



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**DETERMINACIÓN DE LA FACTIBILIDAD DEL SISTEMA ARN ANTISENTIDO
COMO HERRAMIENTA DE ANÁLISIS GENÉTICO EN *Trypanosoma rangeli*,
ACOPLADO AL SISTEMA DE EXPRESIÓN CONDICIONAL DE GENES
ARNpT7/TetR.**

**TRABAJO ESPECIAL DE
GRADO**

Presentado ante la Ilustre
Universidad Central de
Venezuela, por la bachiller
Floritza Bustamante como
requisito parcial para optar al
título de Licenciado en Biología

CARACAS, VENEZUELA
OCTUBRE - 2009

AGRADECIMIENTOS

Quiero dedicar este trabajo a toda mi familia, a los cuales les agradezco por su incondicional confianza y apoyo para avanzar y culminar con éxito mi carrera universitaria.

También agradezco a mis compañeros y amigos más cercanos por su compañía y todo el apoyo ofrecido, a mis amigos que conocí en nuestra segunda casa la Universidad, con quienes compartí momentos irrepetibles y junto a los cuales vencí muchas de las barreras presentes durante nuestra carrera. Agradezco a mis compañeros de laboratorio, con los cuales compartí durante dos años, e hicieron que esta recta final fuese menos difícil.

Agradezco a todos los profesores de las materia de pregrado, de de quienes tuve el privilegio ser alumna, y quienes contribuyeron en mi formación como profesional.

Además quiero agradecer a mis jurados de tesis, por el interés y la ayuda ofrecida durante mi trabajo especial de grado, así como a todos los profesionales que contribuyeron en el desarrollo de este trabajo.

Agradezco a la Profesora Palmira, quién me dio su voto de confianza para estar en su laboratorio, en el cual madure mis conocimientos teóricos y prácticos, formándome como profesional.

Quiero dar un gran reconocimiento y agradecimiento a la Universidad Central de Venezuela, específicamente la Facultad de ciencias y el instituto de Biología experimental, donde durante estos años aprendí que la constancia y la propia exigencia son necesarias para alcanzar el éxito.

Finalmente quiero agradecer a Dios por haberme dado la dicha de haber culminado esta etapa, y de haber conocido y compartido con excelentes personas durante estos años.

A todos ustedes mis agradecimientos...

INDÍCE GENERAL

	Página
Índice General	i
Índice de Figuras y Tablas	v
Índice de Abreviaturas	viii
Resumen	x
1. Introducción	1
1.1. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma rangeli</i>	1
1.2. Expresión génica en tripanosomatideos	4
1.3. ¿Cómo abordar el estudio de los mecanismos moleculares de la interacción parásito/hospedador?	6
2. Antecedentes	13
3. Objetivos	25
3.1. Objetivo General.	25
3.2. Objetivos específicos.	25
4. Materiales y Métodos	26
4.1. Fase I: Recuperación y Caracterización de los plásmidos pLew13 y pTcIndex-RFP	27
4.1.1. Preparación de células competentes	27
4.1.2. Transformación de células competentes	27
4.1.3. Aislamiento de ADN plasmídico mediante miniprep	28

4.1.4. Digestión de ADN plasmídico con enzimas de restricción	29
4.1.5. Análisis de ADN mediante electroforesis en geles de agarosa	29
4.1.6. Tratamiento con ARNasa	29
4.1.7. Cuantificación por espectrofotometría	30
4.2. Fase II: Establecimiento de Líneas celulares estables de <i>T. rangeli</i> transfectadas con pLew13.	30
4.2.1. Mantenimiento de los cultivos de parásitos	30
4.2.2. Aislamiento de ADNg de <i>T. rangeli</i>	30
4.2.3. Tipificación de los aislados de <i>T. rangeli</i> mediante los ensayos de PCR P542 y Clon6.	31
4.2.4. Obtención de líneas transfectantes	32
4.2.5. Clonamiento de líneas celulares	33
4.2.6. Obtención y marcaje de sonda	33
4.2.7. Southern blot.	34
4.2.8. Aislamiento de proteínas totales de <i>T. rangeli</i> .	35
4.2.9. Electroforesis de proteínas totales aisladas de poblaciones clonadas de <i>T. rangeli</i> Triat-1[pLew13].	35
4.2.10. Detección de la proteína ARNpT7 en poblaciones clonadas de <i>T. rangeli</i> Triat-1[pLew13].	36
4.3. Fase III: Construcción de los vectores de expresión pTcIndex- <i>atub</i> → y ←	37
4.3.1. Aislamiento del gen de α tubulina	37
4.3.2. Fosforilación del fragmento α tubulina	38
4.3.3. Defosforilación del vector	38
4.3.4. Reacción de ligamiento	38

5. Resultados	40
5.1. Recuperación y caracterización de los vectores de expresión pLew13, pTcIndex-RFP y pTcIndexI.	40
5.2. Obtención de líneas celulares estables de <i>T. rangeli</i> Triat-1 expresando la ARNpT7, la proteína TetR y el gen <i>NPT</i> desde el contexto cromosómico, a partir de la transfección del vector de expresión pLew13 lineal.	45
5.2.1. Tipificación de la cepa <i>T. rangeli</i> Triat-1.	45
5.2.2. Preparación del vector pLew13.	47
5.2.3. Obtención de líneas estables <i>T. rangeli</i> Triat-1[pLew13]	48
5.2.4. Clonamiento poblacional de las líneas estables de <i>T. rangeli</i> [pLew13]	54
5.3. Caracterización molecular de la inserción de pLew13 en el genoma de <i>T. rangeli</i> Triat-1 en las líneas celulares estables.	58
5.3.1. Verificación del mapa de la región β - α de <i>T. rangeli</i> Triat-1.	58
5.3.2. Evaluación de la Inserción de el plásmido pLew13 en el genoma de <i>Trypanosoma rangeli</i> Triat-1.	62
5.3.2.1. Modelo de inserción por recombinación homóloga.	62
5.3.3.2. Análisis de Southern blot en controles y líneas clonadas <i>T. rangeli</i> Triat-1[pLew13].	64
5.4. Detección de la proteína ARNpT7.	72
5.5. Construcción del vector de expresión condicional incorporando al gen de alfa tubulina.	74
5.5.1. Primera Estrategia de Clonamiento.	74
5.5.2. Segunda Estrategia de Clonamiento.	75
5.5.3. Tercera estrategia de clonamiento.	81

