presencia del inserto en las construcciones realizadas mediante digestión con enzimas de restricción. El análisis por patrones de digestión se realizó empleando las enzimas de restricción EcoR I y Stu I (*Thermo Scientific*) que liberan el inserto clonado generando bandas de 1000 y 1100 pb aproximadamente. EcoR I reconoce la secuencia 5'G↓AATTC3', mientras que Stu I reconoce 5'AGG↓CCT3'. Se usaron las unidades de enzima especificadas por el comerciante, definiéndose 1 unidad (U) de enzima de restricción como la cantidad de enzima necesaria para digerir 1 µg de ADN en 1 hora. Las mezclas de reacción se incubaron a la temperatura y tiempo recomendados por el fabricante. Particularmente, se realizaron digestiones con EcoR I y Stu I, en las condiciones especificadas en la Tabla 4, durante 1 hora a 37°C. Los plásmidos positivos por digestión y PCR fueron enviados a secuenciar para su confirmación.

Tabla 4. Concentraciones y volúmenes de los reactivos utilizados en la digestión con EcoR I y Stu I.

Reactivo	Concentración stock	Concentración final	Volumen (µL)
Enzima de restricción	1U/µL	1U	1
Buffer	10X	1X	5
ADN		≤1 µg	
Agua estéril	-	-	c.s.p. 50 µL

5.4.8 Clonado en vectores de expresión

Para el clonado en los vectores de expresión se realizó la digestión del vector pCR2.1-TOPO, conteniendo la secuencia codificante de la proteína en estudio con sitios de restricción compatibles con los vectores de expresión de destino. En el caso de pQE-30, se utilizaron los sitios BamH I y Kpn I, y para el vector pGEX4T1 se utilizaron BamH I y Xho I. En este caso, como se realizó una doble digestión, se empleó la herramienta DoubleDigest de *Thermo Scientific*,

disponible en el sitio web <http://www.thermoscientificbio.com/webtools/doubledigest> para seleccionar el tampón más adecuado para la reacción con dos enzimas. La enzima BamH I reconoce la secuencia 5'G↓GATCC3', Kpn I reconoce 5'GGTAC↓C3', mientras Xho I reconoce 5'C↓TCGAG3'. Se empleó la relación de unidades de enzima especificadas por el comerciante y se llevó a cabo la reacción en las condiciones especificadas en la Tabla 5, durante 1 hora a 37°C.

Tabla 5. Concentraciones y volúmenes de los reactivos utilizados en la doble digestión con BamH I y Xho I.

Reactivo	Concentración stock	Concentración final	Volumen (μL)
Enzima BamH I	1U/μL	1U	1
Enzima Kpn I o Xho I	1U/μL	2U	2
Buffer BamH I	10X	1X	5
ADN		≤1 μg	
Agua estéril	-	-	c.s.p. 50 μL

Una vez digeridos los vectores de expresión y el inserto correspondiente con las mismas enzimas, tanto los vectores linealizados como los insertos escindidos del vector pCR2.1TOPO se resolvieron en geles de agarosa, desde donde fueron purificados usando el Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (*Zymo Research*). Previo a la reacción de ligación se empleó una fosfatasa alcalina termosensible (FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase, *Thermo Scientific*), que desfosforila el extremo 5' de los vectores linealizados para evitar la recircularización de los mismos. Para ello se incubó el vector lineal con fosfatasa alcalina a 37°C durante 10 minutos, y luego se inactivó dicha enzima a 75°C por 5 minutos. Las reacciones de ligación de fragmentos de ADN se realizaron con la enzima T4 DNA ligasa (*Thermo Scientific*), procedente del bacteriófago T4. Esta enzima cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre los extremos 5'-fosfato y 3'-hidroxilo del ADN, pudiendo unir tanto extremos cohesivos como romos. Las concentraciones de inserto y vector a emplear fueron determinadas mediante la ecuación:

$$\text{ng de inserto} = \frac{(\text{ng de vector}) (\text{tamaño en pb de inserto}) (\text{Relación Molar Inserto : Vector})}{(\text{tamaño de vector en pb})}$$

La relación molar inserto:vector empleada fue 5:1. El volumen final fue de 20 μL en el tampón suministrado por el comerciante y se incubó durante 10 minutos a 22°C. Los productos de ligación fueron usados para transformar bacterias BL21 químicamente competentes.

5.4.9 Preparación de células competentes

Para la preparación de células químicamente competentes se usó el protocolo descrito por Ausubel (Ausubel, 1987). Brevemente, se inoculó 50 mL de medio LB con una colonia única y se crecieron las células 12 horas a 37°C. Posteriormente, se inoculó 4 mL del cultivo en 400 mL de medio LB, dejándose crecer a 37°C hasta una densidad óptica a 600 nm de 0,375 para después alicuotar el cultivo en 8 tubos de 50 mL y dejarse enfriar las células en hielo durante 10 minutos. Luego de centrifugar el cultivo (1600 g, 7 minutos), se resuspendieron las bacterias en 10 mL de solución de CaCl₂ y se dejaron en hielo 30 minutos. Finalmente, se volvió a centrifugar y a resuspender las bacterias en 2 mL de solución de CaCl₂ frío con 15% glicerol. Las bacterias competentes fueron alicuotadas de a 100 µL y guardadas a -80°C hasta su uso.

5.4.10 Transformación de bacterias *E. coli*

Para la transformación de bacterias competentes se sacaron 100 µL de células a -80°C y se dejaron descongelar en hielo 30 minutos. Se agregó ADN en una proporción menor a 25 µL de ADN por 100 µL de células. Se dejó 20 minutos en hielo y se dio un shock térmico de 90 segundos a 42°C. A continuación se colocó en hielo 1-2 minutos y se adicionó 4 volúmenes de LB a temperatura ambiente. Se dejó a 37°C durante una hora con agitación fuerte y se plaquearon 100 µL en agar LB-ampicilina.

5.4.11 Purificación de ADN plasmídico de bacterias

Se empleó el método de lisis alcalina en el cuál las células son lisadas en una solución de detergente a pH alcalino lo que provoca la desnaturalización del ADN. Posteriormente, la solución se neutraliza y el ADN plasmídico se renaturaliza por su pequeño tamaño y estructura y permanece en solución, mientras que el ADN genómico precipita junto al detergente y las proteínas. Brevemente, se cultivaron células conteniendo el plásmido de interés en medio líquido LB hasta la fase estacionaria. Se transfirió cada cultivo a un tubo eppendorf de 1,5 mL y se centrifugó por 30 segundos. El *pellet* se lavó con 1 mL de tampón SET y luego se resuspendió en 150 µL de dicho tampón. A continuación se agregó 50 µg de RNAsa A y luego de mezclar bien se agregó 350 µL de la mezcla lítica. Dicha solución alcalina, se neutralizó con 250 µL de acetato

de sodio 3 M, pH 4,8 y se agitó por inversión. Se colocó 30 minutos en hielo para precipitar el SDS y el ADN cromosómico, se centrifugó 20 minutos a 4°C y se guardó el sobrenadante conteniendo el ADN plasmídico. Al sobrenadante se le adicionó un volumen de isopropanol, se agitó por inversión, se dejó a temperatura ambiente por 15 minutos y se centrifugó 20 minutos. Se lavó el *pellet* con 200 µL de etanol 70%, se volvió a centrifugar por 5 minutos, se secó el *pellet* y finalmente se resuspendió en 40 µL de agua libre de nucleasas.

5.4.12 Secuenciación

La secuencia nucleotídica de todas las construcciones realizadas fue verificada por secuenciación capilar. La misma se realizó en el Servicio de Secuenciación de MacroGen, Korea, y las condiciones para la reacción de secuenciación fueron las requeridas por el servicio. Se secuenció automáticamente en ambas direcciones utilizando los cebadores M13 forward y M13 reverse o los cebadores específicos previamente sintetizados.

5.5 Análisis de proteínas

5.5.1 Expresión de proteínas recombinantes en bacterias

En primer lugar se realizó una expresión a pequeña escala para determinar las mejores condiciones de expresión de la proteína recombinante. Brevemente, se creció un precultivo de bacterias BL21 conteniendo el plásmido recombinante, a partir del cual se realizó una dilución 1/100 en 3 mL de medio selectivo LB ampicilina 100 µg/mL hasta una densidad óptica (DO) a 600 nm de ~0,6 con agitación. Luego se indujo la expresión de la proteína recombinante agregando distintas concentraciones de IPTG, durante distintos tiempos a diferentes temperaturas.

Luego de evaluar las condiciones de inducción que produjeron mayor cantidad de proteína recombinante soluble y menos degradada, se procedió a realizar la producción de proteína a mayor escala. Se creció un cultivo de 200 mL de LB ampicilina (100 µg/mL) a 37°C con agitación hasta la DO a 600 nm requerida y se indujo con IPTG por el tiempo y la temperatura que exhibieron los mejores resultados.

5.5.2 Obtención de extractos proteicos de *E. coli*

Los cultivos se centrifugaron a 7000 g, 10 minutos a 4°C para sedimentar las células, resuspendiendo en un volumen de PBS frío 1/20 del volumen del cultivo y se sonicaron en hielo. Luego de sonificado el cultivo, se suplementó con tritón 1% y se agitó durante 30 minutos en hielo para ayudar a la solubilización de la proteína. El lisado se centrifugó 45 minutos a 12000 g a 4°C, y se separó en dos fracciones: soluble (sobrenadante) e insoluble (*pellet*). La fracción insoluble fue resuspendida en distintas concentraciones de urea. El *pellet* de la mayor concentración de urea fue resuspendido en PBS 1X.

5.5.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La separación de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida o SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-PoliAcrilamide Gel Electrophoresis*). El tratamiento con SDS convierte las proteínas en poli-aniones cargados negativamente, para luego ser separadas en un campo eléctrico de acuerdo a su peso molecular. Los geles de poliacrilamida empleados fueron discontinuos, un gel concentrador y un gel separador. El gel concentrador se preparó con 5% de poliacrilamida, mientras que el gel separador se preparó con 10% o 12% de poliacrilamida. Se usó persulfato de amonio (APS) y N,N,N',N'-tetrametil etilendiamina (TEMED) como agentes polimerizantes. Las muestras se mezclaron con tampón de carga para SDS-PAGE 1X y se desnaturalizaron por calor a 100°C por 5 minutos. Un volumen de carga de 5 µL fue evaluado en los geles que se corrieron en tampón de corrida para SDS-PAGE 1X. Las corridas electroforéticas se realizaron a intensidad de corriente constante entre 100 y 150 V. Como marcador de peso molecular se empleó PageRuler Prestained Protein Ladder (*Thermo Scientific*) (Figura 15). El método de tinción de los geles fue azul de Coomassie. Este es un colorante que forma complejos fuertes no covalentes con las proteínas, y su incorporación es aproximadamente proporcional a la cantidad de proteínas. La tinción con Coomassie blue permite detectar bandas de hasta 100 ng de proteína. La tinción se realizó durante 1-4 horas y luego se decoloraron en Solución de destañido durante el mismo tiempo.

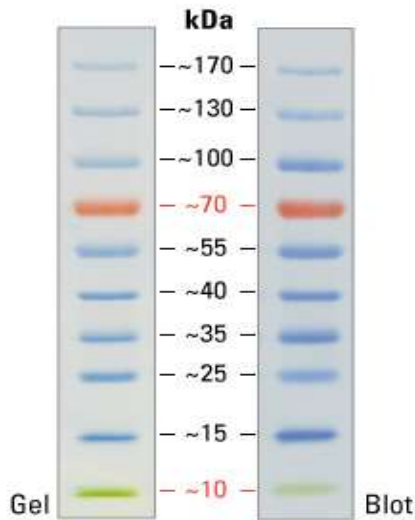


Figura 15. Marcador de peso molecular PageRuler Prestained Protein Ladder empleado en SDS-PAGE. Extraído de *Thermo Scientific*.

5.5.4 Western blot

La técnica de Western blot permitió verificar la presencia de la proteína recombinante FRD mediante un anticuerpo primario específico que reconoce el GST fusionado a la misma. Los extractos proteicos se transfirieron del gel, en el que fueron anteriormente separados de acuerdo a su peso molecular, hacia una membrana de nitrocelulosa Hybond C-Extra (*Amersham Bioscience*) sobre la cual se realizó la unión antígeno-anticuerpo. Se preparó el *cassette* con esponjas y papeles de filtro Whatman humedecidos en tampón de transferencia 1X, el gel y la membrana. Se colocó dentro de la cuba de transferencia, se cubrió con tampón de transferencia 1X y se realizó la transferencia O.N. a 15 mA. Al finalizar la transferencia, se tomó la membrana y se incubó en la solución de bloqueo durante 1 hora con agitación constante a temperatura ambiente. Se incubó la membrana con el anticuerpo primario α -GST Cabra policlonal conjugada a fosfatasa alcalina (*Thermo Scientific*) en dilución 1/1000 en tampón de bloqueo durante 1 hora con agitación constante a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con PBS-Tween 0,1% y se reveló con NBT (50 mg/mL en dimetilformamida 70%) y BCIP (50 mg/mL en dimetilformamida 100%) en Tampón AP.

5.5.5 Purificación por cromatografía de afinidad

La proteína de fusión con GST se purificó por cromatografía de afinidad usando columnas comerciales GST Fast Flow (*Amersham Bioisciences*), las cuales tienen glutatión inmovilizado en una matriz de Sefarosa. La columna se equilibró con 5 volúmenes de PBS 1X y se aplicó la muestra con un flujo constante de 0,5 mL/min. Luego se lavó con 10 volúmenes de PBS 1X con flujo de 1 mL/min. Finalmente, se eluyó la proteína por competencia con 5 volúmenes de glutatión reducido 10 mM en tampón Tris-HCl 50 mM.

5.5.6 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método de Bradford, usando el reactivo Bradford *ready-to-use* (*Fermentas*). El ensayo se basa en la formación de complejos entre el colorante Azul de Coomassie Brilliant G-250 y las proteínas en solución. Esta unión provoca un cambio en la absorción máxima del colorante de 465 nm a 595 nm. La concentración de la muestra de proteína es determinada por referencia a la absorción de una serie de diluciones estándar de Albúmina Bovina Sérica (BSA) ensayadas en paralelo (0,125–1 mg/mL). Brevemente, la muestra de proteína se mezcla con el reactivo a temperatura ambiente, se deja incubar 5 minutos y se mide la absorbancia de la solución a 595 nm, esta absorción se interpola en la curva de calibración realizada con BSA y obteniendo así la cantidad de proteína presente en la solución.

6. Resultados y discusión

6.1 Obtención de los marcos abiertos de lectura de las isoformas de FRD

Los marcos abiertos de lectura de las isoformas FRD2, FRDm1 y FRDg se obtuvieron de la información disponible en la base de datos TriTrypDB, mediante búsqueda por homología en el genoma completo de *T. cruzi* de la secuencia codificante para cada isoforma descrita en *T. brucei* (Números de acceso: AY880989, AY880988 y AF457132, respectivamente) (Coustou, 2005). La búsqueda en todos los casos reveló la presencia de tres secuencias codificantes de FRD putativas entre varios pseudogenes. Una de estas secuencias codificantes pertenecía a un alelo Non Esmeraldo-like de la cepa CL Brener, ubicada en el cromosoma 38-P, de 2370 pb y un peso molecular estimado de 85492 Da (Gene ID: TcCLB.503849.60), otra de las secuencias identificadas pertenecía al alelo Esmeraldo-like de CL Brener, ubicada en el cromosoma 38-S, de 3429 pb y 124798 Da (Gene ID: TcCLB.510215.10) y la última secuencia correspondía al alelo Esmeraldo-like de la cepa CL Brener, ubicada en el cromosoma 38-S, de 3648 pb y 132385 Da (Gene ID: TcCLB.508535.10) (Tabla 6). Para todas las secuencias se analizó la presencia de señal de localización mitocondrial usando el programa MitoProt II v1.101 (Anexo 9.6). La proteína codificada por el gen TcCLB.503849.60, presenta según la base de datos CDD (*Conserved Domain Database* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>) sólo dos de los dominios descritos para FRD (Figura 17) presentando homología con la proteína FRD2 de *T. brucei*. A diferencia de la FRD2 de *T. brucei*, la FRD2 de *T. cruzi* no presenta señal de localización mitocondrial. Vale destacar que si bien la proteína FRD2 de *T. brucei* presenta una señal de localización mitocondrial sugerida por el programa MitoProt II 1.0a4 (Coustou, 2005), dicha localización no fue verificada experimentalmente. La proteína codificada por el gen TcCLB.510215.10 no presenta señal de localización mitocondrial (Anexo 9.6) y presenta los tres dominios descritos para proteínas FRD (Figura 17), presentando homología con la isoforma FRDg de *T. brucei*. Finalmente, la proteína codificada por el gen TcCLB.508535.10 presenta señal de localización mitocondrial (Anexo 9.6) y los tres dominios descritos como en la FRDm de *T. brucei*, por lo que se determinó por homología que corresponde a la isoforma FRDm1.

Tabla 6. Características de las isoformas de FRD en *T. cruzi*. Se detalla Gene ID, su ortólogo en *T. brucei*, su tamaño en pares de bases y peso molecular.

Secuencia	Gene ID	Número de acceso GenBank del ortólogo en <i>T. brucei</i>	Pares de bases	Peso Molecular
FRD2	TcCLB.503849.60	AY880989	2370 pb	85492 Da
FRDm1	TcCLB.508535.10	AY880988	3648 pb	132385 Da
FRDg	TcCLB.510215.10	AF457132	3429 pb	124798 Da

Se realizaron alineamientos con el programa BioEdit para determinar el porcentaje de identidad y similitud entre las secuencias obtenidas en *T. cruzi* y las reportadas en *T. brucei*. Este análisis reveló que las proteínas entre estos tripanosomátidos presentan entre un 56 y un 73% de identidad (Tabla 7). Adicionalmente se alinearon las secuencias proteicas de las tres isoformas de *T. cruzi* y también el dominio fumarato reductasa de cada isoforma de *T. cruzi* (Figura 16). Los resultados muestran una alta identidad a nivel aminoacídico de este dominio, siendo la porción más conservada al presentar entre 79 y 98% de identidad, valores similares a los de las FRD de *T. brucei*. La secuencia completa presenta una identidad de entre casi 40 y 64%, valores sensiblemente menores a los de las FRD de *T. brucei*. Los resultados se detallan en la Tabla 7.

Tabla 7. Identidad y similitud entre las isoformas de FRD en *T. cruzi* y *T. brucei*, entre las isoformas de *T. cruzi* y entre el dominio fumarato reductasa de las isoformas de *T. cruzi*.

