

---

**IDENTIFICACIÓN DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS  
EN *Trypanosoma cruzi* CON FENOTIPO SENSIBLE Y RESISTENTE  
NATURAL AL BENZNIDAZOL**

**Estudiante:**

**LAURA GONZÁLEZ URIBE**

**Asesora:**

**ANA MARÍA MEJÍA JARAMILLO**

**UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**PREGRADO DE BIOLOGÍA**

**GRUPO DE BIOLOGÍA Y CONTROL DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS  
(BCEI)**

**MEDELLÍN**

**2013**

## **AGRADECIMIENTOS**

Alguien alguna vez escribió que la vida era como una escalera y que a medida que subimos cada peldaño nos damos cuenta de que no solo estamos más alto, sino que hay que hacer más esfuerzos para alcanzarlo, y definitivamente hoy no podría estar más de acuerdo con ella. Lo que viví en mi pregrado no fue fácil, significó muchos sacrificios y esfuerzos, pero también muchas recompensas a nivel académico y personal. Estoy consiente que lo que sigue tampoco será fácil, pero no me arrepiento de la decisión que tomé algunos años atrás cuando decidí seguir en este camino y también sé que como ahora, cuento con muchas personas que me van a apoyar para cumplir cada uno de las metas que tengo.

Estoy convencida que el universo es perfecto y que cada una de las personas que pasó por mi vida aportó algo para que yo llegara a estar en donde estoy. Ahora después de 6 años no tengo más que palabras de agradecimiento para todos.

A mi mamá y mi papá, por enseñarme a luchar por lo que quiero, a seguir mis sueños por más locos que parezcan. Porque me apoyaron en esta decisión y nunca dudaron de que lo lograría y porque, definitivamente, sin su apoyo esto no hubiera sido posible. A mi hermano que ha sido mi compañía y mi punto de apoyo a lo largo de toda la vida.

Omar y Ana María, la confianza que ustedes depositaron en mi me dio fuerza para conseguir este resultado. Lo que hemos logrado, no solo yo, sino el resto de las personas del grupo es el reflejo de su trabajo y su dedicación. Nunca voy a tener suficientes palabras para agradecerles por el tiempo que ustedes han dedicado a enseñarme y compartir sus conocimientos conmigo y aportarme las ideas para lograr el desarrollo de este trabajo y cumplir con los objetivos propuestos.

A mis compañeros del BCEI les quiero agradecer por todo lo que aportaron a este trabajo y a mi vida y por hacer del laboratorio un lugar bueno para trabajar. Le agradezco especialmente a Angie y Lau porque se han convertido en personas en las que puedo confiar, que me escuchan, me aconsejan y me han apoyado

durante todo este tiempo y a Geysson, que aunque ya no está en el laboratorio, desde el primer día que llegué me enseñó lo que significa investigar, que no se trata de saber las técnicas si no se conoce la teoría y a tener la mente abierta para aprender y desarrollar nuevos conocimientos.

A Lina Orrego, que sin ser parte de sus obligaciones, me enseñó y me ayudó en la realización de la parte de proteómica en este trabajo.

Sin lugar a dudas, todo lo que he aprendido en el BCEI ha sido fundamental para lograr esto, pero para llegar ahí fueron muchos los profesores que aportaron un “granito” en todo este camino de aprendizaje: a todos ellos, gracias por dedicar su vida a el trabajo de enseñarle a otros, para eso se necesita pasión y mucha dedicación. A todos los que confiaron en mi, nuevamente GRACIAS.

Han sido muchas personas que han pasado por mi vida en todos estos años: Horus, Fabian, Maicol, David, Sergio, Mile, Meli, Juli, a mis compañeros del laboratorio microbiología, a “las niñas del taller” (incluida caro) les agradezco por ayudarme, por aportar conocimiento, risas y largas conversaciones; por acompañarme en este largo camino, que en realidad apenas comienza.

Finalmente, y no menos importante un agradecimiento inmenso a mis amigas Pao, Nathy y Suzan. Un día hace 7 años tomamos caminos diferentes que nos llevaron a cada una a luchar por nuestro sueño, un sueño que en aquel entonces parecía muy lejano y que hoy se hace realidad. Hoy sé que cuento con ustedes en todo momento y son ustedes las que le ponen ese toque de diversión y alegría a la vida, ustedes sin hacer parte de mi familia se convirtieron en mis confidentes y tienen un lugar gigante en mi corazón.

Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación de COLCIENCIAS, bajo el proyecto código 111551929168 y título “Identificación de genes de resistencia a benznidazole en *Trypanosoma cruzi* mediante el análisis del transcriptoma”, para esta institución un especial agradecimiento.

# TABLA DE CONTENIDO

<b>INDICE DE FIGURAS</b>	<b>6</b>
<b>INDICE DE TABLAS</b>	<b>7</b>
<b>1 RESUMEN</b>	<b>8</b>
<b>2 INTRODUCCIÓN</b>	<b>9</b>
<b>3 MARCO TEÓRICO</b>	<b>11</b>
<b>4 JUSTIFICACIÓN</b>	<b>19</b>
<b>5 HIPÓTESIS</b>	<b>21</b>
<b>6 OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
6.1 Objetivo general	22
6.2 Objetivos específicos	22
<b>7 MATERIALES Y METODOS</b>	<b>23</b>
7.1 CULTIVOS DE PARÁSITOS	23
7.2 EXTRACCIÓN DE ADN	23
7.3 GENOTIFICACIÓN DE LOS CLONES DE LA CEPA DA	23
7.3.1 <i>LSSP-PCR</i>	24
7.3.2 <i>RAPDS</i>	24
7.4 CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DEL CLON SENSIBLE Y RESISTENTE	25
7.4.1 <i>Curva de crecimiento</i>	25
7.5 AMPLIFICACIÓN DE GENES DE <i>T. cruzi</i> POR PCR CONVENCIONAL	25
7.6 SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DEL GEN NTR I	25
7.7 ANALISIS DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE ARNm DE GENES POSIBLEMENTE INVOLUCRADOS CON EL MECANISMO DE RESISTENCIA AL BZ, MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL	26
7.7.1 <i>Obtención del ARN</i>	26
7.7.2 <i>Síntesis de ADN copia (ADNc)</i>	27
7.7.3 <i>PCR en tiempo real</i>	27
7.7.4 <i>Cuantificación relativa de los transcritos</i>	28
7.8 DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS	29
7.8.1 <i>Extracción de ADN</i>	29

7.8.2	<i>PCR en tiempo real</i>	29
7.9	IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EXPRESADAS DIFERENCIAL	29
7.9.1	<i>Preparación de extractos proteicos</i>	29
7.9.2	<i>Electroforesis bidimensionales</i>	30
<b>8</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>33</b>
8.1	CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE CINCO CLONES DE LA CEPA DA MEDIANTE LA LSSP-PCR DEL $\kappa$ ADN Y MINI-EXÓN Y RAPD PCR	33
8.2	DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO <i>in vitro</i> DEL FENOTIPO SENSIBLE Y RESISTENTE NATURAL AL BZ	34
8.3	ANÁLISIS DE LA SECUENCIA Y EXPRESION DE NTR I EN AMBOS FENOTIPOS	35
8.3.1	<i>EVALUACIÓN DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA DE LA ENZIMA NTR I EN EL CLON S Y R</i>	36
8.3.2	<i>CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE TRANSCRIPCIÓN DEL ARNm DE LA ENZIMA NTR I EN LOS CLONES S Y R.</i>	38
8.3.3	<i>DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS RELATIVO DE NTR I CON RESPECTO A HGPRT.</i>	39
8.4	CARACTERIZACIÓN DE OTROS GENES POSIBLEMENTE IMPLICADOS EN LA RESISTENCIA NATURAL DE LOS PARÁSITOS	40
8.4.1	<i>CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE LOS NIVELES DE TRANSCRIPCIÓN DEL ARNm DE GENES POSIBLEMENTE IMPLICADOS EN MECANISMOS DE RESISTENCIA.</i>	40
8.4.2	<i>DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS RELATIVO DE GENES POSIBLEMENTE INVOLUCRADOS EN RESISTENCIA.</i>	42
8.5	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS	43
8.5.1	<i>IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS</i>	45
<b>9</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>51</b>
<b>10</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>62</b>
<b>11</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>63</b>
<b>12</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>64</b>
<b>13</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>66</b>

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Mecanismos bioquímicos de resistencia a medicamentos	14
Figura 2. Genotipificación mediante LSSP-PCR del gen mini-exón y kADN (A) y RAPD-PCR (B) de cinco clones, con diferentes CI <sub>50</sub> al Bz.	34
Figura 4. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína NTR I de los parásitos sensibles (S) y resistentes (R) naturales al Bz	37
Figura 5. ARN total extraído de los parásitos S y R.	38
Figura 6. Cuantificación relativa, mediante PCR en tiempo real.	39
Figura 7. Número de copias relativo mediante PCR en tiempo real, de NTR I.	40
Figura 8. Cuantificación relativa mediante PCR en tiempo real, de 8 genes posiblemente involucrados en resistencia al Bz.	41
Figura 9. Número de copias relativo mediante PCR en tiempo real de 8 genes evaluados.	42
Figura 10. Gel SDS-PAGE de extracción de proteínas totales.	43
Figura 11. Geles de proteínas 2DE de clones S y R.	44
Figura 12. Total de proteínas diferencialmente expresadas ( $p < 0,05$ ).	45

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentración inhibitoria 50 de los clones aislados de la cepa de <i>T. cruzi</i> DA.	23
Tabla 2. Eficiencia de amplificación obtenida para NTR I y dos genes de referencia, en el fenotipo sensible (S) y (R).	38
Tabla 3. Eficiencia de amplificación obtenida para NTR I y un gen de referencia en el fenotipo sensible (S) y (R).	39
Tabla 4. Eficiencia de amplificación para 8 genes y dos genes de referencia en el fenotipo sensible (S) y (R).	41
Tabla 5. Eficiencia de amplificación obtenida para 8 genes y un gen de referencia en el fenotipo sensible (S) y (R).	42
Tabla 6. Proteínas diferencialmente expresadas e identificación por MALDI TOF/TOF MS.	47
Tabla 7. Características anotadas en la base de datos TriTrypDB para cada una de las proteínas identificadas por medio de la espectrometría de masas.	48

# 1 RESUMEN

La resistencia natural del parásito *Trypanosoma cruzi* al benznidazol (Bz) ha sido reportada como una de las principales causas de la ineficiencia de los tratamientos contra la enfermedad de Chagas. Actualmente se han dilucidado algunos mecanismos por los cuales los parásitos pueden adquirir resistencia cuando son presionados continuamente con el Bz. Sin embargo, los mecanismos de resistencia natural siguen siendo desconocidos y diversos estudios apuntan a que difieren, en cierta medida, con los de la resistencia inducida. Con el fin de proponer genes que puedan estar relacionados con la resistencia natural, en el presente trabajo se analizaron diferencias en algunos parámetros genéticos de un clon con resistencia natural (R) y un clon sensible (S). Para esto, se evaluaron cambios en la secuencia, niveles de transcripción y número de copias de la enzima NTR I, implicada en la resistencia inducida. Posteriormente, se cuantificaron los niveles de transcripción y número de copias de otros 8 genes que se han visto regulados en diversos estudios de resistencia. Finalmente, se amplió la búsqueda de genes diferencialmente expresados entre ambos fenotipos por medio de un estudio proteómico. Entre los resultados obtenidos se encontró que ni la enzima NTR I, ni los 8 genes evaluados tienen diferencias en los parámetros evaluados entre ambos clones. Adicionalmente, de las 17 proteínas que se encontraron diferencialmente expresadas entre el clon S y el R, seis han sido asociadas con resistencia en bacterias, hongos, otros parásitos e insectos y fueron identificadas como prostaglandina F2 alfa sintasa (OYE), adenina fosforibosiltransferasa (ADPR), proteína de choque térmico HSP70 y precursor de la proteína de HSP70 mitocondrial, alcohol deshidrogenasa (ADH), y fosfomanomutasa (PMM). En resumen, en este estudio se lograron identificar nuevos genes que podrían estar implicados con los mecanismos de resistencia natural al Bz, lo que contribuye al conocimiento en esta área y por ende, al mejoramiento de la quimioterapia de la enfermedad de Chagas.



## 2 INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, el cual es transmitido por insectos triatomínicos y encontrado en animales silvestres, domésticos y humanos de áreas rurales y periurbanas de toda América Latina (WHO, 2010a).

Si bien, el uso frecuente de los insecticidas (Moncayo, 2003; WHO, 2010a, 2012a) ha sido la estrategia de control más importante para lograr la disminución y/o eliminación de insectos domiciliados y la disminución del ciclo de transmisión doméstico del parásito *T. cruzi* (Telleria and Tibayrenc, 2010), su éxito se ha visto afectado por el incremento de la resistencia de los insectos a los insecticidas, la recolonización de vectores primarios y la colonización de vectores secundarios (Noireau, 2009; WHO, 2012a). Por lo tanto, en la actualidad, el tratamiento de las personas afectadas se ha convertido en una estrategia de control indispensable para la interrupción completa de la transmisión de este parásito.

Actualmente no se cuenta con procedimientos 100% efectivos para tratar a las personas afectadas, disminuir el número de casos e interrumpir los ciclos de transmisión. Los únicos tratamientos parasitológicos aceptados por la OMS son el nifurtimox y el benznidazol (WHO, 2012a), que pueden curar solo hasta el 50% de las infecciones en la fase aguda de la enfermedad (Telleria and Tibayrenc, 2010). No obstante, los resultados para el tratamiento en esta fase han demostrado ser disímiles en los diferentes países debido, probablemente, a las diferencias genéticas existentes entre las cepas de *T. cruzi* (Guzmán *et al.*, 1999), a las características genotípicas de los hospederos y a la resistencia del parásito a los medicamentos (Coura and Castro, 2002; Filardia and Brenera, 1987; Guzmán *et al.*, 1999; Rosas *et al.*, 2007).

Teniendo en cuenta que una de las fallas principales del tratamiento es la resistencia del parásito a los medicamentos, entender los mecanismos moleculares que conducen a que esta se presente, junto con las vías de acción de los fármacos, se ha convertido en una de las prioridades de los estudios sobre la

quimioterapia en esta y otras enfermedades parasitarias. Con este fin, se han desarrollado estrategias que permiten la comparación entre fenotipos sensibles y resistentes y así detectar cambios específicos que puedan ser asociados a la característica observada. Dichas técnicas pueden evaluar la expresión diferencial de genes mediante la cuantificación de los niveles de sus transcritos o proteínas (Breeze and Obaseiki-Ebor, 1983; Drummelsmith *et al.*, 2004; Linares *et al.*, 2005; M Andrade *et al.*, 2008; McCalla *et al.*, 1978; Mejía *et al.*, 2012a; Mott *et al.*, 2010; Murta *et al.*, 2006; Villarreal *et al.*, 2005).

En Tripanosomátidos se han observado mecanismos de resistencia tanto natural (Filardia and Brenera, 1987) como inducida (Wilkinson *et al.*, 2008). pero a pesar de las diferentes técnicas usadas, estos mecanismos no se han podido correlacionar (M Andrade *et al.*, 2008; Nogueira *et al.*, 2006, 2009; Villarreal *et al.*, 2005) y poco se conoce en la actualidad de los mecanismos de la resistencia natural. Es por esta razón, que en el presente trabajo, se pretende identificar genes diferencialmente expresados entre un clon sensible y un clon resistente aislados de una cepa con resistencia natural (Mejía *et al.*, 2012b) como una estrategia para proponer nuevos genes candidatos involucrados en este tipo de resistencia, lo que permitiría aportar conocimiento para el futuro desarrollo de quimioterapias y biomarcadores que permitan conocer la respuesta de los parásitos al tratamiento usado.

### 3 MARCO TEÓRICO

La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana) es considerada por la organización mundial de la salud como una enfermedad endémica para 21 países de América Latina (WHO, 2012b). Fue descrita en 1909 por el médico brasileño Carlos Chagas, el cual identificó el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* como agente causal de la enfermedad. Este parásito posee un complejo ciclo de vida que involucra un paso obligatorio por vertebrados (que puede incluir a los humanos) y un paso por los invertebrados de la subfamilia *triatominae* (Coura and Castro, 2002). Las rutas más comunes de transmisión en los humanos son el contacto con heces de insectos triatominos infectados (80-90%), transfusiones de sangre (5%-20%) y transmisión congénita (0,5-8,0%) (Coura and Castro, 2002). Sin embargo, también se ha reportado la infección con *T. cruzi* por vía oral, debido al consumo de alimentos infectados (Medicina *et al.*, 2011) y contagio por trasplantes de órganos (WHO, 2012b). En agosto de 2012 se estimó que 10 millones de personas se encuentran infectadas y 25 millones están en riesgo de contraer la infección (WHO, 2012a). Asimismo, en la actualidad se han reportado casos en países no endémicos, como Estados Unidos, Canadá, Australia, Japón y algunos países de Europa debido a la migración y el turismo, aumentando el riesgo de infección en estos países por transfusión de sangre o trasplante de órganos (Schmunis, 2007; WHO, 2010b).

La enfermedad se presenta en dos fases principales: aguda y crónica. La fase aguda se manifiesta aproximadamente 2 meses después de la infección; en la cual los amastigotes se multiplican en los macrófagos y células tisulares. En esta etapa el diagnóstico puede ser determinado sólo para el 10% de los casos, ya que en su mayoría no se presentan síntomas. En el periodo crónico los pacientes pueden ser asintomáticos, no se observan parásitos circulando en el torrente sanguíneo y en la mayoría de los casos la enfermedad no avanza, sin embargo un 30% de los pacientes continúan con el desarrollo de la enfermedad hasta una fase crónica sintomática, en la cual se presentan patologías graves del sistema cardíaco, como arritmias severas, trombosis arterial y venosa, y el sistema

digestivo observándose un aumento de tamaño del esófago o el colon, lo que se conoce como megaesófago y megacolon, respectivamente (Apt and Zulantay, 2011; García-torres and Pérez-montfort, 2011; Rosas *et al.*, 2007).

El tratamiento de esta enfermedad en la fase aguda y en la fase temprana crónica es basado en dos medicamentos el benznidazol (Bz) y nifurtimox (Nfx). Estos medicamentos fueron usados por más de tres décadas sin conocimiento de su mecanismo de acción (Coura and Castro, 2002) y fue sólo hasta hace unos años atrás que se conoció que ambos medicamentos actúan como profármacos, es decir, para tener efecto tripanocida deben ser activados por la enzima nitrorreductasa I (NTR I), que es insensible al oxígeno, dependiente de NADH o NAD(P)H y une el cofactor flavín mononucleótido (FMN) (Boiani *et al.*, 2010; Hall *et al.*, 2011; Maya *et al.*, 2007; Wilkinson and Kelly, 2009; Wilkinson *et al.*, 2008).

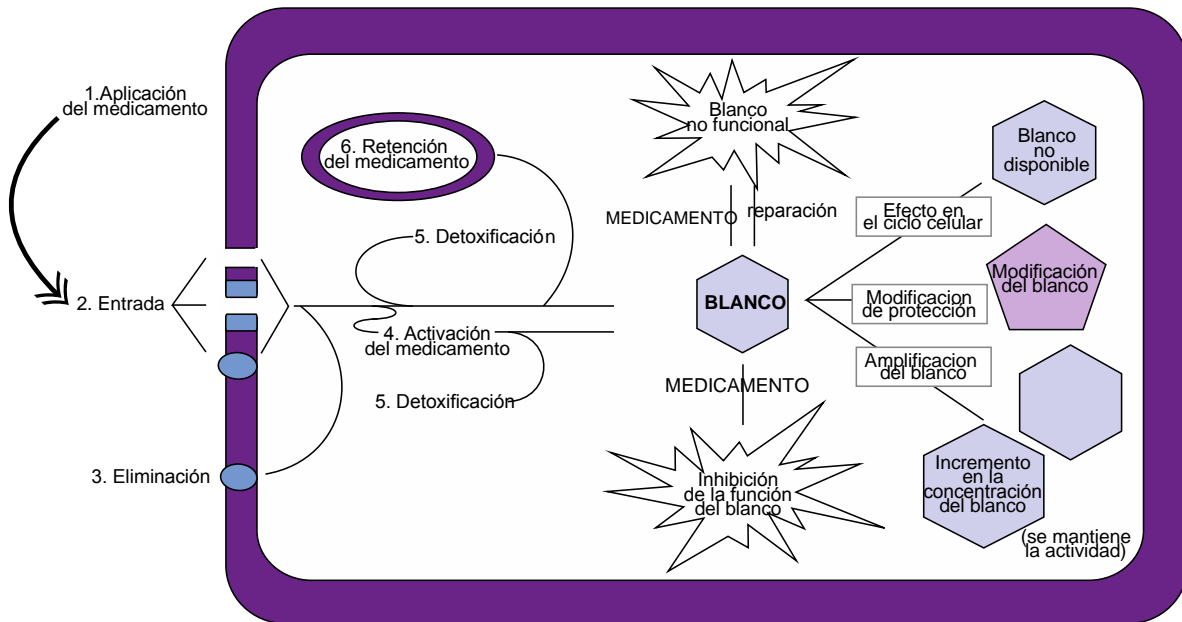
Una vez activado el medicamento en el interior del parásito, ambos compuestos parecen diferir en su mecanismo de acción; por un lado la NTR I cataliza la reducción de 4 electrones para transformar el Nfx en cadena abierta insaturada de nitrilo, la cual tiene el potencial de funcionar como aceptor Michaels y puede reaccionar de forma no específica con un amplio número de componentes celulares (Hall *et al.*, 2011); mientras que el Bz es transformado en el compuesto tóxico dialdehído glioxal, que en presencia de guanosina forma un aducto glioxal-guanosina e impide la formación de nuevas cadenas de ADN (Hall and Wilkinson, 2011).