6. Discusión	83
7. Conclusiones	90
8. Bibliografía	92

INDÍCE DE FIGURA Y TABLAS

FIGURAS	Página
1. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma rangeli</i> en el insecto vector.	2
2. Mecanismo del ARNi.	10
3. Mapa físico de los vectores pLew13 y pTcIndex-RFP.	11
4. Sistema de inducción del gen reportero Luciferasa utilizado por Wirtz y Clayton en 1995.	14
5. Sistema inducible ARNpT7/TetR utilizado por Wirtz y colaboradores, 1999.	16
6. Sistemas de expresión condicional desarrollados en el parásito <i>L. donovani</i> bajo el control del promotor ribosomal.	18
7. Sistema inducible utilizado en <i>Leishmania chagasi</i> por Yao y colaboradores en el 2007	20
8. Sistema de inducción empleado en <i>T. cruzi</i> utilizado por Wen y colaboradores en el 2001.	21
9. Estrategias para la producción de ARNdc y ARN antisentido in vivo en tripanosomatideos	24
10. Análisis de los patrones de restricción del vector pLew13	42
11. Análisis de los patrones de restricción del vector pTcIndex-RFP.	43
12. Análisis de los patrones de restricción del vector pTcIndexI.	44
13. Tipificación especie específica de los cultivos de <i>T. rangeli</i> Triat-1 mediante ensayos de PCR.	46
14. Análisis de la digestión preparativa de pLew13 con la enzima <i>NotI</i> .	47
15. Seguimiento del comportamiento de los cultivos de <i>T. rangeli</i> Triat-1 parentales y líneas transfectadas con pLew13 y pTrexn-GFP5 luego de la transfección.	50
16. Seguimiento del comportamiento de los cultivos de <i>T. rangeli</i> Triat-1 parentales y líneas transfectadas con pLew13 y pTrexn-GFP5 luego de la	52

transfección.	
17. Evaluación al microscopio de líneas celulares de <i>T. rangeli</i> Triat-1 ocho semanas después de la transfección con el vector pTrexn-GFP5.	53
18. Registro esquemático del resultado del clonamiento por dilución seriada, diagrama del clonamiento poblacional de las líneas celulares estables de <i>T. rangeli</i> Triat-1transfectadas con pLew13 y pTrexn-GFP5.	55
19. Evaluación al microscopio de la morfología de las líneas celulares de <i>T. rangeli</i> Triat-1 parentales y <i>T. rangeli</i> [pLew13] diez semanas después del clonamiento	56
20. Evaluación al microscopio de Líneas celulares de <i>T. rangeli</i> [pTrexn-GFP5] diez semanas después del clonamiento.	57
21. Verificación del mapa de restricción de la región α - β de <i>T. rangeli</i> Triat-1.	59
22. Análisis del polimorfismo del sitio <i>Hind</i> III en el locus de α tubulina de las cepas <i>T. rangeli</i> Triat-1 y San Agustín (SA).	61
23. Estrategia propuesta para la recombinación del vector pLew13 en el locus α - β tubulina de <i>T. rangeli</i> .	63
24. Esquema de patrones de restricción en <i>T. rangeli</i> con pLew13 insertado.	65
25. Análisis Southern Blot de los patrones de restricción pLew13 hibridados con la sonda de β tubulina.	67
26. Organización genómica de pLew13 en las líneas clonales de <i>T. rangeli</i> [pLew13].	69
27. Análisis de plásmidos obtenidos de los clones <i>T. rangeli</i> Triat-1[pLew13] a través de transformación bacteriana.	70
28. Caracterización mediante análisis de restricción del ADN plasmídico aislado de los clones <i>T. rangeli</i> [pLew13].	71
29. Inmunodetección de la proteína ARNpT7 en controles y líneas clonales <i>T. rangeli</i> Triat-1[pLew13].	73
30. Clonamiento de la región α tubulina en pTcIndex-RFP; Primera estrategia	76
31. Clonamiento de la región α tubulina en pTcIndex-RFP, esquema de la segunda estrategia.	78
32. Caracterización de la dirección del gen alfa tubulina en los recombinantes pTrTriatalfaTub.	80
33. Caracterización de los sitios <i>Bam</i> HI y <i>Xba</i> I en pTcIndex-RFP.	82

TABLAS

1. Herramientas genéticas aplicadas en protozoarios tripanosomatideos	9
2. Registro de los resultados obtenidos en las experiencias de transfección de <i>T. rangeli</i> Triat-1 con los vectores de expresión pLew13 y pTrexn-GFP5.	51
3. Análisis comparativo de los patrones de restricción en el locus α - β tubulina en diferentes cepas de <i>T. rangeli</i> .	87

INDÍCE DE ABREVIATURAS

α tub	Gen de alfa tubulina
ADN	Ácido deoxiribonucleico
ADNg	ADN genómico
ADNp	ADN plasmídico
Amp ^R	Gen de resistencia a ampicilina
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNdc	ARN doble cadena
ARNi	ARN de interferencia
ARNm	ARN mensajero
ARNp	ARN polimerasa
ARNp I	ARN polimerasa I
ARNp II	ARN polimerasa II
ARNp III	ARN polimerasa III
ARNpT7	ARN polimerasa del bacteriófago T7
ARNr	ARN ribosomal
ARNsa	Ribonucleasa
ARNsi	ARN doble cadena de interferencia pequeños

β tub	Gen de beta tubulina
Ble	Gen de resistencia a bleomicina
D.O.	Densidad óptica
dNTP	Dideoxynucleotido
EDTA	Sal sódica de etilín dietil tetra acetato
GFP	Proteína de fluorescencia verde
kb	Kilo pares de bases
LB	Medio Luria Bernati
μ F	Microfaraday
μ g	Microgramos
μ M	micromolar
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetros
NPT	Gen de la Neomicin fosfotransferasa
nm	Nanómetros
pb	Pares de base
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RFP	Proteína de fluorescencia roja

SDS	Dodecíl sulfato de sodio
TAE	Tampón Tris-acetato EDTA
TE	Tampón Tris-HCl EDTA
OTetR	Región operadora de tetraciclina
TetR	Proteína represora de tetraciclina
V	Voltios
Zeo	Gen de resistencia a Zeocina
Ω	Ohmnios

RESUMEN

DETERMINACIÓN DE LA FACTIBILIDAD DEL SISTEMA ARN ANTISENTIDO COMO HERRAMIENTA DE ANÁLISIS GENÉTICO EN *Trypanosoma rangeli*, ACOPLADO AL SISTEMA DE EXPRESIÓN CONDICIONAL DE GENES ARN_{pT7/TetR}.