Identidad/Similitud de secuencias de FRD entre <i>T. brucei</i> y <i>T. cruzi</i>			
FRD <i>T. cruzi</i> vs. FRD <i>T. brucei</i>			
FRD2	0.562/0.699		
FRDg	0.728/0.851		
FRDm1	0.631/0.765		
Identidad/Similitud de secuencias de FRD en <i>T. cruzi</i>			
	FRD2	FRDg	FRDm1
FRD2	1	0.509/0.560	0.396/0.479
FRDg	0.509/0.560	1	0.644/0.743
FRDm1	0.396/0.479	0.644/0.743	1
Identidad/Similitud del dominio fumarato reductasa de FRD en <i>T. cruzi</i>			
	FRD2	FRDg	FRDm1
FRD2	1	0.983/0.994	0.791/0.854
FRDg	0.983/0.994	1	0.799/0.857
FRDm1	0.791/0.854	0.799/0.857	1

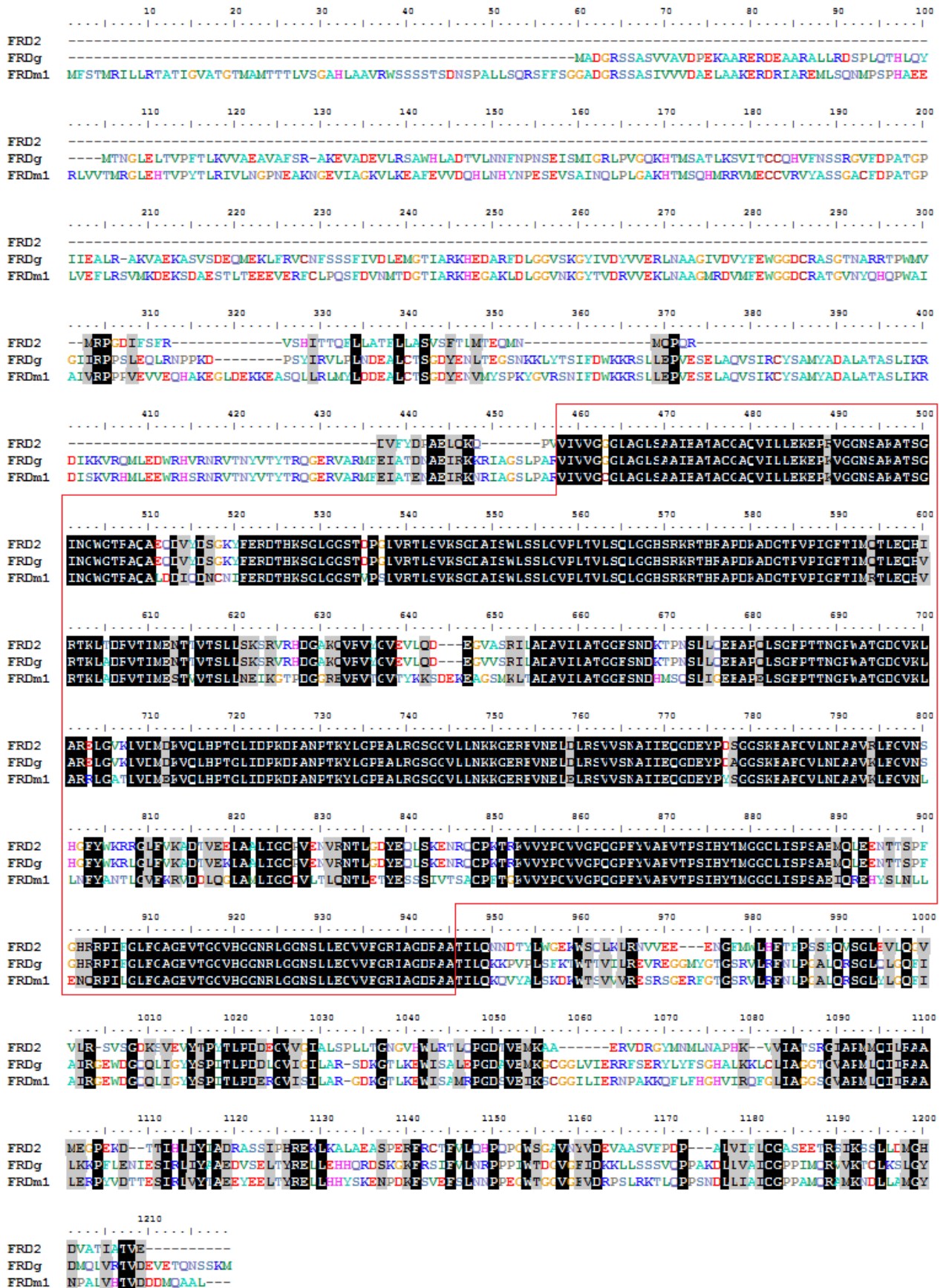


Figura 16. Alineamiento entre las secuencias aminoacídicas FRDg, FRDm1 y FRD2 de *T. cruzi*. En negro se muestran los aminoácidos idénticos en las tres isoformas y en gris los similares. Se recuadra en rojo el dominio fumarato reductasa.

Dado que existen errores de anotación en la base de datos utilizada, una vez obtenidas las secuencias del TritypDB, se recurrió al curado manual de las mismas, cotejando las secuencias anotadas con resultados experimentales disponibles de análisis genómicos masivos de transcriptómica y de *riboprinting* (Pastro, L., artículo en preparación; Smircich, P., sometido). En ambos casos se observó que la presencia de *reads* comenzaba varios pares de bases después del ATG del extremo 5' anotado, sugiriendo un error de anotación. Por esto, se decidió trabajar a partir de un ATG interno, a los 115, 316 y 286 pares de bases después del inicio anotado para FRD2, FRDm1 y FRDg, respectivamente, corroborando que el marco abierto de lectura se mantenía en fase y los dominios relevantes para la función FRD no eran afectados (Figura 17).

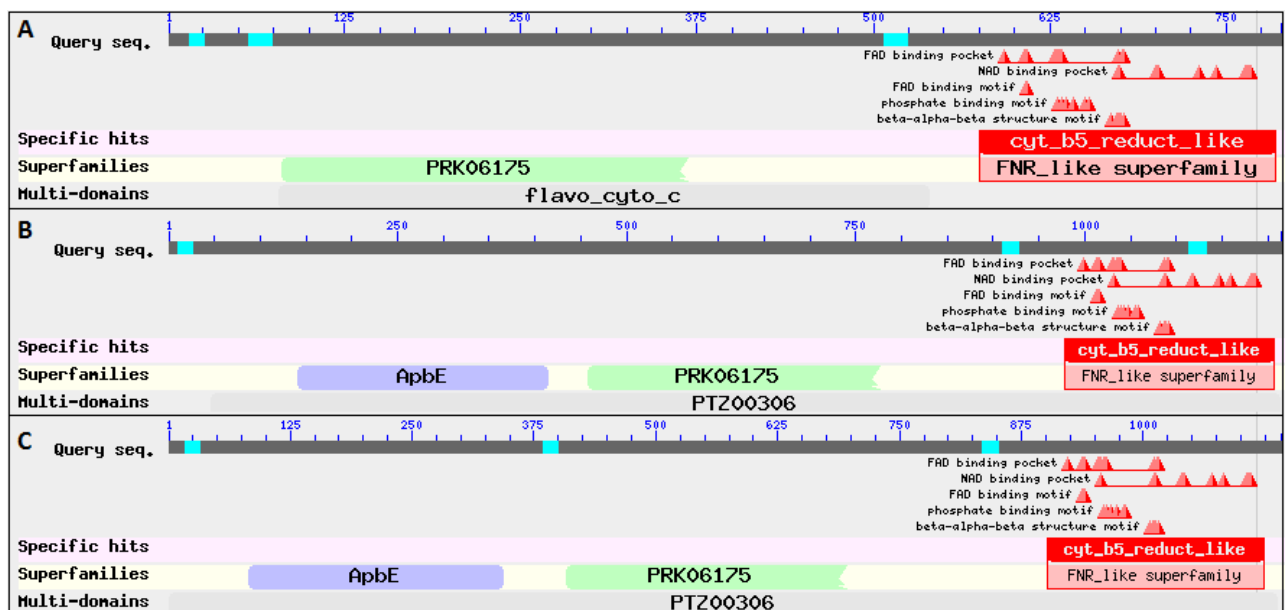


Figura 17. Salidas de Blast donde se observan los dominios y el sitio de unión a NAD de cada isoforma de FRD. **A.** Gene ID: TcCLB.503849.60 (FRD2). **B.** Gene ID: TcCLB.508535.10 (FRDm1). **C.** Gene ID: TcCLB.510215.10 (FRDg). FRDg y FRDm1 presentan tres dominios: uno N-terminal que es homólogo a las proteínas ApbE (en lila), un dominio central PRK06175 presente en las fumarato reductasas (en verde) y un dominio C-terminal, homólogo a las citocromo b5 reductasas (en rojo). FRD2 sólo presenta dos dominios, el central y el C-terminal.

6.2 Amplificación y clonado de las secuencias FRD

El gen que codifica para la isoforma FRDm1 se logró amplificar por PCR, pero en presencia de otras bandas mayoritarias, por lo que la reacción debe continuar siendo optimizada. En el caso del gen codificante para la isoforma FRDg la reacción de PCR no ha amplificado el fragmento esperado.

El marco abierto de lectura de la isoforma de FRD2 fue amplificado por PCR directamente del ADN genómico de CL Brener debido a que en *T. cruzi* los genes no poseen intrones. Se realizaron reacciones de PCR usando cebadores con los adaptadores adecuados compatibles para el clonado posterior en los vectores de expresión (Tabla 1). La optimización de la PCR resultó en el uso de casi el doble de la concentración recomendada de los cebadores para la amplificación con la HiFi Polimerasa (0,5 μ M en lugar de 0,3 μ M, Tabla 2) (*Biosystems, 2013*) y en el empleo de dos ciclos consecutivos de amplificación, el segundo con una temperatura de hibridación más rigurosa que el primero (Tabla 3). El amplicón esperado para la reacción era de ~2200 pb. En la Figura 18 se muestra el resultado del PCR visualizado en un gel de agarosa 1%.

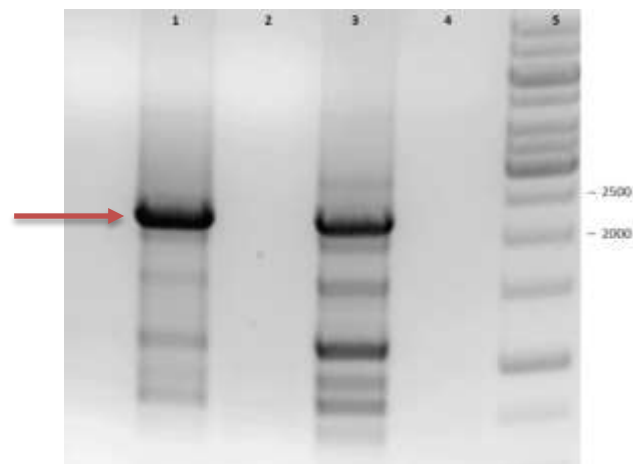


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa 1%. Carril 1: Producto de PCR de la secuencia FRD2 con adaptadores BamH I y Xho I para clonar en el vector de expresión pGEX4T1. Carril 3: Producto de PCR de la secuencia FRD2 con adaptadores BamH I y Kpn I para clonar en el vector de expresión pQE-30. Carriles 2 y 4: controles negativos sin ADN molde de carriles 1 y 3, respectivamente. Carril 5: Marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (*Thermo Scientific*). Se señala con una flecha roja el producto mayoritario de tamaño esperado.

Luego de ensayar diferentes temperaturas, tiempos de hibridación y concentración de los oligonucleótidos cebadores no fue posible obtener una única banda específica como producto de la reacción de PCR. La presencia de bandas inespecíficas en la reacción de PCR a partir de ADN genómico podría deberse a que en el genoma de *T. cruzi* se encuentran varios pseudogenes de

FRD. El uso de ADNc como molde de la reacción de PCR tampoco mejoró el resultado de la reacción de PCR, esto podría deberse al hecho de que la transcripción es policistronica y la regulación de la expresión génica en estos parásitos es post-transcripcional, por tanto el uso de ADNc no previene en gran medida la amplificación de estos posibles pseudogenes. De todas maneras, los controles fueron exitosos y no se observa amplificación en los controles sin ADN, por lo que se procedió a purificar del gel la banda mayoritaria de peso molecular esperado (Figura 18). Estos fragmentos fueron luego adenilados y clonados en el vector pCR2.1-TOPO, generando la construcción plasmídica que se esquematiza en la Figura 19. Con ello se transformaron bacterias quimiocompetentes XL1-Blue, a partir de las cuales se aisló el plásmido por el método de lisis alcalina.



Figura 19. **A.** Mapa del vector pCR2.1-TOPO con el marco abierto de lectura de la isoforma FRD2 clonado representado en rojo. Se muestran los sitios de restricción relevantes en la verificación del plásmido y para el posterior clonado en los vectores de expresión. **B.** Secuencia aminoacídica de la isoforma FRD2 clonada, se muestra en rojo la porción N-terminal no incluida en la construcción.

La presencia del inserto en el vector-T se comprobó por PCR, por patrones de digestión y secuenciación. La PCR se realizó usando el ADN plasmídico como molde, y se obtuvo un producto de amplificación con el tamaño de banda esperado (~2200 pb) usando los mismos cebadores con los que se amplificó desde el ADN genómico, en iguales condiciones de amplificación (Figura 20).

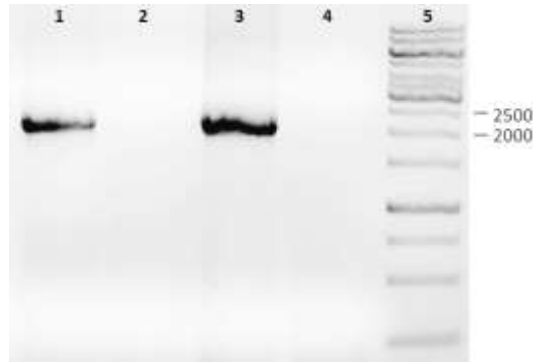


Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa 1%. Carril 1: Producto de PCR sobre el plásmido pCR2.1-TOPO-FRD2 con adaptadores BamH I y Xho I. Carril 3: Producto de PCR sobre el plásmido pCR2.1-TOPO-FRD2 con adaptadores BamH I y Kpn I. Carriles 2 y 4: Controles negativos sin ADN de carriles 1 y 3, respectivamente. Carril 5: Marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (*Thermo Scientific*).

El análisis por patrones de digestión se realizó empleando las enzimas de restricción EcoR I y Stu I. El vector-T empleado tiene dos sitios de restricción para EcoR I que liberan el inserto del vector. Adicionalmente, el inserto posee un sitio para esta enzima que lo divide en dos fragmentos del mismo tamaño aproximadamente (Figura 19). De esta manera, el patrón de restricción esperado es una banda de ~3.9 kb perteneciente al vector linealizado y dos fragmentos de ~1.1 y ~1 kb, correspondientes al inserto escindido. Por su parte, el vector no tiene sitio de restricción Stu I, pero si lo tiene el inserto como se observa en la Figura 19, por lo que el corte con esta enzima linealiza el vector con el inserto, lo cual se estima se ubica en los ~6 kb. De esta manera se confirma no sólo la presencia de inserto del tamaño esperado, sino también la identidad del inserto debido a la presencia del sitio Stu I. Estos patrones de restricción esperados se observan en la Figura 21.

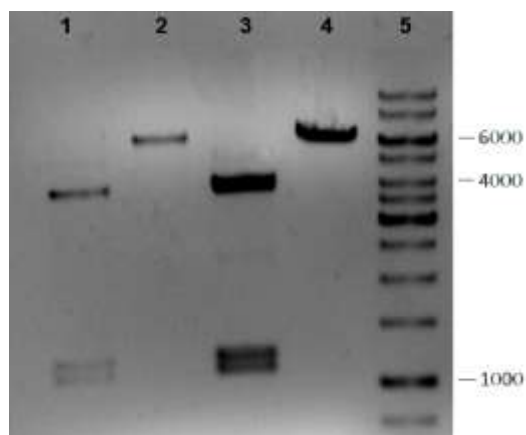


Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa 1%. Digestión del plásmido pCR2.1-TOPO-FRD2 con adaptadores BamH I y Xho I. Carril 1: EcoR I. Carril 2: Stu I. Digestión del plásmido pCR2.1-TOPO-FRD2 con adaptadores BamH I y Kpn I. Carril 3: EcoR I. Carril 4: StuI. Carril 5: Marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (*Thermo Scientific*).

Finalmente, los clones verificados por PCR y digestión fueron secuenciados para confirmar que el marco abierto de lectura clonado pertenece a la FRD y que no hay mutaciones ni codones *stop* en el mismo. En la Figura 22 se observa parcialmente el cromatograma proveniente de la secuenciación de las porciones 5' y 3' del gen FRD2 clonado en vector-T. Puede observarse parte de la secuencia del mismo, los cebadores con los sitios de restricción adicionados para el clonado en fase en los vectores de expresión y parte de la secuencia de FRD2. En el anexo 9.4 pueden observarse las salidas de *Blast* realizadas con las secuenciaciones, si bien no se logró la secuenciación completa por lo extenso del fragmento y la falta de cebadores internos, se evidencia la alta fidelidad de la polimerasa empleada dado el alto porcentaje de identidad y la ausencia de *gaps* entre la secuencia FRD2 anotada y la amplificada y clonada en este trabajo.