A pesar de que se ha demostrado que ambos medicamentos son citotóxicos para tripomastigotes circulantes en sangre y amastigotes intracelulares, se han observado diversos efectos colaterales que pueden tener estos compuestos en el 30% de los casos, que van desde intolerancia gastrointestinal (náuseas, vómito y dolor abdominal) hasta depresión de la médula ósea que puede causar disminución en los niveles de plaquetas y leucocitos (Apt and Zulantay, 2011; Coura, 2007). Sin embargo, los efectos colaterales no son los únicos elementos que impiden el éxito de la terapia, puesto que algunos estudios han demostrado una baja eficiencia del tratamiento debido a la presencia de poblaciones de

parásitos resistentes a los medicamentos en los pacientes (Cançado, 1999; Coronado *et al.*, 2006; Filardia and Brenera, 1987).

La resistencia se ha estudiado desde hace varias décadas en bacterias, parásitos, insectos, entre otros. El término resistencia es relativo y hace referencia a un patógeno que es capaz de sobrevivir, multiplicarse e infectar nuevos hospederos a pesar del tratamiento realizado. La cepa resistente es definida por comparación con otra que es conocida por ser sensible al tratamiento, datos que son soportados con experimentos *in vitro* e *in vivo* (Sibley and Price, 2012). La resistencia ha sido clasificada en dos grupos: la intrínseca y la inducida, cuya diferencia principal radica en el momento en el cual el organismo adquiere la resistencia (Hayes and Wolf, 1990). La resistencia intrínseca o natural se basa en el hecho de que el organismo posee una característica distintiva que permite a algunos miembros de la población sobrevivir a cambios particulares en el ambiente. Estas características pueden variar desde la estructura de la membrana, hasta la expresión de proteínas de reparación (Figura 1). En este tipo de resistencia, esa característica especial esta presente en el organismo antes de ser sometido al tratamiento. La resistencia natural se desarrolla a través de presiones con otros agentes químicos diferentes al que se observa la resistencia posterior (Hayes and Wolf, 1990).

Por el contrario, la resistencia inducida surge en una población que inicialmente era susceptible al medicamento y que, debido a la larga exposición al fármaco durante el tratamiento, que es de 1-4 meses para Nfx y de 1-2 meses para Bz (Barrett *et al.*, 2003; Paulos *et al.*, 1989; Raaflaub and Ziegler, 1979; Raether and Hänel, 2003), el parásito desarrolla resistencia mediada por la amplificación o mutación de genes específicos involucrados en las vías de protección, mutaciones en genes que regulan el proceso de respuesta al estrés celular o activación del medicamento, que llevan a una alteración en expresión de algunas proteínas, o mediante la transferencia de genes (Hayes and Wolf, 1990).



**Figura 1 Mecanismos bioquímicos de resistencia a medicamentos**

En este sentido, para *T. cruzi* se ha reportado en la naturaleza la presencia de parásitos con resistencia natural al Nfx y Bz, detectada al menos en un 27% de las cepas aisladas de diferentes orígenes geográficos y biológicos (Filardia and Brenera, 1987). Asimismo, el estudio reciente de la sensibilidad al Bz de cepas colombianas reveló que 36% de las cepas analizadas eran sensibles, 48% parcialmente resistentes y 16% resistentes al fármaco, confirmando los reportes previos de resistencia natural para este parásito (Mejía *et al.*, 2012b).

Adicionalmente, se ha encontrado que cepas sensibles que han sido sometidas a presiones continuas de Nfx y Bz adquieren resistencia, la cual ha sido atribuida a la pérdida parcial o total de los genes que codifican para NTR I (Wilkinson *et al.*, 2008) y a la modificación de la secuencia de esta misma enzima, que afecta tanto la conformación estructural de la proteína como su actividad enzimática (Mejía 2011). De esta manera, en la actualidad la NTR I se considera como una de las enzimas claves del mecanismo de acción de los medicamentos y el surgimiento de resistencia a dichos fármacos (Mejía 2011; Boiani *et al.* 2010; Hall, Bot, and Wilkinson 2011; S. R. Wilkinson *et al.* 2008).

No obstante, la NTR I no es la única nitrorreductasa de éste tipo presente en los tripanosomátidos, existe además la prostaglandina F<sub>2</sub>α sintasa, conocida también como “enzima amarilla u OYE (Old Yellow Enzyme, por sus siglas en inglés) (Kubata *et al.*, 2002; Murta *et al.*, 2006; Nogueira *et al.*, 2006) que, en condiciones aérobicas es capaz de producir prostaglandina PGF<sub>2</sub> a partir de PGH<sub>2</sub> (Yamaguchi *et al.*, 2011) lo cual parece tener un papel importante en la modificación de las reacciones del hospedero para su propio beneficio (Figarella *et al.*, 2005). Sin embargo, en ausencia de O<sub>2</sub> su principal función consiste en la reducción de medicamentos heterocíclicos (Kubata *et al.*, 2002). En 2006, Murta y colaboradores demostraron que parásitos que poseían resistencia inducida al Bz perdían dos copias de este gen (Murta *et al.*, 2006), resultados que hasta la fecha no han sido validados mediante la sobreexpresión o knock-out de este gen en parásitos sensibles.

Igualmente, la citocromo p450 reductasa se ha propuesto como una enzima capaz de activar los medicamentos (Maya *et al.*, 2007), pues en ambientes aeróbicos y con FMN o flavín adenín dinucleótido (FAD) como cofactor, catalizan la reducción de un electrón del sustrato formando radicales nitro, que en presencia de oxígeno molecular permite un ciclo redox del cual se producen aniones superóxido y la regeneración del compuesto nitro (Boiani *et al.*, 2010; Wilkinson *et al.*, 2008). A pesar de esto, en la actualidad existen controversias sobre la función de esta enzima en el mecanismo de acción de los medicamentos, ya que Hall y colaboradores encontraron que la sobreexpresión de esta enzima no confería un fenotipo sensible a los parásitos resistentes (Hall *et al.*, 2011), mientras que Portal y colaboradores demostraron que la sobreexpresión de ésta enzima aumenta la resistencia de los parásitos a los medicamentos y por lo tanto, dicha enzima participaría en la detoxificación de los metabolitos que se producen por la reducción del Bz y el Nfx (Portal *et al.*, 2008).

Pese a que la activación es un paso fundamental en la acción de los fármacos antichagásicos, no es el único factor importante a la hora de establecer mecanismos de acción y resistencia (Hayes and Wolf, 1990; Maya *et al.*, 2007).

Esto se debe a que éstos organismos tienen la capacidad de detoxificar las especies reactivas de oxígeno (ROS) como el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el  $H_2O_2$  y los radicales hidroxilo (Viodé *et al.*, 1999), provenientes de la reducción de los medicamentos y por lo tanto, la sobreexpresión de las enzimas que participan en estas vías de detoxificación podrían conferir resistencia a los parásitos.

En este sentido, se conoce que para el metabolismo de  $O_2^-$ , los tripanosomátidos expresan proteínas que pertenece a la familia de las superóxido dismutasa (SOD) (Ismail *et al.*, 1997; Kabiri and Steverding, 2001). Estas son metaloproteínas que eliminan los radicales superóxido mediante la dismutación en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular (McCord and Fridovich, 1988).

Hasta la fecha se ha reportado la actividad de diferentes isoenzimas de FeSOD en algunos tripanosomátidos como *T. cruzi*, y su importancia en la detoxificación de medicamentos, con algunos resultados inconsistentes. En estudios de sobreexpresión en *T. cruzi* y subexpresión de la FeSOD en *T. brucei* se observó el incremento de la resistencia y la sensibilidad, respectivamente (Nogueira *et al.*, 2006; Prathalingham *et al.*, 2007). Adicionalmente, en el 2008, Andrade y colaboradores, identificaron por medio de análisis proteómicos la expresión diferencial de la FeSODA en una cepa de *T. cruzi* con resistencia inducida *in vitro* y la expresión de FeSODB en la cepa resistente inducida *in vivo*, ratificando la importancia del proceso de detoxificación realizado por las SOD en la resistencia inducida al Bz (M Andrade *et al.*, 2008).

Por otro lado, otra de las estrategias de los kinetoplastidios para combatir el estrés oxidativo es por medio de la síntesis de un tiol análogo al glutatión de los humanos conocido como el tripanotión (Irigoín *et al.*, 2008; Krauth-Siegel and Comini, 2008; Müller *et al.*, 2003), que se forma a partir de 2 moléculas de glutatión y una molécula de espermidina, por la acción de dos enzimas: la glutatión espermidina sintetasa (GST) y la tripanotión sintetasa (TS), en una reacción dependiente de ATP (Irigoín *et al.*, 2008). Adicionalmente, como una forma de mantener los niveles de tripanotión reducido dentro del parásito es necesario la acción de la tripanotión reductasa (TryR), una flavoproteína dependiente de NADPH. En



*Leishmania donovani* se ha observado que la disminución de la expresión de esta proteína mediante expresión heteróloga disminuye la habilidad de los parásitos de sobrevivir en los macrófagos (Tovar *et al.*, 1998a) y en *T. brucei*, Krieger y colaboradores, demostraron que parásitos que carecían de TryR aumentaban su sensibilidad al estrés oxidativo y perdían la capacidad de infectar y sobrevivir en macrófagos humanos (Krieger *et al.*, 2000)

Por su parte, el tripanotión actúa con otras enzimas como las triparedoxinas peroxidasa (TXPs), que se encuentran tanto en el citosol como en la mitocondria (Tetaud *et al.*, 2001), son antioxidantes dependientes de NADPH y tienen como funciones proteger a las células de daños mediados a partir de hidroperóxidos (Piñero *et al.*, 2005) y transferir electrones a la ribonucleótido reductasa para la reducción de ribonucleótidos y peroxirredoxinas (Patel *et al.*, 2010; Wilkinson and Kelly, 2003). Estas enzimas se han visto reguladas en los parásitos con resistencia inducida al Bz, tanto a nivel de la expresión de ARNm (Nogueira *et al.*, 2009), como a nivel de proteínas, en donde se observó la expresión de las peroxidases de forma exclusiva en los parásitos resistentes (M Andrade *et al.*, 2008).

La búsqueda y estudio de los genes mencionados anteriormente, se ha realizado por diferentes técnicas que buscan encontrar cambios en la transcripción y expresión de genes, amplificación o delección de estos o cambios en sus secuencias. Entre estas técnicas se pueden señalar “Southern blot”, “Northern blot”, “Western blot”, electroforesis en campo pulsado (Murta *et al.*, 2006, 2008; Nogueira *et al.*, 2006, 2009; Villarreal *et al.*, 2005; Wilkinson *et al.*, 2008), secuencias aleatorias diferencialmente expresadas (RADES) (Villarreal *et al.*, 2005), “Diferential display” (DD) (Murta *et al.*, 2008), PCR en tiempo real (qRT-PCR) (Mejía *et al.*, 2011; Murta *et al.*, 2006, 2008; Nogueira *et al.*, 2006, 2009), proteómica (M Andrade *et al.*, 2008) y secuenciación (Mejía *et al.*, 2012a; Wilkinson *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta, que en los tripanosomátidos la transcripción parece no ser un paso regulatorio de la expresión, debido a su naturaleza policistrónica, es la regulación post transcripcional y post traduccional

fundamental en la modulación de la expresión y función de las proteínas (Liang *et al.*, 2003; Martı́ *et al.*, 2003), y se hace necesario abordar el estudio de los cambios de la expresión desde diferentes metodologías. En este sentido, técnicas como la qRT-PCR y la proteómica son útiles para medir diferentes niveles de transcripción y expresión, respectivamente, en poblaciones de parásitos sensibles y resistentes a los medicamentos, y detectar genes diferencialmente transcritos y expresados, que permitan identificar aquellos que estén siendo regulados y que puedan ser importantes en la resistencia y en los mecanismos de acción de los medicamentos.

Por otro lado, considerando que la mayoría de estudios para dilucidar estos mecanismos de resistencia se ha basado en la investigación de parásitos con resistencia inducida al Bz y teniendo en cuenta todos los antecedentes mencionados anteriormente, en éste trabajo se quiso evaluar diferentes aspectos de la resistencia a medicamentos en clones con resistencia natural. Para esto, se empezó caracterizando biológica y genéticamente los clones con diferentes sensibilidades al Bz, luego se siguió con el análisis del gen que codifica para la enzima con mayor implicación en la resistencia inducida, la NTRI, continuando con el análisis de otros genes que se han observado implicados en la resistencia al fármaco, mediante la medición de sus niveles de transcripción y número de copias por PCR en tiempo real y terminando con un estudio más global, que permitió un análisis más profundo de la expresión mediante el análisis del proteoma de dichos parásitos. Todo lo anterior, teniendo como objetivo final, contribuir al conocimiento de los mecanismos de acción de los medicamentos y de la resistencia natural, que se traduce en aportar herramientas que en un futuro permitan mejorar los tratamientos actuales, así como predecir blancos quimioterapéuticos y marcadores de resistencia.

## 4 JUSTIFICACIÓN

El parásito hemoflagelado *T. cruzi* es el agente causal de la enfermedad de Chagas, la cual causa insuficiencia cardíaca a miles de personas anualmente en muchas regiones de Latinoamérica (Rosas *et al.*, 2007). En la actualidad los dos medicamentos aceptados para el tratamiento de esta enfermedad son el Nfx y Bz (WHO, 2012a).

Si bien, ambos fármacos tienen efectos citotóxicos contra las dos formas parasitarias presentes en los mamíferos, tienen numerosas limitaciones como, la presencia de cepas resistentes que se desarrollan por la larga exposición de los parásitos a los fármacos debido al tiempo de los tratamientos, (Barrett *et al.*, 2003; Paulos *et al.*, 1989; Raaflaub and Ziegler, 1979; Raether and Hänel, 2003) y a la presión de selección a los cuales están sometidos todos los organismos, (Hayes and Wolf, 1990), la resistencia cruzada que ocurre con algunos compuestos nitroheterocíclicos como el nifurtimox, la nitrofurazona, el benznidazol, entre otros (Bot *et al.*, 2010; Sokolova *et al.*, 2010; Wilkinson *et al.*, 2008) y los efectos secundarios de los medicamentos que van desde intolerancia gastrointestinal, hasta depresión de la médula ósea, que causa la disminución en los niveles de plaquetas y leucocitos en el 30% de los casos (Apt and Zulantay, 2011; Coura and Castro, 2002) y que implica la finalización temprana de los tratamientos (Apt and Zulantay, 2011).

En la actualidad, se propone que para el desarrollo de nuevas quimioterapias antiparasitarias es necesario el entendimiento y el análisis de las redes celulares que permitan la identificación de enzimas implicadas en los modos de acción de los tratamientos usados hoy en día y en los mecanismos de resistencia que los parásitos han desarrollado (Cançado, 1999; García-torres and Pérez-montfort, 2011; Klipp *et al.*, 2010). Dicho entendimiento puede servir para la identificación de enzimas que con una baja inhibición farmacológica tengan gran impacto en la ruta de acción y finalmente en la supervivencia de los parásitos (Olin-Sandoval *et al.*, 2012). No obstante, hasta el momento los estudios se han enfocado en el análisis

de parásitos sensibles que han adquirido la resistencia *in vitro* e *in vivo*, dilucidando algunas de las enzimas implicadas en el modo de acción del Nfx y Bz, como la NTR I (Hall and Wilkinson, 2011; Mejía *et al.*, 2011; Wilkinson *et al.*, 2008) y su importancia en la adquisición de resistencia. Sin embargo, aún no resulta claro si el mecanismo molecular de la resistencia inducida a los medicamentos es el mismo en las cepas con resistencia natural.

Teniendo como base la importancia de establecer diferencias biológicas y moleculares en parásitos con resistencia natural, se clonó una cepa aislada de humano antes del tratamiento, obteniendo clones resistentes y sensibles al Bz, con los cuales se estudiaros aspectos como la diferencia de transcripción y número de copias génicas para algunos genes y la expresión de proteínas, para aportar al conocimiento sobre la resistencia y la acción de los medicamentos e implementar nuevo conocimiento a la investigación sobre las estrategias quimioterapéuticas para la enfermedad de Chagas, mejorar el tratamiento con los medicamentos actuales y poder determinar genes o proteínas implicadas en resistencia que sean detectables antes y durante la terapia, para garantizar un tratamiento pertinente y eficaz a cada paciente.

## 5 HIPÓTESIS

Los genes que se expresan diferencialmente entre parásitos de *T. cruzi* con fenotipo sensible y resistente natural al Bz podrían estar implicados con los mecanismos de resistencia natural a este medicamento.

## 6 OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo general

Identificar genes diferencialmente expresados en clones de *T. cruzi* con fenotipo sensible y resistente natural al Bz.

### 6.2 Objetivos específicos

- Evaluar el perfil genético de 5 clones de la cepa DA que poseen diferencias en la sensibilidad al Bz.
- Comparar crecimiento *in vitro* de dos clones de *T. cruzi* que poseen diferentes sensibilidades al Bz.
- Determinar el nivel de transcripción y número de copias de 9 genes por PCR en tiempo real en un clon sensible y un clon con resistencia natural al Bz de *T. cruzi*.
- Identificar proteínas diferencialmente expresadas en *T. cruzi* sensible y naturalmente resistente al Bz, mediante el análisis del proteoma.

## 7 MATERIALES Y METODOS

### 7.1 CULTIVOS DE PARÁSITOS

En este trabajo utilizaron cinco clones obtenidos a partir de la cepa DA de *T. cruzi* que fue aislada de un humano sin tratar, y que poseen diferentes concentraciones inhibitorias 50 (CI<sub>50</sub>) al Bz (Tabla 1). Estos clones se mantuvieron por repiques semanales a 28 °C en 5 ml de medio RMPI suplementado con suero bovino fetal 20%.

Tabla 1. Concentración inhibitoria 50 de los clones aislados de la cepa de *T. cruzi* DA.

Clones cepa DA	CI <sub>50</sub> (µM)
1	11,0 ± 2,2
2	26,9 ± 3,0
3	29,2 ± 2,1
4	34,4 ± 2,9
5	49,5 ± 3,3

### 7.2 EXTRACCIÓN DE ADN

El ADN de los parásitos se obtuvo a partir de un cultivo de parásitos en crecimiento exponencial. Para esto, 10 ml de cultivo (aproximadamente  $8 \times 10^7$  células/ml) se recolectaron mediante centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos (min), se resuspendieron en 3 ml de buffer de lisis (10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA pH=7,5, 1% SDS) con 20 µg/ml de proteinasa K y se incubaron a 37 °C toda la noche. Posteriormente, el ADN fue extraído con un volumen de fenol, uno de fenol-cloroformo (1:1) y uno de cloroformo y precipitado con 2,5 volúmenes de etanol absoluto. Finalmente, la madeja de ADN obtenida se lavó con etanol al 70% (v/v) y se resuspendió en agua estéril con 1 µg/ml ARNasa y se incubó a 37°C por dos horas.