Los tripanosomátidos constituyen una familia de protozoos que incluye parásitos de importancia médica y veterinaria, entre los cuales se encuentran *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, y las diferentes especies de *Leishmania* causantes de diversos cuadros clínicos en humanos. Dentro de la familia del orden Kinetoplastida se encuentra *Trypanosoma rangeli*, parásito que infecta a humanos sin patologías asociadas a la infección en el hospedador vertebrado, el cual comparte con *T. cruzi* hospedadores vertebrados e invertebrados, reservorios y en consecuencia la distribución geográfica en el continente Americano. Ambos protozoarios han sido utilizados como modelos experimentales, para conocer y entender los distintos mecanismos que operan en los sistemas de interacción parásito-hospedador a nivel molecular. Para este abordaje molecular se han desarrollado herramientas genéticas, particularmente vectores de expresión específicos para tripanosomátidos, permitiendo generar el fondo genético necesario para la producción condicional de ARN antisentido y ARN de interferencia (ARNi) *in vivo*. Basados en el conocimiento existente de los sistemas inducibles en Tripanosomatideos y la efectividad de la metodología del ARNi y ARN antisentido para la inactivación funcional de genes en *T. brucei* y *Leishmania*, en el Laboratorio de Genética Molecular nos hemos planteado determinar la factibilidad del sistema ARN antisentido en *T. rangeli*, acoplado a un sistema de expresión condicional de genes utilizando los vectores pLew13 y pTcIndex. La estrategia de trabajo planteo la construcción de líneas estables de *T. rangeli* mediante la inserción de

pLew13 lineal en el genoma, mediada por recombinación homóloga de la región β tubulina presente en el vector. Contrario a lo esperado, el análisis del Southern blot determinó la ubicación episomal del vector pLew13 en los clones 1, 3 y 4, sin embargo el análisis por Western blot determinó la expresión estable del gen ARNpT7 en estas tres líneas.

La evaluación preliminar de la organización de la tanga α - β tubulina en *T. rangeli* demostró la existencia de un polimorfismo en el sitio *HindIII*, presente en el gen de α tubulina de la cepa venezolana Triat-1, similar al reportado por Esquenazi y colaboradores (1989) en un aislado venezolano, y ausente en una cepa del Amazonas, abriendo la posibilidad de utilizar este marcador para diferenciar los grupos poblacionales descritos en *T. rangeli* (Da Silva y col., 2007).

La evaluación del sistema ARN antisentido planteo el clonamiento dirigido del gen de α tubulina de *T. rangeli* sentido y antisentido en el vector pTcIndex-RFP, utilizando los sitios *XbaI* y *BamHI* y partiendo del aislamiento del gen de los recombinantes pTrTriatalfatub 3 y pTrTriatalfatub 4. La verificación de los sitios *XbaI* y *BamHI* en pTcIndex-RFP demostró la presencia de sitios únicos de corte en posiciones espaciadas por 1600 pb, impidiendo su utilización para este clonamiento.

En la actualidad planteamos el clonamiento dirigido del gen α tubulina en ambos sentidos en el vector pTcIndexI, utilizando los sitios *NotI/BamHI*. La transfección de pTcIndexatub en líneas *T. rangeli* Triat-1[pLew13], permitirá evaluar la presencia del sistema ARN antisentido en *T. rangeli*, permitiendo así la utilización de esta herramienta en el análisis genético mediante *Knock out* funcionales.

INTRODUCCIÓN

Los tripanosomátideos constituyen una familia de protozoos que incluye parásitos de importancia médica y veterinaria, entre los cuales se encuentran *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas; *Trypanosoma brucei*, agente etiológico de la enfermedad del sueño y las diferentes especies de *Leishmania* causantes de diversos cuadros clínicos que abarcan desde leishmaniasis cutánea hasta leishmaniasis visceral (Puerta, 2007). Dentro de esta familia del orden Kinetoplastida se encuentra *Trypanosoma rangeli*, parásito que infecta a humanos sin patologías asociadas a la infección en el hospedador vertebrado (D'Alessandro-Bacigalupo y Saravia, 1992). *T. rangeli* comparte con *T. cruzi* hospedadores vertebrados e invertebrados, reservorios y en consecuencia la distribución geográfica en el continente Americano, de allí la importancia del estudio conjunto de la biología de ambos protozoarios, para conocer y entender los distintos mecanismos que operan en sus sistemas de interacción parásito-hospedador a nivel molecular.

1.1 Ciclo de vida de *T. rangeli*: el ciclo de vida de *T. rangeli* en el hospedador vertebrado es poco conocido, lo contrario sucede en el hospedador invertebrado donde se ha descrito en detalle su desarrollo (Figura 1). El comportamiento de *T. rangeli* en el triatomino varía de acuerdo a la cepa (D'Alessandro-Bacigalupo y Saravia, 1992), sin embargo, el patrón de desarrollo en todos los casos permanece invariable. Por lo general, los tripomastigotes sanguíneos son ingeridos por el triatomino cuando se alimenta con sangre de vertebrados infectados. Al llegar al intestino medio los parásitos ingeridos (tripomastigotes sanguícolas) comienzan a dividirse transformándose en epimastigotes, los cuales se multiplican por fisión binaria. Algunos flagelados alcanzan el recto y son excretados con las heces, sin embargo, no colonizan la pared rectal como lo hace *T. cruzi*