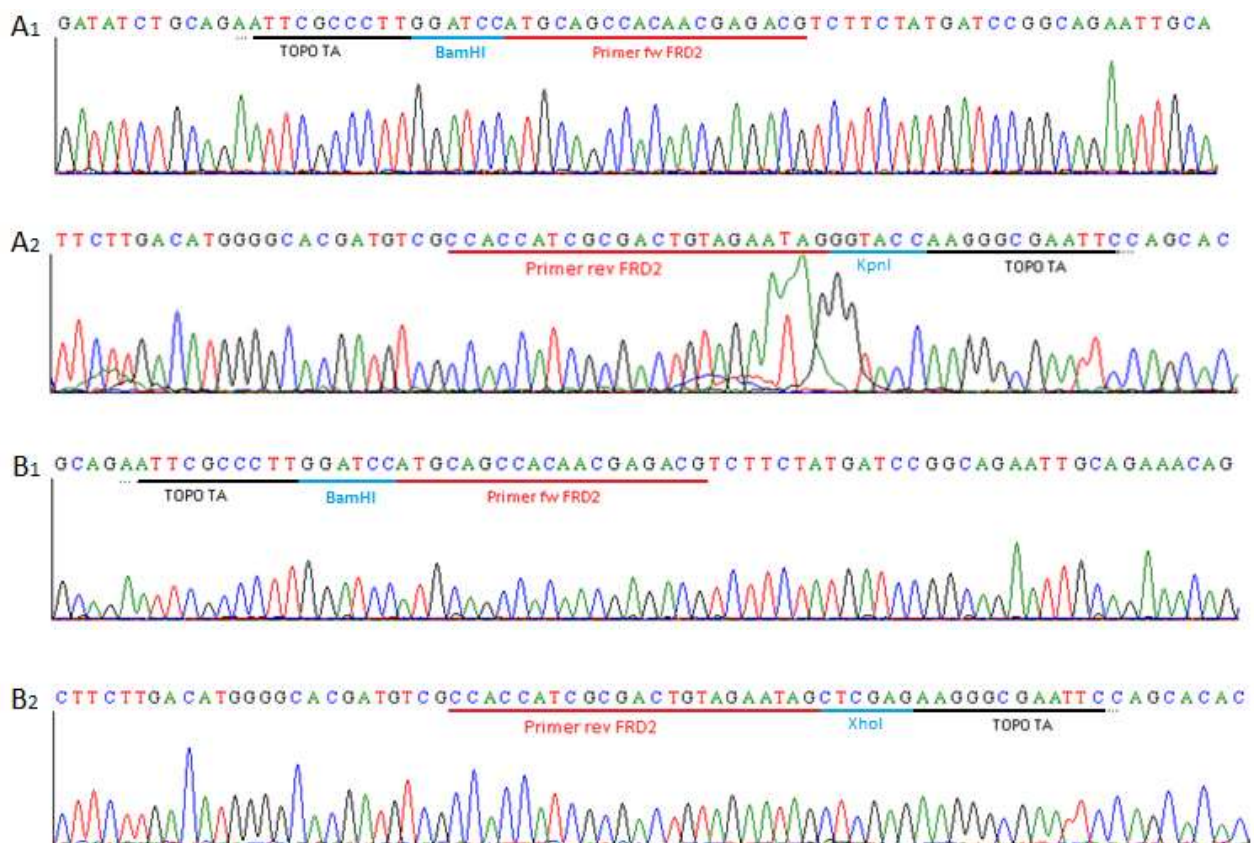


Figura 22. Cromatograma obtenido de la secuenciación de los marcos abiertos de lectura de FRD2. **Paneles A.** Secuenciación de FRD2 para la clonación en el vector de expresión pQE-30. **A1.** Se observa parte de la secuencia del vector-T, el sitio BamH I adicionado al cebador, el primer directo con el codón de inicio (ATG) y la porción 5' del gen FRD2. **A2.** Se observa la porción 3' de la secuencia de FRD2, el primer reverso con el codón *stop* (TAG), el sitio Kpn I adicionado al cebador, y parte de la secuencia del vector-T. **Paneles B.** Secuenciación de FRD2 para la clonación en el vector de expresión pGEX4T1. **B1.** Se observa parte de la secuencia del vector-T, el sitio BamH I adicionado al cebador, el primer directo con el codón de inicio (ATG) y la porción 5' del gen FRD2. **B2.** Se observa la porción 3' de la secuencia de FRD2, el primer reverso con el codón *stop* (TAG), el sitio Xho I adicionado al cebador, y parte de la secuencia del vector-T.

Una vez verificados los marcos abiertos de lectura clonados en el vector-T, se procedió a la escisión del inserto con las enzimas de restricción compatibles con los vectores de expresión: BamH I y Xho I para clonar en el vector pGEX4T1, y BamH I y Kpn I para clonar en el vector pQE-30. Las mismas enzimas se usaron para digerir estos vectores de expresión permitiendo así un clonado direccional en fase. En la Figura 23 A. se observa en un gel de agarosa 1% los fragmentos correspondientes al gen escindido con BamH I y Kpn I del vector-T (Carril 1, flecha roja); y al vector de expresión pQE-30 linealizado con las mismas enzimas de restricción (Carril 2, flecha verde). En la Figura 23 B. se observan los fragmentos correspondientes al gen escindido con BamH I y Xho I del vector-T (Carril 1, flecha roja) y al vector de expresión pGEX4T1 linealizado con las mismas enzimas de restricción (Carril 2, flecha verde).

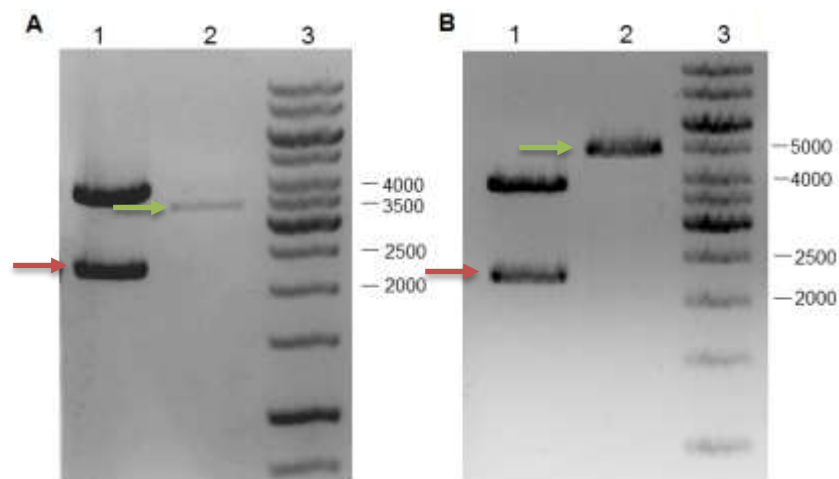


Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa 1%. **A.** Carril 1: Doble digestión del vector pCR2.1-TOPO-FRD2 con BamH I y Kpn I. Carril 2: Doble digestión del vector de expresión pQE-30 con BamH I y Kpn I. Carril 3: Marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (*Thermo Scientific*). **B.** Carril 1: Doble digestión del vector pCR2.1-TOPO-FRD2 con BamH I y Xho I. Carril 2: Doble digestión del vector de expresión pGEX4T1 con BamH I y Xho I. Carril 3: Marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (*Thermo Scientific*).

El vector de expresión lineal una vez purificado del gel fue desfosforilado con una fosfatasa alcalina termosensible, a fin de evitar su recircularización y luego fueron ligados vector e inserto usando la enzima T4 DNA ligasa. La mezcla de ligación se usó para transformar células quimiocompetentes BL21 Star (DE3)pLysS de *E. coli* y los plásmidos se aislaron por el método de lisis alcalina. Se realizaron nuevamente ensayos de PCR y digestión para confirmar la presencia del inserto y se envió a secuenciar. La secuenciación de pQE-30 no arrojó resultados concluyentes ya que falló la reacción de secuenciación. En el caso de pGEX4T1, la secuenciación fue parcial dado que en el laboratorio no contamos con cebadores del vector, así como tampoco contamos con cebadores reversos específicos que hibriden cerca del inicio de la secuencia de

interés, por lo que la secuenciación se realizó con los cebadores directos y reversos diseñados para la PCR inicial. El cromatograma no muestra el ATG inicial, por lo que para ambos vectores, la confirmación de que el inserto está en fase se realizó indirectamente. Primero se realizó un análisis teórico para estimar el tamaño de la proteína que se obtendría con los distintos marcos abiertos de lectura y luego se realizó un ensayo de expresión a pequeña escala. Como se observa en la Figura 24, si el marco abierto de lectura no está en fase se obtendrían proteínas truncadas, de unos pocos aminoácidos y no la proteína de peso molecular de 110 kDa esperada.

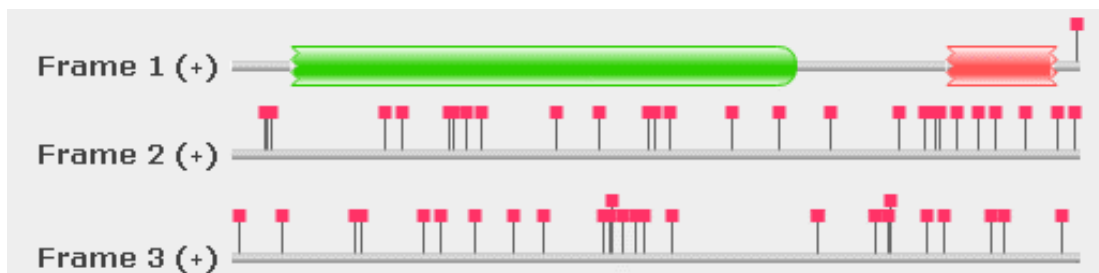


Figura 24. Salida de Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) de los marcos abiertos de lectura posibles de la secuencia FRD2. Los cuadrados rojos indican la presencia de codones *stop*.

El ensayo de expresión a pequeña escala se realizó con un cultivo de 3 mL de bacterias de la cepa BL21 Star (DE3)pLysS de *E. coli* transformadas con los vectores de expresión generados a fin de comprobar la correcta expresión de la proteína recombinante. La inducción de la proteína FRD2 recombinante se realizó a 37°C, con 0,1 mM de IPTG por 2 y 4 horas. Luego de esto las bacterias fueron colectadas y lisadas por el agregado de Tampón de carga para SDS-PAGE 1X e incubando a 95°C durante 5 minutos. Los extractos proteicos totales de los cultivos sin inducir e inducidos fueron corridos en un gel discontinuo de poliacrilamida 12% que fue teñido con Azul de Coomassie para su visualización. El resultado de estas inducciones se observa en la Figura 25.

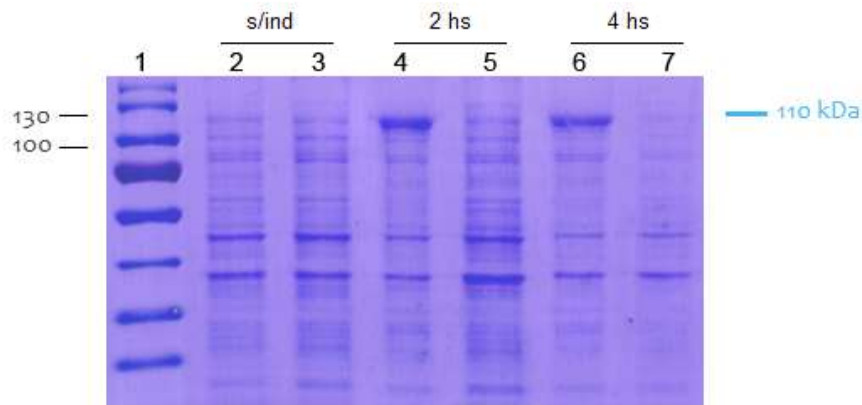


Figura 25. SDS-PAGE (12%) de los extractos proteicos totales correspondientes a las inducciones de la expresión de la proteína de fusión en bacterias *E. coli* de la cepa BL21 Star (DE3)pLysS transformadas con los vectores de expresión generados. Carril 1: Marcador de peso molecular PageRuler Prestained Protein Ladder (*Thermo Scientific*). Carriles 2 y 3: Controles sin inducir de los vectores pGEX4T1 y pQE-30, respectivamente. Carriles 4 y 5: Inducción de los vectores pGEX4T1 y pQE-30 con 0,1 mM de IPTG, a 37°C, por 2 horas, respectivamente. Carriles 6 y 7: Inducción de los vectores pGEX4T1 y pQE-30 con 0,1 mM de IPTG, 37°C, por 4 horas, respectivamente.

En el gel de poliacrilamida se aprecia la sobreexpresión de la proteína recombinante a partir del vector de expresión pGEX4T1, con un peso molecular de aproximadamente 110 kDa, tamaño esperado dado que el *tag* GST le añade 25 kDa a los 85 kDa predictivos de la proteína FRD2. Estos resultados estimularon la puesta a punto de la expresión de la proteína recombinante, dado que validaron el clonado en fase de FRD2 en dicho vector de expresión. En el caso del vector pQE-30 no se observa sobreexpresión de la proteína recombinante, lo que indicaría la incorporación de codones *stop* en la secuencia o que el marco abierto de lectura no quedó clonado en fase, por lo que se siguió adelante únicamente con el vector que expresa FRD2 fusionada a GST.

6.3 Expresión de FRD2 recombinante

A partir de bacterias BL21 Star (DE3)pLysS transformadas con el vector pGEX4T1 conteniendo la FRD2, se procedió a ensayar las condiciones de expresión óptimas para obtener la proteína recombinante soluble fusionada a GST. Los parámetros más influyentes a tener en cuenta para poner a punto la expresión de una proteína recombinante son la concentración de IPTG, la temperatura y el tiempo de inducción. Para determinar si la concentración de IPTG generaba una expresión considerablemente diferente en la sobreexpresión de la proteína recombinante se realizó una prueba de expresión a pequeña escala con distintas concentraciones del mismo. El ensayo se realizó con un cultivo de 3 mL, durante 6 horas a 30°C y se emplearon tres concentraciones de IPTG: 0,1, 0,5 Y 1 mM (Figura 26).

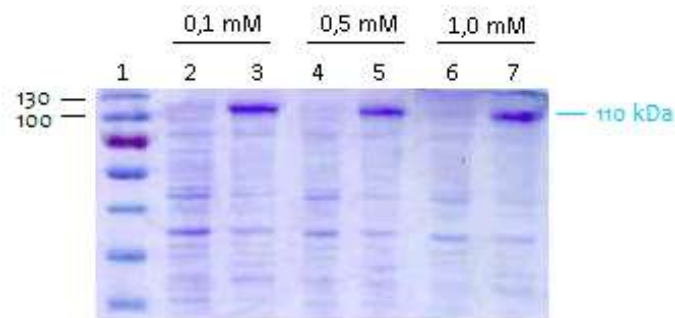


Figura 26. SDS-PAGE (12%) donde se observa la fracción total de la inducción del vector pGEX4T1 a 30°C, durante 6 horas, en 3mL de cultivo con 0,1, 0,5 y 1 mM de IPTG en carriles 3, 5 y 7, respectivamente. Carril 1: Marcador de peso molecular PageRuler Prestained Protein Ladder (*Thermo Scientific*). Carriles 2, 4 y 6: Control sin inducir de carriles 3, 5 y 7, respectivamente.

Como se observa en la Figura 26, las concentraciones de IPTG no generan una expresión significativamente diferente de la proteína recombinante. Se decidió entonces continuar los ensayos con la concentración más baja del inductor, dado que se ha encontrado que las células fuertemente inducidas presentan un comportamiento indeseable como crecimiento lento, eventual detención del crecimiento y producción de proteínas insolubles por la formación de agregados insolubles o cuerpos de inclusión, así como un crecimiento retardado como consecuencia del desvío del metabolismo celular hacia procesos de producción del ADN plasmídico y expresión de la proteína recombinante (Lee, 2008). Se continuó entonces la puesta a punto de la expresión de FRD recombinante induciendo con 0,1 mM de IPTG variando temperatura y tiempo de inducción a fin de encontrar las mejores condiciones de expresión de proteína.

Se realizaron inducciones a 37°C durante 2, 4 y 6 horas, con 0,1 mM de IPTG, en un cultivo de 3 mL con una DO_{595} de ~0,6, este valor de densidad celular asegura condiciones metabólicas favorables como el alto contenido de ribosomas, mayor disponibilidad de nutrientes y menor concentración de subproductos tóxicos. Para obtener información acerca de la solubilidad de la proteína se separó la fracción soluble de la insoluble del extracto total de proteínas, las cuales fueron incluidas en el gel de poliacrilamida (Figura 27).

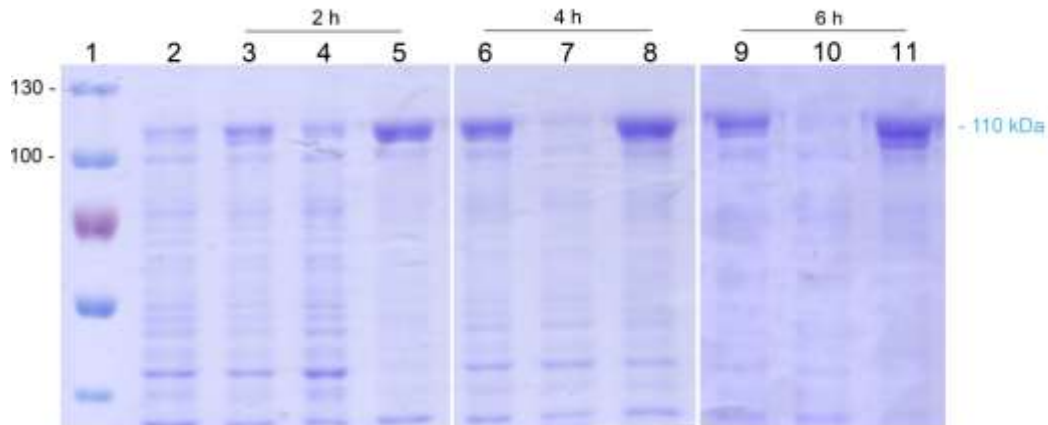


Figura 27. SDS-PAGE (10%) donde se observa la inducción del vector pGEX4T1 a 37°C, durante 2, 4 y 6 horas, en 3 mL de cultivo con 0,1 mM de IPTG. Carril 1: Marcador de peso molecular PageRuler Prestained Protein Ladder (*Thermo Scientific*). Carril 2: Control sin inducir. Carriles 3, 6 y 9: Fracción total de la inducción por 2, 4 y 6 horas, respectivamente. Carriles 4, 7 y 10: Fracción soluble de la inducción por 2, 4 y 6 horas, respectivamente. Carriles 5, 8 y 11: Fracción insoluble de la inducción durante por 2, 4 y 6, respectivamente.

En la Figura 27 se observa que si bien en las inducciones a 37°C durante 2, 4 y 6 horas se observa un buen nivel de expresión de la proteína recombinante, la misma aparece mayoritariamente en la fracción insoluble (Figura 27 carriles 5, 8 y 11). Dado que se realizó el ensayo a tres tiempos de inducción diferentes sin la obtención de la proteína soluble en estas condiciones, se decidió variar otro parámetro: la temperatura de inducción. El uso de temperaturas inferiores a la del crecimiento óptimo, en algunos casos puede reducir respuestas metabólicas indeseables para la síntesis de proteínas recombinantes y, como consecuencia, mejorar el rendimiento y/o la solubilidad de la proteína de interés, posiblemente por la reducción de la velocidad de la tasa de traducción de las proteínas en cuestión, lo cual podría incidir en el correcto plegamiento. Se ha demostrado además, que la sobreproducción de proteínas recombinantes en *E. coli* a 37°C induce a la formación de cuerpos de inclusión, mientras que a bajas temperaturas se genera un incremento en el plegamiento correcto de las proteínas producidas y la ubicación en los compartimentos deseados (Chen, 2003). Se realizaron

entonces inducciones a 30°C durante 4 y 6 horas con 0,1 mM de IPTG, en un cultivo de 3 mL partiendo de una DO_{595} de 0,6 (Figura 28).