### 7.3 GENOTIFICACIÓN DE LOS CLONES DE LA CEPA DA

Con el fin de seleccionar dos clones con diferentes sensibilidades al Bz uno sensible (S) y otro resistente (R), pero genéticamente similares, para identificar

genes posiblemente implicados en la resistencia natural, mediante el análisis de diferencias a nivel transcripcional, expresión de proteínas y número de copias, se realizó la genotificación de cinco clones de la cepa DA, utilizando PCR de baja astringencia con un único oligo (LSSP-PCR) y amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD).

### **7.3.1 LSSP-PCR**

Para la LSSP-PCR de la región variable de los minicírculos del kADN y de la región intergénica del mini-exón se usaron las condiciones detalladas en el Anexo 2.

Los productos amplificados de 330 y 350 pb obtenidos de la región variable del kADN y del mini-exón, respectivamente, se purificaron a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión al 1,5%, se diluyeron 10 veces en agua bidestilada y 1 µl de la dilución se usó como molde para la reacción de LSSP-PCR (Vago *et al.*, 1996). Para llevar a cabo esta técnica se usó solamente el oligo 121 para el kADN y el oligo TCC para el gen mini-exón. Para la visualización de las bandas se usó una cámara de electroforesis vertical, con gel de poliacrilamida al 8% (poliacrilamida 40% con TBE 10X como solución tampon, APS 10% y temed para la polimerización del gel). La tinción se realizó con nitrato de plata y posteriormente el gel fue escaneado para su análisis.

### **7.3.2 RAPDS**

El procedimiento de amplificación aleatoria fue realizado como lo describe Steindel y colaboradores (Steindel *et al.*, 1994). Para esto, se utilizaron tres oligos en una sola reacción y/o en reacciones independientes (Anexo 1 y Anexo 2). Para la visualización de los perfiles se usó un gel de poliacrilamida, como se mencionó anteriormente.



## **7.4 CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DEL CLON SENSIBLE Y RESISTENTE**

### **7.4.1 Curva de crecimiento**

Para este estudio se realizaron curvas de crecimiento *in vitro* de clones con fenotipo sensible y resistente natural al Bz. Para esto, se inició con cultivos de  $1 \times 10^6$  parásitos en 10 ml de medio RPMI, por triplicado, incubados a 28 °C y contados cada dos días en la cámara de Neubauer hasta alcanzar la fase estacionaria, utilizando alícuotas de 10  $\mu$ l para estimar el crecimiento relativo de la población. Las diferencias en el crecimiento en la fase exponencial se analizaron mediante una prueba t-student en el programa GraphPad Prims.

## **7.5 AMPLIFICACIÓN DE GENES DE *T. cruzi* POR PCR CONVENCIONAL**

Los genes NTR I, la región intergénica de los genes mini-exón y la región variable de los minicírculos del kADN se amplificaron mediante PCR convencional (Anexo 1 y Anexo 2), se separaron por medio de una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 0,8% (p/v), utilizando TBE 0,5X como solución tampón (89 mM Tris, 89 mM ácido bórico y 50 mM EDTA pH 8,3) y posterior tinción con bromuro de etidio (BrET), a una concentración final de 0,5  $\mu$ g/ml y visualizaron bajo luz ultravioleta (U.V).

## **7.6 SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DEL GEN NTR I**

Una vez verificada la amplificación de NTR I los fragmentos se enviaron para la purificación y secuenciamiento a la empresa MacroGen Inc. ,en Seúl, Republica de Corea ([www.dna.macrogen.com](http://www.dna.macrogen.com)), utilizando los primers 1F, 2R y 2R seq. Las secuencias de los oligos y las condiciones de amplificación se encuentran detalladas en los anexos 1 y 2.

Para cada gen, las secuencias (1F, 2R y 2R seq) fueron visualizadas y ajustadas manualmente mediante el programa BioEdit v.7.0,9.0 y posteriormente alineadas utilizando el programa ClustalX para obtener una secuencia consenso por clon.

Para su análisis cada secuencia fue alineada y comparada con la secuencia NTR I de *T. cruzi* de la cepa DA, un clon sensible y un clon con resistencia inducida (Mejía, 2011) utilizando el programa ClustalX.

## **7.7 ANALISIS DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE ARNm DE GENES POSIBLEMENTE INVOLUCRADOS CON EL MECANISMO DE RESISTENCIA AL BZ, MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL**

La evaluación de la expresión de ARNm se realizó para 9 genes que podrían estar implicados en mecanismos de resistencia de los parásitos al Bz, basados en la revisión de literatura; estos genes fueron: el gen de la enzima amarilla (TcOYE), nitrorreductasa I (NTR I), NADPH citocromo P-450 reductasa (P-450), tripanotión reductasa (TryR), glutationil espermidina sintetasa (GTS), tripanotión sintetasa (TryS), triparedoxin peroxidasa citosólica y mitocondrial (TxPc y TxPm) y la superóxido dismutasa A (SODA). Como genes de referencia se seleccionaron la hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa (HGPRT) y el gen ARN ribosomal 24Sα, los cuales se han reportado de expresión constante en *T. cruzi* (Murta *et al.*, 2006).

Esta evaluación se realizó para un clon sensible (S) y un clon resistente (R), mantenidos en cultivo sin presión de Bz y procesados por duplicado en experimentos independientes como réplicas biológicas.

### **7.7.1 Obtención del ARN**

El ARN de los parásitos se obtuvo a partir de un cultivo en crecimiento logarítmico, el cual se recolectó mediante centrifugación a 3000 rpm durante 10 min a 4 °C, y el pellet obtenido se resuspendió en 1 ml de Trizol (Invitrogen), seguido de una extracción con el kit “GeneJET™ RNA Purification Kit” de Fermentas, siguiendo la metodología descrita en el manual. La concentración, pureza y calidad del ARN

total se evaluó por espectrometría a 260/280 nm en NANODROP 2000c y mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5%, teñidos con BrEt y visualizados bajo luz U.V. Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

### **7.7.2 Síntesis de ADN copia (ADNc)**

El ADNc se sintetizó empleando la metodología descrita para la transcriptasa reversa Revert Aid M-MLV (Fermentas), a partir del ARN previamente tratado con 1 U ADNasa I (Promega) por cada  $\mu\text{g}$  de ARN usado durante 2 horas a 37 °C. Para la síntesis del ADNc, se adicionó 1  $\mu\text{g}$  de ARN total, 50  $\mu\text{M}$  de oligo dT y 500 ng/ $\mu\text{l}$  de hexámeros aleatorios (Promega) a un volumen final de 10  $\mu\text{l}$ . Esta solución se incubó a 70°C por 5 min, luego se pasó a hielo, y se agregó 5X de buffer de reacción, 10 mM dNTPs y se incubó a 25 °C por 5 min. Posteriormente, se adicionó 1 U de la transcriptasa reversa, lo cual se incubó a 25°C por 10 min, 42 °C por 60 min y 70 °C por 10 min. Finalmente, el ADNc se almacenó a -20 °C hasta su uso.

### **7.7.3 PCR en tiempo real**

Para la evaluación de la expresión diferencial del ARNm de los genes asociados a la resistencia en todos los grupos experimentales, se utilizó la PCR en tiempo real (qRT-PCR). Para la amplificación se usaron los oligos específicos diseñados por Mejía 2011 (Anexo 3) y las condiciones estandarizadas anteriormente para cada uno de los genes (Mejía, 2011): volumen final de reacción 10  $\mu\text{l}$ , conteniendo 2,5  $\mu\text{l}$  de ADNc a una concentración inicial de 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 1X SYBR Green, 1X Buffer TrueStart HS taq (Fermentas), 3,0 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 1  $\mu\text{M}$  de cada oligo, 1U TrueStar HS Taq (Fermentas). La reacción de amplificación y detección se llevó a cabo empleando el equipo Rotor-Gene-Q (Qiagen), con el rotor de 72 tubos. Los ciclos de amplificación se realizaron a una temperatura inicial de 95 °C por 10 min, seguida de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 62 °C por 10 segundos y 72 °C por 20 segundos y un ciclo final a 72 °C por 10 min. Todas las reacciones se hicieron por triplicado para aumentar la fidelidad de la cuantificación.

Como parámetro de la especificidad en la reacción de amplificación se construyó una curva de disociación en el rango de 75 °C a 80 °C con una tasa de transición de temperatura de 0,1 °C y una adquisición de fluorescencia continua.

#### 7.7.4 Cuantificación relativa de los transcritos

Para determinar los niveles de expresión del ARNm se utilizó un método de cuantificación relativa que viene definido en la ecuación (1):

$$\text{Expresión relativa} = \frac{(\text{Eficiencia}_{\text{blanco}})^{\Delta\text{CP}_{\text{blanco}}(\text{Promedio sensible-Promedio resistente})}}{(\text{Eficiencia}_{\text{referencia}})^{\Delta\text{CP}_{\text{referencia}}(\text{Promedio sensible-Promedio resistente})}} \quad (1)$$

El análisis de cuantificación de los genes evaluados entre el clon sensible y los resistentes se realizaron en el programa REST 2009, modo RG, el cual es específico para los datos provenientes del equipo Rotor-Gene-Q ([http://www.genequantification.de/REST\\_2009\\_Software\\_User\\_Guide.pdf](http://www.genequantification.de/REST_2009_Software_User_Guide.pdf)). Para esto, se usaron los datos del software de dicho equipo, los cuales se obtuvieron en la opción “Comparative Quantitation Analysis”, donde se observa la eficiencia de la reacción de amplificación para cada muestra (“Amplification”), al igual que el CP “Crossing Point” (“Take off”) (Pfaffl, 2001). Los análisis se realizaron mediante la comparación del clon sensible con cada uno de los resistentes utilizando un análisis de aleatorización con 10,000 permutaciones en dicho programa y usando como genes de referencia HGPRT y el gen ARN ribosomal 24Sα simultáneamente. La expresión de los genes se consideró significativa por debajo o por encima de los niveles de expresión del clon sensible cuando poseía valores que lo superaban en al menos dos veces y con un valor p significativo de 0,05 (Pfaffl, 2001; Pfaffl et al., 2002).

Este procedimiento se realizó independientemente para cada una de las réplicas biológicas, obteniéndose dos valores de significancia y de expresión para cada uno de los genes estudiados.

## 7.8 DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS

La evaluación del número de copias se realizó para los genes mencionados anteriormente, de la siguiente manera:

### 7.8.1 Extracción de ADN

La extracción del ADN se realizó usando el kit comercial “GeneJET Genomic DNA Purification Kit” de Fermentas. Para esto, se utilizaron  $5,0 \times 10^7$  parásitos y se siguió la metodología descrita en el manual para extracción de ADN de células de mamífero. El ADN obtenido se cuantificó por espectrometría a 260/280 nm en NANODROP 2000c y se diluyó a una concentración de 10 ng/ $\mu$ l.

### 7.8.2 PCR en tiempo real

Para la amplificación y análisis se siguió la metodología descrita anteriormente para determinar la expresión del ARNm. En este caso, se determinó el número de copias para cada gen del clon R con respecto al S usando la ecuación (2) y teniendo como gen de referencia HGPRT, el cual tiene dos copias por genoma diploide en *T. cruzi* (Murta et al., 2006).

$$\text{Número de copias} = \frac{(\text{Eficiencia}_{\text{referencia}})^{\Delta CP_{\text{referencia}}}}{(\text{Eficiencia}_{\text{blanco}})^{\Delta CP_{\text{blanco}}}} \quad (2)$$

## 7.9 IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EXPRESADAS DIFERENCIAL

### 7.9.1 Preparación de extractos proteicos

Para la obtención de los extractos proteicos se hizo un recuento de los cultivos de epimastigotes de aproximadamente 8 días o hasta alcanzar una concentración mayor a  $1 \times 10^7$  parásitos/ml. Los parásitos se cosecharon por centrifugación a 3000 rpm durante 10 min. Se realizaron dos lavados con PBS isotónico pH 7,2 (13,6 mM NaCl, 0,27 mM KCl, 0,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,15 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) y finalmente se resuspendieron en 2 ml de PBS hipotónico (13,6 mM NaCl, 0,27 mM KCl, 0,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,15 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), con 1X de inhibidores de proteasas

(Complete, EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets, Roche). Los parásitos se lisaron mediante 15 ciclos de sonicación y congelamiento con nitrógeno líquido de 5 min y 1 minuto, respectivamente, manteniendo las muestras en hielo durante todo el procedimiento de sonicación. Este sonicado total se centrifugó a 13.000 rpm durante 7 min a 4 °C, para obtener la fracción soluble que fue analizada mediante electroforesis bidimensionales.

La fracción soluble se lavó con 500 µl de acetona fría, se centrifugó nuevamente a 13.000 rpm durante 15 min, posteriormente se removió el sobrenadante, el pellet fue resuspendido en 200 µl de tampón de isoelectroenfoco (9M urea, 4% CHAPS, 40 mM DTT y 1% anfólitos 3-10), fue incubado una hora a temperatura ambiente y luego a 4 °C por 24 horas, después de las cuales se realizaron 10 ciclos adicionales de sonicación, nitrógeno líquido y vortex por tiempos de 5 min, 30 segundos y 1 minuto respectivamente. Consecutivamente, la concentración de las proteínas se determinó empleando el kit de 2D QUANT (GE Healthcare), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. Las proteínas cuantificadas fueron almacenadas a -80 °C hasta su uso.

## **7.9.2 Electroforesis bidimensionales**

Para cada clon, se realizaron tres geles que corresponden a las réplicas biológicas.

### **7.9.2.1 Isoelectroenfoco**

Para la primera dimensión, las proteínas se separaron en tiras de poliacrilamida de gradiente de pH inmovilizado (IPG) de 7 cm de longitud, con rangos de pH de 5-8 (GE Healthcare). Las muestras proteicas se separaron por punto isoeléctrico en un sistema Ettan IPGphor 3 a una temperatura de 20 °C a 50 µA/tirilla, con las siguientes condiciones eléctricas: Rehidratación pasiva por 12 horas; constante de 1 a 200V por una hora (100 Vhr); gradiente desde 200 a 500V por una hora (350 Vhr); gradiente desde 500 a 1000V por una hora (750 Vhr); gradiente desde 1000 a 3500V por 30 min (1125 Vhr); 3500V constantes por 5 horas o hasta completar un voltaje igual a 20000Vhr.

### **7.9.2.2 Electroforesis SDS-PAGE**

Para la segunda dimensión, las tiras se equilibraron en un tampón compuesto de urea 6 M, SDS 2% (v/v), Tris-HCl 375 mM (pH 8,8) y glicerol 20% (v/v), el cual permite mantener el pH de las tiras en un rango apropiado para la electroforesis. Las tiras situadas de manera horizontal, se pusieron en contacto con 2,5 ml del tampón con 10 mg/ml de DTT por 20 min, con el fin de mantener las proteínas reducidas. Las tiras equilibradas se situaron sobre geles de poliacrilamida al 12% de 1 mm de espesor, y se sembraron 2 µl de marcador de peso molecular (Protein Molecular Weight Marker, Fermentas). Para favorecer el contacto entre las dos matrices de poliacrilamida y facilitar la migración de las proteínas de la primera a la segunda dimensión, se adicionaron aproximadamente 500 µl de agarosa al 1% (p/v) con trazas de azul de bromofenol sobre la tira, que a su vez funciona como frente de corrida de los geles. La migración de las proteínas se realizó en un sistema Mini-PROTEAN Tetra Cell en tampón estándar Tris/Glicina/SDS, empleando 20V/cm por 120 min.

### **7.9.2.3 Tinción del gel con coomasie coloidal**

Para la visualización de las proteínas, los geles obtenidos para cada clon, se tiñeron empleando la coloración de Azul de Coomassie Coloidal (G-250), la cual tiene una sensibilidad de detección de 8-50 ng de proteína en el gel, es compatible con espectrometría de masas y tiene una alta reproducibilidad, esencial para el análisis de expresión diferencial.

Para proceder a la tinción, una vez acabada la segunda dimensión, los geles se incubaron durante 90 min con una solución fijadora compuesta por 30% (v/v) de metanol y 2% (v/v) de ácido fosfórico, haciendo cambio de la solución cada 30 min; una vez terminada la fijación se realizaron 3 lavados de 30 min con una solución compuesta por 2% (v/v) de ácido fosfórico. Finalmente, los geles se incubaron con una solución de 18% (v/v) de metanol, 2% (v/v) de ácido fosfórico y 15% (p/v) de sulfato de amonio durante 30 min, tras los cuales se adicionó el colorante (Brilliant Blue G) a una concentración del 1% (v/v) con respecto al

volumen de la solución y se dejaron en incubación durante 72 horas a temperatura ambiente en constante agitación.

#### **7.9.2.4 Análisis de imágenes**

Para obtener las imágenes de los geles se utilizó un escaner ImageScannerTM III (GE Healthcare). El análisis diferencial de las imágenes se llevó a cabo en el software ImageMaster 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare), el cual permite la detección, conteo y comparación del volumen relativo de los puntos de proteínas presentes en los geles teñidos con Azul de Coomassie Coloidal G-250. Los parámetros usados para la selección de los *spots* fueron: Suavisado = 2, prominencia = 24 y área mínima, fueron inspeccionados manualmente y, cuando fuera necesario, editados con la herramienta Edit Spot Tools.

#### **7.9.2.5 Identificación de proteínas**

Las proteínas expresadas diferencialmente ( $p < 0,05$ ) se enviaron al laboratorio Mass Spectrometry Laboratoy en Texas, US para la identificación de la secuencia por medio de MALDI-TOF/TOF, se identificaron con el programa Matrix Science Mascot (<http://www.matrixscience.com/>) y se compararon y anotaron funcionalmente contra la base de datos de *T. cruzi* TriTrydb (<http://www.tritrypdb.org/tritrypdb/>). Adicional a esto, se buscó en la base de datos Kegg (<http://www.genome.jp/kegg/>), la posible ruta metabólica en la cual se encuentra implicada.



## **8 RESULTADOS**

### **8.1 CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE CINCO CLONES DE LA CEPA DA MEDIANTE LA LSSP-PCR DEL kADN Y MINI-EXÓN Y RAPD PCR**

Debido a la estructura multiclonal de las poblaciones de *T. cruzi* (Tibayrenc, 2003), es necesario evidenciar mediante el estudio de los perfiles genéticos obtenidos con diferentes marcadores moleculares, la variabilidad que existe entre cinco de los clones aislados de la cepa DA y determinar si son similares o diferentes entre ellos, con el fin de seleccionar dos clones homogéneos, pero con diferente sensibilidad al Bz.

Para esto se realizó la genotipificación con dos técnicas basadas en PCR, la LSSP-PCR del marcador mitocondrial kADN y el marcador nuclear mini-exón, y RAPD-PCR (Figura 2). El análisis de los tres marcadores, mostró que los perfiles obtenidos para los clones 1 y 5 fueron similares, siendo el CL1 el más sensible (11,0  $\mu\text{M}$ ) y el CL5 el más resistente (49,5  $\mu\text{M}$ ). Debido a sus similitudes genéticas y a sus diferencias en la sensibilidad al Bz, estos clones fueron seleccionados para el estudio de la resistencia natural y fueron nombrados S y R, respectivamente.