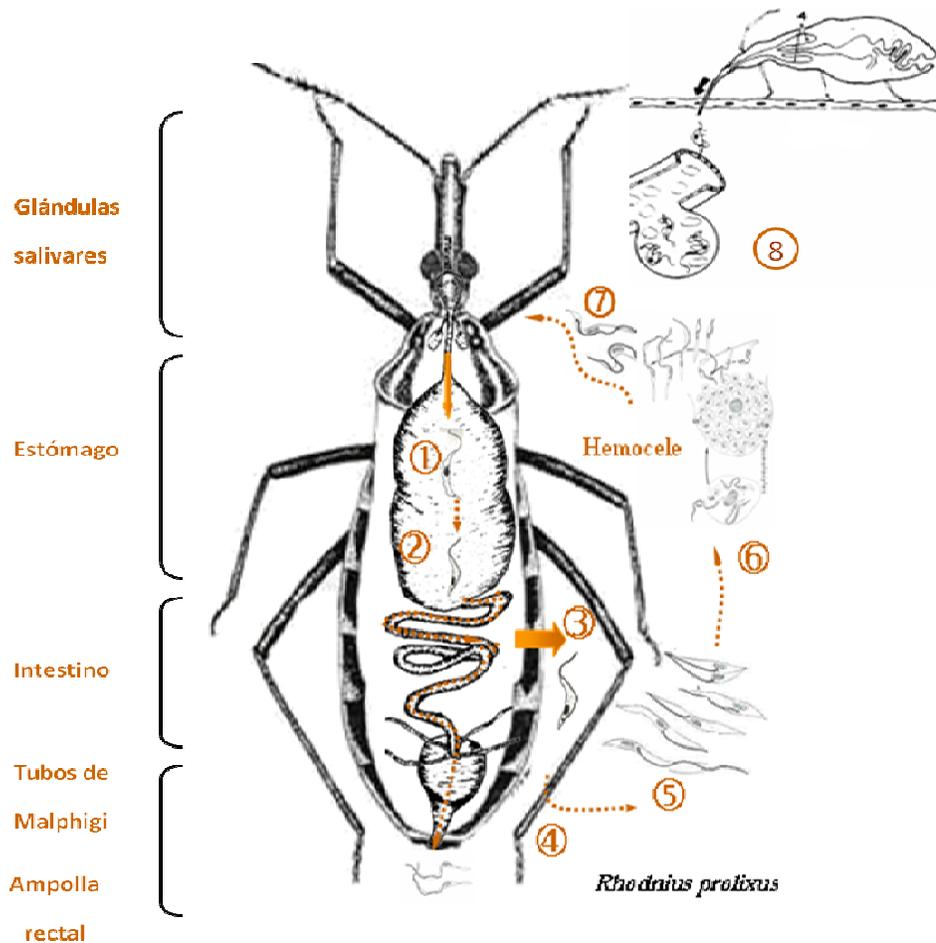


Figura 1.

Ciclo de vida de *Trypanosoma rangeli* en el insecto vector.

1. Los tripomastigotes sanguíneos son ingeridos junto con la sangre del vertebrado infectado. 2. Los tripomastigotes se diferencian a epimastigotes cortos y esferomastigotes en el intestino medio. 3. Invasión del hemocele a partir del intestino medio. 4. Formas epimastigotes y tripomastigotes cortos pueden ser detectadas en heces. 5. Multiplicación en la hemolinfa de epimastigotes. 6. Invasión y multiplicación de los epimastigotes y diferenciación a amastigotes en hemocitos. 7. Invasión de las glándulas salivales por la formas metacíclicas y epimastigotes cortos. 8. transmisión de formas tripomastigotes metacíclicos durante la picadura en un hospedero vertebrado (Tomado con modificaciones de Rodríguez-Mesa, 2005).

(Zeledón y Blanco, 1965). La invasión de la hemolinfa ocurre cuando unas pocas formas epimastigotes y tripomastigotes, predominantes en el intestino medio, penetran el epitelio intestinal y llegan al hemocele (D'Alessandro, 1963; Tobie, 1965). Una parte de esta

población invade hemocitos dentro de los cuales se dividen y diferencian a amastigotes, mientras la otra se multiplica en la hemolinfa. Los epimastigotes cortos que se generan invaden las glándulas salivares y llegan a los conductos colectores en donde se adhieren a una superficie glicosilada por medio de interacciones específicas receptor-ligando, gracias al reconocimiento de carbohidratos con residuos de N-acetil-glucosamina, manosa, N-acetil-galactosamina y fucosa (Basseri y col, 2002), donde inician su transición en tripomastigotes metacíclicos, la forma más infectiva del parásito. Los tripomastigotes metacíclicos se encuentran sólo en la hemolinfa y en las glándulas salivares del hemíptero, por lo que su transmisión al hospedero vertebrado es inoculativa durante la penetración de la probóscide del triatomino en la epidermis del mamífero, en busca de un capilar sanguíneo a partir del cual alimentarse (Pifano y Meyer, 1949). Esto representa una marcada diferencia biológica con *T. cruzi*, el cual invade exclusivamente el tracto intestinal, produciéndose las formas infectivas en el intestino posterior, las cuales son liberadas más tarde con las heces durante la picadura del insecto, producto del desplazamiento por el volumen de la ingesta de sangre, un proceso conocido como transmisión contaminativa. El conocimiento actual del desarrollo de *T. rangeli* en el vector invertebrado ha sido bien documentado (D'Alessandro, 1963) en poblaciones naturales y en experimentos de laboratorio, en contraste con el escaso conocimiento acerca de su ciclo de vida en los hospedadores vertebrados; donde los pocos reportes describen solo formas tripomastigotes sanguícolas, que no se dividen, y es aún controversial la existencia de una fase intracelular (Cuba, 1998).

1.2. Expresión génica en tripanosomatideos.

Los protozoarios flagelados del orden Kinetoplastida, familia Tripanosomatidae, exhiben dos fases en su ciclo de vida, alternado entre dos hospedadores: insecto y mamífero. Durante su ciclo de vida, en el parásito ocurren una serie de cambios complejos, los cuales son probablemente esenciales en la supervivencia y crecimiento del organismo. A nivel molecular, estos procesos están directamente relacionados con la regulación de la expresión

de un amplio rango de productos génicos implicados en la activación y represión de rutas metabólicas, así como la regulación del ciclo de división celular (Graham, 1995).

Las enzimas encargadas de la transcripción en estos parásitos son tres ARN polimerasas que también están presentes en otros eucariotas. La ARN polimerasa I, cuya función es la transcripción de los genes para el ARN ribosomal y los genes para las glicoproteínas de superficie en *T. brucei*; la ARN polimerasa II transcribe los genes que produce el ARN mensajero; y la ARN polimerasa III, dirigida a transcribir los genes de ARN de transferencia y los genes de ARN ribosomal 5S. En ausencia de promotores fácilmente identificables para la ARN polimerasa II, se ha propuesto que esta polimerasa puede iniciar la transcripción al azar en una extensión del ADN. Sin embargo, se han reportado algunos promotores para la ARNp II: en el locus de hsp70 de *T. brucei* (Graham, 1995), así como arreglos cromosómicos que sugieren ser regiones candidatas de promotores en *L. major* (Campbell y col, 2003).

En los protozoarios Kinetoplastidos, la transcripción de genes es policistronica. Esta condición influye en cuales son los niveles donde se regula la expresión de proteínas de estos organismos. La mayoría de los mecanismos de control de estos protozoarios son a nivel post transcripcional, afectando la estabilidad del ARNm a través de las interacciones de las proteínas unidas al ARN con los elementos en cis de la regiones no traducidas (UTRs) 5' y 3' del ARNm (Campbell y Sturm, 2007).