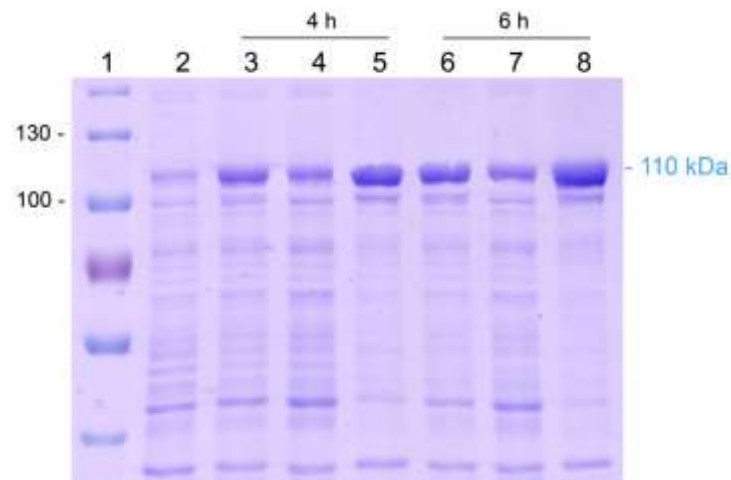


Figura 28. SDS-PAGE (10%) donde se observa la inducción de la expresión de la FRD2 a partir del vector pGEX4T1 a 30°C, durante 4 y 6 horas, en 3 mL de cultivo con 0,1 mM de IPTG. Carril 1: Marcador de peso molecular PageRuler Prestained Protein Ladder (*Thermo Scientific*). Carriles 2: Control sin inducir. Carriles 3 y 6: Fracción total de la inducción por 4 y 6 horas, respectivamente. Carriles 4 y 7: Fracción soluble de la inducción durante 4 y 6 horas, respectivamente. Carril 5 y 8: Fracción insoluble de la inducción durante 4 y 6 horas, respectivamente.

En la Figura 28 se observa que en las inducciones a 30°C durante 4 y 6 horas la fracción insoluble de la proteína recombinante aparenta ser proporcionalmente mayor a la fracción soluble, aunque se observa un aumento de la proteína en la fracción soluble con respecto a las inducciones realizadas a 37°C (Figura 27). A pesar de que una parte considerable de la proteína recombinante aún se expresa en forma insoluble, decidimos igualmente purificar la FRD presente en la fracción soluble obtenida en estas condiciones (inducción a 30°C con 0,1 mM de IPTG durante 4 horas) dado que no pudimos encontrar un mejor escenario de expresión de FRD en forma soluble. Antes de proceder a realizar la expresión en un cultivo a mayor escala para obtener mayores cantidades de proteína recombinante para purificar, se confirmó la identidad de la proteína obtenida realizando un *western blot* utilizando anticuerpos monoclonales α -GST, esperándose una banda de 110 kDa correspondiente a la proteína FRD recombinante fusionada a GST (Figura 29).

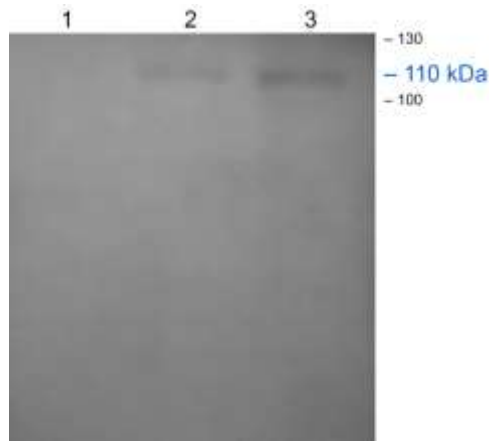


Figura 29. Western blot con anticuerpo α -GST contra el producto de inducción del vector pGEX4T1 con 0,1 mM de IPTG durante 4 horas a 30°C. Carril 1: Control sin inducir. Carril 2: Fracción soluble. Carril 3: Fracción insoluble.

El *western blot* realizado permitió confirmar que la proteína expresada corresponde a la proteína de fusión con GST. El resultado obtenido confirmó que la proteína de fusión se expresa también en forma soluble, aunque no lo hace en grandes cantidades. Este ensayo, debido a su mayor sensibilidad permitió establecer también que no hay expresión basal de la proteína recombinante en el cultivo sin inducir y que la proteína de fusión no está siendo degradada al no observarse señales de un peso molecular menor al esperado.

Una vez confirmada la identidad de la proteína recombinante, se llevó a cabo su expresión a mayor escala en un cultivo de 200 mL con las condiciones determinadas en el ensayo a pequeña escala (Figura 30). En este caso además de determinar si la proteína se expresaba soluble o insoluble se analizó su grado de insolubilidad, al intentar solubilizar la proteína recombinante con urea 2, 4, 6 y 8 M, un agente desnaturizante empleado comúnmente para solubilizar proteínas expresadas en cuerpos de inclusión, al promover la disrupción de interacciones intermoleculares y el desdoblamiento completo de la proteína (Middelberg, 2002).

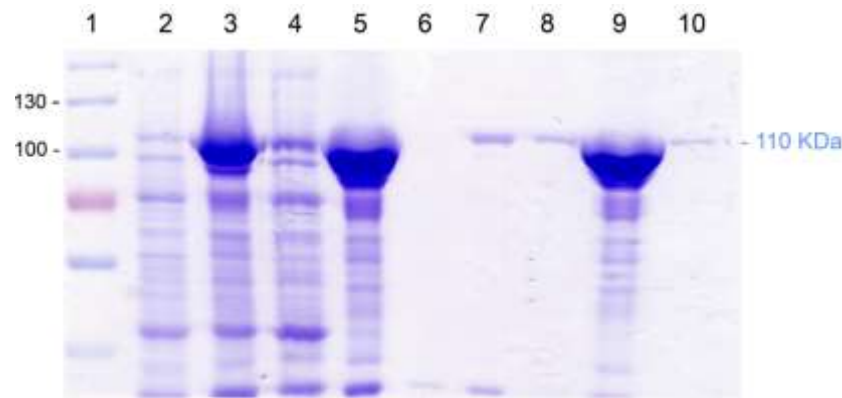


Figura 30. SDS-PAGE (10%) donde se observa la inducción del vector pGEX4T1 a 30°C, en 200 mL de cultivo con 0,1 mM de IPTG, durante 4 horas. Carril 1: Marcador de peso molecular PageRuler Prestained Protein Ladder (*Thermo Scientific*). Carril 2: Control sin inducir. Carril 3: Fracción total de la inducción. Carril 4: Fracción soluble. Carril 5: Fracción insoluble. Carril 6: Fracción soluble en urea 2 M. Carril 7: Fracción soluble en urea 4 M. Carril 8: Fracción soluble en urea 6 M. Carril 9: Fracción soluble en urea 8 M. Carril 10: *Pellet* insoluble en urea 8 M.

Como se observa en la Figura 30, la fracción insoluble es mayoritaria, y se consiguió su solubilización parcial a partir de urea 4 M, aunque la mayor solubilización se logra con urea 8 M. Esta proteína solubilizada en urea podría ser purificada luego de realizar con ella procedimientos de *refolding* para intentar solubilizarla (Singh, 2005). Sin embargo, eso no garantiza su correcto plegamiento ni que presente actividad enzimática, por lo que en lugar de realizar este procedimiento se optó por intentar realizar una purificación de la proteína soluble obtenida.

6.4 Purificación por cromatografía de afinidad

La purificación de la proteína de fusión con GST se realizó por cromatografía de afinidad usando columnas comerciales de 1 mL de glutatión inmovilizado en una matriz de Sefarosa (GST Trap FF Sepharose). Luego de equilibrada la columna se aplicó la muestra y se recuperó el *flow through*, así como el posterior lavado como controles del proceso de purificación. La proteína fue eluída por competencia con glutatión reducido y se recuperaron fracciones de eluato de 1 mL. Todas las fracciones colectadas fueron evaluadas en un gel de poliacrilamida 10% (Figura 31).

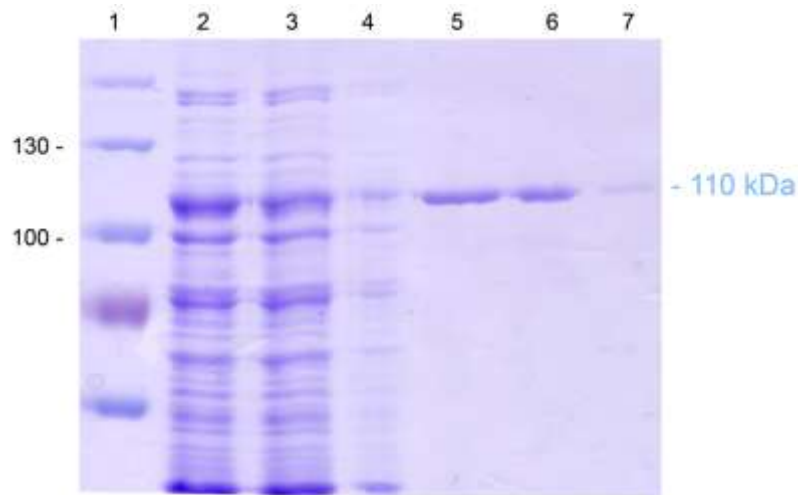


Figura 31. SDS-PAGE (10%) donde se observa la purificación de la fracción soluble de la inducción del vector pGEX4T1 a 30°C, en 200 mL de cultivo con 0,1 mM de IPTG, durante 4 horas. Carril 1: Marcador de peso molecular PageRuler Prestained Protein Ladder (*Thermo Scientific*). Carril 2: Fracción soluble total. Carril 3: *Flow through*. Carril 4: Lavado con PBS 1X. Carril 5: Eluato 1. Carril 6: Eluato 2. Carril 7: Eluato 3.

La purificación por cromatografía de afinidad permitió la obtención de la proteína recombinante soluble, íntegra y pura en las primeras dos fracciones eluadas, mayoritariamente. El *flow through* y el lavado recuperados muestran que si bien no toda la proteína de interés fue retenida en la columna, se pudo recuperar proteína recombinante durante la purificación. La proteína soluble purificada presenta concentraciones de 270 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y de 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en el primer y segundo eluato, respectivamente, totalizando 0,45 mg de proteína, lo que de acuerdo al peso molecular de la proteína de fusión (110 kDa) corresponde a una concentración de $2,05 \times 10^{-9}$ M de proteína recombinante.

7. Conclusiones y perspectivas

7.1 Conclusiones

La búsqueda *in silico* de las secuencias codificantes para enzimas FRD en *T. cruzi* permitió la identificación de tres isoformas ortólogas a las descritas en *T. brucei*: FRD2 (Gene ID: TcCLB.503849.60), FRDg (Gene ID: TcCLB.510215.10) y FRDm1 (Gene ID: TcCLB.508535.10), además de la presencia de muchos pseudogenes de FRD.

Datos de expresión de transcriptómica y *riboprinting* muestran que las FRD presentarían problemas de anotación en el TriTrypDB, por lo que las secuencias fueron curadas manualmente.

Las secuencias obtenidas para *T. cruzi* presentan un alto porcentaje de identidad con las reportadas en *T. brucei*. Las tres isoformas de *T. cruzi* presentan niveles de identidad aminoacídica menores a los de las FRD de *T. brucei*. El dominio fumarato reductasa de cada isoforma representa la porción más conservada de la proteína.

Se amplificó por PCR la secuencia codificante de la isoforma FRD2 mediante la puesta a punto de la técnica para disminuir la amplificación inespecífica.

La secuencia FRD2 fue clonada en el vector-T pCR2.1-TOPO, corroborado mediante PCR, digestión y secuenciación.

Se clonó, en fase con el *tag* GST, la secuencia FRD2 en el vector de expresión bacteriano pGEX4T1.

Se analizaron diferentes condiciones de expresión de la proteína recombinante soluble. En varias condiciones ensayadas se observó que la proteína se agrega mayoritariamente en cuerpos de inclusión insolubles. Utilizando una temperatura de inducción de 30°C, durante 4 horas, con 0,1 mM de IPTG, a una DO₅₉₅ de 0,6 se obtuvo una fracción de la proteína en forma soluble.

La identidad de la proteína de fusión fue confirmada mediante un ensayo de *western blot* con un anticuerpo anti-GST.

La proteína soluble fue purificada mediante cromatografía de afinidad y se obtuvieron 0,45 mg a partir de 200 mL de cultivo.

7.2 Perspectivas

Analizar si la proteína recombinante presenta actividad fumarato reductasa, mediante análisis indirecto a través de determinación de consumo de NADH a 340 nm.

Evaluar a la enzima FRD como blanco de drogas potencial analizando el efecto en la actividad enzimática de los agentes antichagásicos previamente sintetizados (Vieites, 2008).

Optimizar las condiciones de expresión para obtener mayores cantidades de la proteína FRD recombinante soluble.

Transformar con el vector de expresión generado otras cepas bacterianas para expresar la proteína recombinante en sistema heterólogo.

Evaluar la funcionalidad de la FRD2 producida en un sistema de expresión eucariota, para estudiar el posible efecto de modificaciones postraduccionales en la actividad enzimática. No se puede descartar que en este caso modificaciones estructurales postraduccionales sean efectivamente imprescindibles para su correcto plegamiento y funcionalidad.

Realizar el *refolding* de la proteína recombinante insoluble.

Cortar con trombina el *tag* GST de la proteína FRD2 recombinante.

Reintentar el clonado de la isoforma FRD2 en el vector de expresión pQE-30.

Clonar las secuencias FRDm1 y FRDg en vectores de expresión, para obtener dichas proteínas recombinantes purificadas y evaluar su actividad enzimática.

8. Referencias bibliográficas

- Agabian, N. 1990. Trans splicing of nuclear pre-mRNAs. *Cell*. 61:1157-1160.
- Alarcon de Noya, B., Diaz-Bello, Z., Colmenares, C., Ruiz-Guevara, R., Mauriello, L., Zavala-Jaspe, R., Suarez, J.A., Abate, T., Naranjo, L., Paiva, M., Rivas, L., Castro, J., Marques, J., Mendoza, I., Acquatella, H., Torres, J., Noya, O. 2010. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. *J Infect Dis* 201:1308-1315.
- Ausubel, F.M. 1987. Current protocols in molecular biology. Published by Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience : J. Wiley, New York. v. (loose-leaf) pp.
- Bangs, J.D., Crain, P. F., Hashizume, T., McCloskey, J. A., Boothroyd, J. C. 1992. Mass spectrometry of mRNA cap 4 from trypanosomatids reveals two novel nucleosides. *J Biol Chem*. 267:9805-9815.
- Bern, C., Kjos, S., Yabsley, M.J., Montgomery, S.P. 2011. Trypanosoma cruzi and Chagas' Disease in the United States. *Clin Microbiol Rev* 24:655-681.
- Besteiro, S., Biran, M., Biteau, N., Coustou, V., Baltz, T., Canioni, P., Bringaud, F. 2002. Succinate secreted by Trypanosoma brucei is produced by a novel and unique glycosomal enzyme, NADH-dependent fumarate reductase. *J Biol Chem*. 277:38001-38012.
- Biosystems, K. 2013. Protocol KAPA HiFi HotStart PCR Kit.
- Boiani, M., Piacenza, L., Hernández, P., Boiani, L., Cerecetto, H., González, M., Denicola, A. 2010. Mode of action of nifurtimox and N-oxide-containing heterocycles against Trypanosoma cruzi: is oxidative stress involved? *Biochemical pharmacology*. 79:1736-1745.
- Bonse, S., Richards, J. M., Ross, S. A., Lowe, G., Krauth-Siegel, R. L. 2000. (2,2':6',2''-Terpyridine)platinum(II) complexes are irreversible inhibitors of Trypanosoma cruzi trypanothione reductase but not of human glutathione reductase. *Journal of medicinal chemistry*. 43:4812-4821.
- Boveris, A., Hertig, C. M., Turrens, J. F. 1986. Fumarate reductase and other mitochondrial activities in Trypanosoma cruzi. *Mol Biochem Parasitol*. 19:163-169.
- Bringaud, F., Riviere, L., Coustou, V. 2006. Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. *Mol Biochem Parasitol* 149:1-9.
- Buscaglia, C.A., Di Noia, J. M. 2003. Trypanosoma cruzi clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 5:419-427.
- Cantey, P.T., Stramer, S.L., Townsend, R.L., Kamel, H., Ofafa, K., Todd, C.W., Currier, M., Hand, S., Varnado, W., Dotson, E., Hall, C., Jett, P.L., Montgomery, S.P. 2012. The United States Trypanosoma cruzi Infection Study: evidence for vector-borne transmission of the parasite that causes Chagas disease among United States blood donors. *Transfusion*. 52:1922-1930.
- Cazzulo, J.J. 1992. Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. *FASEB J*. 6:3153-3161.
- CDC. 2014. Centers for Disease Control and Prevention. Parasites - American Trypanosomiasis <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>.
- Cerecetto, H., Gonzalez, M. 2001. N-oxides as hypoxia selective cytotoxins. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 1:219-231.
- Cerecetto, H., González, M. 2012. Enfermedad de Chagas: Estrategias en la búsqueda de nuevos medicamentos. <http://cedicpy.files.wordpress.com/2012/03/libro20chagas.pdf>.
- Clayton, C.E. 2002. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *The EMBO journal*. 21:1881-1888.
- Coustou, V., Besteiro, S., Riviere, L., Biran, M., Biteau, N., Franconi, J.M., Boshart, M., Baltz, T., Bringaud, V. 2005. A mitochondrial NADH-dependent fumarate reductase involved in the production of succinate excreted by procyclic Trypanosoma brucei. *J Biol Chem*. 280:16559-16570.
- Chagas, C. 1909. Nova tripanozomíaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi, agente etiologico da nova entidade mórbida do homen. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1:159-219.
- Chen, Y., Song, J., Sui, S. F., Wang, D. N. 2003. DnaK and DnaJ facilitated the folding process and reduced inclusion body formation of magnesium transporter CorA overexpressed in Escherichia coli. *Protein expression and purification*. 32:221-231.