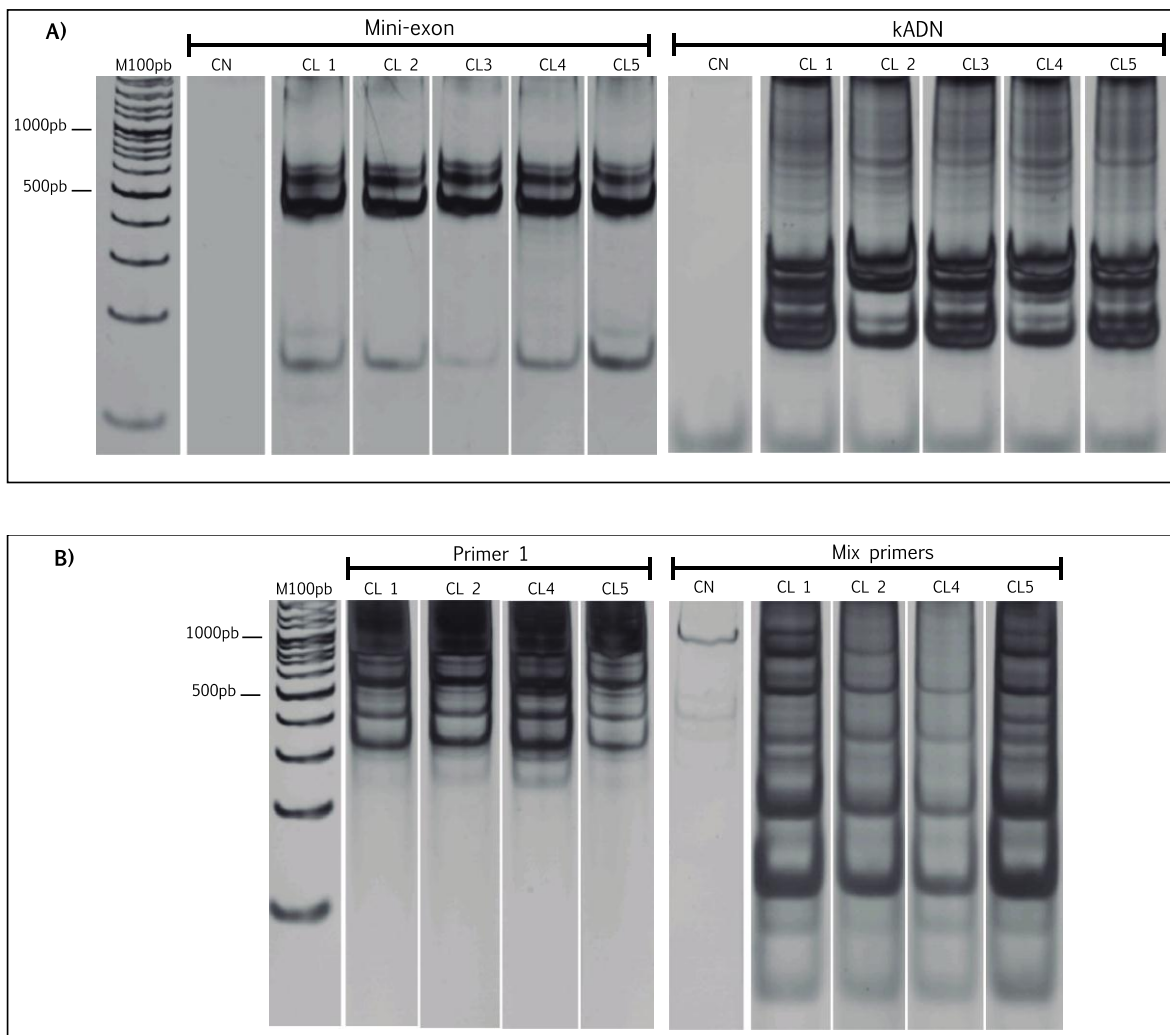


Figura 2. Genotipificación mediante LSSP-PCR del gen mini-exón y kADN (A) y RAPD-PCR (B) de cinco clones aislados de la cepa DA, con diferentes  $CI_{50}$  al Bz. Los productos de la PCR fueron separados en geles de poliacrilamida al 8% y teñidos con nitrato de plata. M100pb: marcador de tamaño molecular de 100 pb, CN: control negativo de la PCR.

## 8.2 DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO *in vitro* DEL FENOTIPO SENSIBLE Y RESISTENTE NATURAL AL BZ

Además de asegurar que existe un perfil genético similar, es necesario evaluar algunas características biológicas como el crecimiento *in vitro* y así asegurar, en cierta medida, que las diferencias genéticas que se pueden encontrar no están afectando otros aspectos biológicos de los parásitos diferentes a la resistencia.

Como se observa en la Figura 3 los clones S y R alcanzaron aproximadamente una densidad poblacional de  $50 \times 10^6$  parásitos/ml en 8 días, tiempo después del cual continuaron con un crecimiento estacionario. El análisis estadístico mediante la prueba t-student realizado en la fase exponencial de crecimiento para ambos clones no mostró diferencias significativas.

### 8.3 ANALISIS DE LA SECUENCIA Y EXPRESION DE NTR I EN AMBOS FENOTIPOS

Debido a la importancia de la enzima NTR I en la activación del Bz y la implicación directa que tiene en la resistencia inducida, ya sea por mutaciones puntuales (Mejía *et al.*, 2012a) o por pérdida del número de copias génicas (Mejía *et al.*, 2012a; Wilkinson *et al.*, 2008), se decidió evaluar estas características para esta enzima en los clones S y R.

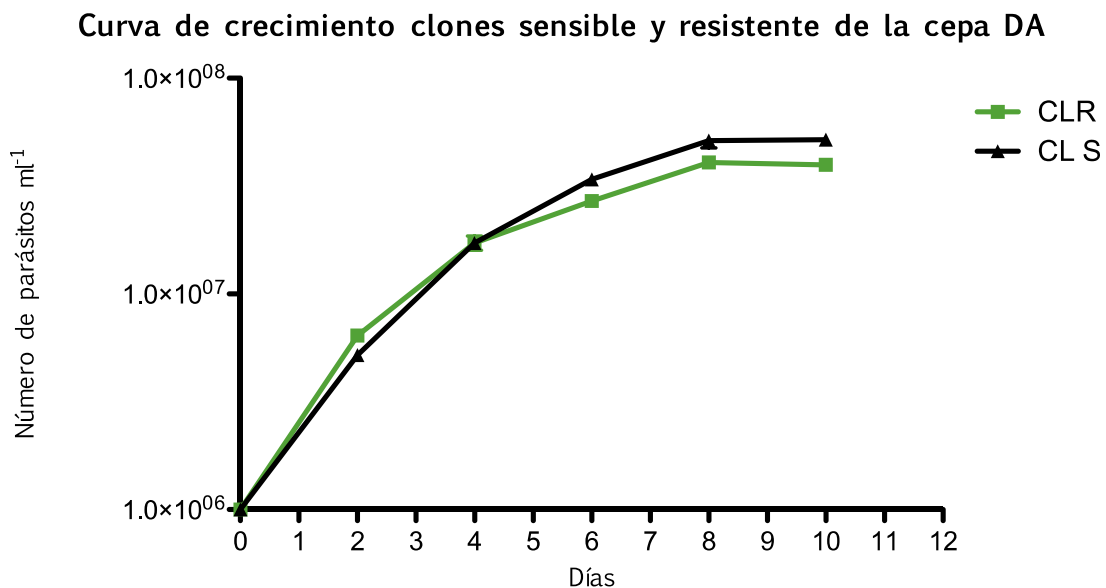


Figura 3. Curva de crecimiento *in vitro* de los clones S y R de la cepa DA, sin medicamento. En el gráfico se muestra el número de parásitos por ml obtenidos luego del conteo por triplicado durante 10 días.

### **8.3.1 EVALUACIÓN DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA DE LA ENZIMA NTR I EN EL CLON S Y R**

Con el fin de evaluar la estructura primaria de la NTR I y observar si las secuencias tenían mutaciones como las observadas en la NTR I de clones con resistencia inducida, se realizó la secuenciación del gen que codifica para la enzima NTR I de los clones S y R. Posteriormente, se realizó el alineamiento y la comparación de las secuencias con la secuencia de un clon sensible, un clon resistente inducido previamente reportadas (Mejía, 2011) y la cepa parental a partir de la cual se realizaron las clonaciones (Figura 4).

Como se observa en la Figura 4, las secuencias de los clones S y R son iguales a las secuencias de la cepa parental y el clon sensible y no se ve ninguna mutación tanto a nivel de nucleótidos (datos no mostrados) como de aminoácidos. Además, es importante señalar que la mutación encontrada en el clon con resistencia inducida no está presente en el clon con resistencia natural.

		10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Clon sensible		..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
Clon resistente inducido		MRRNDIKRGL	WDSLILYWRW	NRESLLRNVS	AFAENGRHVI	GMDGPVETGS	EKGVGRGNSS	MPPFFSSMPP	SLSSSSSLPL	DAMKRVVHER	RSCIKRFDPTK
Cepa DA		MRRNDIKRGL	WDSLILYWRW	NRESLLRNVS	AFAENGRHVI	GMDGPVETGS	EKGVGRGNSS	MPPFFSSMPP	SLSSSSSLPL	DAMKRVVHER	RSCIKRFDPTK
DA S (IC <sub>50</sub> = 11,00)		MRRNDIKRGL	WDSLILYWRW	NRESLLRNVS	AFAENGRHVI	GMDGPVETGS	EKGVGRGNSS	MPPFFSSMPP	SLSSSSSLPL	DAMKRVVHER	RSCIKRFDPTK
DA R (IC <sub>50</sub> = 49,5)		MRRNDIKRGL	WDSLILYWRW	NRESLLRNVS	AFAENGRHVI	GMDGPVETGS	EKGVGRGNSS	MPPFFSSMPP	SLSSSSSLPL	DAMKRVVHER	RSCIKRFDPTK
		110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
Clon sensible		..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
Clon resistente inducido		PIDLDVVSDL	LAMTVRAPTA	LNLQPPWVAV	IHEEEQRETL	SRAALGQPQP	RDAPVTVVFA	GDMEPESNAP	AALEMGLESG	YYHSLYGAAY	LRHVYLLHG
Cepa DA		PIDLDVVSDL	LAMTVRAPTA	LNLQPPWVAV	IHEEEQRETL	SRAALGQPQP	RDAPVTVVFA	GDMEPESNAP	AALEMGLESG	YYHSLYGAAY	LRHVYLLHG
DA S (IC <sub>50</sub> = 11,00)		PIDLDVVSDL	LAMTVRAPTA	LNLQPPWVAV	IHEEEQRETL	SRAALGQPQP	RDAPVTVVFA	GDMEPESNAP	AALEMGLESG	YYHSLYGAAY	LRHVYLLHG
DA R (IC <sub>50</sub> = 49,5)		PIDLDVVSDL	LAMTVRAPTA	LNLQPPWVAV	IHEEEQRETL	SRAALGQPQP	RDAPVTVVFA	GDMEPESNAP	AALEMGLESG	YYHSLYGAAY	LRHVYLLHG
		210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
Clon sensible		..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
Clon resistente inducido		GPCEAMSHVK	AIVSAWYSES	TGNAMLSVPR	NKQAYAWKQV	MIPATTFLYL	ATAAGFDTAI	LEGFDEAQVR	RVAGLPPRFT	VPVIISVGHG	AKNGFHSVRS
Cepa DA		GPCEAMSHVK	AIVSAWYSES	TGNAMLSVPR	NKQAYAWKQV	MIPATTFLYL	ATAAGFDTAI	LEGFDEAQVR	RVAGLPPRFT	VPVIISVGHG	AKNGFHSVRS
DA S (IC <sub>50</sub> = 11,00)		GPCEAMSHVK	AIVSAWYSES	TGNAMLSVPR	NKQAYAWKQV	MIPATTFLYL	ATAAGFDTAI	LEGFDEAQVR	RVAGLPPRFT	VPVIISVGHG	AKNGFHSVRS
DA R (IC <sub>50</sub> = 49,5)		GPCEAMSHVK	AIVSAWYSES	TGNAMLSVPR	NKQAYAWKQV	MIPATTFLYL	ATAAGFDTAI	LEGFDEAQVR	RVAGLPPRFT	VPVIISVGHG	AKNGFHSVRS
		310									
Clon sensible		..... .....	.....								
Clon resistente inducido		PRFPTKHLVR	WGKF*								
Cepa DA		PRFPTKHLVR	WGKF*								
DA S (IC <sub>50</sub> = 11,00)		PRFPTKHLVR	WGKF*								
DA R (IC <sub>50</sub> = 49,5)		PRFPTKHLVR	WGKF*								

Figura 4. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína NTR I de los parásitos sensibles (S) y resistentes (R) naturales al Bz de *T. cruzi* con un clon sensible, resistente inducido y la cepa parental (DA). Los aminoácidos resaltado en rosado corresponden a la secuencia de localización mitocondrial, los aminoácidos resaltados en color morado son los posibles sitios a unión al cofactor FMN y la posición 125, resaltada en verde es el lugar de la mutación encontrada en los parásitos con resistencia inducida.

### 8.3.2 CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE TRANSCRIPCIÓN DEL ARNm DE LA ENZIMA NTR I EN LOS CLONES S Y R.

Luego de extraer el ARN, comprobar su calidad (Figura 5), cantidad y realizar la síntesis de ADNc, se procedió a evaluar diferencias a nivel de transcripción de la enzima NTR I, mediante qRT-PCR.

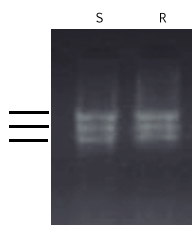


Figura 5. ARN total extraído de los parásitos S y R, corridos en geles de agarosa al 1,5% y teñidos con bromuro de etidio. Las tres bandas del ARN ribosomales, están indicados a la izquierda y corresponden de abajo hacia arriba a 1.660, 2.030 y 2.400 nucleótidos.

Para determinar los niveles de transcripción relativos de NTR I en el clon resistente, con respecto al sensible, se tuvo en cuenta la eficiencia de amplificación y el CP de la muestra (R), el control (S) y los genes de referencia HGPRT y 24S $\alpha$  ribosomal (Tabla 2). Al realizar el análisis de los niveles relativos de transcripción del ARNm de NTR I, se observó que el clon R se expresó 1,5 veces más que el clon S, con un valor p estadísticamente significativo (Figura 6).

Tabla 2. Eficiencia de amplificación obtenida del software del Rotor Gene- Q para NTR I y dos genes de referencia, en el fenotipo sensible (S) y resistente (R). Los valores obtenidos corresponden a en tres réplicas técnicas y dos experimentos independientes.

Nombre del gen		Eficiencia de amplificación promedio
Nitrorreductasa I	NTR I	1,73 $\pm$ 0,01
Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa	HGPRT	1,75 $\pm$ 0,02
Subunidad ribosomal 24s	24S $\alpha$	1,72 $\pm$ 0,02

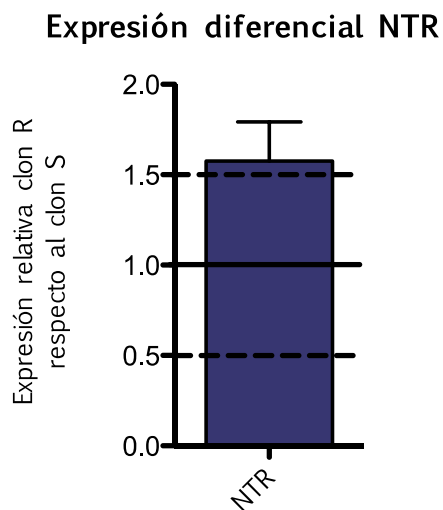


Figura 6. Cuantificación relativa, mediante PCR en tiempo real, de los niveles de ARNm de NTR I, normalizados simultáneamente con respecto a los genes HGPRT y ARN ribosomal 24S $\alpha$ , del clon resistente (R), con respecto al clon sensible (S). La gráfica corresponde al análisis de expresión relativa realizado en REST 2009, con tres réplicas y dos experimentos independientes.

### 8.3.3 DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS RELATIVO DE NTR I CON RESPECTO A HGPRT.

Con el fin de determinar si el clon R tenía un número de copias del gen NTR I diferente al clon S, se realizó una PCR en tiempo real a partir de ADN total. Al analizar los resultados obtenidos de la qRT-PCR con los datos mostrados en la Tabla 3, se observó que no existen diferencias significativas entre el número de copias del clon S y R, obteniéndose una copia del gen NTR I por genoma haploide (Figura 7).

Tabla 3. Eficiencia de amplificación obtenida del software del Rotor Gene- Q para NTR I y un gen de referencia en el fenotipo sensible (S) y resistente (R). Los valores obtenidos corresponden a tres réplicas técnicas y dos experimentos independientes.

Nombre del gen		Eficiencia de amplificación promedio
Nitrorreductasa I	NTR I	1,58 ± 0,01
Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa	HGPRT	1,79 ± 0,02

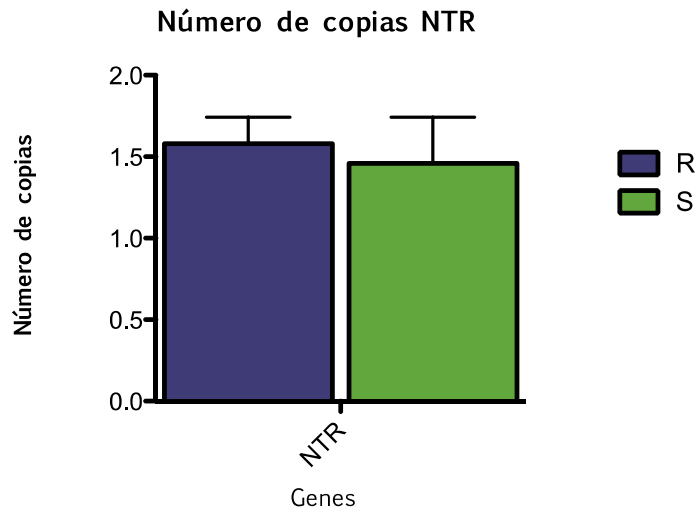


Figura 7. Número de copias relativo mediante PCR en tiempo real, de NTR I del clon resistente (R) con respecto al clon sensible (S) y normalizado con HGPRT que posee copia única en el genoma haploide. Se realizaron tres réplicas y dos experimentos independientes.

#### 8.4 CARACTERIZACIÓN DE OTROS GENES POSIBLEMENTE IMPLICADOS EN LA RESISTENCIA NATURAL DE LOS PARÁSITOS

Debido a que los resultados obtenidos para la enzima NTR I fueron diferentes a lo que se ha reportado en la resistencia inducida, no encontrándose cambios importantes ni en la secuencia, ni en los niveles de transcripción del ARNm, ni en el número de copias, se decidió evaluar otros genes previamente reportados en la literatura como posiblemente involucrados en los mecanismos de resistencia.

##### 8.4.1 CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE LOS NIVELES DE TRANSCRIPCIÓN DEL ARNm DE GENES POSIBLEMENTE IMPLICADOS EN MECANISMOS DE RESISTENCIA.

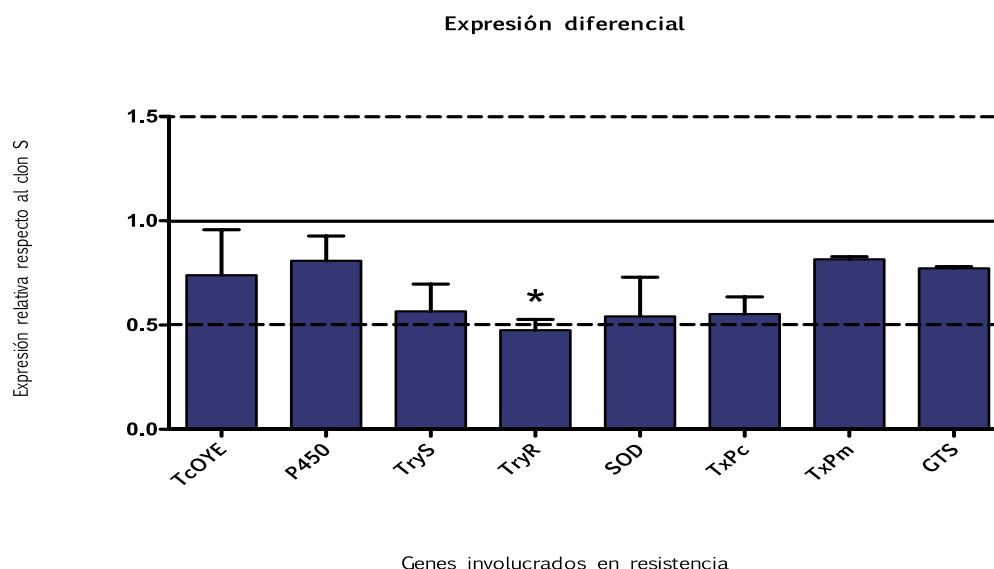
La cuantificación de los niveles de transcripción se realizó para 8 genes que según la literatura podrían participar en el mecanismo de acción del Bz y la resistencia al mismo. Éste análisis se realizó mediante qRT-PCR con el mismo ADNc usado para la cuantificación de NTR I como se indicó en materiales y métodos.



Teniendo en cuenta las eficiencias de amplificación de cada uno de los genes evaluados (Tabla 4) y los CP, se pudo determinar la transcripción relativa de cada gen del clon R con respecto al clon S. En este sentido, en los análisis de la cuantificación se observó que el único gen regulado significativamente en el fenotipo R con respecto al S, fue TryR, con una transcripción del ARNm 0,5 veces menor (Figura 8).