En el núcleo el ARN precursor sufre ataques nucleofílicos, que traen como consecuencia los procesos de maduración como lo son el trans-splicing y la poliadenilación (Graham, 1995). Durante el “trans-splicing” cada ARNm recibe en el extremo 5' una secuencia única de 39 nucleótidos (secuencia líder) del miniexón. La secuencia líder (SL) tiene en su extremo 5' un residuo de 7-metil Guanosina trifosfato (“cap”), cuya función es

estabilizar al ARNm. Esta reacción de *trans*-esterificación requiere de la presencia de un dinucleótido AG conservado en el extremo 3' de la región intergénica del pre-ARN, conocido como sitio de empalme ("*splice acceptor site*" o 3'SS), donde se lleva a cabo la adición de la secuencia líder (Da Rocha y col, 2004). La poliadenilación, es el mecanismo mediante el cual se añaden residuos de 200 adeninas (poli-A) al extremo 3' del ARNm (Graham, 1995), en una región específica caracterizada por presentar una secuencia rica en pirimidinas. La principal consecuencia que presenta este tipo de organización policistrónica en tripanosomatídeos, es la ausencia de la regulación de la expresión de genes de forma individual. La regulación no puede ocurrir al inicio de la transcripción debido a que todos los genes de la unidad se presume comparten la misma región promotora y, muy probablemente se transcriban al mismo tiempo; alternativamente se ha propuesto un mecanismo de regulación de la expresión a nivel post-transcripcional, implicando en este caso a los mecanismos de "*trans*-splicing" y poliadenilación. Bajo ciertas condiciones, algunas proteínas pueden interactuar con estas secuencias restringiéndose el procesamiento del transcrito primario, y por ende disminuyendo la eficiencia de traducción de los genes (Graham, 1995).

1.3. ¿Cómo abordar el estudio de los mecanismos moleculares de la interacción parásito/hospedador?

En la actualidad, un área de particular interés es el análisis funcional de genes involucrados en la síntesis de moléculas potencialmente implicadas en la virulencia y transmisión de algunos tripanosomatídeos (Beverly y col, 2002). Partiendo del conocimiento de la organización del genoma y de los mecanismos de regulación de la expresión de genes en tripanosomatídeos se han desarrollado diversas herramientas moleculares para el análisis genético enfocado desde la perspectiva de la genética "en reverso", alguna de las cuales son mencionadas en la tabla 1. Estos métodos constituyen poderosas herramientas genéticas que

permiten, a través de varias rutas y pruebas, la identificación de genes, sus productos y sus funciones en tripanosomatídeos, mediante el desarrollo de estrategias que implican el aumento o pérdida de su funcionalidad, así como también la localización de sus productos mediante el uso de etiquetas moleculares (Beverley, 2003).

El silenciamiento génico a través de la pérdida por delección o “*gene knock-out*”, es otra de las herramientas más comunes que permiten el análisis funcional de genes. Sin embargo, el principal obstáculo que se presenta está relacionado con la naturaleza asexual diploide o aneuploide en algunos casos, o la presencia de familias multigénicas, razón por la cual se encuentran dos o más copias de los genes en el genoma. En estos casos, para llevar a cabo el silenciamiento de un gen, se hace necesaria la disrupción de cada alelo de forma individual (Wang y col, 2000). Alternativamente, durante la última década se han desarrollado mecanismos de silenciamiento génico post-transcripcional, los cuales en comparación con los métodos tradicionales, han demostrado ser más simples y más rápidos en la interferencia selectiva con la expresión de genes en tripanosomatídeos, como son las técnicas de ARN interferencia (ARNi) y ARN antisentido, las cuales han sido las más aplicadas en el estudio de la biología de los Kinetoplastida (Beverley, 2003).

El ARNi es un mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional de tipo secuencia-específico (Figura 2) mediante el cual, moléculas de ARN doble cadena – producidas *in vitro* o *in vivo*- disparan la degradación de transcritos homólogos (Ullu y col, 2004). El mecanismo de silenciamiento génico por ARN antisentido, implica el uso de moléculas de ARN producidas *in vivo*, complementarias a secuencias específicas en el ARNm, las cuales tienen la capacidad de bloquear o inhibir de manera específica la síntesis de proteínas. Se ha postulado que la inhibición ocurre mediante la unión de la secuencia antisentido a la región no traducida 5' (5'untranslated región: 5'UTR) del ARNm maduro, bloqueando la interacción inicial entre el transcrito maduro y la sub-unidad 40S,

impidiéndose eventualmente el ensamblaje del ribosoma 80S (Giles, 2000). Alternativamente, se ha descrito un segundo mecanismo que implica la formación de ARNdc producto de la unión de la secuencia antisentido con una secuencia específica del ARNm. Este ARNdc sirve de sustrato para una enzima con actividad ribonucleasa (ARNasa H) capaz de degradar al transcrito maduro (Kernodle y col, 1997). Recientemente se ha sugerido que el mecanismo de acción del ARN antisentido puede ser el resultado de la inducción indirecta del mecanismo de ARNi (Liang y col, 2003). Zamore y col. (2000) y Liang y col. (2003), han reportado la producción de ARNsi en sistemas de silenciamiento génico que implican la síntesis *in vivo* de secuencias antisentido. Liang y colaboradores en el 2003, proponen que el silenciamiento génico por ARN antisentido puede estar mediado por el complejo RISC y por la enzima “*dicer*”, descritas en el mecanismo de ARNi.

Utilizando los vectores de expresión desarrollados en los tripanosomas y las especies de *leishmania*, se han logrado establecer sistemas de inducción, los cuales constituyen una herramienta útil para la expresión de genes a voluntad. Uno de los sistemas de inducción disponibles es aquel que utiliza a los vectores de expresión pLew13 (Wirtz y col, 1999) y pTcIndex-RFP (Taylor y Kelly, 2006). El vector pLew13 (Figura 3A) presenta el gen que codifica una ARN polimerasa, la ARNp del bacteriófago T7, y un gen que codifica para una proteína reguladora, siendo esta última el represor del operon tetraciclina (*TetR*). Además pLew13 presenta una región del gen de β tubulina de *T. brucei* (Wirtz y col, 1999) utilizada para la integración del vector al genoma por recombinación homóloga. El segundo vector de este sistema de inducción es el pTcIndex-RFP (Figura 3B), diseñado originalmente para *T. cruzi*, el cual presenta la región promotora para la ARNpT7, así como la región operadora para la unión de la proteína TetR, y un sitio múltiple de clonamiento donde se inserta el gen a ser inducido. Tanto la ARNpT7, como la proteína represora (TetR) codificadas en pLew13, son capaces de regular la expresión de los genes clonados en pTcIndex, dependiendo de la presencia o ausencia de tetraciclina en el medio. Cada uno de los genes del sistema

bacteriano presentes en pLew13 y pTcIndex-RFP, contienen secuencias intergénicas de genes en tripanosomas que garantizan el correcto procesamiento