- Chibale, K. 2002. A chemical approach towards understanding the mechanism and reversal of drug resistance in *Plasmodium falciparum*: is it viable? *IUBMB life*. 53:249-252.
- De Carvalho, T.U., De Souza, W. . 1986. Infectivity of amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 28:205-212.
- De Lange, T., Berkvens, T. M., Veerman, H. J., Frasch, A. C., Barry, J. D., Borst, P. 1984. Comparison of the genes coding for the common 5' terminal sequence of messenger RNAs in three trypanosome species. *Nucleic acids research*. 12:4431-4443.
- De Pablos, L.M.O., A. 2012. Multigene families in *Trypanosoma cruzi* and their role in infectivity. *Infection and immunity*. 80:2258-2264.
- De Souza, W. 2002. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des*. 8:269-285.
- De Souza, W., Meyer, H. . 1974. On the fine structure of the nucleus in *Trypanosoma cruzi* in tissue culture forms. Spindle fibers in the dividing nucleus. *J Protozool*. 21:48-52.
- Denicola-Seoane, A., Rubbo, H., Prodanov, E., Turrens, J. F. 1992. Succinate-dependent metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Mol Biochem Parasitol*. 54:43-50.
- Diaz de Toranzo, E.G., Castro, J.A., Franke de Cazzulo, B.M., Cazzulo, J.J. 1988. Interaction of benzimidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. *Experientia*. 44:880-881.
- El-Sayed, N.M., Myler, P. J., Bartholomeu, D. C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A. N., Ghedin, E., Worthey, E. A., Delcher, A. L., Blandin, G., Westenberger, S. J., Caler, E., Cerqueira, G. C., Branche, C., Haas, B., Anupama, A., Arner, E., Aslund, L., Attipoe, P., Bontempi, E., Bringaud, F., Burton, P., Cadag, E., Campbell, D. A., Carrington, M., Crabtree, J., Darban, H., da Silveira, J. F., de Jong, P., Edwards, K., Englund, P. T., Fazelina, G., Feldblyum, T., Ferella, M., Frasch, A. C., Gull, K., Horn, D., Hou, L., Huang, Y., Kindlund, E., Klingbeil, M., Kluge, S., Koo, H., Lacerda, D., Levin, M. J., Lorenzi, H., Louie, T., Machado, C. R., McCulloch, R., McKenna, A., Mizuno, Y., Mottram, J. C., Nelson, S., Ochaya, S., Osoegawa, K., Pai, G., Parsons, M., Pentony, M., Pettersson, U., Pop, M., Ramirez, J. L., Rinta, J., Robertson, L., Salzberg, S. L., Sanchez, D. O., Seyler, A., Sharma, R., Shetty, J., Simpson, A. J., Sisk, E., Tammi, M. T., Tarleton, R., Teixeira, S., Van Aken, S., Vogt, C., Ward, P. N., Wickstead, B., Wortman, J., White, O., Fraser, C. M., Stuart, K. D., Andersson, B. 2005a. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. 309:409-415.
- El-Sayed, N.M., Myler, P. J., Blandin, G., Berriman, M., Crabtree, J., Aggarwal, G., Caler, E., Renaud, H., Worthey, E. A., Hertz-Fowler, C., Ghedin, E., Peacock, C., Bartholomeu, D. C., Haas, B. J., Tran, A. N., Wortman, J. R., Alsmark, U. C., Angiuoli, S., Anupama, A., Badger, J., Bringaud, F., Cadag, E., Carlton, J. M., Cerqueira, G. C., Creasy, T., Delcher, A. L., Djikeng, A., Embley, T. M., Hauser, C., Ivens, A. C., Kummerfeld, S. K., Pereira-Leal, J. B., Nilsson, D., Peterson, J., Salzberg, S. L., Shallom, J., Silva, J. C., Sundaram, J., Westenberger, S., White, O., Melville, S. E., Donelson, J. E., Andersson, B., Stuart, K. D., Hall, N. 2005b. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science*. 309:404-409.
- Enomoto, K., Ohki, R., Muratsubaki, H. 1996. Cloning and sequencing of the gene encoding the soluble fumarate reductase from *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*. 3:263-267.
- Figueiredo, L.M., Cross, G. A., Janzen, C. J. 2009. Epigenetic regulation in African trypanosomes: a new kid on the block. *Nature reviews. Microbiology*. 7:504-513.
- Frasch, A.C. 2000. Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today*. 16:282-286.
- Gomez, C., Esther Ramirez, M., Calixto-Galvez, M., Medel, O., Rodriguez, M. A. 2010. Regulation of gene expression in protozoa parasites. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2010:726045.
- Hall, B., Bot, C., Wilkinson, S. . 2011. Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. *The Journal of biological chemistry* 286. 286:13088-13095.
- Hannaert, V., Bringaud, F., Opperdoes, F.R., Michels, P.A. 2003. Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. *Biol Dis* 2:11.

- Hannaert, V., Michels, P.A. 1994. Structure, function, and biogenesis of glycosomes in kinetoplastida. *J Bioenerg Biomembr* 26.
- Invitrogen. 2006. TOPO TA Cloning <http://mvz.berkeley.edu/egl/inserts/TopoTACloning.pdf>.
- Ivens, A.C., Peacock, C. S., Worthey, E. A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., Sisk, E., Rajandream, M. A., Adlem, E., Aert, R., Anupama, A., Apostolou, Z., Attipoe, P., Bason, N., Bauser, C., Beck, A., Beverley, S. M., Bianchetti, G., Borzym, K., Bothe, G., Bruschi, C. V., Collins, M., Cadag, E., Ciarloni, L., Clayton, C., Coulson, R. M., Cronin, A., Cruz, A. K., Davies, R. M., De Gaudenzi, J., Dobson, D. E., Duesterhoeft, A., Fazelina, G., Fosker, N., Frasch, A. C., Fraser, A., Fuchs, M., Gabel, C., Goble, A., Goffeau, A., Harris, D., Hertz-Fowler, C., Hilbert, H., Horn, D., Huang, Y., Klages, S., Knights, A., Kube, M., Larke, N., Litvin, L., Lord, A., Louie, T., Marra, M., Masuy, D., Matthews, K., Michaeli, S., Mottram, J. C., Muller-Auer, S., Munden, H., Nelson, S., Norbertczak, H., Oliver, K., O'Neil, S., Pentony, M., Pohl, T. M., Price, C., Purnelle, B., Quail, M. A., Rabinowitsch, E., Reinhardt, R., Rieger, M., Rinta, J., Robben, J., Robertson, L., Ruiz, J. C., Rutter, S., Saunders, D., Schafer, M., Schein, J., Schwartz, D. C., Seeger, K., Seyler, A., Sharp, S., Shin, H., Sivam, D., Squares, R., Squares, S., Tosato, V., Vogt, C., Volckaert, G., Wambutt, R., Warren, T., Wedler, H., Woodward, J., Zhou, S., Zimmermann, W., Smith, D. F., Blackwell, J. M., Stuart, K. D., Barrell, B., Myler, P. J. 2005. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*. 309:436-442.
- Janzen, C.J., Fernandez, J. P., Deng, H., Diaz, R., Hake, S. B., Cross, G. A. 2006. Unusual histone modifications in *Trypanosoma brucei*. *FEBS Lett*. 580:2306-2310.
- Kramer, S. 2012. Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: the case of kinetoplastids. *Mol Biochem Parasitol*. 181:61-72.
- Lee, S.K., Keasling, J. D. 2008. Heterologous protein production in *Escherichia coli* using the propionate-inducible pPro system by conventional and auto-induction methods. *Protein expression and purification*. 61:197-203.
- Lenardo, M.J., Dorfman, D. M., Donelson, J. E. 1985. The spliced leader sequence of *Trypanosoma brucei* has a potential role as a cap donor structure. *Molecular and cellular biology*. 5:2487-2490.
- Lohmeier, E., Hagen, D. S., Dickie, P., Weiner, J. H. 1981. Cloning and expression of fumarate reductase gene of *Escherichia coli*. *Canadian journal of biochemistry*. 59:158-164.
- Lowe, G., Droz, A. S., Vilaivan, T., Weaver, G. W., Tweedale, L., Pratt, J. M., Rock, P., Yardley, V., Croft, S. L. 1999. Cytotoxicity of (2,2':6',2''-terpyridine)platinum(II) complexes to *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi*, and *Trypanosoma brucei*. *Journal of medicinal chemistry*. 42:999-1006.
- Mair, G., Shi, H., Li, H., Djikeng, A., Aviles, H. O., Bishop, J. R., Falcone, F. H., Gavrilescu, C., Montgomery, J. L., Santori, M. I., Stern, L. S., Wang, Z., Ullu, E., Tschudi, C. 2000. A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. *Rna*. 6:163-169.
- Mandava, V., Fernandez, J. P., Deng, H., Janzen, C. J., Hake, S. B., Cross, G. A. 2007. Histone modifications in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*. 156:41-50.
- Merlino, A., Vieites, M., Gambino, D., Coitiño, L. . 2014. Homology modeling of *T. cruzi* and *L. major* NADH-dependent fumarate reductases: Ligand docking, molecular dynamics validation, and insights on their binding modes. *J Molec Graphics Modelling* 48:47-59.
- Michels, P.A., Bringaud, F., Herman, M., Hannaert, V. 2006. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochim Biophys Acta*. 1763:1463-1477.
- Michels, P.A., Hannaert, V., Bringaud, F. 2000. Metabolic aspects of glycosomes in trypanosomatidae - new data and views. *Parasitol Today* 16:482-489.
- Middelberg, A.P. 2002. Preparative protein refolding. *Trends in biotechnology*. 20:437-443.
- Miura, A., Kameya, M., Arai, H., Ishii, M., Igarashi, Y. 2008. A soluble NADH-dependent fumarate reductase in the reductive tricarboxylic acid cycle of *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *Journal of bacteriology*. 190:7170-7177.
- Moloney, A. 2009. Trial renews interest in Chagas' disease. *Lancet*. 374:1490.
- Moyersoen, J., Choe, J., Fan, E., Hol, W.G., Michels, P.A. 2004. Biogenesis of peroxisomes and glycosomes: trypanosomatid glycosome assembly is a promising new drug target. *FEMS Microbiol Rev* 28:603-643.

- Muratsubaki, H., Enomoto, K., Ichijoh, Y., Tezuka, T., Katsume, T. 1994. Rapid purification of yeast cytoplasmic fumarate reductase by affinity chromatography on blue sepharose CL-6B. *Preparative biochemistry*. 24:289-296.
- Nozaki, T., Engel, J. C., Dvorak, J.A. 1996. Cellular and Molecular Biological Analyses of Nifurtimox Resistance in *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg* 55:111-117.
- Opperdoes, F.R., Borst, P. 1977. Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *FEBS Lett* 80:360-364.
- Opperdoes, F.R., Borst, P. 1987. Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. *Annu Rev Microbiol*. 41:127-151.
- Opperdoes, F.R., Markos, A., Steiger, R.F. 1981. Localization of malate dehydrogenase, adenylate kinase and glycolytic enzymes in glycosomes and the threonine pathway in the mitochondrion of cultured procyclic trypomastigotes of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 4:291-309.
- OPS. 2002. *Organización Panamericana de la Salud*. XIa. Reunión de la Comisión Intergubernamental para la eliminación de *Triatoma infestans* y la interrupción de la tripanosomiasis americana por transfusión <http://www.bvsops.org.uy/pdf/chagas06.pdf>.
- Otero, S., Sulleiro, E., Molina, I., Espiau, M., Suy, A., Martín-Nalda, A., Figueras, C. 2012. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in non-endemic areas: evaluation of a screening program in a tertiary care hospital in Barcelona, Spain. *Am J Trop Med Hyg* 87:832-836.
- Ouellette, M., Papadopoulou, B. 2009. Coordinated gene expression by post-transcriptional regulons in African trypanosomes. *Journal of biology*. 8:100.
- PAHO. 2014. Pan American Health Organization. Enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis Americana) http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=3591&Itemid=3921&lang=es.
- Parsons, M. 2004. Glycosomes: parasites and the divergence of peroxisomal purpose. *Mol Microbiol*. 53:717-724.
- Pays, E., Vanhamme, L., Berberof, M. 1994. Genetic controls for the expression of surface antigens in African trypanosomes. *Annu Rev Microbiol*. 48:25-52.
- Polak, A.a.R., R. 1978. Mode of action of 2-nitroimidazole derivative benznidazole. *Ann. Trop. Med. Parasitol*. 72:228-232.
- QIAexpressionist™, T. 2006. A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/QIAGEN_QIAexpressionist_EN.pdf.
- Rassi Jr, A., Rassi, A., Marin-Neto J.A. 2010. Chagas disease. *Lancet*. 375:1388-1402.
- Respuela, P., Ferella, M., Rada-Iglesias, A., Aslund, L. 2008. Histone acetylation and methylation at sites initiating divergent polycistronic transcription in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem*. 283:15884-15892.
- Rodrigues Coura, J.a.d.C., S. L. 2002. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 97:3-24.
- Sanchez-Delgado, R.A., Anzellotti, A., Suarez, L. 2004a. Metal complexes as chemotherapeutic agents against tropical diseases: malaria, trypanosomiasis, and leishmaniasis. *Metal ions in biological systems*. 41:379-419.
- Sanchez-Delgado, R.A.A., A. 2004b. Metal complexes as chemotherapeutic agents against tropical diseases: trypanosomiasis, malaria and leishmaniasis. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 4:23-30.
- Schofield, C.J., Galvao, C. 2009. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta tropica*. 110:88-100.
- Schurch, N., Hehl, A., Vassella, E., Braun, R., Roditi, I. 1994. Accurate polyadenylation of procyclin mRNAs in *Trypanosoma brucei* is determined by pyrimidine-rich elements in the intergenic regions. *Molecular and cellular biology*. 14:3668-3675.
- Shapiro, T.A., Englund, P. T. 1995. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annu Rev Microbiol*. 49:117-143.

- Shaw, J.M., Feagin, J. E., Stuart, K., Simpson, L. 1988. Editing of kinetoplastid mitochondrial mRNAs by uridine addition and deletion generates conserved amino acid sequences and AUG initiation codons. *Cell*. 53:401-411.
- Shikanai-Yasuda, M.A., Carvalho, N.B. 2012. Oral transmission of Chagas disease. *Clin Infect Dis*. 54:845-852.
- Shuman, S. 1991. Recombination mediated by vaccinia virus DNA topoisomerase I in Escherichia coli is sequence specific. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88:10104-10108.
- Shuman, S. 1994. Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem*. 269:32678-32684.
- Siegel, T.N., Hekstra, D. R., Kemp, L. E., Figueiredo, L. M., Lowell, J. E., Fenyo, D., Wang, X., Dewell, S., Cross, G. A. 2009. Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in Trypanosoma brucei. *Genes & development*. 23:1063-1076.
- Singh, S.M., Panda, A. K. 2005. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of bioscience and bioengineering*. 99:303-310.
- Tan, T.H., Pach, R., Crausaz, A., Ivens, A., Schneider, A. 2002. tRNAs in Trypanosoma brucei: genomic organization, expression, and mitochondrial import. *Molecular and cellular biology*. 22:3707-3717.
- Teixeira, D.E., Benchimol, M., Crepaldi, P. H., de Souza, W. 2014. Atlas didático Ciclo de vida do Trypanosoma cruzi.
- Teixeira, S.M., De Paiva, R. M., Kangussu-Marcolino, M. M., Darocha, W. D. 2012. Trypanosomatid comparative genomics: Contributions to the study of parasite biology and different parasitic diseases. *Genetics and molecular biology*. 35:1-17.
- Thomas, S., Green, A., Sturm, N. R., Campbell, D. A., Myler, P. J. 2009. Histone acetylations mark origins of polycistronic transcription in Leishmania major. *BMC genomics*. 10:152.
- Thompson, J.D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*. 22:4673-4680.
- Tobin, D., Arvanitidis, M., Bisby, R. H. 2002. One-electron oxidation of "photo-Fenton" reagents and inhibition of lipid peroxidation. *Biochemical and biophysical research communications*. 299:155-159.
- Turrens, J. 2012. The Enzyme NADH-fumarate Reductase in Trypanosomatids: a Potential Target against Parasitic Diseases. *Mol Cell Pharmacol* 4:117-122.
- Turrens, J.F. 1989. The role of succinate in the respiratory chain of Trypanosoma brucei procyclic trypomastigotes. *The Biochemical journal*. 259:363-368.
- Turrens, J.F., Newton, C.L., Zhong, L., Hernandez, F.R., Whitfield, J., Docampo, R. 1999. Mercaptopyridine-N-oxide, an NADH-fumarate reductase inhibitor, blocks Trypanosoma cruzi growth in culture and in infected myoblasts. *FEMS Microbiol Lett* 175:217-221.
- Turrens, J.F., Watts Jr., B.P., Zhong, L., Docampo, R. 1996. Inhibition of Trypanosoma cruzi and T. brucei NADH fumarate reductase by benzimidazole and anthelmintic imidazole derivatives. *Mol Biochem Parasitol* 82:125-129.
- Ullu, E., Matthews, K. R., Tschudi, C. 1993. Temporal order of RNA-processing reactions in trypanosomes: rapid trans splicing precedes polyadenylation of newly synthesized tubulin transcripts. *Molecular and cellular biology*. 13:720-725.
- Ullu, E., Tschudi, C. 1991. Trans splicing in trypanosomes requires methylation of the 5' end of the spliced leader RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88:10074-10078.
- van Weelden, S.W., Fast, B., Vogt, A., van der Meer, P., Saas, J., van Hellemond, J.J., Tielens, A.G., Boshart, M. 2003. Procyclic Trypanosoma brucei do not use Krebs cycle activity for energy generation. *J Biol Chem* 278:12854-12863.
- van Weelden, S.W., van Hellemond, J.J., Opperdoes, F.R., Tielens, A.G. . 2005. New functions for parts of the Krebs cycle in procyclic Trypanosoma brucei, a cycle not operating as a cycle. *J Biol Chem* 280:12451-12460.