**Tabla 4. Eficiencia de amplificación obtenida del software del Rotor Gene- Q para 8 genes y dos genes de referencia en el fenotipo sensible (S) y resistente (R). Los valores obtenidos corresponden a tres réplicas técnicas y dos experimentos independientes.**

Gen		Eficiencia de amplificación promedio
Enzima Amarilla	TcOYE	1,76 ± 0,02
Citocromo P-450 reductasa	P-450	1,74 ± 0,03
Tripanotión sintetasa	TryS	1,74 ± 0,03
Tripanotión reductasa	TryR	1,75 ± 0,03
Superóxido dismutasa A	SOD	1,71 ± 0,04
Triparedoxin peroxidasa citosólica	TxPc	1,75 ± 0,02
Triparedoxin peroxidasa mitocondrial	TxPm	1,78 ± 0,02
Glutación espermidina sintasa	GTS	1,62 ± 0,27
Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa	HGPRT	1,75 ± 0,02
ARN ribosomal 24S	24Sα	1,72 ± 0,02



**Figura 8. Cuantificación relativa mediante PCR en tiempo real, de los niveles de ARNm de 8 genes posiblemente involucrados en resistencia al Bz, normalizados simultáneamente con respecto a los genes HGPRT y ARN ribosomal 24Sα. La gráfica representa la expresión del clon resistente (R), con respecto al clon sensible (S), con tres réplicas técnicas y en dos experimentos independientes.**

## 8.4.2 DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS RELATIVO DE GENES POSIBLEMENTE INVOLUCRADOS EN RESISTENCIA.

Para establecer si había diferencias en el número de copias por genoma haploide de los 8 genes evaluados anteriormente, entre el fenotipo S y el R, se utilizó la qRT-PCR (Tabla 5 y Figura 9). Los resultados encontrados muestran que todos los genes evaluados poseen una copia de cada gen por genoma haploide excepto el gen TcOYE que tiene un total de 4 copias. En general, se observó que no existen diferencias en el número de copias entre el fenotipo R y el S.

Tabla 5. Eficiencia de amplificación obtenida del software del Rotor Gene- Q para 8 genes y un gen de referencia en el fenotipo sensible (S) y resistente (R). Los valores obtenidos corresponden a tres réplicas técnicas y dos experimentos independientes.

Gen	Tamaño	Eficiencia de amplificación promedio
Enzima Amarilla	TcOYE	1,69 ± 0,04
Citocromo P-450 reductasa	P-450	1,69 ± 0,04
Tripanotión sintetasa	TryS	1,7 ± 0,04
Tripanotión reductasa	TryR	1,68 ± 0,05
Superóxido dismutasa A	SOD	1,73 ± 0,04
Triparedoxin peroxidasa citosólica	TxPc	1,73 ± 0,04
Triparedoxin peroxidasa mitocondrial	TxPm	1,75 ± 0,01
Glutación espermidina sintasa	GTS	1,72 ± 0,03
Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa	HGPRT	1,8 ± 0,04

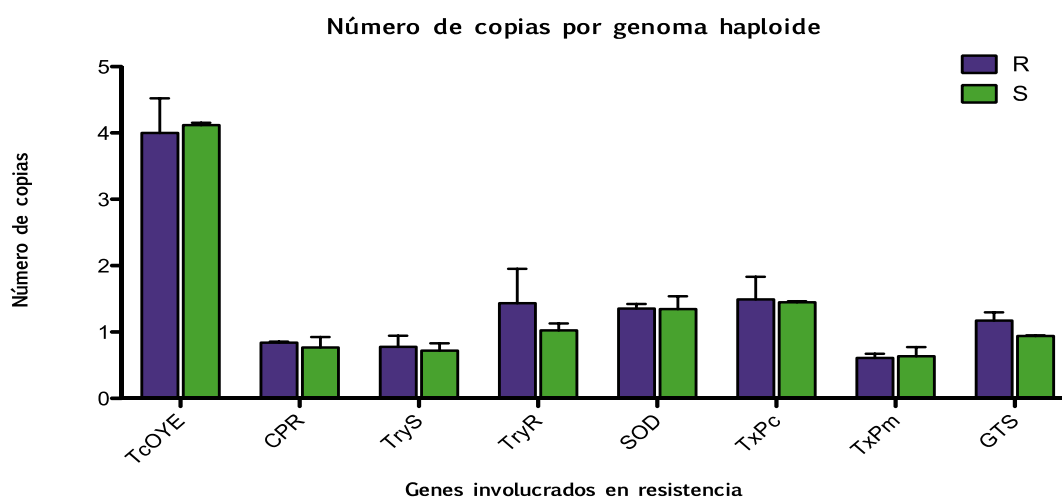
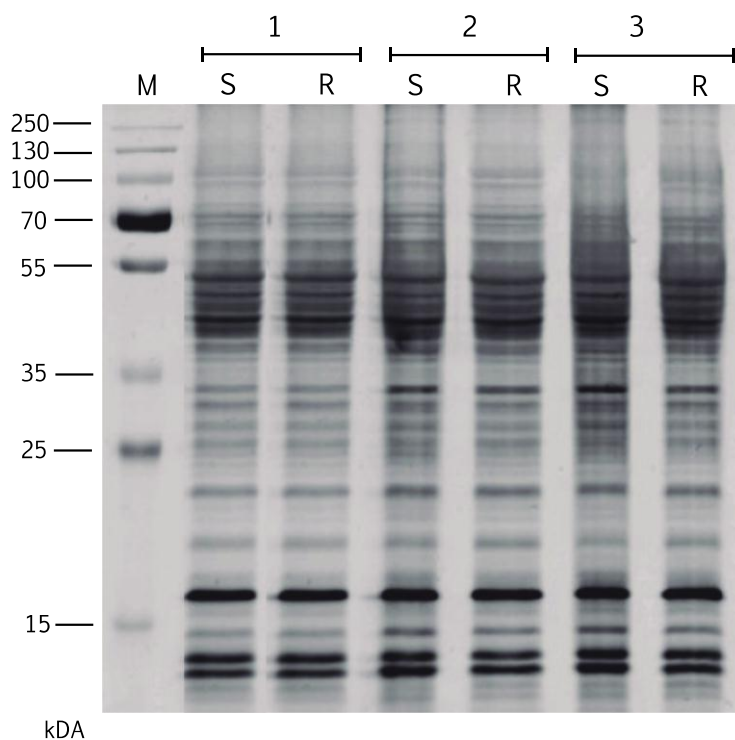


Figura 9. Número de copias relativo mediante PCR en tiempo real de 8 genes evaluados, del clon resistente (R) con respecto al clon sensible (S) y normalizado con HGPRT, el cual tiene una sola copia por genoma haploide. Se realizaron tres réplicas técnicas y dos experimentos independientes.

## 8.5 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS

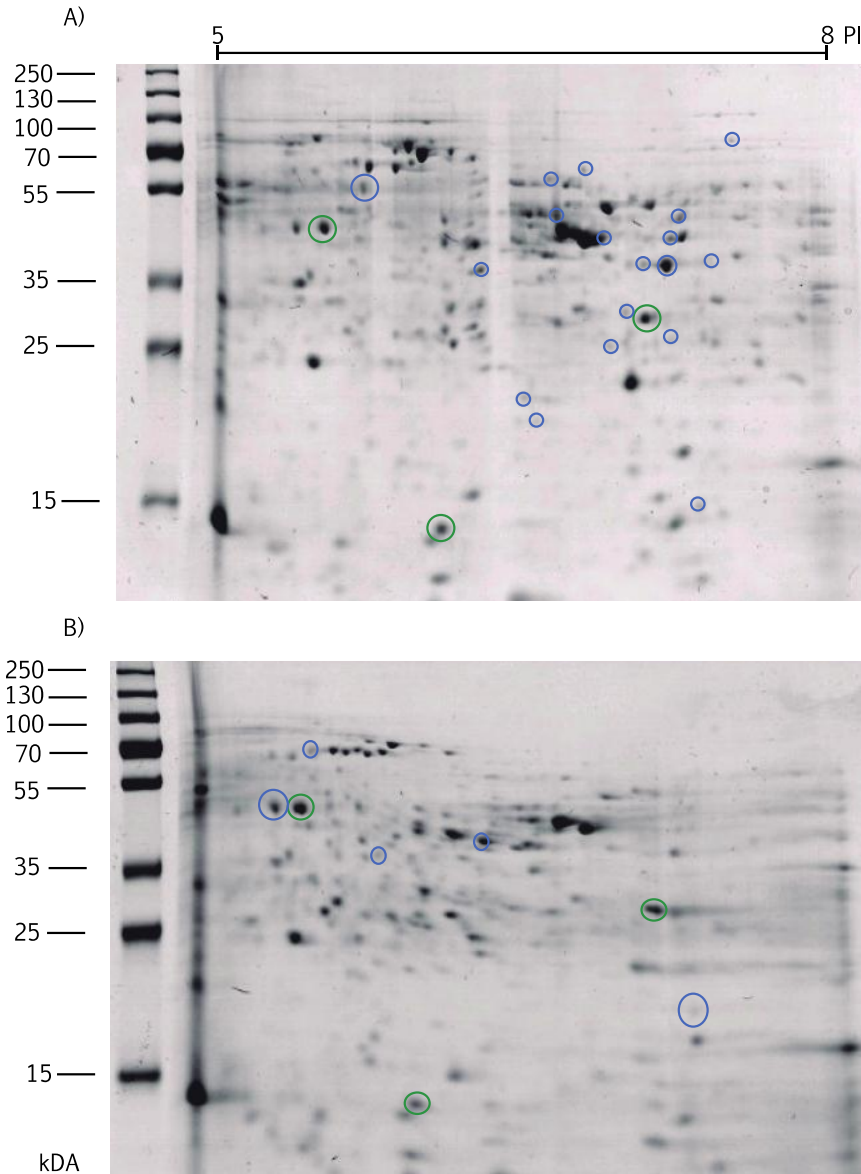
Con el fin de tener un panorama más amplio sobre las proteínas que posiblemente se están regulando en los mecanismos de resistencia, se realizó un análisis de expresión diferencial de proteínas, mediante geles bidimensionales.

Luego de realizar la extracción de las proteínas en triplicados independientes, seguida de la cuantificación y la separación mediante geles SDS-PAGE, se observó en todas las extracciones el mismo perfil, asegurando que éstas fueron óptimas y no se presentó degradación de las proteínas (Figura 10).



**Figura 10.** Gel SDS-PAGE de extracción de proteínas totales, teñido con nitrato de plata, de un clon sensible (S) y uno resistente (R). M: marcador de peso, 1, 2 y 3: tres replicas biológicas independientes.

Posteriormente, al realizar los geles bidimensionales y analizar las imágenes mediante el programa *Image master 2D platinum Software*, se encontró que el número de spots varió entre 170 spots en el clon R y 195 en el clon S (Figura 11).



**Figura 11. Geles de proteínas 2DE de los clones S (A) y R (B). El IEF se realizó en tirillas de 7cm con un rango de 5-8NL pH y 80 µg de proteínas. El SDS-PAGE se realizó en geles al 12%, teñidos con azul de Coomassie G-250. Los círculos verdes representan los *land mark* usados para el análisis de imagen y los círculos morados los spots enviados a identificar.**

Al comparar un total de 208 spots para ambos fenotipos, se encontró que 40 poseían diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, después de hacer la selección manual de los spots, se descartaron 19, debido a que la diferencia no se observaba claramente, eran proteínas precipitadas en el extremo de la tirilla o de bajo peso molecular, lo que impedía observarlos entre las réplicas. Del resto de

proteínas, 13 fueron exclusivas para el clon S, 2 para el clon R y 5 se encontraron diferencialmente expresadas (Figura 12).

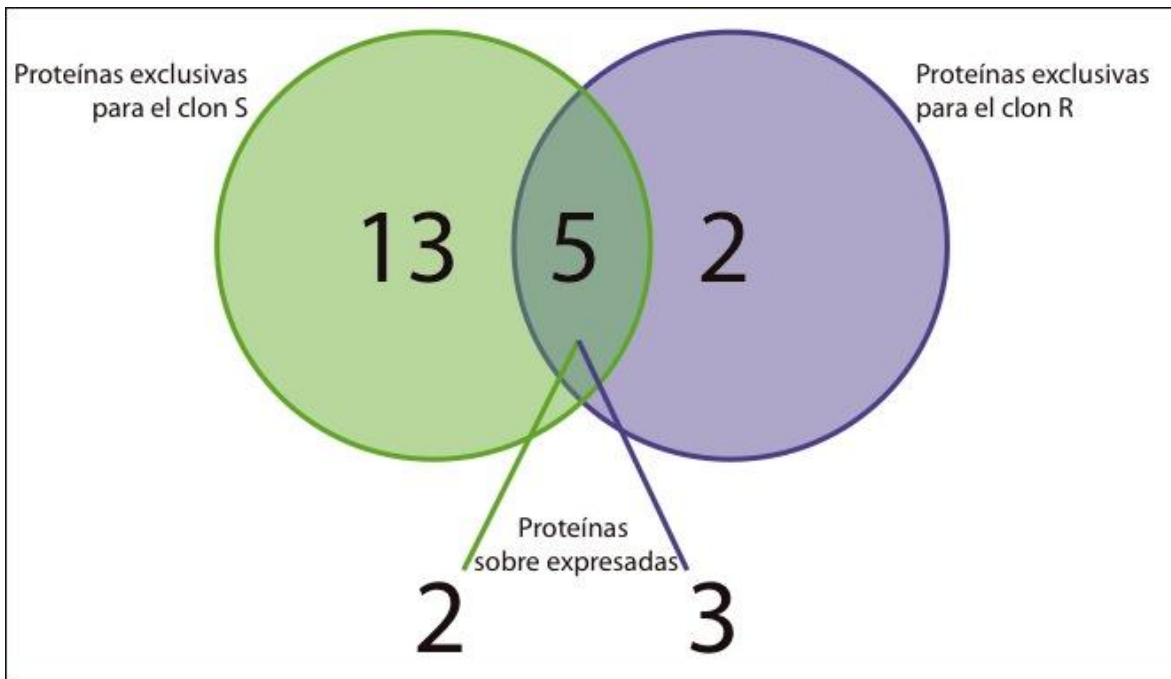


Figura 12. Total de proteínas diferencialmente expresadas ( $p < 0,05$ ). Clon S vs clon R.

### 8.5.1 IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

En la Tabla 6 se muestra la proteína predicha para cada spot, el número de acceso de la base de datos TriTrypDB, el score y la comparación teórica vs experimental del peso molecular (MW) y el punto isoeléctrico (pI). De los 21 puntos analizados por TOF/TOF MS, uno no pudo ser detectado por el equipo, puesto que no emitía ninguna señal. Las proteínas que se encontraron exclusivas para el clon S fueron: adenina fosforibosiltransferasa, disulfido isomerasa, putativa, 6-fosfogluconolactonasa, putativa, fosfomanomutasa, ribosa 5- fosfato isomerasa, putativa, prostaglandina 2Falfa sintasa, cistationina beta-sintasa, proteína de unión a ARN RGGm, putativa, enolasa, dDTP glucosa 4, 6- deshidratasa, GrpE, co-chaperona, urocanato hidratasa y una proteína hipotética. Las proteínas para el clon R fueron sólo dos: la proteína de choque térmico HSP70 precursor mitocondrial y una ATPasa transicional retículo endoplasmático, putativa. Las que se sobreexpresaron en el clon S fueron: receptor C y una

hipotética, mientras que las sobre expresadas en el resistente fueron: alcohol deshidrogenasa, putativa, proteína de choque térmico HSP70 y una hipotética.

Sin embargo, sólo las proteínas con un score en la identificación, mayor a 85 y que pudieron ser identificadas en la base de datos TriTrypDB, se les hizo la búsqueda de función biológica, proceso biológico, localización celular (Tabla 7z).

**Tabla 6. Proteínas diferencialmente expresadas e identificación por MALDI TOF/TOF MS.**

<b>Proteína</b>	<b>Número de acceso (TriTrypDB)</b>	<b>MASCOT Score<sup>(a)</sup></b>	<b>MW Exp (teo)</b>	<b>pI Exp (teo)</b>
Adenina fosforibosiltransferasa	Tc00.1047053507519.140	108	32 (25,86)	6,2 (7,34)
Proteína disulfido isomerasa, putativa	Tc00.1047053508209.140	289	41 (41,87)	7,18 (7,18)
6-fosfogluconolactonasa, putativa	Tc00.1047053503945.40	323	30 (28,70)	6,97 (6,84)
Fosfomanomutasa	Tc00.1047053510187.480	391	25 (28,21)	6,87 (6,43)
Ribosa 5- fosfato isomerasa, putativa	Tc00.1047053508601.119	477	14 (17,28)	7,44 (7,11)
Prostaglandina 2Falfa sintasa	Tc00.1047053508461.80	659	42 (42,19)	6,79 (6,43)
Cistationina beta-sintasa	Tc00.1047053511691.10	364	48 (43,42)	7,23 (7,32)
Proteína hipotética	Tc00.1047053511903.40	593	59 (54,72)	6,61 (6,59)
Proteína de unión a ARN RGGm, putativa	Tc00.1047053503419.50	260	37 (19,73)	7,06 (9,31)
Enolasa	Tc00.1047053504105.140	423	49 (46,42)	6,65 (6,20)
dDTP glucosa 4, 6- deshidratasa	Tc00.1047053509051.30	52	38 (36,62)	7,35 (6,7)
GrpE, co-chaperona	Tc00.1047053509045.20	468	21 (24,35)	6,50 (8,95)
Urocanato hidratasa	--	78	76 (74,72)	7,44
Proteína hipotética TCSYLVIO_2103	Tc00.1047053510947.30	351	56 (48,62)	5,67 (5,07)
Receptor C, proteína quinasa activada	Tc00.1047053511211.120	520	28 (35,01)	6,21 (6,04)
Proteína hipotética	--	60	20 (21,19)	6,56
Alcohol deshidrogenasa, putativa	Tc00.1047053506357.50	125	30 (41,79)	6,32 (6,50)
Proteína de choque térmico HSP70, precursor mitocondrial	Tc00.1047053507029.30	123	36 (70,95)	5,88 (5,71)
ATPasa transicional retículo endoplasmático, putativa	Tc00.1047053509733.170	143	62 (86,06)	5,52 (5,23)
Proteína de choque térmico HSP70	Tc00.1047053511211.170	336	45 (71,21)	5,37 (5,22)

(A) MASCOT SCORE > 85, estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ )

Tabla 7. Características anotadas en la base de datos TriTrypDB para cada una de las proteínas identificadas por medio de la espectrometría de masas.

Proteína	Fenotipo del clon R <sup>(a)</sup>	Función biológica	Proceso biológico	Localización celular	Proceso biológico asociado <sup>(b)</sup>	Referencia
Adenina fosforibosiltransferasa	Ausente	Actividad adenina fosforibosil	Salvamento de purinas ribonucleósidos	No conocida		
Proteína disulfido isomerasa, putativa	Ausente	Actividad disulfido isomerasa	Plegamiento de proteínas	No conocida	Virulencia Interacción patógeno-hospedero	(Ben Khalaf <i>et al.</i> , 2012; Stolf <i>et al.</i> , 2011)
6-fosfogluconolactonasa, putativa	Ausente	Actividad 6-fosfogluconolactonasa	Derivación de pentosa-fosfato	Citoplasma	Sobrevivencia cuando se produce estrés oxidativo	(Barrett, 1997)
Fosfomanomutasa	Ausente	No conocida	No conocida	No conocida	En <i>Streptomyces coelicolor</i> : virulencia, cambios físicos en la pared celular y disminución tasa de supervivencia intracelular	(Rajesh <i>et al.</i> , 2012)
Ribosa 5- fosfato isomerasa, putativa	Ausente	Actividad Ribosa 5- fosfato isomerasa	Derivación de pentosa-fosfato, subdivisión no-oxidativa	No conocida	Sobrevivencia cuando se produce estrés oxidativo	(Barrett, 1997)
Prostaglandina 2Falfa sintasa	Ausente	No conocida	No conocida	No conocida	Sobrevivencia dentro del hospedero	(Figarella <i>et al.</i> , 2005)
Cistationina beta-sintasa	Ausente	Actividad Cistationina beta-sintasa	Biosíntesis de las cisteína	No conocida	Síntesis de tripanotión, balance redox y protección contra daño oxidativo	(Nozaki <i>et al.</i> , 2001)
Proteína hipotética	Ausente	No conocida	No conocida	No conocida		



Proteína de unión a ARN RGGm, putativa	Ausente	Unión al ARN	Procesamiento ARN	Membrana exterior de la mitocondria		
Enolasa	Ausente	Unión al ion magnesio, actividad fosfopiruvato hidratasa	Gluconeogénesis, glicogénesis	Citosol	Viabilidad y virulencia	(Avilán <i>et al.</i> , 2011)
GrpE, co-chaperona	Ausente	Actividad de intercambio de adenil-nucleótido, unión a chaperonas	Plegamiento de proteínas	Mitocondria		
Proteína hipotética TCSYLVIO_2103	Subexpresada	No conocida	No conocida	No conocida		
Receptor C, proteína quinasa activada	Subexpresada	Unión a proteínas, unión a la proteína quinasa C	Apoptosis, regulación de citocinesis	Ribosomas		
Alcohol deshidrogenasa, putativa	Sobreexpresada	No conocida	No conocida	No conocida		
Proteína de choque térmico HSP70, precursor mitocondrial	Exclusiva	Función molecular	Plegamiento de proteínas y patogénesis	Mitocondria		
ATPasa transicional retículo endoplasmático, putativa	Exclusiva	Actividad ATPasa	Proceso biológico	Membrana citoplasmática		

Proteína de choque térmico HSP70	Sobreexpresada	Función molecular	Plegamiento de proteínas	No conocida	Asistencia en el plegamiento de nuevas proteínas, transporte celular de proteínas y vesículas, disociación o formación de complejos y degradación de proteínas	(Evans <i>et al.</i> , 2010)
----------------------------------	----------------	-------------------	--------------------------	-------------	--	------------------------------

(a) Expresión de la proteína en el clon resistente.