Tabla1. Herramientas genéticas aplicadas en protozoarios tripanosomatideos

	<i>T. brucei</i>	<i>T. cruzi</i>	<i>Leishmania</i>	<i>T. rangeli</i>
Transfección temporal	+++	+	++	+ (***)
Transfección estable	+++	++	+++	+ (***)
Vectores de expresión:				
Episomales	+	++	+++	+ ⁽³⁾
Cromosómicos	+++	+	+++	ND
Regulados	+++	+++ (***)	+	ND
Marcadores:				
Positivo	6	3	8	ND
Negativo	1	1	2	ND
“Knock out” de genes	+++	++	+++	ND
Cruces sexuales	+	ND	-	ND
Clonamiento posicional	Posible	ND	-	ND
ARNi	+++	- ⁽²⁾	-	ND
Rescate funcional	+	ND	+++	ND
Mutagénesis por transposones	+	-	+++	ND
Tamaño del genoma (Mb)*	35	40	35	ND
Nº de Cromosomas	11 +mini-cromosomas	>30	~36	16-24 ⁽¹⁾

El símbolo “+” indica que la metodología ha sido establecida como herramienta molecular en el parásito; el número de símbolos “+” refleja una medida aproximada de cuan bien el método funciona en cada especie, mientras el símbolo “-“ indica que la metodología no funciona en el parásito. ND se refiere a que no se ha determinado dicha metodología al momento de la revisión. (Tomado con modificaciones de Beverly, 2003); (1) Toaldo y col, 2001; (2) Da Rocha y col, 2004; (3) Guevara y col, 2005; (***) Taylor y Kelly, 2006).*tamaño del genoma de las cepas utilizadas en el proyecto genoma.

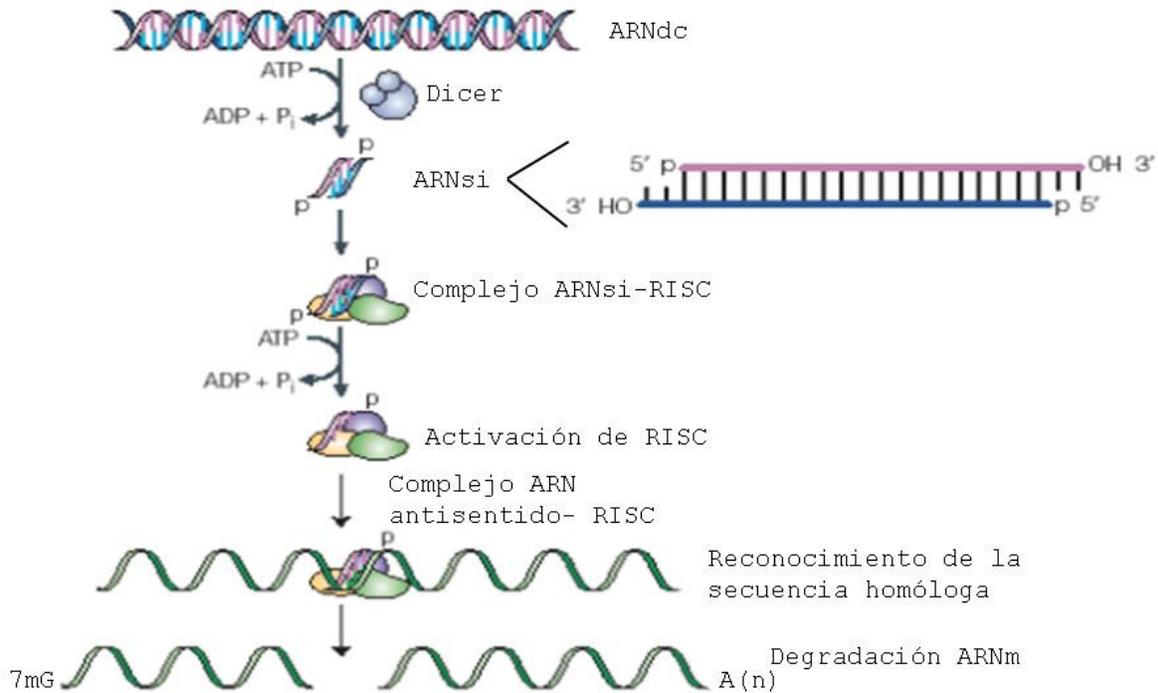


Figura 2.

Mecanismo del ARNi.

Las moléculas de ARNdc son digeridas por la enzima dicer, reacción dependiente de ATP, produciéndose moléculas de ARN doble cadena más pequeña (ARNsi) de 19 nucleótidos y extremos 3' no fosforilados, las cuales son incorporadas a un complejo proteico (complejo inductor de silenciamiento, conocido como RISC) en una reacción independiente de ATP, donde ocurre la separación de las dos cadenas complementarias manteniéndose unida solo la antisentido. Este nuevo complejo endonucleolítico será guiado hasta la secuencia homóloga en el ARNm donde ocurrirá la actividad endonucleolítica del ARN diana. (Tomado con modificaciones de Dikxhoorn y col, 2003).

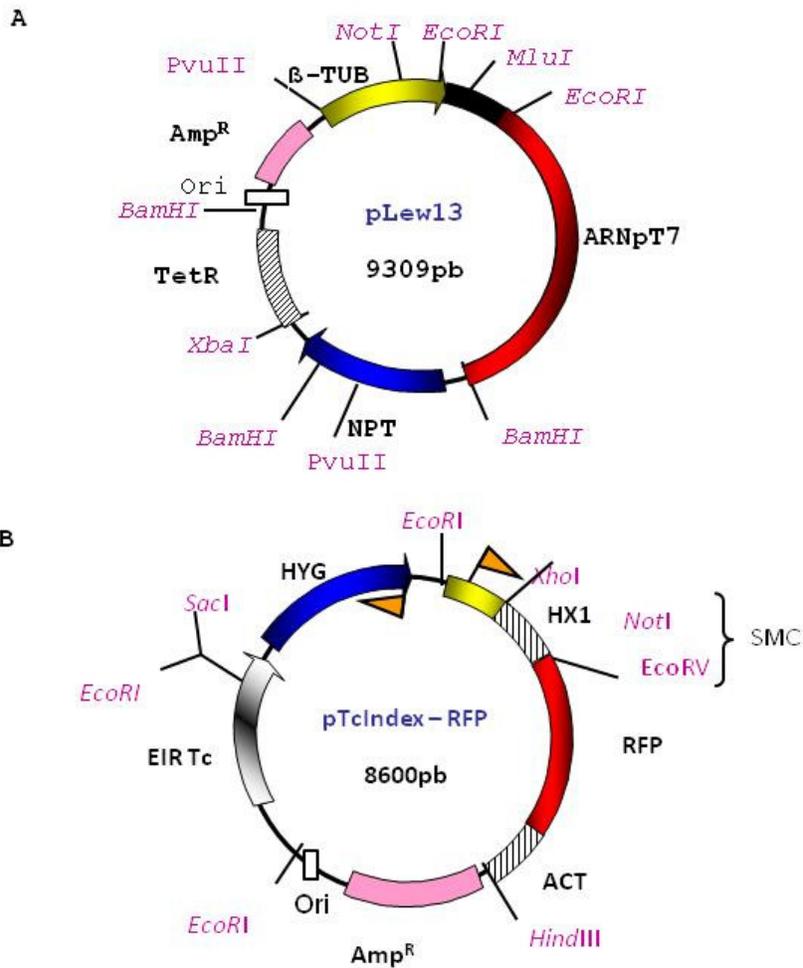


Figura 3.