- Vieites, M., Smircich, P., Parajon-Costa, B., Rodriguez, J., Galaz, V., Olea-Azar, C., Otero, L., Aguirre, G., Cerecetto, H., Gonzalez, M., Gomez-Barrío, A., Garat, B., Gambino D. 2008. Potent in vitro anti-Trypanosoma cruzi activity of pyridine-2-thiol N-oxide metal complexes having an inhibitory effect on parasite-specific fumarate reductase. *J Biol Inorg Chem*. 13:723-735.
- Wahle, E., Keller, W. 1992. The biochemistry of 3'-end cleavage and polyadenylation of messenger RNA precursors. *Annual review of biochemistry*. 61:419-440.
- WHO. 2002. *World Health Organization*. Control de la enfermedad de Chagas http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_905_spa.pdf.
- WHO. 2010a. *World Health Organization*. Chagas disease: control and elimination http://extranet.who.int/iris/restricted/bitstream/10665/2385/1/A63_17-en.pdf.
- WHO. 2010b. *World Health Organization*. Distribution of cases of Trypanosoma cruzi infection, based on official estimates and status of vector transmission, worldwide, 2006-2009. Control of Neglected Tropical Diseases. Disponible en http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_chagas_2009.png.
- WHO. 2014a. *World Health Organization*. Chagas disease (American trypanosomiasis) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>.
- WHO. 2014b. *World Health Organization*. Chagas disease (American trypanosomiasis) http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/chagas/en/.
- Zingales, B., Andrade, S. G., Briones, M. R., Campbell, D. A., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A. M., Machado, C. R., Miles, M. A., Romanha, A. J., Sturm, N. R., Tibayrenc, M., Schijman, A. G. 2009. A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 104:1051-1054.

9. Anexo

9.1 Secuencia de la isoforma FRD2

(>TcCLB.503849.60) | Trypanosoma cruzi CL Brener Non-Esmeraldo-like | NADH-dependent fumarate reductase, putative | genomic | TcChr38-P forward | (geneStart+0 to geneEnd+0) | length=2370

```
ATGCGTCCGGGGGATATTTTGTAGTTTCAGAGTCAGTCACATCACAACCTCAATTTTGTCTGCCACCTTCCTGCTGGCTTCGGTGTCT
TTTTACCTTAATGACCGAACAAATGAACATGCAGCCACAACGAGACGTCTTCTATGATCCGGCAGAATTGCAGAAACAGCCAGT
TGTTATTGTTGTGGGTGGTGGTCTTGCCGGGTTGTCTGCTGCCATCGAGGCCACCGCTGCGGAGCCCAAGTCATCCTGCTGGA
GAAGGAACCGAGGGTTGGTGGCAACAGCGCCAAGGCAACGTCGGCATCAATGGCTGGGGCACACGCGCACAGGCAGAGCA
GGATGTCTATGACAGCGGGAAGTACTTTGAGCGCGACACGCACAAATCGGGTCTCGGTGGCAGCACCGACCCCGGTCTGGTGC
GCACACTCTCCGTAAAGAGCGGGGATGCCATTTCTGGCTTCGTCGCTTGGCGTCCCTGACAGTGCTTTTCGAGCTTGGTGG
GCACAGCCGCAAGCGCACGCACCGTGCCCCGATAAGGCCGACGGCACTCTGTGCCATTGGCTTACCATCATGCAAACGCT
TGAGCAGCACATCCGCACGAAGCTGACGGATCGCGTGACGATCATGGAAAACACTACTGTCACTTCGCTGCTGAGCAAATCCCG
GGTGCGCCATGATGGTGCCAAACAGGTGAGGGTGTACGGCGTGGAAGTACTGCAGGACGAGGGGGTGGCATCAAGGATACT
GGCGGATGCCGTCACTTCGCCACCGGCGGCTTTTCAAATGACAAGACGCCCAACTCGCTTCTCCAGGAGTTTGCGCCGAGTT
GTCCGGCTTCCCTACAACCAATGGACCGTGGGCCACGGGTGACGGCGTCAAGCTTGACGCGAGCTGGGGGTGAAGCTTGTGC
ACATGGACAAGGTACAATTCACCCGACAGGCCTCATCGACCCGAAAGACCCCGCAAACCCGACCAAGTACCTTGGCCCGGAG
GCGCTGCGTGGGTGCGGCGGCGTCTGCTAAACAAGAAGGGTGTGAGCGGTTTGTCAATGAGCTTGACCTCCGTTCCGTGGTCTC
CAACGCCATCATTGAGCAGGGAGACGAATACCCCGATTGAGCGGTAGCAAGTTTGCCTTCTGTGTCTCAATGACGCAGCGGT
GAGGCTCTTCGGCGTGAATTCACCGGCTTTTATTGGAAGCGCCGTGGTCTTTTTGTAAAGGCTGACACAGTGAAGAGCTTGC
GGCACTCATTGGATGCCCTGTGGAGAATGTGCGGAATACGCTGGGGGACTACGAGCAGCTCTCAAAGAAAACCGTCAATGCC
CCAAGACTCGAAGGTTGTACTCCCGTGTGTGGTGGGACCGCAGGGTCCCTTTTATGTTGCCCTTGTGACGCCGTGCATCCACTA
CACAATGGGCGGCTGCCTCATTTGCCCTCGGCAGAGATGCAGTTGGAAGAAAACACGACCTCCCTTTGGCCACCGCCGTCC
CATTTTTGGCTTGTGGTGGTGGCGGAGGTGACGGGCGGGGTGCATGGCGGAAACCGGCTTGGTGGCAATTCGCTGCTGGAAT
GCGTCTCTTTGGCCGATTGCTGGGGATCGTGCCGCGACTATCCTGCAGAATAATGACACTTACCTCTGGGGCGAGAAGTGGT
CTCAGCTGAAGCTGCGGAATGTCTGGAAGAAGAGAATGGATTTATGTGGTTGCACTTCACTTTCCCAAGCAGTTTCAAGTTTC
TGGATTGGAAGTCTTACAGGGGGTGGTGTGCGTTCTGTCTCCGGTGATAAAAGTGTGGAAGTTTATACTCCATATACTTTACCT
GACGATGAGGGTGTGTGGGCATTGCGTTGAGTCCATTGCTCACTGGGAATGGGGTGCATTGGTTGCGTACACTGCAGCCGGG
GGATACGGTGGAAATGAAAGCTGCTGAACGGGTGGATCGCGGTTATATGAATATGCTGAATGCTCCACATAAAGTTGTCATCG
CCACTCTCGCGGATTGCTCCCATGATGCAAATCCTTCGGGCCCGCATGGAAGGGCCGAGAAGGATAACAACCATTTAA
TTTACATTGCGGATCGAGCATCTCCATTCTCATCGTAAAAGCTGAAGGCGTTGGCGGAGGCATCCCTGAACGATTCCGGT
GTACATTTGTTCTGCAGCACCCACCCGGGTGGTGGGTGCTGTGAACTATGTGGACGAGGTTGCTGCATCCGTGTTCCCG
ACCCCGCACTCGTCATCTTCTGTGGTGCCAGCGAAGAGACAAGGTCTATAAAGAGCTCTTCTTGTGACATGGGGCACGATGT
CGCCACCATCGCGACTGTAGAATAG
```

9.2 Secuencia de la isoforma FRDm1

(>TcCLB.508535.10) | Trypanosoma cruzi CL Brener Esmeraldo-like | NADH-dependent fumarate reductase, putative | genomic | TcChr38-S forward | (geneStart+0 to geneEnd+0) | length=3648

```
ATGTTCTCAACAATGCGCATTTTACTCCGCACCGCCACGATCGGCGTCCGCACGGGGACAATGGCGATGACAACAACCTTTGGTG
TCTGGTGCACATCTTGCCGACGTACGGTGGTCTCTCCTCGACGTCCGACAATCACCGGCACTCTTGTGCGAGCGAAGTTTTT
TTCCGGAGGCGCCGATGGTTCGCTCCTCCGCGTGCATTGTCGTGGTTCGATGCTGAGCTTCCCGCAAAGGAGCGTGACCGCATCG
CACGTGAGATGTTGTCGAGAACATGCCTAGCCCTCATGCCGAGGAGCGATTGGTGGTACGATGAGGGGACTGGAGCACACT
GTGCCGTATACCCTTCGATCGTTCTGAACGGGCCAAACGAAGCAAAGAATGGTGAAGTCATAGCGGGGAAAGTATTAAGA
GGCCTTCGAGGTTGGATCAGCATTTGAATCACTATAACCCGGAGAGCGAGGTGTCGGCAATCAACCAGCTTCTTTAGGGGC
GAAGCACACCATGTACAGCACATGCGACGTGTGATGGAGTGTTCGTACGGGTCTACGCATCCAGTGGAGCCTGCTTTGACCC
TGCCACAGGACCGCTGGTTGAATTTCTCGTTCTGTGATGAAGGATGAGAAGAGTGACGCAGAGTCAACACTTACGGAAGAGG
```


AAGTGGAGCGCTTTTGCCTGCCTCAGAGTTTTGATGTAATATGACAGACGGCACCATCGCCCGCAAGCACGAGGGTGCCAAGT
 TGGATTTGGGTGGTGTAAACAAGGGCTACACTGTGGACCGTGTGGTGGAAAAAGCTTAACGCAGCTGGGATGCGGGATGTGAT
 GTTTGAATGGGGAGGTGATTGCCGTGCAACGGGAGTGAATTATCAGCATCAGCCATGGGCCATTGCCATTGTGCGCCACC
 CTGTGAGGTGGTGAACAGCACGCCAAGGAAGGGTTGGATGAAAAAAGGAGGCATCACAGTTGCTTCGACTCATGTATCTT
 GACGATGAGGCACTTTGTACGAGTGGCGACTATGAAAATGTCATGTACAGTCCAAAATATGGTGTCCGCAGCAACATCTTTGAC
 TGGAAAAAGAGAAGTCTGCTGGAGCCAGTTGAAAGTGAAGTGGCGCAGGTTCCATCAAGTGCTACAGTGCAATGTACGCTGA
 CGCACTTGCAACGGCAAGCCTCATCAAACGTGACATTTCAAAGTACGGCATATGTTGGAGGAATGGCGTCACTCGCGAAATCG
 CGTCACGAATTACGTTACCTACACACGACAGGGCGAACCGTAGCCCGTATGTTTGAATAGCAACAGAAAATGCCGAGATTCCG
 CAAAAACCGTATTGCCGGTCTCTTCTGACGCGTAATTGTTGTGGGTTGTGGTCTTGCCGGGTTGTCTGCAGCCATCGAGGCC
 ACCGCCTGCGGAGCCCAAGTCATCCTGCTGGAGAAGGAACCGAAGTTGGTGGCAACAGCGCCAAGGCAACGTCGCGCATCA
 ATGGCTGGGGCACACGCGCACAGGCACTGGATGACATCAAAGATAACTGCAATATATTTGAGCGGATACGCACAAATCGGGT
 CTCGGCGGACAGCCGTCCCGAGTCTGGTGCACACTCTCCGTAAGAGCGGGGATGCCATTTCTTGCTTTGCTCGCTTGGC
 GTTCCACTGACAGTGTCTTTCGAGCTTGGCGGGCACAGCCGCAAGCGCACGCACCGTGCCCCGATAAGGCAGACGGCACTCT
 GTGCCATTGGCTTACCATCATGCGGACGCTTGGAGCAGCAGTTCGCACGAAGCTGGCGGATCGCGTTACGATCATGGAAGC
 ACTGTCGTACTTTCGTTCTAAATGAGATCAAAGGTACACCCGATGGTGGGCGTGAAGTGAGAGTACAGGGCGTTACTTACAAG
 AAGTCCGATGAGAAGGAGGCAGGTTGATGAACTTACCAGCGGATGCCGTCATTCTCGCCACCGGCGGCTTTTCAAATGATCAC
 ATGTGCGAATCACTCATTGGCGAGTTTGCGCCAGAGTTGTCCGGCTTCCCAACAACCAATGGACCGTGGGCCACGGGTGACGGC
 GTCAAGCTTGACAGCAGCCTTGGTGCACACTTGTGACATGGAAGGTTACAACCTCACCCGACAGGCCTCATCGACCCGAAA
 GACCCCGCAAACCCGACCAAGTACCTTGGCCGGAGGCGCTGCGTGGGTGCGGGCGGCTCTGCTAAACAAGAAGGGTGAGC
 GTTTTGTCAATGAGCTTGAACCTCCGTTCCGTTGCTCCAACGCCATCATTGAGCAGGGCGACGAATATCCATATTCAGGCGGTA
 GCAAGTTTGCCTTCTGTGTGCTCAATGACGCAGCGGTGAAGCTCTTTGGCGTCAATCTGTTGAACCTTACGCAAATACTTTGGG
 AGTGTAAAGCGTGTGGATGACCTGCAGGGGCTGGCAATGCTCATTGGTTGTGATGTTTTAACTTTCGAGAATACGCTGGAAC
 ATACGAGTCAAGCAGTATTGTTACCTCCGCTGTCCATTTACGGGAAAGGTTGTCTACCCGTGTGTGGTGGGACCGCAGGGTCC
 CTTTTATGTTGCCTTGTGACGCCGTGATCCACTACACAATGGGCGGCTGCCTCATCTCGCCCTCGGCAGAAATTCAGCGTGAA
 CACTATTCTGAACCTTCTTGAAGAATCAACGTCCATTCTTGGCTTGTGGTGCAGGGCGAGGTGACGGGCGGGGTGCATGGT
 GAAAACCGGCTTGGTGGCAATTCGCTGCTGGAATGCGTCTTTGGCCGATTGCTGGGGATCGTGCCGCAACAATCCTGCAG
 AAGCAAGTGTATGCGCTTCAAAGGATAAGTGGACATCCGTTGTGGTCCGTAATCCCGCAGTGGTGAACGTTTGGGACCGG
 CTCTGCTGTGCTGCGGTTAACCTTCCGGGTGCCTTGCAGCGTCTGGACTTACCTCGGCCAGTTTATTGCCATCCGCGGTGAG
 TGGGATGGCCAGCAGCTCATTGGTACTACAGCCCATCACATTGCCGATGAACGTGGCGTCATATCTATCTTGCCGTGGG
 GACAAGGGGACTTTGAAGGAGTGGATTTCTGCCATGCGCCCTGGTACTCCGTAGAGATTAAGGTTGCGGTGGCATTCTCATT
 GAGCGCAATCCGGCGAAGAAGCAATTTCTTCCACGGACATGTTATACGGCAATTCGGGCTTATGCGGGGGCTCAGGCGT
 GGCACCGATGCTGCAGATCATTGCTGCCGCGCTGGAACGCCATACGTGGATAACAACGGAGTCCATCCGTTAGTTTACACCGC
 CGAGGAATATGAAGAGTTAACGTACCGTGAAGTCTTCACTACTATCCAAGGAGAATCCGGACAAGTTTTCCGTTGAATTTCT
 CTTAACAACCCACCGAGGGATGGACCGGGGTGTTGGCTTCTGTTGATCGTCCGCTCGTGCAGAAAACACTGCAGCCTCCTTCG
 AATGATCTGCTTATTGCCATCTGCGGCCCGCCGCTATGCAGCGTGAATGAAGAACGACCTGCTGGCTATGGGCTATAACCCA
 GCGCTTGTGCACACGGTGGATGATGACATGCAAGCCGCACTGTAA

9.3 Secuencia de la isoforma FRDg

(>TcCLB.510215.10) | Trypanosoma cruzi CL Brener Esmeraldo-like | NADH-dependent fumarate reductase, putative | genomic | TcChr38-S forward | (geneStart+0 to geneEnd+0) | length=3429

ATGGCAGACGGTGCATCTCCGCTCCGTCGTTGCTGTTGATCCTGAGAAGGCCGCACGGGAAAGGGATGAGGCGGCCCGTGC
 CCTTCTCGGGACAGCCCCTTGCAAACACTTGAATACATGACCAACGGCCTCGAGCTACTGTGCCTTTCACATTGAAGGTT
 GTTGACAGAGGCGGTTGCTTCTCGCGCGCAAAGAGGTAGCGGATGAAGTCTCCGCTCCGCTTGGCATCTTGCAGATACCGTT
 CTGAACAATTTAACCCCAACAGTGAATCTCCATGATTGGCAGGCTTCCAGTTGGTCAAAGCACACGATGTCTGCCACGCTTA
 AGAGTGTCAATTACGTGCTGTCAACACGCTTTAACTCTTCCGTTGGGGTGTGGTACCCTGCCACTGGACCAATCATTGAGGCGTT
 ACGTGCCAAAGTTGCAGAGAAAGCCTCAGTGTGCGATGAACAGATGGAGAAGCTTTCCGGGTCTGCAACTTTTCCAGCAGCTT
 CATCGTTGACTTGGAAATGGGCACCATCGCCGCAAGCACGAAGATGCTCGCTTGGATCTGGGCGGTGTGAGCAAGGGCTACA
 TAGTGGACTACGTCGTGGAGAGGTTAAACGCAGCTGGAATGTGATGTGACTTTGAATGGGGCGGTGACTGTCGTGCAAGT
 GGTACGAACGCGCAGCACACCATGGATGGTAGGCATTATTCGCCCCTGCTCCGTTGGAGCAATTGCGAAATCCGCCAAAAGA
 CCCTTCATATATCCGTTGCTGCTCACTCAACGATGAGGCTCTGTGTACGAGTGGGGACTACGAGAATTGACAGAAGGCTCCAA
 CAAGAAGCTTTACACTTCCATCTTGTACTGAAAAAGAGAAGTCTGCTGGAGCCGTTGAAAGTGAAGTGGCGCAGGTTTCCAT
 CAGGTGCTACAGCGCAATGTACGCTGACGCACTTGAACGGCAAGCCTCATCAAACGTGACATTAAGGAGTACGGCAAATGTT