(b) Proceso biológico al cual ha sido asociada en diversos estudios.

## 9 DISCUSIÓN

Hoy en día la estrategia más usada para el entendimiento de los mecanismos de resistencia y acción de los fármacos es sin duda la inducción de resistencia *in vitro* o *in vivo*, la cual implica la formación de clones resistentes por medio de una presión continua con el medicamento que permite una posterior comparación biológica, genética y molecular del clon parental y del clon con resistencia inducida (M Andrade *et al.*, 2008; Mejía *et al.*, 2011; Murta *et al.*, 2006; Nogueira *et al.*, 2006; Wilkinson *et al.*, 2008). Estos esfuerzos han dado buenos resultados, demostrando en diversos estudios que proteínas como la NTR I se encuentran menos expresadas o en algunos casos inactiva en los parásitos resistentes, lo cual ha permitido realizar aproximaciones sobre la activación de los medicamentos y su posible modo de acción (Hall and Wilkinson, 2011; Hall *et al.*, 2011). Sin embargo, esto parece diferir de lo que ocurre en las cepas con resistencia natural, lo cual ha impedido correlacionar estos dos mecanismos (M Andrade *et al.*, 2008; Nogueira *et al.*, 2006; Villarreal *et al.*, 2005).

Por tales motivos, en este trabajo se pretendió evaluar la expresión diferencial y número de copias de 9 genes que han sido constantemente relacionados con la resistencia al Bz, en parásitos sensibles y con resistencia natural y realizar un análisis de algunas características biológicas y moleculares con el fin de proponer proteínas relacionadas con este mecanismo para futuros estudios sobre resistencia y quimioterapia de la enfermedad de Chagas.

Para este fin se decidió usar la cepa DA, aislada de un paciente sin tratar de Boyacá, Colombia, y que en estudios realizados por Mejía, y colaboradores se clasificó entre el 16% de cepas colombianas con resistencia a este medicamento, con un  $CI_{50}$  de 32,75  $\mu$ M (Mejía *et al.*, 2012b). De esta cepa se obtuvieron clones por medio de diluciones seriadas a los cuales, posteriormente, se les evaluó la  $CI_{50}$  al Bz y al Nfx con MTT. De los clones obtenidos, cinco fueron seleccionados por tener diferencias significativas en la concentración inhibitoria 50 al Bz (ver materiales y métodos). En este estudio los parásitos no tuvieron presión con el

fármaco en ningún momento, con el fin de poder evaluar las enzimas que están reguladas diferencialmente antes del contacto con el medicamento y que son las responsables de la resistencia natural y evitar la generación de resistencia adicional a la existente debido a la exposición a la sustancia.

En las zonas endémicas existe la probabilidad de aislar cepas que poseen alta heterogeneidad entre sus clones debido a la infección múltiple por el contacto de los individuos con diferentes triatomíneos, que a su vez pueden estar infectados con distintos clones por la alimentación de diferentes organismos (a M. Macedo & Pena, 1998; Tibayrenc, Ward, Moya, & Ayala, 1986). Estos clones pueden ser tan diferentes como para ser clasificados en distintas unidades de tipificación discretas (DTU) (Zingales *et al.*, 2012) o tener mutaciones puntuales inducidas por presiones ambientales que los hacen poseer una expresión fenotípica diferente, en este caso la resistencia, pero provenir de la misma unidad celular (Rodríguez *et al.*, 2009). Con el fin de conocer el perfil genético de los 5 clones seleccionados, se realizaron dos técnicas: la LSSP-PCR y RAPD, las cuales han sido ampliamente usadas para esto (Botero *et al.*, 2007; Duque *et al.*, 2011; Marquez *et al.*, 2007; Mejía and Triana, 2005; Rodríguez *et al.*, 2009). Ambas técnicas se basan en la reacción en cadena de la polimerasa, pero difieren en el grado de sensibilidad. La primera, con una sensibilidad mayor, es usada para detectar diferencias nucleotídicas hasta de una base en marcadores genéticos específicos (Pena *et al.*, 1994). En *T. cruzi* comúnmente son usados dos marcadores los cuales son variables para demostrar diferencia entre los aislados, pero lo suficientemente estable para no afectar la identificación de la cepa: una secuencia de 330 pb del minicirculo del kADN (Vago *et al.*, 1996) y una secuencia nucleotídica correspondiente a 350 pb de la región intergénica mini-exón (Brisse *et al.*, 2001). La segunda, una técnica menos sensible pero de amplio espectro, que usa oligos arbitrarios con el fin de amplificar segmentos del ADN al azar (Macedo *et al.*, 2004). Con la metodología usada se pudieron seleccionar dos clones con perfil genético similar pero con diferente  $CI_{50}$ : uno sensible (S) con  $CI_{50}$  de 11.0  $\mu M$  y otro resistente (R) cuyo  $CI_{50}$  es de 49.5  $\mu M$  (Figura 2).

Como se mencionó anteriormente, en los estudios de resistencia realizados hasta la fecha se ha podido dilucidar el modo de activación del medicamento, en el cual la principal enzima implicada es la NTR I, que hace parte de la familia de las nitrorreductasas (NTR). Las NTR son proteínas muy estudiadas en enterobacterias como *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella typhimurium*, entre otras (Bryant *et al.*, 1991; Lovering *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 1990). La NTR I de *E. coli*, tiene actividad oxidorreductasa (Anlezark *et al.*, 1992), su actividad fisiológica no está claramente definida, se cree que puede metabolizar algunos xenobióticos; pero logra la activación de las quinonas como la menadiona o los compuestos nitroaromáticos por medio de la reducción del grupo nitro (Kitts *et al.*, 2000). En bacterias como *E. coli* y *S. typhimurium*, se ha observado el desarrollo de resistencia a los nitrofuranos, usualmente atribuida a mutaciones en las NTR tipo I (McCalla *et al.*, 1978; Watanabe *et al.*, 1990; Whiteway *et al.*, 1998).

De igual modo, en tripanosomátidos como *T. cruzi* y *T. brucei* se demostró que una reducción en la actividad de la NTR I, debido a la pérdida parcial o total de los alelos que expresan esta proteína, genera resistencia del parásito a los compuestos Nfx y Bz (Wilkinson *et al.*, 2008). Adicional a esto, Mejía y colaboradores (2012) demostraron que cambios específicos en la secuencia de NTR I en clones con resistencia inducida modifican el plegamiento de la proteína e impiden la unión al cofactor y subsecuentemente la actividad enzimática, afectando así la activación del medicamento e impidiendo la generación de citotoxicidad (Mejía *et al.*, 2012a). Teniendo en cuenta estos antecedentes, en el presente estudio se realizó el secuenciamiento y posterior análisis de la secuencia de NTR I para los clones naturales S y R. Los resultados indicaron que no existe ninguna diferencia a nivel nucleotídico y aminoacídico que permitiera explicar el fenotipo resistente (Figura 4). Si bien las mutaciones puntuales es uno de los mecanismos como los organismos adquieren la resistencia, no es el único mecanismo que existe. La expresión diferencial de genes o el cambio del número de copias también puede alterar el fenotipo de los parásitos (Hayes and Wolf, 1990; Tenover, 2006). Ambas características fueron evaluadas para los clones.

Tanto los niveles de transcripción como el número de copias no mostraron diferencias significativas entre el clon S y R (Figura 6 y Figura 7), al contrario de lo observado para NTR I en la resistencia inducida (Mejía *et al.*, 2011; Wilkinson *et al.*, 2008). Este resultado pone en evidencia lo encontrado por otros autores donde los mecanismos de ambos tipos de resistencia no se relacionan (M Andrade *et al.*, 2008; Nogueira *et al.*, 2006, 2009; Villarreal *et al.*, 2005). Por otra parte, cabe resaltar que para estos clones no existe una resistencia cruzada con el Nfx, ya que los valores de  $CI_{50}$  para este medicamento no son significativamente diferentes ( $5,12 \pm 0,15$  para el clon R y  $6,64 \pm 0,33$  para el clon S). En este sentido, la no alteración de NTR I podría explicar este resultado y sugiere que algunos de los mecanismos de resistencia al Bz, pueden ser muy diferentes a los de Nfx, pues a pesar de ser medicamentos con estructuras semejantes, poseen vías de reducción muy diferentes (Hall and Wilkinson, 2011; Hall *et al.*, 2011). Este resultado es muy interesante, pues si se logra identificar algunos genes implicados en la resistencia al Bz, y se encuentran afectados en pacientes a ser tratados podría utilizarse el Nfx como otra opción quimioterapéutica, lo que no es posible en la resistencia adquirida, según lo mostrado por diversos autores (Mejía *et al.*, 2012a; Wilkinson *et al.*, 2008).

Si bien la NTR I es la enzima que ha tenido más relevancia en los estudios de acción del Bz y a la resistencia hacia el mismo, no es la única enzima asociada con este proceso, ya que otros genes de activación del medicamento (Kubata *et al.*, 2002; Wilkinson *et al.*, 2008) y genes de detoxificación (Fairlamb and Cerami, 1992; Fairlamb *et al.*, 1985; Maya *et al.*, 1997; Nogueira *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2010) han mostrado algunos resultados. Teniendo como referencia el mapa bioquímico construido por Mejía (2011) y lo discutido en la introducción, se seleccionaron 8 genes más que podrían tener alguna relación con el fenotipo de resistencia para ser evaluados mediante PCR en tiempo real y así observar si el número de copias o la transcripción mostraban una expresión diferencial entre ambos clones, como ha sido descrito previamente (Murta *et al.*, 2006; Nogueira *et al.*, 2006, 2009; Pfaffl, 2001).

Particularmente, el gen tripanotión reductasa (TryR) fue el único gen de los 8 evaluados en el que se observó una alteración en la expresión del ARNm en el clon R, observándose una disminución en la transcripción aproximadamente de la mitad con respecto al clon S (Figura 8). Esta enzima cataliza la reducción del tripanotión, molécula asociada a la detoxificación de compuestos químicos, xenobióticos y metabolitos provenientes del estrés oxidativo (Fairlamb and Cerami, 1992; Irigoín *et al.*, 2008; Thomson *et al.*, 2003), la cual tiene gran importancia en el metabolismo de los parásitos. Diversos estudios sugieren que cualquier alteración en la ruta metabólica para la formación de esta molécula puede ser perjudicial para la sobrevivencia de los organismos (Müller *et al.*, 2003; Olin-Sandoval *et al.*, 2012; Steverding and Tyler, 2005) y específicamente la TryR parece ser un punto clave en la síntesis del tripanotión. En *Leishmania* y *T. brucei* se demostró que la subregulación de esta enzima lleva a una disminución en la sensibilidad al estrés oxidativo, la sobrevivencia de los parásitos al interior de los macrófagos activados (Dumas *et al.*, 1997; Krieger *et al.*, 2000; Tovar *et al.*, 1998a, b) y la pérdida de virulencia (Krieger *et al.*, 2000). Sin embargo, lo observado sugiere que la pérdida de al menos la mitad de la expresión de TryR en el fenotipo resistente de *T. cruzi* no es letal y no afecta su crecimiento *in vitro* (Figura 3). Adicionalmente, es posible que el clon R tenga menos éxito para resistir el sistema inmune de los hospederos y de infectar células, lo cual debe ser probado en otros estudios. No obstante, esta diferencia en el ARNm podría no afectar el nivel de expresión de proteínas en ambos clones.

Con respecto a los demás genes evaluados el panorama es menos claro, algunos estudios sugieren el rol de estas enzimas en la generación de resistencia. En este estudio no se observaron cambios significativos (Figura 8 y Figura 9), probablemente debido a la diferencia de metodologías usadas, por ejemplo, al usar diferentes concentraciones de Bz se logran efectos distintos. Es así como la FeSODA, una proteína implicada en detoxificación de especies reactivas de oxígeno, se ve alterada cuando se induce la resistencia a 220  $\mu\text{M}$  (Nogueira *et al.*, 2006, 2009), pero no en experimentos en los cuales los clones con resistencia inducida tienen un  $\text{CI}_{50}$  de hasta 58  $\mu\text{M}$ . Esto puede explicarse por los recientes

estudios de Hall y colaboradores (2011), en donde se demuestra que el Bz no actúa por medio del estrés oxidativo sino por la formación de compuestos como el glioxal (Hall and Wilkinson, 2011), pero en concentraciones de medicamento (Nfx) por encima de 400  $\mu$ M sí se produce la formación de especies reactivas de oxígeno que tendrían una implicación directa en la actividad de FeSODA (Boiani *et al.*, 2010).

Con el fin de identificar otras posibles proteínas involucradas en la resistencia natural, en el presente trabajo se hizo una comparación de las proteínas expresadas en los clones S y R por medio de geles bidimensionales y análisis de imágenes (ver materiales y métodos). Entre los resultados encontrados se observan un total de 21 spots con expresión diferencial. Trece fueron exclusivos para la clon S y 3 para el clon R, mientras que 3 se encontraron sobreexpresados en el fenotipo S y 2 en el R. De las proteínas identificadas, la prostaglandina F2 alfa sintasa (OYE), la adenina fosforibosiltransferasa (ADPR), la proteína de choque térmico HSP70 y el precursor de la proteína de HSP70 mitocondrial, la alcohol deshidrogenasa (ADH), y la fosfomanomutasa (PMM), han sido asociados a la resistencia de compuestos en diferentes organismos, las demás parecen tener funciones en procesos metabólicos, de infectividad y virulencia (Tabla 7).

La OYE, tiene como función principal la síntesis de prostaglandina, su acumulación es comúnmente encontrada en el suero de pacientes con Chagas, lo que sugiere que es una molécula usada por los parásitos para modificar la respuesta de los hospederos en pro de su sobrevivencia (Figarella *et al.*, 2005), pero también ha sido propuesta como una enzima capaz de activar los compuestos nitroheterocíclicos. En estudios realizados por Murta y colaboradores (2006) se demostró que en cepas con resistencia inducida se perdían tres de las cuatro copias del genoma en la población resistente (Murta *et al.*, 2006), sin embargo debido a que la TcOYE no es capaz de reducir el Bz (Kubata *et al.*, 2002) los autores plantearon la probabilidad de que esta enzima posea un efecto en pasos siguientes a la activación (Murta *et al.*, 2006). Es interesante resaltar que esta proteína fue evaluada a nivel de número de copias (Figura 9) y a nivel



transcripcional (Figura 8). Para el número de copias se encontró que este gen tiene 4 copias por genoma haploide, pero sin diferencia entre los fenotipos, similar a lo reportado por Mejía y colaboradores (2011). Por su parte a nivel transcripcional tampoco se encontró diferencia significativa en los niveles de expresión de ARNm, pero a nivel proteico fue exclusiva para el clon S, lo que lleva a concluir que para este gen la diferencia entre fenotipos está dada en alguna forma por la regulación post-traducciona y que podría ser un paso importante en la adquisición de resistencia, según lo mencionado anteriormente. Sin embargo, análisis de western blot son necesarios para corroborar la no expresión de esta proteína en el fenotipo resistente.

Otra enzima expresada exclusivamente para el clon S fue la adenina fosforibosiltransferasa (APRT) que hace parte de la vía de salvamento que tienen los tripanosomátidos para usar las purinas de su hospedero y sintetizar nucleótidos (Boitz and Ullman, 2006, 2010). La APRT se ha visto asociada a la resistencia hacia análogos de purinas citotóxicos en *L. donovani*, *S. cerevisiae* y *Drosophila melanogaster*. El mecanismo de resistencia se asocia con deficiencia en la expresión de la proteína APRT, así como a mutaciones específicas del gen (Johnson and Friedman, 1983; Kaur *et al.*, 1986; Woods *et al.*, 1984) y se establece que la APRT defectuosa no es capaz de convertir los análogos de purinas en nucleótidos tóxicos que afectarían la supervivencia de los organismos (Johnson and Friedman, 1983). Si bien el Bz no es un análogo de purinas, se sabe que este, una vez activado por la NTR I, forma un metabolito conocido como glioxal, que a su vez forma un aducto con la guanosina, que podría servir de sustrato para la APRT y formar otros compuestos tóxicos en el clon S. La ausencia de esta proteína en el clon R, podría conferir resistencia a estos últimos, aunque, este aspecto no ha sido soportado en otros estudios.

Por su parte, la fosfomanomutasa (PMM), también fue encontrada de forma exclusiva en el clon S en el análisis de geles bidimensionales, es una proteína implicada en la síntesis de GDP-manosa a partir de manosa-1-fosfato, que a su vez es usada para la síntesis de carbohidratos, ácido ascórbico, polímero de

alginate para la encapsulación celular y glucógeno y glucoconjugados en procariotas como eucariotas (Rajesh *et al.*, 2012). Su actividad puede ser bifuncional, lo que implica que tiene actividad glucosa-6-fosfato y manosa-6-fosfato (Rajesh *et al.*, 2012), aunque en *E. coli* solo tiene la función específica manosa-6-fosfato (Yang *et al.*, 2010). Diversos autores han propuesto que en *Streptomyces coelicolor* la delección de esta enzima lleva a la pérdida o atenuación de la virulencia, cambios físicos en la pared celular, disminución tasa de supervivencia intracelular, pérdida de la resistencia al estrés oxidativo e incremento en la sensibilidad a los antibióticos como el cloranfenicol; se propone que el mecanismo es debido a que la delección de la PMM conlleva a la disminución de la tasa de traducción del ARNm de las proteínas implicadas en las bombas eliminación del medicamento (Rajesh *et al.*, 2012). Por su parte, en *L. mexicana* a diferencia de lo encontrado en *S. coelicolor*, la PMM no parece ser una enzima esencial, pues los mutantes ( $\Delta$ PMM) son viables en medio estándar (Rajesh *et al.*, 2012). En este estudio, se encontró que, al igual que en *Leishmania* (Garami and Mehlert, 2001), la PMM no es esencial para la sobrevivencia de *T. cruzi* en el crecimiento *in vitro* (Figura 3). Sin embargo, como no ha sido asociada a la resistencia en parásitos y este fue, además del crecimiento, el único parámetro biológico evaluado, no se logró establecer una explicación de la expresión diferencial encontrada.