Mapa físico de los vectores pLew13 y pTcIndex-RFP.

A) Mapa físico pLew13. Bloque rojo: gen de la *ARNpT7*; Bloque azul gen de la neomicina fosfotransferasa NPT; Bloque con líneas: gen de la proteína represora de tetraciclina (*TetR*); Bloque rosado: gen de resistencia a ampicilina de pUC19; Bloque amarillo: secuencia de β -tubulina de *T. brucei*. **B) Mapa físico de pTcIndex-RFP.** Bandera naranja (arriba): región promotora de la ARN polimerasa del bacteriofago T7 (*ARNpT7*); HX1: región intergénica de la proteína ribosomal de *Trypanosoma cruzi* P2 β H1.8; Bloque rojo: gen de la proteína de fluorescencia roja (*RFP*); *ACT*: región intergénica del gen de la actina de *T. cruzi*; Bloque rosado: gen de resistencia a ampicilina de pUC19. Bloque gris: Espaciador Intergénico Ribosomal (*EIR*) de *T. cruzi*. Bloque azul: gen de resistencia a higromicina; Bandera naranja (abajo): región terminadora de la transcripción de la *ARNpT7*. SMC sitio múltiple de clonamiento. Para ambos vectores en morado se señalan los sitios de restricción y el bloque blanco (*ORI*) representa el origen de replicación bacteriano.

(transplicing y poliadenilación) para su expresión en los Kinetoplastida (Taylor y Kelly, 2006).

Basados en el conocimiento existente de los sistemas inducibles en Tripanosomatideos y la efectividad de la metodología del ARNi y ARN antisentido para la inactivación funcional de genes en *T. brucei* y *Leishmania*, en el Laboratorio de Genética Molecular nos hemos propuesto desarrollar estrategias dirigidas a la adaptación del sistema inducible pLew13/pTcIndexI en *T. rangeli*, como un primer paso para demostrar la funcionalidad del ARN antisentido en esta especie de Tripanosoma Americano.

El objetivo último se enfoca en la inactivación genética de funciones específicas y la aplicación de estas herramientas para facilitar el abordaje molecular del estudio de los mecanismos de interacción parásito/hospedador. En nuestro caso utilizaremos la construcción de líneas transfectantes estables insertando a pLew13 en el genoma, seguido de la introducción de la construcción pTcIndexI- α tub; portando la secuencia antisentido del gen de α tubulina, con la finalidad de investigar si ocurre la inactivación de la expresión de α tubulina con un efecto en el fenotipo de las células, evidenciándose la existencia del mecanismo de ARN antisentido en *T. rangeli*.

ANTECEDENTES

La aplicación del ARN de interferencia o ARN antisentido, requieren de un sistema que permita la expresión inducida de los ARNs. Particularmente en el caso de genes esenciales se promueve la expresión de forma condicional de los ARN permitiendo funcionalmente silenciar al gen específico.

La evolución de los sistemas de expresión condicional en tripanosomatideos, va desde la importación de genes y elementos reguladores de origen procariota con la incorporación de genes reporteros que demuestran el principio del sistema una vez transfectados en los tripanosomatideos. A continuación se describen algunos antecedentes relacionados con los sistemas de expresión condicional y sistemas de ARN antisentido e interferencia aplicados a los kinetoplastideos.

En 1995 Wirtz y Clayton, crearon un sistema de vectores basado en la importación de elementos reguladores del operon de resistencia a tetraciclina de *Escherichia coli* y demostraron su funcionamiento en *Trypanosoma brucei*. El gen del represor de tetraciclina (*TetR*) codificado por el transposon Tn10 de *E. coli* fue clonado en el vector pHD360 y luego transfectado linealmente en *T. brucei*, mediante recombinación homóloga de una región del gen de β tubulina presente en el vector, se insertó en el locus de β tubulina del genoma del parásito (Figura 4A). Utilizaron como monitor del sistema inducible al gen de la luciferasa (*LUC*) expresado bajo el control del promotor endógeno de la proteína repetitiva ácida procíclica (PARP) reconocido por la ARNp I e insertado contiguo a la región operadora de la proteína TetR (OTetR). Todo este sistema fue clonado en una serie de vectores secundarios (pHD33, pHDtop1, pHDtop3 o pHDtop4), cada uno de los cuales varía en la posición de inserción de la región OTetR con respecto al sitio de inicio de la transcripción (Figura 4B). Con este sistema en *T. brucei* y en presencia de tetraciclina, se