GGAGGACTGGCGTCACGTGCGAAATCGCGTCACGAATTACGTTACCTACACACGACAGGGCGAACGCGTAGCCCGTATGTTTG
AAATAGCCACTGATAACGCCGAGATTCGCAAAAAACGTATTGCCGGTTCCTTCTCCTGCACGCGTAATTGTTGTGGGTGGTGGTCT
TGCCGGGTTGTCTGCAGCCATCGAGGCCACCGCCTGCGGAGCCCAAGTCATCCTCCTGGAGAAGGAACCGAAGGTTGGTGGCA
ACAGCGCCAAGGCAACGTCCGGCATCAATGGCTGGGGCACACGCGCACAGGCAGAGCAGGATGTCTATGACAGCGGGAAGTA
CTTTGAGCGCGATACGCACAAATCGGGTCTCGGCGGCAGCACCGACCCCGGTCTGGTGCACACTCTCCGTAAAGAGCGGGG
ATGCCATTTCTGGCTTCGTCGCTTGGCGTTCCACTGACAGTGCTTTTCGAGCTTGGCGGGCACAGCCGCAAGCGCACGCACCG
TGCCCCGATAAAGGCAGACGGCACTCCTGTGCCATTGGTTTACCATCATGCAAACGCTTGAGCAGCACGTTTCGCACGAAGCT
GGCGGATCGCGTGACGATCATGAAAAACACTACTGTCACTTCACTGCTGAGCAAGTCCCGGTGCGCCATGATGGTGCCAAAC
AGGTGAGGGTGTACGGCGTGGAAGTACTGCAGGACGAGGGGGTGGTATCAAGGATACTGGCGGATGCCGTCATTCTCGCCAC
CGGCGGCTTTTCAAATGACAAGACGCCAACTCGCTTCTCCAGGAGTTTGCGCCGAGTTGTCCGGCTTCCCAACAACCAATGGA
CCGTGGGCCACGGGTGACGGCGTCAAGCTTGCACGTGAAGTGGGGTGAAGCTTGTGCACATGGACAAGGTACAACCTCACCC
GACAGGCCTCATCGACCCGAAAGACCCCGCAAACCGACCAAGTACCTTGGCCCGAGGCGCTGCGTGGGTGGGGCGGCGTCC
TGCTAAACAAGAAGGGTGTAGCGGTTTGTCAATGAGCTTGACCTCCGTTCCGTGGTCTCCAACGCCATCATTGAGCAGGGCGACG
AATACCCCGATGCAGGTGGTAGCAAAATTTGCCTTCTGTGTGCTCAATGACGCAGCGGTGAAGCTCTTCGGCGTGAATCCACG
GCTTTTATTGGAAGCGTCTTGGTCTTTTGTAAAGGCTGACACAGTGGAAAAGCTTGCGGCACTCATTGGATGCCCTGTGGAGA
ATGTGCGGAATACGCTGGGGGACTACGAGCAGCTCTAAAAGAAAACCGTCAATGCCCTAAGACTCGCAAGGTTGTCTACCCGT
GTGTGGTGGGACCGCAGGGTCCCTTTATGTTGCCTTTGTGACGCCGTCGATCCACTACACAATGGGCGGCTGCCTCATCTCGCC
CTCGGCAGAGATGCAGTTGGAAGAAAACACGACCTCTCCCTTGGCCATCGCCGTCCTATTTTTGGCTTGTGGTGGCGGGCA
GGTGACGGGCGGAGTGATGGTGGAAATCGGCTTGGTGGCAATTCGCTGCTGGAATGCGTCTTGGCCGATTGCTGGGG
ATCGTGCCGCAACAATCCTGCAGAAGAAACCTGTCCGCTGTCATTTAAAACCTGGACGACAGTGATTTTGCGCGAGGTGCGGG
AGGGTGAATGTACGGAAGTGGCTCTCGTGTGCTGCGGTTTAACTTCCGGGTGCCTTGCAGCGTCTGGGCTTCAACTCGGCC
AGTTTATTGCCATCCGCGGTGAGTGGGATGGCCAGCAGCTCATTGGGTACTACAGCCCCATCACATTGCCGGACGATCTTGGCG
TCATTGGTATCCTGGCGAGGAGTGACAAGGGGACTTTGAAGGAGTGGATTTCCGCCCTAGAACCAGGCGATGCGGTGGAGAT
GAAAGTTGCGGTGGCCTGGTATTGAGCGCGTTTTCAGCGAACGATACTTGTACTTTTTCAGGCCATGCGCTGAAAAAATTTG
CCTTATTGCCGCGGCACAGGTGTGGCACCGATGCTGCAGATCATTCTGCGCACTCAAGAAGCCGTTTCTTAAAAATATCGA
GAGCATCCGCTCATCTACGCTGCCGAAGATGTCTCGGAGCTCACGTACCGCGAACTGCTTGAACATCACCAGCGAGATTCAA
GGGAAAGTTTTCGAGTATTTTTGTTTTGAATCGCCCTCACCAATTTGGACTGACGGCGTTGGGTTTATTGACAAGAAGCTTCTG
AGCTCATCCGTACAACCGCCGCAAAAGATCTGTTGGTGGCCATCTGCGGCCGCAATTATGCAGCGGTTGTCAAGACGTGC
CTGAAGAGTCTTGGGTACGACATGCAACTAGTGCCTACTGTCGACGAAGTGAAACCCAGAAGTCACTCAAGATGTAA

9.4 Predicción de señal de localización mitocondrial

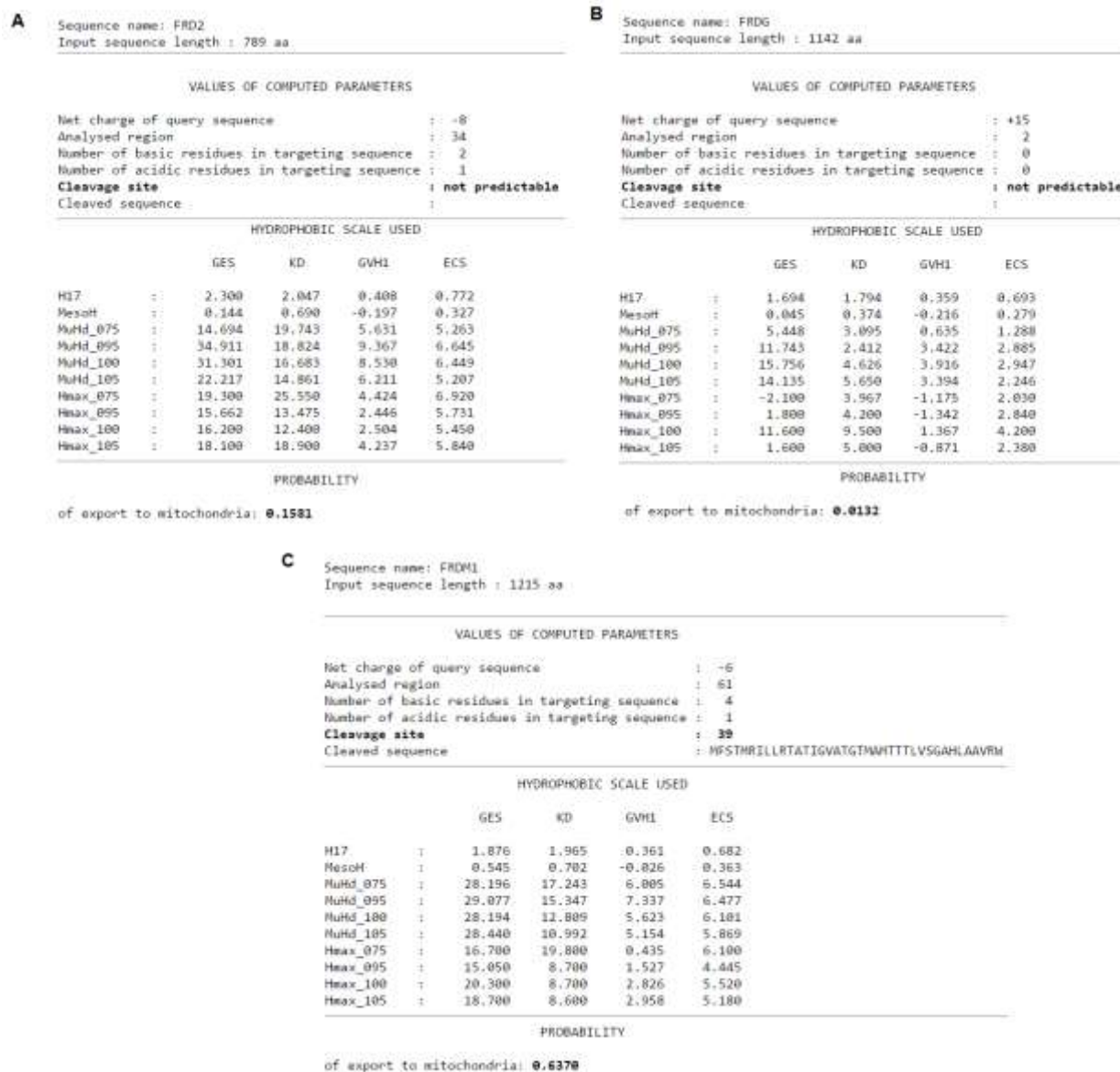


Figura A1. Salidas del programa MitoProtII - v1.101, donde se observa si hay señales de localización mitocondrial predictivas en la secuencia proteica de las isoforma FRD2, FRDg y FRDm1 (A, B y C, respectivamente).

9.5 Secuenciación del vector pCR2.1-TOPO con la isoforma FRD2

Trypanosoma cruzi strain CL Brener NADH-dependent fumarate reductase partial mRNA
 Sequence ID: [ref|XM_805139.1](#) Length: 2370 Number of Matches: 1

Range 1: 114 to 971 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1500 bits(812)	0.0	835/858(97%)	0/858(0%)	Plus/Plus
Query 116	CATGCAGCCACAACGAGACGTCTTCTATGATCCGGCAGAATTGCAGAAACAGCCAGTTGT			175
Sbjct 114	CATGCAGCCACAACGAGACGTCTTCTATGATCCGGCAGAATTGCAGAAACAGCCAGTTGT			173
Query 176	TATTGTTGTGGGTGGTGGTCTTGCCGGGTTGTCTGCTGCCATCGAGGCCACCGCCTGCGG			235
Sbjct 174	TATTGTTGTGGGTGGTGGTCTTGCCGGGTTGTCTGCTGCCATCGAGGCCACCGCCTGCGG			233
Query 236	AGCCCAAGTCATCTGCTGGAGAAGGAACCGAGGGTTGGTGGCAACAGCGCCAAAGGCAAC			295
Sbjct 234	AGCCCAAGTCATCTGCTGGAGAAGGAACCGAGGGTTGGTGGCAACAGCGCCAAAGGCAAC			293
Query 296	GTCCGGCATCAATGGCTGGGGCACACGCGCACAGGCAGAGCAAGSATGTCTATGACAGCGG			355
Sbjct 294	GTCCGGCATCAATGGCTGGGGCACACGCGCACAGGCAGAGCAAGSATGTCTATGACAGCGG			353
Query 356	GAAGTACTTTGAGCGCGACACGCAAAATCGGGTCTCGGTGGCAGCACCCGACCCCGGTCT			415
Sbjct 354	GAAGTACTTTGAGCGCGACACGCAAAATCGGGTCTCGGTGGCAGCACCCGACCCCGGTCT			413
Query 416	GGTGGCACACTCTCCGTAAGAGCGGGGATGCCATTTCTTGGCTTTCGTGCTTGGCGT			475
Sbjct 414	GGTGGCACACTCTCCGTAAGAGCGGGGATGCCATTTCTTGGCTTTCGTGCTTGGCGT			473
Query 476	TCCCCTGACAGTGTCTTCGACGCTTGGTGGGCACAGCCGCAAGCGCACGACCGTGCCTCC			535
Sbjct 474	TCCCCTGACAGTGTCTTCGACGCTTGGTGGGCACAGCCGCAAGCGCACGACCGTGCCTCC			533
Query 536	CGATAAGGCCGACGGCACTCCTGTGCCATTGGCTTACCATCATGCAAAACGCTTGAGCA			595
Sbjct 534	CGATAAGGCCGACGGCACTCCTGTGCCATTGGCTTACCATCATGCAAAACGCTTGAGCA			593
Query 596	GCACATCCGCACGAAAGCTGACGGATCGCGTGACGATCATGAAAAACACTACTGTCACTTC			655
Sbjct 594	GCACATCCGCACGAAAGCTGACGGATCGCGTGACGATCATGAAAAACACTACTGTCACTTC			653
Query 656	GCTGCTGAGCAAAATCCCGGGTGCGCCATGATGGTGCCAAACAGGTGAGGGTGTACGGCGT			715
Sbjct 654	GCTGCTGAGCAAAATCCCGGGTGCGCCATGATGGTGCCAAACAGGTGAGGGTGTACGGCGT			713
Query 716	GGAAAGTACTGCAAGGACGAGGGGGTGGCATCAAGNACTGCGGATGCCGTCAATCTCGC			775
Sbjct 714	GGAAAGTACTGCAAGGACGAGGGGGTGGCATCAAGNACTGCGGATGCCGTCAATCTCGC			773
Query 776	CACCGCGGCTTTTCAAATGACAAGACGCCCAACTCGCTTCTCCAGGANTTTGNGCCGCA			835
Sbjct 774	CACCGCGGCTTTTCAAATGACAAGACGCCCAACTCGCTTCTCCAGGANTTTGNGCCGCA			833
Query 836	NTTGTCCGGCTTCCCTACAACCAATGGACCGGGGCCACGGGTGANGGCGTCAAGCTTGC			895
Sbjct 834	NTTGTCCGGCTTCCCTACAACCAATGGACCGGGGCCACGGGTGANGGCGTCAAGCTTGC			893
Query 896	ACGCNAGCTGGGGGTGAAGCTTGTGNANNTGGNNNANGTANNACTTCNCCCACAGGNNT			955
Sbjct 894	ACGCNAGCTGGGGGTGAAGCTTGTGCACATGGACAAGGTACAACCTCACCCGACAGGCCT			953
Query 956	CATCGACCCnaangaccc 973			
Sbjct 954	CATCGACCCGAAAGACCC 971			

Figura A2. Blast realizado contra la secuenciación del vector-T clonado con la isoforma FRD2 con adaptadores BamH I y Kpn I para el clonado en pQE-30. Se observa el comienzo de la secuencia en el ATG ubicado a los 115 pb.

Trypanosoma cruzi strain CL Brener NADH-dependent fumarate reductase partial mRNA

Sequence ID: [reflXM_805139.1](#) Length: 2370 Number of Matches: 1

Range 1: 1983 to 2365 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
608 bits(329)	2e-170	356/383(93%)	0/383(0%)	Plus/Plus
Query 59	GAATNCTCCACATAAAGTNGTCATCGCCNCNTCTCNCNGATTGCTCCCANGANNCNNAT	118		
Sbjct 1983	GAATGCTCCACATAAAGTTGTCATCGCCACCTCTCGCGGGATTGCTCCCATGATGCAAAT	2042		
Query 119	CCTTNGGNNCNCATGGAAGGNCGGAGAGGANACANNNCNTCATTTAATTTACATTGC	178		
Sbjct 2043	CCTTCGGGCCGCCATGGAAGGGCCGAGAGGATACAACCATTCAATTTAATTTACATTGC	2102		
Query 179	GGATNNNCATCTTCCATTCCCTCATCGTGAANAANCTGAAGGCGTTGGCGGAGGCATCCCC	238		
Sbjct 2103	GGATCGAGCATCTTCCATTCCCTCATCGTGAANAANCTGAAGGCGTTGGCGGAGGCATCCCC	2162		
Query 239	TGAACGATTCCGGTGTACATTTGTTCTGCAGCACCCACAGCCCGGGTGGTCCGGTGTCTGT	298		
Sbjct 2163	TGAACGATTCCGGTGTACATTTGTTCTGCAGCACCCACAGCCCGGGTGGTCCGGTGTCTGT	2222		
Query 299	GAACATGTGGACGAGGTTGCTGCATCCGTGTTTCCCGACCCCGCACTCGTCATCTTTCT	358		
Sbjct 2223	GAACATGTGGACGAGGTTGCTGCATCCGTGTTTCCCGACCCCGCACTCGTCATCTTTCT	2282		
Query 359	CTGTGGTGCCAGCGAAGAGACAAGGTCTATAAAGAGCTCTTCTTGACATGGGGCACGA	418		
Sbjct 2283	CTGTGGTGCCAGCGAAGAGACAAGGTCTATAAAGAGCTCTTCTTGACATGGGGCACGA	2342		
Query 419	TGTCGCCACCATCGCGACTGTAG 441			
Sbjct 2343	TGTCGCCACCATCGCGACTGTAG 2365			

Figura A3. Blast realizado contra la secuenciación del vector-T clonado con la isoforma FRD2 con adaptadores BamH I y Kpn I para el clonado en pQE-30. No se observan al final de la secuencia los últimos 5 nucleótidos por la presencia de una “burbuja” o lectura sucia en el cromatograma que fue resuelta manualmente (Ver Figura 22).

Trypanosoma cruzi strain CL Brener NADH-dependent fumarate reductase partial mRNA

Sequence ID: [reflXM_805139.1](#) Length: 2370 Number of Matches: 1Range 1: 114 to 650 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
878 bits(475)	0.0	512/537(95%)	0/537(0%)	Plus/Plus
Query 119	CATGCAGCCACAACGAGACGTCTTCTATGATCCGGCAGAATTGCAGAAACAGCCAGTTGT			178
Sbjct 114	CATGCAGCCACAACGAGACGTCTTCTATGATCCGGCAGAATTGCAGAAACAGCCAGTTGT			173
Query 179	TATTGTTGTGGGTGGTGGTCTTGCCGGGCTGTCTGCAGCCATCGAGGCCACCGCCTGCGG			238
Sbjct 174	TATTGTTGTGGGTGGTGGTCTTGCCGGGTTGTCTGCTGCCATCGAGGCCACCGCCTGCGG			233
Query 239	AGCCCAAGTCATCCTCCTGGAGAAGGAACCGAAGTTGGTGGCAACAGCGCCAAGGCAAC			298
Sbjct 234	AGCCCAAGTCATCCTGCTGGAGAAGGAACCGAGGGTTGGTGGCAACAGCGCCAAGGCAAC			293
Query 299	GTCCGGCATCAATGGCTGGGGCACACGCGCACAGGCAGAGCAGGATGTCTATGACAGCGG			358
Sbjct 294	GTCCGGCATCAATGGCTGGGGCACACGCGCACAGGCAGAGCAGGATGTCTATGACAGCGG			353
Query 359	GAAGTACTTTGAGCGCGACACGCACAAATCGGGTCTCGGCGGCAGCACCGACCCCGGTCT			418
Sbjct 354	GAAGTACTTTGAGCGCGACACGCACAAATCGGGTCTCGGTGGCAGCACCGACCCCGGTCT			413
Query 419	GGTGCGCACACTCTCCGTAAGAGCGGGGATGCCATTTCTTGGCTTTCGTGCTTGGCGT			478
Sbjct 414	GGTGCGCACACTCTCCGTAAGAGCGGGGATGCCATTTCTTGGCTTTCGTGCTTGGCGT			473
Query 479	TCCACTGACAGTGCTTTTCGCAGCTTGGCGGGCACAGCCGCAAGCGCACGCACCGTGCCCC			538
Sbjct 474	TCCCTGACAGTGCTTTTCGCAGCTTGGTGGGCACAGCCGCAAGCGCACGCACCGTGCCCC			533
Query 539	CGATAAGGNANACGGCACTCCTGTGCCATTGGNTTACCATCATGNGGACGCTTGANCA			598
Sbjct 534	CGATAAGGCCGACGGCACTCCTGTGCCATTGGCTTACCATCATGCAAAACGCTTGGAGCA			593
Query 599	NCACATTCNCACGAANCTGGNNNATCGCGTGACNATCATGGAAAACACTACTGNAC			655
Sbjct 594	GCACATCCGCACGAAGCTGACGGATCGCGTGACGATCATGGAAAACACTACTGTCAC			650

Figura A4. Blast realizado contra la secuenciación del vector-T clonado con la isoforma FRD2 con adaptadores BamH I y Xho I para el clonado en pGEX4T1. Se observa el comienzo de la secuencia en el ATG ubicado a los 115 pb.