Por otro lado, están las proteínas de choque térmico (HSP70), que son proteínas altamente conservadas, que se encuentran en el citoplasma, mitocondria y retículo endoplasmático (Louw *et al.*, 2010) y se caracterizan por expresarse rápidamente en respuesta al estrés, señal que, al parecer, se desencadena por la presencia de proteínas mal plegadas (Evans *et al.*, 2010; Fernandez, 2006; Louw *et al.*, 2010). En tripanosomátidos estas proteínas tiene un rol importante en la adaptación a los cambios ambientales asociados a su ciclo de vida y diferenciación celular (Louw *et al.*, 2010). En *Leishmania spp*, por ejemplo, se han llegado a considerar como la primera línea de defensa contra los fármacos, hasta que se expresa un mecanismo de resistencia más eficiente y específico (Brochu *et al.*, 2004). En *T. cruzi*, Murta y colaboradores (2008) no pudieron asociar la resistencia al Bz a

estas proteínas, ya que a pesar de encontrar una expresión de 4 veces más ARNm de HSP70 en los clones resistentes este incremento no fue observado a nivel proteico, sugiriéndose, como en *Leishmania*, que estas proteínas podrían estar asociadas a la prevención de daños celulares, más no a la resistencia a medicamentos (Murta *et al.*, 2008). Es importante resaltar que en el presente trabajo se encontró una proteína de choque térmico (HSP70) sobreexpresada en el clon R y una HSP70, precursor mitocondrial exclusiva del mismo fenotipo, aun cuando los parásitos fueron mantenidos bajo las mismas condiciones y sin presión al Bz. Lo anterior sugiere que en el clon R esta proteína podría estar cumpliendo un papel fundamental durante el crecimiento de los parásitos en condiciones normales o de “no estrés”, como la asistencia en el plegamiento de nuevas proteínas, el transporte celular de proteínas y vesículas, la disociación o formación de complejos y degradación de proteínas (Carmelo *et al.*, 2006; Evans *et al.*, 2010), que le podrían conferir resistencia o por lo menos ventaja sobre el clon S una vez son expuestos al medicamento.

Finalmente, la alcohol deshidrogenasa (ADH), es una proteína que cataliza la oxidación reversible del etanol a acetaldehído o cetonas, procesos esenciales en los organismos tanto procariotas como eucariotas, es dependientes de NAD(P) en tripanosomátidos (Arauzo and Cazzulo, 1989) y es capaz de detoxificar aldehídos *in vivo* (Larroy *et al.*, 2002). En el 2011 Hoon y colaboradores demostraron que la sobreexpresión de la AHD6 confiere resistencia al glioxal en levaduras (Hoon *et al.*, 2011). Debido a que el glioxal es el compuesto que se forma después de la activación de Bz por la NTR I (Hall and Wilkinson, 2011), se podría pensar que al igual que las levaduras, en *T. cruzi* la ADH suprime la toxicidad del glioxal, lo que podría explicar la sobreexpresión de la proteína ADH encontrada en el clon R en este estudio. Este resultado fue corroborado por análisis del transcriptoma de estos mismo clones, encontrándose que en los parásitos R el nivel de transcritos fue mayor que en el clon S (datos no reportados). Sin embargo, nuestros datos son diferentes a lo reportado para la resistencia inducida por Murta y colaboradores (2009) quienes encontraron una expresión transcripcional 4 veces menor en la ADH de la cepa resistente inducida al Bz (17LER) que en su

contraparte sensible (17WTS) (Campos *et al.*, 2009). Todos estos resultados apoyan que los mecanismos de resistencia natural son diferentes a los de resistencia inducida, y posiblemente específicos para el Bz, siendo el gen ADH un candidato promisorio para seguir estudiando estos posibles mecanismos (Campos *et al.*, 2009; M Andrade *et al.*, 2008; Murta *et al.*, 2008).

Adicionalmente, el análisis de todas las proteínas diferencialmente expresadas parece indicar que en el desarrollo de la resistencia se están perdiendo algunos procesos biológicos que permiten la sobrevivencia de los parásitos dentro del insecto y los mamíferos cuando no hay presión con Bz, ya que por lo general, las formas mutantes de un organismo son menos aptas que las cepas silvestres en ausencia de selección (Walliker *et al.*, 2005). Lo que sugieren estudios en bacterias y virus es que la inducción de resistencia causada por alteraciones en moléculas blanco puede tener un costo biológico, que se observa como una disminución en la tasa de crecimiento, la virulencia o la infectividad (Andersson, 2006; Sandegren *et al.*, 2008; Ughes and Ndersson, 1998). En estudios anteriores sobre resistencia de *T. cruzi* al Bz, se ha observado que la adquisición de resistencia afecta la tasa de crecimiento *in vitro* y la infectividad a células de mamíferos (Mejía, 2011; Villarreal *et al.*, 2005; Wilkinson *et al.*, 2008), y aunque en el presente estudio no hubo una diferencia significativa en el crecimiento *in vitro*, es posible que sí exista en otras características biológicas no evaluadas. Sin embargo, es posible que se presente el mismo fenómeno que en bacterias, en donde después de un largo periodo sin la exposición a los antibióticos, mutaciones en genes específicos les permiten elevar nuevamente su crecimiento al nivel de las bacterias sensibles (Wijngaarden *et al.*, 2005). Igualmente, cabe la posibilidad de que se hayan generado mutaciones de resistencia “sin costo”, lo que implica que aunque se induzca resistencia, la tasa de crecimiento se mantiene estable, como se ha visto en *S. typhymurium* (Ughes and Ndersson, 1998). Por lo anterior, es importante resaltar que se deben desarrollar otros estudios en donde se puedan estudiar otras funciones biológicas de estos clones y así saber si existe un costo biológico debido a la resistencia.

Para concluir, si bien en *T. cruzi*, la NTR I se ha reportado como la enzima específica para la activación del Bz y esta directamente implicada en la inducción de resistencia al medicamento; el hecho de que ambos clones sean sensibles al Nfx y que no se encuentren mutaciones en su secuencia indica que la enzima es totalmente funcional y que probablemente para la resistencia natural al Bz el mecanismo es diferente y esta mediado por la regulación de enzimas que están involucradas en los pasos posteriores a la activación (Fairlamb and Cerami, 1992; Fairlamb *et al.*, 1985; Kubata *et al.*, 2002; Maya *et al.*, 1997; Nogueira *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2010; Wilkinson *et al.*, 2008), que podrían ser proteínas como las que se encontraron diferencialmente expresadas en este estudio (HSP70, ATPR, TcOYE, ADH o PMM).

En síntesis, en este estudio se encontraron 6 proteínas que se expresan diferencialmente entre el clon S y R y que se han sido involucrados en la resistencia a fármacos en otros organismos por lo que se debe continuar con la caracterización de estos genes en *T. cruzi*, corroborar su papel en la resistencia natural al Bz y poder proponer un mecanismo por el cual los parásitos tienen resistencia natural.

## 10 CONCLUSIONES

1. La identificación de genes diferencialmente expresados en fenotipos con diferentes sensibilidades a un medicamento es una herramienta útil para la selección de genes posiblemente involucrados con los mecanismos de resistencia.
2. El mecanismo de resistencia natural en *T. cruzi* es diferente al mecanismo de resistencia inducida, sin la participación de enzimas como NTR I y ni otras previamente reportadas.
3. El análisis proteómico es una herramienta poderosa para la identificación de genes que poseen expresión diferencial en fenotipos sensibles y resistentes al Bz.
4. La resistencia natural puede involucrar procesos de defensa inicial en los que participan proteínas como la HSP70 y procesos estables en los que participarían otras proteínas como TcOYE, ADPR, ADH y PMM.

## 11 PERSPECTIVAS

En este estudio se pudo analizar dos clones con diferente sensibilidad al Bz. Sin embargo, es necesario observar si las diferencias en la sensibilidad se mantienen a lo largo del ciclo de vida del parásito en los estadios que están presentes en los humanos. Igualmente, es importante observar si expresión o ausencia de las proteínas encontradas está afectando otros procesos biológicos como son la virulencia, infectividad y metaciclologénesis en ambos clones.

Por otro lado, es primordial extender la búsqueda de genes usando otros rangos de pH en los geles bidimensionales y otras técnicas que permitan observar modificaciones como fosforilaciones y glicosilaciones que puedan estar relacionadas con ganancia o pérdida de la actividad enzimática en la resistencia natural. Además, es importante utilizar otras técnicas como western blot para validar los resultados obtenidos por proteómica.

Por último, se necesita estudiar más a fondo el papel de las proteínas TcOYE, ADPR, ADH y PMM en la resistencia natural, caracterizando la estructura y actividad enzimática para probar que son enzimas activas y si tienen afinidad por algún sustrato formado a partir de la activación del Bz. Además, se podría estudiar el efecto sobre el fenotipo cuando se sobreexpresan o subexpresan dichas enzimas, para relacionarlas específicamente con la resistencia a este medicamento..

## 12 ANEXOS

**Anexo 1. Tamaño de los amplificadores y secuencias de los oligos utilizados para las PCR convencionales realizadas en este estudio**

Gen	Tamaño	Oligos	Secuencias oligos	Propósito de amplificación
Mini-exón	300 TcII/350 TcI	TCC TC1 TC2	5'-CCCCCTCCCAGGCCACTG-3' 5'-GTGTCCGCCAC CTCCTTCGGGCC-3' 5'-CCTGCAGGCACACGTGTGTGTG-3'	Genotipificación
kADN	330pb	121 122	5'-AAATAATGTACGGGGAGATGCATGA-3' 5'-GGGTTTCGATTGGGGTTGGTGT-3'	Genotipificación
RAPDs	Múltiples	M13-40 L15996 Igt11	5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3' 5'-CTCCACCATTAGCACCCAAAGC-3' 5'-GACTCCTGGAGCCCG-3'	Genotipificación
NTR I	939-960 pb	TcNTR-1F TcNTR-2R TcNTR-seqR	5'-ggacgggggatccATGAGGAGAAATGACATAAAAAAG-3' 5'-cccaagcttCAAAAACCTTCCCCACCGAAC-3' 5'-CTTCACATGGGCCACCGTGAAGTAGGTAGTA-3'	Amplificación y secuenciamiento

**Anexo 2. Concentraciones finales de los reactivos de la PCR y condiciones de ciclado para la amplificación de genes usados en este estudio**

Gen/ Técnica	Buffer	MgCl <sub>2</sub>	Oligos	dNTPs	Taq	ADN	Vol final	T° inicial	# ciclos	Ciclos	T° final
Mini-exón	1x	1,5 mM	0,5 µM	200 µM	0,6 U	25 ng	25 µl	94°C /3min	27	94°C/30s,55°C/30s,72°C/30s	72°C/10min
kADN	1x	1,5 mM	0,4 µM	160 µM	1,25 U	25 ng	25 µl	94°C /3min	35	94°C/45s,63°C/45s,72°C/45s	72°C/10min
LSSP-PCR	1x	1,5 mM	4 µM	350 µM	4 U	1 µM	25 µl	95°C /5min	35	94°C/45s,30°C/45s,72°C/45s	72°C/10min
RAPD	1x	1,5 mM	0,4 µM	125 µM	1 U	10 ng	25 µl	95°C /5min	2 38	95°C/30s,30°C/2m,72°C/1m 95°C/30s,40°C/2m,72°C/1m	72°C/10min
NTR I	1x	1,5 mM	0,5 µM	200 µM	1 U	50 ng	50 µl	98°C /30s	30	98°C/10s,50°C/30s,72°C/30s	72°C/10min

**Anexo 3. Tamaño de los amplificadores y secuencias de los oligos utilizados para las PCR en tiempo real realizadas en este estudio.**

Gen	Tamaño	Forward	Reverse
Enzima Amarilla (TcOYE)	146 pb	5'-ACTTTCGCTTGCCTATCTGC-3'	5'-GTATTTGCTGGTCTGCCTCTTC-3'
Nitrorreductasa I (NTR I)	195 pb	5'-GCACGTGATTGGTATGGATG-3'	5'-CTTTGTTGGGTCAAATCGCT-3'
Citocromo P-450 reductasa (CPR-B)	140 pb	5'-GCATACCGTTGGACACTTT-3'	5'-GCCTTCAGGAATGATACGGA-3'



Tripanotión reductasa (TRYR)	191 pb	5'-CTCTACAAGAAGCGGGTTGC-3'	5'-CTGAGAGTGGTGCGATCAAA -3'
Glutatioil- espermidina sintetasa (GTS)	125 pb	5'-ACTTCCACCGGGTCTTTTCT-3'	5'-CTGCGGCATTCATCACATAC-3'
Tripanotión sintetasa (TS)	130 pb	5'-ATCCGTTGGAGGATGAAGTG-3'	5'-TAAATGTCAGACGACGCAGC-3'
Triparedoxin peroxidasa citosólica (TXPc)	169 pb	5'-AAGTGGCTGGTGCTCTTCTT-3'	5'-TTGCGCTCAATGCTTGTCCA-3'
Triparedoxin peroxidasa mitocondrial (TXPm)	137 pb	5'-TGCAACACCCTGCGACTTCTTA-3'	5'-GCCCTTGTAGTCATTCAAGCTG-3'
Superóxido dismutasa A (SODA)	184 pb	5'-GTTGAGACGTGCGGTGAATA-3'	5'-GCCTTGTGGTGTGTTGGTGTA-3'
Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (HGPRT)	171 pb	5'-ATTGTTGACACCGCCCTTAC-3'	5'-ACCGTAGCCAATCACAAAGG -3'
ARN ribosomal 24S $\alpha$	110 pb	5'-AAGGTGCGTCGACAGTGTGG-3'	5'-TTTTCAGAATGGCCGAACAGT-3'

## 13 REFERENCIAS

- Andersson, D. I. (2006).** The biological cost of mutational antibiotic resistance: any practical conclusions? *Current opinion in microbiology* **9**, 461–5.
- Anlezark, G., Menton, R., Sherwood, R., Coles, B., Friedllos, F. & Knox, R. J. (1992).** The bioactivation of 5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB1954)—Purification and properties of a nitroreductase enzyme from *Escherichia coli*—A potential enzyme for antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT). *Biochemical Pharmacology* **44**, 2289–2295.
- Apt, W. & Zulantay, I. (2011).** Estado actual en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Revista médica de Chile* **139**, 247–257.
- Arauzo, S. & Cazzulo, J. (1989).** The NADP-linked aldehyde reductase from *Trypanosoma cruzi*: subcellular localization and some properties. *Fems Microbiology letters* **49**, 283–286.
- Avilán, L., Gualdrón López, M., Quiñones, W., González González, L., Hannaert, V., Michels, P. a M. & Concepción, J. L. (2011).** Enolase: a key player in the metabolism and a probable virulence factor of trypanosomatid parasites-perspectives for its use as a therapeutic target. *Enzyme research* **2011**, 932549.
- Barrett, M. P. (1997).** The pentose phosphate pathway and parasitic protozoa. *Parasitology today (Personal ed)* **13**, 11–6.
- Barrett, M. P., Burchmore, R. J. S., Stich, A., Lazzari, J. O., Frasch, A. C., Cazzulo, J. J. & Krishna, S. (2003).** The trypanosomiases. *Lancet* **362**, 1469–80.
- 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**, 1736–45.
- Boitz, J. M. & Ullman, B. (2006).** *Leishmania donovani* singly deficient in HGPRT, APRT or XPRT are viable in vitro and within mammalian macrophages. *Molecular and biochemical parasitology* **148**, 24–30.
- Boitz, J. M. & Ullman, B. (2010).** Amplification of adenine phosphoribosyltransferase suppresses the conditionally lethal growth and virulence phenotype of *Leishmania donovani* mutants lacking both hypoxanthine-guanine and xanthine phosphoribosyltransferases. *The Journal of biological chemistry* **285**, 18555–64.
- Bot, C., Hall, B. S., Bashir, N., Taylor, M. C., Helsby, N. a & Wilkinson, S. R. (2010).** Trypanocidal activity of aziridinyl nitrobenzamide prodrugs. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **54**, 4246–52.

- Botero, L. A., Mejía, A. M. & Triana, O. (2007).** Caracterización biológica y genética de dos clones pertenecientes a los grupos I y II de *Trypanosoma cruzi* de Colombia. *Biomedica* **27**, 64–74.
- Breeze, A. S. & Obaseiki-Ebor, E. E. (1983).** Mutations to nitrofurantoin and nitrofurazone resistance in *Escherichia coli* K12. *Journal of general microbiology* **129**, 99–103.
- Brisse, S., Verhoef, J. & Tibayrenc, M. (2001).** Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *International journal for parasitology* **31**, 1218–26.
- Brochu, C., Haimeur, A. & Ouellette, M. (2004).** The heat shock protein HSP70 and heat shock cognate protein HSC70 contribute to antimony tolerance in the protozoan parasite leishmania. *Cell stress & chaperones* **9**, 294–303.
- Bryant, C., Hubbard, L. & McElroy, W. D. (1991).** Cloning, nucleotide sequence, and expression of the nitroreductase gene from *Enterobacter cloacae*. *The Journal of biological chemistry* **266**, 4126–30.
- Campos, F. M. F., Liarte, D. B., Mortara, R. a, Romanha, A. J. & Murta, S. M. F. (2009).** Characterization of a gene encoding alcohol dehydrogenase in benzimidazole-susceptible and -resistant populations of *Trypanosoma cruzi*. *Acta tropica* **111**, 56–63.
- Cançado, J. R. (1999).** Criteria of Chagas disease cure. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **94 Suppl 1**, 331–5.
- Carmelo, E., Zurita, A. ., González, A. ., Martínez, E. & Valladares, B. (2006).** Proteínas de choque térmico en parásitos : la Hsp70 y el sistema inmune .
- Coronado, X., Zulantay, I., Rozas, M., Apt, W., Sánchez, G., Rodríguez, J., Ortiz, S. & Solari, A. (2006).** Dissimilar distribution of *Trypanosoma cruzi* clones in humans after chemotherapy with allopurinol and itraconazole. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **58**, 216–9.
- Coura, J. & Castro, S. L. (2002).** A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **97**, 3–24.
- Coura, J. R. (2007).** Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **102 Suppl** , 113–22.
- Drummelsmith, J., Girard, I., Trudel, N. & Ouellette, M. (2004).** Differential protein expression analysis of *Leishmania major* reveals novel roles for methionine adenosyltransferase and S-adenosylmethionine in methotrexate resistance. *The Journal of biological chemistry* **279**, 33273–80.
- Dumas, C., Ouellette, M., Tovar, J., Cunningham, M. L., Fairlamb, a H., Tamar, S., Olivier, M. & Papadopoulou, B. (1997).** Disruption of the trypanothione reductase

gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. *The EMBO journal* **16**, 2590–8.

**Duque, M. C., Ramírez, J. D., Rendón, L. M. & Guhl, F. (2011).** Evaluación de la variabilidad genética de aislamientos colombianos de *Trypanosoma cruzi* mediante marcadores microsátélites. *Infectio* **15**, 227–234.

**Evans, C. G., Chang, L. & Gestwicki, J. E. (2010).** Heat shock protein 70 (hsp70) as an emerging drug target. *Journal of medicinal chemistry* **53**, 4585–602.

**Fairlamb, A. H., Blackburn, P., Ulrich, P., Chait, B. T. & Cerami, A. (1985).** Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science* **227**, 1485–1487.

**Fairlamb, A. H. & Cerami, A. (1992).** Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annual review of microbiology* **46**, 695–729.

**Fernandez, C. (2006).** *Los genes HSP70 de Leishmania : importancia de la regulación traduccional y relevancia biológica del gen HSP70-II.* Universidad Autónoma.

**Figarella, K., Rawer, M., Uzcategui, N. L. & Kubata, B. K. (2005).** Prostaglandin D<sub>2</sub> induces programmed cell death in *Trypanosoma brucei* bloodstream form. *cell Death and Differentiation* **12**, 335–346.

**Filardia, L. S. & Brenera, Z. (1987).** Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Higiene* **81**, 755–759.

**Garami, A. & Mehlert, A. (2001).** Glycosylation Defects and Virulence Phenotypes of *Leishmania mexicana* Phosphomannomutase and Dolicholphosphate- Mannose Synthase Gene Deletion Mutants. *Molecular and cellular biology* **21**, 8168–8183.

**García-torres, I. & Pérez-montfort, R. (2011).** Avances en la identificación de blancos terapéuticos y el diseño racional de fármacos contra la enfermedad de chagas. *REB* **30**, 68–81.

**Guzmán, E. S., Zavala, J. E., Acosta, K. Y. & Rosado, M. E. (1999).** Importancia de la caracterización de cepas de *Trypanosoma*. *Revista Biomedica* **10**, 177–184.

**Hall, B. S. & Wilkinson, S. R. (2011).** Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. *Antimicrobial agents and chemotherapy* AAC.05135–11–.

**Hall, B. S., Bot, C. & Wilkinson, S. R. (2011).** Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. *The Journal of biological chemistry* **286**, 13088–13095.

**Hayes, J. D. & Wolf, C. R. (1990).** Molecular mechanisms of drug resistance **272**, 281–295.

- Hoon, S., Gebbia, M., Costanzo, M., Davis, R. W., Giaever, G. & Nislow, C. (2011).** A global perspective of the genetic basis for carbonyl stress resistance. *G3 (Bethesda, Md)* **1**, 219–31.
- Irigoín, F., Cibils, L., Comini, M. a, Wilkinson, S. R., Flohé, L. & Radi, R. (2008).** Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. *Free radical biology & medicine* **45**, 733–42.
- Ismail, S. O., Paramchuk, W., Skeiky, Y. a, Reed, S. G., Bhatia, A. & Gedamu, L. (1997).** Molecular cloning and characterization of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and biochemical parasitology* **86**, 187–97.
- Johnson, D. H. & Friedman, T. B. (1983).** Purine-resistant *Drosophila melanogaster* result from mutations in the adenine phosphoribosyltransferase structural gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**, 2990–4.
- Kabiri, M. & Steverding, D. (2001).** Identification of a developmentally regulated iron superoxide dismutase of *Trypanosoma brucei*. *The Biochemical journal* **360**, 173–7.
- Kaur, K., Iovannisci, D. M. & Ullman, B. (1986).** Adenine phosphoribosyltransferase-deficient *Leishmania donovani*. *Advances in experimental medicine and biology* **195 Pt B**, 553–7.
- Ben Khalaf, N., De Muylder, G., Louzir, H., McKerrow, J. & Chenik, M. (2012).** *Leishmania major* protein disulfide isomerase as a drug target: enzymatic and functional characterization. *Parasitology research* **110**, 1911–7.
- Kitts, C. L., Green, C. E., Otley, R. A., Alvarez, M. A. & Unkefer, P. J. (2000).** Type I nitroreductases in soil enterobacteria reduce TNT (2,4,6,-trinitrotoluene) and RDX (hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine). *Canadian journal of microbiology* **46**, 278–82.
- Klipp, E., Wade, R. C. & Kummer, U. (2010).** Biochemical network-based drug-target prediction. *Current opinion in biotechnology* **21**, 511–6. Elsevier Ltd.
- Krauth-Siegel, R. L. & Comini, M. a. (2008).** Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochimica et biophysica acta* **1780**, 1236–48.
- Krieger, S., Schwarz, W., Ariyanayagam, M. R., Fairlamb, a H., Krauth-Siegel, R. L. & Clayton, C. (2000).** Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress. *Molecular microbiology* **35**, 542–52.
- Kubata, B. K., Kabututu, Z., Nozaki, T., Munday, C. J., Fukuzumi, S., Ohkubo, K., Lazarus, M., Maruyama, T., Martin, S. K. & other authors. (2002).** A Key Role for Old Yellow Enzyme in the Metabolism of Drugs by *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Experimental Medicine* **196**, 1241–1252.

- Larroy, C., Gonza, E., Pare, X. & Ferna, M. R. (2002).** Product as a broad specificity NADPH-dependent alcohol dehydrogenase : relevance in aldehyde reduction **172**, 163–172.
- Liang, X., Haritan, A. & Uliel, S. (2003).** trans and cis Splicing in Trypanosomatids : Mechanism , Factors , and Regulation. *Eukaryotic cell* **2**.
- Linares, J. F., Parro, V., Martínez, J. L. & Gustafsson, I. (2005).** RT-PCR vs microarrays for measuring expression of antibiotic resistance genes. *PCR Encyclopedia*.
- Louw, C. a, Ludewig, M. H., Mayer, J. & Blatch, G. L. (2010).** The Hsp70 chaperones of the Tritryps are characterized by unusual features and novel members. *Parasitology international* **59**, 497–505. Elsevier Ireland Ltd.
- Lovering, A. L., Hyde, E. I., Searle, P. F. & White, S. A. (2001).** The structure of Escherichia coli nitroreductase complexed with nicotinic acid: three crystal forms at 1.7 Å, 1.8 Å and 2.4 Å resolution. *Journal of molecular biology* **309**, 203–13.
- M Andrade, H., Murta, S. M. F., Chapeaurouge, A., Perales, J., Nirdé, P. & Romanha, A. J. (2008).** Proteomic Analysis of Trypanosoma cruzi resistance to benznidazole. *Journal of Proteome Research* **7**, 2357–2367.
- Macedo, a M. & Pena, S. D. (1998).** Genetic Variability of Trypanosoma cruzi: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. *Parasitology today (Personal ed)* **14**, 119–24.
- Macedo, A. M., Machado, C. R., Oliveira, R. P. & Pena, S. D. J. (2004).** Trypanosoma cruzi: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **99**, 1–12.
- Marquez, D. S., Ramírez, L. E., Moreno, J., Pedrosa, a L. & Lages-Silva, E. (2007).** Trypanosoma rangeli: RAPD-PCR and LSSP-PCR analyses of isolates from southeast Brazil and Colombia and their relation with KPI minicircles. *Experimental parasitology* **117**, 35–42.
- Marti, S., Yan, S., Nguyen, D., Fox, M., Stuart, K., Myler, P. J. & Street, N. (2003).** Transcription of Leishmania major Friedlin Chromosome 1 Initiates in Both Directions within a Single Region. *Molecular cell* **11**, 1291–1299.
- Maya, J. D., Repetto, Y., Agosín, M., Ojeda, J. M., Tellez, R., Gaule, C. & Morello, A. (1997).** Effects of nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of Trypanosoma cruzi. *Molecular and biochemical parasitology* **86**, 101–6.
- Maya, J. D., Cassels, B. K., Iturriaga-Vásquez, P., Ferreira, J., Faúndez, M., Galanti, N., Ferreira, A. & Morello, A. (2007).** Mode of action of natural and synthetic drugs against Trypanosoma cruzi and their interaction with the mammalian host. *Comparative biochemistry and physiology Part A, Molecular & integrative physiology* **146**, 601–20.

- McCalla, D. R., Kaiser, C. & Green, M. H. (1978).** Genetics of nitrofurazone resistance in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **133**, 10–6.
- McCord, J. & Fridovich, I. (1988).** Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988). *Free radical biology & medicine* **5**, 363–369.
- Medicina, I., Medicina, D. & Oriente, C. (2011).** Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. *Revista médica de Chile* **139**, 258–266.
- Mejía, A. M., Fernández, G. J., Palacio, L. & Triana-Chávez, O. (2011).** Gene expression study using real-time PCR identifies an NTR gene as a major marker of resistance to benznidazole in *Trypanosoma cruzi*. *Parasites & vectors* **4**, 169. BioMed Central Ltd.
- Mejía, A. M., Hall, B. S., Taylor, M. C., Gómez-Palacio, A., Wilkinson, S. R., Triana-Chávez, O. & Kelly, J. M. (2012a).** Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi* is a readily acquired trait that can arise independently in a single population. *The Journal of infectious diseases* **206**, 220–8.
- Mejía, A. M. (2011).** *Estudio de genes de Trypanosoma cruzi involucrados en la adquisición de resistencia al benznidazol en poblaciones parasitarias susceptibles y resistentes y caracterización de la enzima nitrorreductasa tipo I*. Control. Universidad de Antioquia.
- Mejía, A. M. & Triana, O. (2005).** Análisis por LSSP-PCR de la variabilidad genética de *Trypanosoma cruzi* en sangre y órganos de ratones. 76–86.
- Mejía, A. M., Fernández, G. J. & Montilla, M. (2012b).** Sensibilidad al benznidazol de cepas de *Trypanosoma cruzi* sugiere la circulación de cepas naturalmente resistentes en Colombia. *Biomedica* **32**, 196–205.
- Moncayo, A. (2003).** Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **98**, 577–91.
- Mott, T., Soler, M., Grigsby, S., Medley, R. & Whitlock, G. C. (2010).** Identification of potential diagnostic markers among *Burkholderia cenocepacia* and *B. multivorans* supernatants. *Journal of clinical microbiology* **48**, 4186–92.
- Murta, S. M. F., Krieger, M. a, Montenegro, L. R., Campos, F. F. M., Probst, C. M., Avila, A. R., Muto, N. H., De Oliveira, R. C., Nunes, L. R. & other authors. (2006).** Deletion of copies of the gene encoding old yellow enzyme (TcOYE), a NAD(P)H flavin oxidoreductase, associates with in vitro-induced benznidazole resistance in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and biochemical parasitology* **146**, 151–62.
- Murta, S. M. F., Nogueira, F. B., Dos Santos, P. F., Campos, F. M. F., Volpe, C., Liarte, D. B., Nirdé, P., Probst, C. M., Krieger, M. a & other authors. (2008).** Differential gene expression in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole. *Acta tropica* **107**, 59–65.

- Müller, S., Liebau, E., Walter, R. D. & Krauth-Siegel, R. L. (2003).** Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites. *Trends in Parasitology* **19**, 320–328.
- Nogueira, F. B., Krieger, M. a, Nirdé, P., Goldenberg, S., Romanha, A. J. & Murta, S. M. F. (2006).** Increased expression of iron-containing superoxide dismutase-A (TcFeSOD-A) enzyme in *Trypanosoma cruzi* population with in vitro-induced resistance to benznidazole. *Acta tropica* **100**, 119–32.
- Nogueira, F. B., Ruiz, J. C., Robello, C., Romanha, A. J. & Murta, S. M. F. (2009).** Molecular characterization of cytosolic and mitochondrial tryparedoxin peroxidase in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole. *Parasitology research* **104**, 835–44.
- Noireau, F. (2009).** Wild *Triatoma infestans*, a potential threat that needs to be monitored. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **104 Suppl**, 60–4.
- Nozaki, T., Shigeta, Y., Saito-Nakano, Y., Imada, M. & Kruger, W. D. (2001).** Characterization of transsulfuration and cysteine biosynthetic pathways in the protozoan hemoflagellate, *Trypanosoma cruzi*. Isolation and molecular characterization of cystathionine beta-synthase and serine acetyltransferase from *Trypanosoma*. *The Journal of biological chemistry* **276**, 6516–23.
- Olin-Sandoval, V., González-Chávez, Z., Berzunza-Cruz, M., Martínez, I., Jasso-Chávez, R., Becker, I., Espinoza, B., Moreno-Sánchez, R. & Saavedra, E. (2012).** Drug target validation of the trypanothione pathway enzymes through metabolic modelling. *The FEBS journal* **279**, 1811–33.
- Patel, S., Hussain, S., Harris, R., Sardiwai, S., Kelly, J. M., Wilkinson, S. R., Driscoll, P. C. & Djordjevic, S. (2010).** Structural insights into the catalytic mechanism of *Trypanosoma cruzi* GPXI (glutathione peroxidase-like enzyme I). *The Biochemical journal* **425**, 513–22.
- Paulos, C., Paredes, J., Vasquez, I., Thambo, S., Arancibia, A. & Gonzalez-Martin, G. (1989).** Pharmacokinetics of a nitrofurantoin compound, nifurtimox, in healthy volunteers. *International journal of clinical pharmacology, therapy, and toxicology* **27**, 454–7.
- Pena, S. D. J., Barretot, G., Vagot, A. R., Marco, L. D. E., Reinach, F. C., Netoi, E. D. & Simpson, A. J. G. (1994).** Sequence-specific “gene signatures”. **91**, 1946–1949.
- Pfaffl, M. W. (2001).** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* **29**, e45.
- Piñero, M. D., Pizarro, J. C., Lerna, F., Pritsch, O., Cayota, A., Bentley, G. A. & Robello, C. (2005).** Crystal structure of the tryparedoxin peroxidase from the human parasite *Trypanosoma cruzi*. *Journal of structural biology* **150**, 11–22.
- Portal, P., Villamil, S. F., Alonso, G. D., De Vas, M. G., Flawiá, M. M., Torres, H. N. & Paveto, C. (2008).** Multiple NADPH-cytochrome P450 reductases from *Trypanosoma cruzi* suggested role on drug resistance. *Molecular and biochemical parasitology* **160**, 42–51.



- Prathalingham, S. R., Wilkinson, S. R., Horn, D. & Kelly, J. M. (2007).** Deletion of the *Trypanosoma brucei* superoxide dismutase gene *sodb1* increases sensitivity to nifurtimox and benznidazole. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **51**, 755–8.
- Raaflaub, J. & Ziegler, W. H. (1979).** Single-dose pharmacokinetics of the trypanosomicide benznidazole in man. *Arzneimittel-Forschung* **29**, 1611–4.
- Raether, W. & Hänel, H. (2003).** Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. *Parasitology research* **90 Supp 1**, S19–39. Springer Berlin / Heidelberg.
- Rajesh, T., Song, E., Lee, B.-R., Park, S.-H., Jeon, J.-M., Kim, E., Sung, C., Lee, J.-H., Yoo, D. & other authors. (2012).** Increased Sensitivity to Chloramphenicol by Inactivation of *manB* in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of microbiology and biotechnology* **22**, 1324–9.
- Rodríguez, I. B., Botero, A., Mejía-Jaramillo, A. M., Marquez, E. J., Ortiz, S., Solari, A. & Triana-Chávez, O. (2009).** Transmission dynamics of *Trypanosoma cruzi* determined by low-stringency single primer polymerase chain reaction and southern blot analyses in four indigenous communities of the Sierra Nevada de Santa Marta, Colombia. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **81**, 396–403.
- Rosas, F., Vanegas, D. & Cabrales, M. (2007).** *chagas.pdf*, Primera. (F. Rosas, D. I. Vanegas & M. F. Cabrales, Eds.). Medellín: Sociedad Colombiana de Cardiología y Cirugía Cardiovascular.
- Sandegren, L., Lindqvist, A., Kahlmeter, G. & Andersson, D. I. (2008).** Nitrofurantoin resistance mechanism and fitness cost in *Escherichia coli*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **62**, 495–503.
- Schmunis, G. a. (2007).** Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **102 Suppl** , 75–85.
- Sibley, C. H. & Price, R. N. (2012).** Monitoring antimalarial drug resistance: Applying lessons learned from the past in a fast-moving present. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* **2**, 126–133. Australian Society for Parasitology.
- Sokolova, A. Y., Wyllie, S., Patterson, S., Oza, S. L., Read, K. D. & Fairlamb, A. H. (2010).** Cross-resistance to nitro drugs and implications for treatment of human African trypanosomiasis. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **54**, 2893–900.
- Steindel, M., Neto, E. D., Pinto, C. J. C., Grisard, E. C., Menezes, C. L. P., Murta, S. M. F., Simpson, A. J. G. & Romanha, A. J. (1994).** Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Isoenzyme Analysis of *Trypanosoma rangeli* Strains. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* **41**, 261–267.
- Steverding, D. & Tyler, K. (2005).** Novel antitypanosomal agents.pdf. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **14**, 939–955.

- Stolf, B. S., Smyrnias, I., Lopes, L. R., Vendramin, A., Goto, H., Laurindo, F. R. M., Shah, A. M. & Santos, C. X. C. (2011).** Protein disulfide isomerase and host-pathogen interaction. *TheScientificWorldJournal* **11**, 1749–61.
- Telleria, J. & Tibayrenc, M. (2010).** *American Trypanosomiasis Chagas Disease. One Hundred Years of Research. Infectious disease clinics of North America.*
- Tenover, F. C. (2006).** Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American journal of medicine* **119**, S3–10; discussion S62–70.
- Tetaud, E., Giroud, C., Prescott, a R., Parkin, D. W., Baltz, D., Biteau, N., Baltz, T. & Fairlamb, a H. (2001).** Molecular characterisation of mitochondrial and cytosolic trypanothione-dependent trypanedoxin peroxidases in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical parasitology* **116**, 171–83.
- Thomson, L., Denicola, A. & Radi, R. (2003).** The trypanothione–thiol system in *Trypanosoma cruzi* as a key antioxidant mechanism against peroxynitrite-mediated cytotoxicity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **412**, 55–64.
- Tibayrenc, M., Ward, P., Moya, a & Ayala, F. J. (1986).** Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 115–9.
- Tibayrenc, M. (2003).** Kinetoplastid Biology and Disease Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* ( Discrete Typing Units ) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. *Biomed central* **6**, 1–6.
- Tovar, J., Cunningham, M. L., Smith, A. C., Croft, S. L. & Fairlamb, A. H. (1998a).** Down regulation of *Leishmania donovani* trypanothione. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 5311–5316.
- Tovar, J., Wilkinson, S., Mottram, J. C. & Fairlamb, a H. (1998b).** Evidence that trypanothione reductase is an essential enzyme in *Leishmania* by targeted replacement of the tryA gene locus. *Molecular microbiology* **29**, 653–60.
- Ughes, D. I. H. & Ndersson, D. A. N. I. A. (1998).** Virulence of antibiotic-resistant *Salmonella typhimurium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 3949–3953.
- Vago, a R., Macedo, a M., Oliveira, R. P., Andrade, L. O., Chiari, E., Galvão, L. M., Reis, D., Pereira, M. E., Simpson, a J. & other authors. (1996).** Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. *The American journal of pathology* **149**, 2153–9.
- Villarreal, D., Nirde, P., Hide, M., Barnabe, C. & Tibayrenc, M. (2005).** Differential Gene Expression in Benznidazole-Resistant *Trypanosoma cruzi* Parasites. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **49**, 2701–2709.

- Viodé, C., Bettache, N., Cenas, N., Krauth-Siegel, R. L., Chauvière, G., Bakalara, N. & Périé, J. (1999).** Enzymatic reduction studies of nitroheterocycles. *Biochemical pharmacology* **57**, 549–57.
- Walliker, D., Hunt, P. & Babiker, H. (2005).** Fitness of drug-resistant malaria parasites. *Acta tropica* **94**, 251–9.
- Watanabe, M., Ishidate, M. & Nohmi, T. (1990).** Nucleotide sequence of Salmonella typhimurium nitroreductase gene. *Nucleic acids research* **18**, 1059.
- Whiteway, J., Koziarz, P., Veall, J., Sandhu, N., Kumar, P., Hoecher, B. & Lambert, I. B. (1998).** Oxygen-insensitive nitroreductases: analysis of the roles of nfsA and nfsB in development of resistance to 5-nitrofurantoin derivatives in Escherichia coli. *Journal of bacteriology* **180**, 5529–39.
- WHO, W. H. O. (2010a).** *Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases First WHO report on neglected tropical diseases*, 1st edn. France.
- WHO, W. H. O. (2010b).** *Control and prevention of Chagas disease in Europe*. Geneva, Switzerland.
- WHO, W. H. O. (2012a).** Chagas disease control and elimination.pdf.
- WHO, W. H. O. (2012b).** La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis Americana).
- Wijngaarden, P. J., Van den Bosch, F., Jeger, M. J. & Hoekstra, R. F. (2005).** Adaptation to the cost of resistance: a model of compensation, recombination, and selection in a haploid organism. *Proceedings Biological sciences / The Royal Society* **272**, 85–9.
- Wilkinson, S. R., Taylor, M. C., Horn, D., Kelly, J. & Cheeseman, I. (2008).** A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 5022–7.
- Wilkinson, S. R. & Kelly, J. M. (2003).** The role of glutathione peroxidases in trypanosomatids. *The Journal of biological chemistry* **384**, 517–525.
- Wilkinson, S. & Kelly, J. M. (2009).** Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. *Expert reviews in molecular medicine* **11**, e31.
- Woods, R., Roberts, D., Stein, D. & Filpula, D. (1984).** Adenine Phosphoribosyltransferase Mutants in Saccharomyces cerevisiae. *Journal of general microbiology* **140**, 2629–2637.
- Yamaguchi, K., Okamoto, N., Tokuoka, K., Sugiyama, S., Uchiyama, N., Matsumura, H., Inaka, K., Urade, Y. & Inoue, T. (2011).** Structure of the inhibitor complex of old yellow enzyme from Trypanosoma cruzi. *Journal of synchrotron radiation* **18**, 66–9. International Union of Crystallography.

**Yang, Y.-H., Song, E., Park, S.-H., Kim, J.-N., Lee, K., Kim, E., Kim, Y.-G. & Kim, B.-G. (2010).** Loss of phosphomannomutase activity enhances actinorhodin production in *Streptomyces coelicolor*. *Applied microbiology and biotechnology* **86**, 1485–92.

**Zingales, B., Miles, M. a, Campbell, D. a, Tibayrenc, M., Macedo, A. M., Teixeira, M. M. G., Schijman, A. G., Llewellyn, M. S., Lages-Silva, E. & other authors. (2012).** The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **12**, 240–53. Elsevier B.V.