Trypanosoma cruzi strain CL Brener NADH-dependent fumarate reductase partial mRNA
 Sequence ID: [ref|XM_805139.1](#) Length: 2370 Number of Matches: 1

Range 1: 1519 to 2370 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1387	0.0	815/852(96%)	0/852(0%)	Plus/Plus
Query 264	TTTGGNGCGGGCGAGGTGACGGGCGGAGTGCATGNTGSAANCCGGCTTGGTGGCAATTCG			323
Sbjct 1519	TTTGGTGCGGGCGAGGTGACGGGCGGGGTGCATGGCGSAAACCGGCTTGGTGGCAATTCG			1578
Query 324	CTGNTGGANTGCNTNGTCTTTGGCCGCAATTGCTGGGGATCGTGCCGCAACAATCCTGCAG			383
Sbjct 1579	CTGCTGGAATGCGTCTCTTTGGCCGCAATTGCTGGGGATCGTGCCGCGACTATCCTGCAG			1638
Query 384	AATAATGACACTTACNTNTGGGGCGAGAAAGTGGTNTCAGCTGAAGCTGCGSAATGTCATG			443
Sbjct 1639	AATAATGACACTTACCTCTGGGGCGAGAAAGTGGTCTCAGCTGAAGCTGCGSAATGTCGTG			1698
Query 444	GAAGACGAGAAATGSAATTTATGTTGGTTCACCTTCAAGCAGTTTTCAAGTTTCT			503
Sbjct 1699	GAAGAAAGAGAAATGSAATTTATGTTGGTTCACCTTCCAAAGCAGTTTTCAAGTTTCT			1758
Query 504	GGATTGGAAGCCTTACAGGGGGTGGTGTTCGCTTCTGTCCGGTGAATAAAGTGTGGAA			563
Sbjct 1759	GGATTGGAAGTCTTACAGGGGGTGGTGTTCGCTTCTGTCCGGTGAATAAAGTGTGGAA			1818
Query 564	GTTTATACTCCATATACTTTACCTGACGATGAGGGTGTGTGGGCATTGCGTTGAGTCCA			623
Sbjct 1819	GTTTATACTCCATATACTTTACCTGACGATGAGGGTGTGTGGGCATTGCGTTGAGTCCA			1878
Query 624	TGGCTCACTGGSAATGGGGTGCATTGGTTGCGTACACTGCAGCCGGGGATACGGTAGAA			683
Sbjct 1879	TTGCTCACTGGSAATGGGGTGCATTGGTTGCGTACACTGCAGCCGGGGATACGGTAGAA			1938
Query 684	ATGAAAGCTGCTGAACGGGTGSAGCGCAATTATGAAATGCTGAAAGCTCCACATAAA			743
Sbjct 1939	ATGAAAGCTGCTGAACGGGTGSATCGCGTTATATGAAATGCTGAAATGCTCCACATAAA			1998
Query 744	GTTGTCTATTGCCACCTCTCGCGGGATTGCTCCCATGATGCAAACTCTTCGGGCCACCATG			803
Sbjct 1999	GTTGTCTATTGCCACCTCTCGCGGGATTGCTCCCATGATGCAAACTCTTCGGGCCACCATG			2058
Query 804	GAAAGGCCGGAGAAAGGATGCAACCATTCAATTAATTTACATTGCGGATCGAGCATCTTCC			863
Sbjct 2059	GAAAGGCCGGAGAAAGGATGCAACCATTCAATTAATTTACATTGCGGATCGAGCATCTTCC			2118
Query 864	ATCCCTTATCGTGAAGGCTGAAGGCGTTGGCGSAAAGCATCCCCTGAACGATTCCGGTGC			923
Sbjct 2119	ATTCTCATCGTGAAGGCTGAAGGCGTTGGCGSAAAGCATCCCCTGAACGATTCCGGTGC			2178
Query 924	ACATTTGTTCTGCAGCACCCACAGCCCGGGTGGTGGGGTGTGTGAACTATCTGGACGAG			983
Sbjct 2179	ACATTTGTTCTGCAGCACCCACAGCCCGGGTGGTGGGGTGTGTGAACTATCTGGACGAG			2238
Query 984	ATTGCTGCATCCGTGTTCCCGACCCCGCGTAGTCATCTTCTCTGTGGTGGCCAGCGAA			1043
Sbjct 2239	GTTGCTGCATCCGTGTTCCCGACCCCGCGACTGTCATCTTCTCTGTGGTGGCCAGCGAA			2298
Query 1044	GAGACAAGGTCTATAAAGAGCTCTCTTCTTGACATGGGGCACGATGTCCACCATCGCG			1103
Sbjct 2299	GAGACAAGGTCTATAAAGAGCTCTCTTCTTGACATGGGGCACGATGTCCACCATCGCG			2358
Query 1104	ACTGTAGAATAG 1115			
Sbjct 2359	ACTGTAGAATAG 2370			

Figura A5. Blast realizado contra la secuenciación del vector-T clonado con la isoforma FRD2 con adaptadores BamH I y Xho I para el clonado en pGEX4T1. Se observa el final de la secuencia de 2370 pares de bases.

9.6 Secuenciación del vector pGEX4T1 con la isoforma FRD2

Trypanosoma cruzi strain CL Brener NADH-dependent fumarate reductase partial mRNA
 Sequence ID: [refl|XM_805139.1](#) Length: 2370 Number of Matches: 1

Range 1: 169 to 1019 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1404 bits(760)	0.0	815/851(96%)	1/851(0%)	Plus/Plus
Query 35	GTTGTTATTGTTGTGGGTGGTGGTCTTGCCGGGCTGTCTGCAGCCATCGAAGCCACCACC			94
Sbjct 169	GTTGTTATTGTTGTGGGTGGTGGTCTTGCCGGGTTGTCTGCAGCCATCGAAGCCACCACC			228
Query 95	TGCGGAGCCCAAGTCATCCTCCTGGAGAAAGAAACCGAAGGTTGGTGGCAACAGCGCCAAG			154
Sbjct 229	TGCGGAGCCCAAGTCATCCTCCTGGAGAAAGAAACCGAAGGTTGGTGGCAACAGCGCCAAG			288
Query 155	GCAACGTCCGGCATCAATGGCTGGGGCAGACGCGCAGAGCAGAGCAGGATGCTATGAC			214
Sbjct 289	GCAACGTCCGGCATCAATGGCTGGGGCAGACGCGCAGAGCAGAGCAGGATGCTATGAC			348
Query 215	AGCGGGAAGTACTTTGAGCGCGACACGCAAAATCGGGTCTCGGCGGACAGCACCACCC			274
Sbjct 349	AGCGGGAAGTACTTTGAGCGCGACACGCAAAATCGGGTCTCGGCGGACAGCACCACCC			408
Query 275	GGTCTGGTGCACACTCTCCGTAAAGAGCGGGGATGCCATTTCTTGGCTTTCGTGCTT			334
Sbjct 409	GGTCTGGTGCACACTCTCCGTAAAGAGCGGGGATGCCATTTCTTGGCTTTCGTGCTT			468
Query 335	GGCGTCCACTGACAGTGTCTTTCGAGCTTGGCGGGCAGAGCCGCAAGCGCAGCACCCT			394
Sbjct 469	GGCGTCCACTGACAGTGTCTTTCGAGCTTGGCGGGCAGAGCCGCAAGCGCAGCACCCT			528
Query 395	GCCCCGATAAAGGACAGCGCACTCCTGTGCCATTGGTTTCAACATCATGCGGACGCTT			454
Sbjct 529	GCCCCGATAAAGGACAGCGCACTCCTGTGCCATTGGTTTCAACATCATGCGGACGCTT			588
Query 455	GAGCAGCACATTGCGACGAAAGCTGGCGGATCGCGTGACGATCATGGAAGAACTACTGTC			514
Sbjct 589	GAGCAGCACATTGCGACGAAAGCTGGCGGATCGCGTGACGATCATGGAAGAACTACTGTC			648
Query 515	ACTTCGCTGCTGAGCAAATCCCAGGTCGCGCATGATGGTGCAGAAAGGAGGGGTGTAC			574
Sbjct 649	ACTTCGCTGCTGAGCAAATCCCAGGTCGCGCATGATGGTGCAGAAAGGAGGGGTGTAC			708
Query 575	GGCGTGAAGTACTGAGGACGAGGGGGTGGTATCAAGGATACTGGCGGATGCCGTGATT			634
Sbjct 709	GGCGTGAAGTACTGAGGACGAGGGGGTGGTATCAAGGATACTGGCGGATGCCGTGATT			768
Query 635	CTCGCCACCGGCGGCTTTTCAATGACAAGACGCCCAACTCGCTTCTCCAGGAGTTTGGG			694
Sbjct 769	CTCGCCACCGGCGGCTTTTCAATGACAAGACGCCCAACTCGCTTCTCCAGGAGTTTGGG			828
Query 695	CCGCAGTTGTCCGGCTTCCCACAACCNATGGACCGTGGGCCACGGGTGACGGCGTCAAG			754
Sbjct 829	CCGCAGTTGTCCGGCTTCCCACAACCNATGGACCGTGGGCCACGGGTGACGGCGTCAAG			888
Query 755	CTTGACGCGAAGTGGGGGTGAAGCTTGTGACNTNGNNAAGGTACAACCTTNCNCCGACA			814
Sbjct 889	CTTGACGCGAAGTGGGGGTGAAGCTTGTGACNTNGNNAAGGTACAACCTTNCNCCGACA			948
Query 815	GGNNTCATCGACCCGAAAGACCCCGCAN-CCCgannnnnnaCCTTGGNCCGGAGGNCCTG			873
Sbjct 949	GGCTCATCGACCCGAAAGACCCCGCAAACCCGACCAAGTACCTTGGCCCGGAGGCGCTG			1008
Query 874	CGTGGGTCGGG 884			
Sbjct 1009	CGTGGGTCGGG 1019			

Figura A6. Blast realizado contra la secuenciación del vector de expresión pGEX4T1 clonado con la isoforma FRD2 con adaptadores BamH I y Xho I.

Trypanosoma cruzi strain CL Brener NADH-dependent fumarate reductase partial mRNA
 Sequence ID: [ref|XM_805139.1](#) Length: 2370 Number of Matches: 1

Range 1: 1509 to 2320 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1328 bits(719)	0.0	779/812(96%)	0/812(0%)	Plus/Plus
Query 311	TTTTGGCTTGT	TTTTGGCTTGT		370
Sbjct 1509	TTTTGGCTTGT	TTTTGGCTTGT		1568
Query 371	TGGCAATTCGCTGCTGGAATGCGTNGTCTTTGGCCGCATTGCTGGGGATCGTGCCGCAAC	TGGCAATTCGCTGCTGGAATGCGTNGTCTTTGGCCGCATTGCTGGGGATCGTGCCGCAAC		430
Sbjct 1569	TGGCAATTCGCTGCTGGAATGCGTNGTCTTTGGCCGCATTGCTGGGGATCGTGCCGCAAC	TGGCAATTCGCTGCTGGAATGCGTNGTCTTTGGCCGCATTGCTGGGGATCGTGCCGCAAC		1628
Query 431	ANTCNTGCAGAAATAATGACACTTACNTNTGGGGCGAGAAGTGGTNTCAGCTGAAAGCTGCG	ANTCNTGCAGAAATAATGACACTTACNTNTGGGGCGAGAAGTGGTNTCAGCTGAAAGCTGCG		490
Sbjct 1629	TATCCTGCAGAAATAATGACACTTACCTCTGGGGCGAGAAGTGGTCTCAGCTGAAAGCTGCG	TATCCTGCAGAAATAATGACACTTACCTCTGGGGCGAGAAGTGGTCTCAGCTGAAAGCTGCG		1688
Query 491	GAATGTCATGGAAGACGAGAATGGATTTATGTGGTTGCACTTCACTTTTCCAAGCAGTTT	GAATGTCATGGAAGACGAGAATGGATTTATGTGGTTGCACTTCACTTTTCCAAGCAGTTT		550
Sbjct 1689	GAATGTCATGGAAGACGAGAATGGATTTATGTGGTTGCACTTCACTTTTCCAAGCAGTTT	GAATGTCATGGAAGACGAGAATGGATTTATGTGGTTGCACTTCACTTTTCCAAGCAGTTT		1748
Query 551	TCAAGTTTCTGSAATTGSAAGCCTTACAGGGGGTGGTGTGCGTCTGTCTCCGGTGATAA	TCAAGTTTCTGSAATTGSAAGCCTTACAGGGGGTGGTGTGCGTCTGTCTCCGGTGATAA		610
Sbjct 1749	TCAAGTTTCTGSAATTGSAAGCCTTACAGGGGGTGGTGTGCGTCTGTCTCCGGTGATAA	TCAAGTTTCTGSAATTGSAAGCCTTACAGGGGGTGGTGTGCGTCTGTCTCCGGTGATAA		1808
Query 611	AAGTGTGGAAGTTTATACTCCATATACTTTACCTGACGATGAGGGTGTGTGGGCATTGC	AAGTGTGGAAGTTTATACTCCATATACTTTACCTGACGATGAGGGTGTGTGGGCATTGC		670
Sbjct 1809	AAGTGTGGAAGTTTATACTCCATATACTTTACCTGACGATGAGGGTGTGTGGGCATTGC	AAGTGTGGAAGTTTATACTCCATATACTTTACCTGACGATGAGGGTGTGTGGGCATTGC		1868
Query 671	GTTGAGTCCATGCTCACTGGSAATGGGGTGCATTGGTTGCGTACACTGCAGCCGGGGSA	GTTGAGTCCATGCTCACTGGSAATGGGGTGCATTGGTTGCGTACACTGCAGCCGGGGSA		730
Sbjct 1869	GTTGAGTCCATGCTCACTGGSAATGGGGTGCATTGGTTGCGTACACTGCAGCCGGGGSA	GTTGAGTCCATGCTCACTGGSAATGGGGTGCATTGGTTGCGTACACTGCAGCCGGGGSA		1928
Query 731	TACGGTAGAAATGAAAGCTGCTGAACGGGTGGAGCGCAATTATGAAATAGCTGAAAGC	TACGGTAGAAATGAAAGCTGCTGAACGGGTGGAGCGCAATTATGAAATAGCTGAAAGC		790
Sbjct 1929	TACGGTAGAAATGAAAGCTGCTGAACGGGTGGAGCGCAATTATGAAATAGCTGAAAGC	TACGGTAGAAATGAAAGCTGCTGAACGGGTGGAGCGCAATTATGAAATAGCTGAAAGC		1988
Query 791	TCCACATAAAGTTGTCTCATTGCCACCTCTCGCGGGATTGCTCCCATGATGCAAAATCCTTCG	TCCACATAAAGTTGTCTCATTGCCACCTCTCGCGGGATTGCTCCCATGATGCAAAATCCTTCG		850
Sbjct 1989	TCCACATAAAGTTGTCTCATTGCCACCTCTCGCGGGATTGCTCCCATGATGCAAAATCCTTCG	TCCACATAAAGTTGTCTCATTGCCACCTCTCGCGGGATTGCTCCCATGATGCAAAATCCTTCG		2048
Query 851	GGCCACCATGGAAAGGCCGGAGAAAGGATGCAACCATTCAATTAATTTACATTGCGGATCG	GGCCACCATGGAAAGGCCGGAGAAAGGATGCAACCATTCAATTAATTTACATTGCGGATCG		910
Sbjct 2049	GGCCACCATGGAAAGGCCGGAGAAAGGATGCAACCATTCAATTAATTTACATTGCGGATCG	GGCCACCATGGAAAGGCCGGAGAAAGGATGCAACCATTCAATTAATTTACATTGCGGATCG		2108
Query 911	AGCATCTTCCATCCCTTATCGTGAAAAGCTGAAAGGCGTTGGCGGAAAGCATCCCTGAAAG	AGCATCTTCCATCCCTTATCGTGAAAAGCTGAAAGGCGTTGGCGGAAAGCATCCCTGAAAG		970
Sbjct 2109	AGCATCTTCCATCCCTTATCGTGAAAAGCTGAAAGGCGTTGGCGGAAAGCATCCCTGAAAG	AGCATCTTCCATCCCTTATCGTGAAAAGCTGAAAGGCGTTGGCGGAAAGCATCCCTGAAAG		2168
Query 971	ATTCGGTGTACATTGTTCTGCAAGCACCACAGCCCGGGTGGTGGGGTCTGTGAACTA	ATTCGGTGTACATTGTTCTGCAAGCACCACAGCCCGGGTGGTGGGGTCTGTGAACTA		1030
Sbjct 2169	ATTCGGTGTACATTGTTCTGCAAGCACCACAGCCCGGGTGGTGGGGTCTGTGAACTA	ATTCGGTGTACATTGTTCTGCAAGCACCACAGCCCGGGTGGTGGGGTCTGTGAACTA		2228
Query 1031	TCTGGACGAGATTGCTGCATCCGTGTTTCCCGACCCCGCGTAGTCATCTTCTCTGTGG	TCTGGACGAGATTGCTGCATCCGTGTTTCCCGACCCCGCGTAGTCATCTTCTCTGTGG		1090
Sbjct 2229	TCTGGACGAGATTGCTGCATCCGTGTTTCCCGACCCCGCGTAGTCATCTTCTCTGTGG	TCTGGACGAGATTGCTGCATCCGTGTTTCCCGACCCCGCGTAGTCATCTTCTCTGTGG		2288
Query 1091	TGCCAGCGAAGAGACAAAGTCTATAAAGAGCT	TGCCAGCGAAGAGACAAAGTCTATAAAGAGCT	1122	
Sbjct 2289	TGCCAGCGAAGAGACAAAGTCTATAAAGAGCT	TGCCAGCGAAGAGACAAAGTCTATAAAGAGCT	2320	

Figura A7. Blast realizado contra la secuenciación del vector de expresión pGEX4T1 clonado con la isoforma FRD2 con adaptadores BamH I y Xho I.