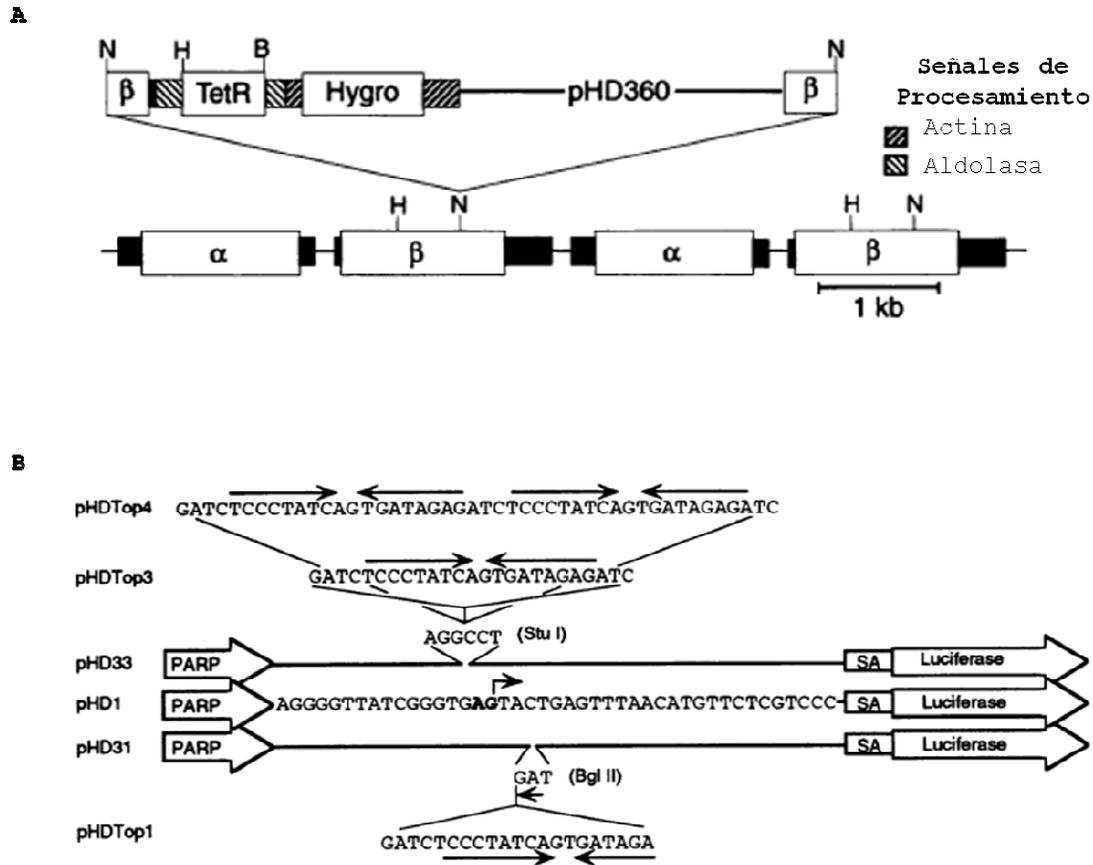


Figura 4.

Sistema de inducción del gen reportero Luciferasa utilizado por Wirtz y Clayton en 1995. A. Construcción y estrategia utilizada para la expresión estable de TetR en *T. brucei*. Se muestra el plásmido pHD360 alineado arriba del locus α - β tubulina de *T. brucei*. β : fragmento del gen de β tubulina de *T. brucei*. TetR: gen de la proteína represora de tetraciclina. Hygro: gen de resistencia a hygromicina. Se señalan los sitios de restricción en ambas construcciones para las enzimas *NotI* (N), *HindIII* (H), *BamHI* (B). **B. Inserción de la región operadora de represor de tetraciclina (OTetR) en la región promotora de la proteína repetitiva ácida procíclica (PARP).** Se muestran las construcciones de los plásmidos pHD33, pHDtop1, pHDtop3 y pHDtop4, con la inserción de la región OTetR en las posiciones -2 o +2 con respecto al sitio de inicio de la transcripción.

se logró inducir y detectar la actividad de la proteína luciferasa.

En 1999, Wirtz y colaboradores lograron mejorar este sistema inducible, al reemplazar la región promotora de PARP, por regiones promotoras del bacteriófago T7, con la finalidad de evitar la posible regulación endógena de la ARNp I del parásito, y así garantizar que la expresión de la proteína luciferasa que se encuentra en el vector de expresión condicional (pLew82), estuviese bajo el control de una región promotora de estricta regulación. En este sentido modificaron el sistema, construyendo los vectores pLew13 y pLew82, que contenían el gen de la polimerasa del bacteriófago T7 (ARNpT7), el gen de la *TetR*, e insertando el gen del Neomicin fosfotransferasa (*NPT*) o el gen de la Hygromicin fosfotrasnferasa (*HYG*) como marcadores selectivos, además de contener regiones de β tubulina de *T. brucei*, las cuales permitieron la inserción por recombinación homóloga en el locus del gen del protozoario (Figura 5). Con el sistema establecido en *T. brucei* se logró observar que la expresión basal del gen reportero sin inducción, no fue mayor a una molécula luminiscente por célula, lográndose 10^4 moléculas luminiscentes por célula durante la inducción. Este resultado demostró el alto grado de regulación del sistema.

A partir de los sistemas de expresión condicional de la ARNpT7/TetR diseñados originalmente para *T. brucei*, se han realizado modificaciones permitiendo su adaptación en otros miembros del orden Kinetoplastida. En el 2001 Yan y colaboradores, lograron adaptar un sistema inducible en *Leishmania donovani*, mediante la construcción de los vectores de expresión pTupactet y pRpactet, ambos vectores generaron el fondo genético necesario para la expresión condicional, el primero de ellos dirigido a la integración homóloga en el locus de α tubulina, y el segundo insertado en el locus del ADN ribosomal

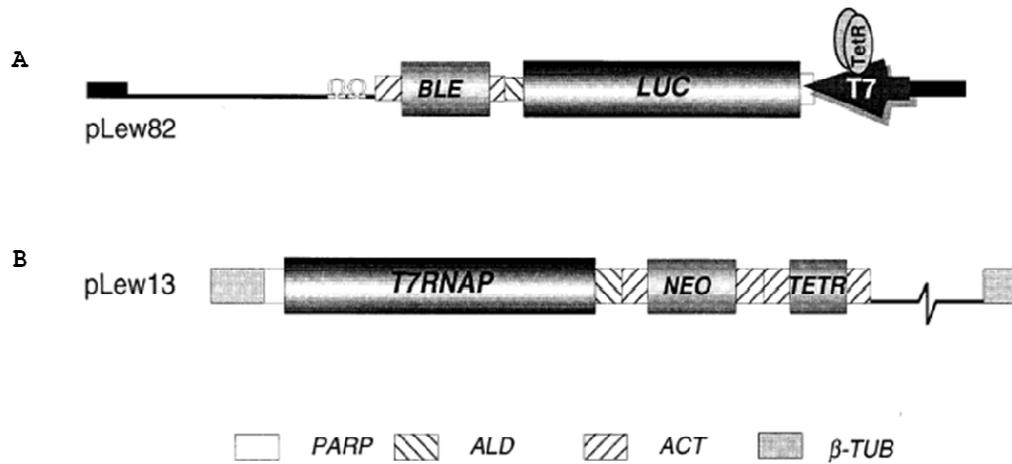


Figura 5.

Sistema inducible ARNpT7/TetR utilizado por Wirtz y colaboradores, 1999.

- A. Mapa físico del vector de expresión condicional pLew82.** Se muestra en la flecha con dirección a la izquierda promotor de la ARNpT7, seguido de la región OTetR TetR, el gen reportero Luc, y un gen de resistencia a Bleomicina (*Ble*). **B. Mapa físico del vector de expresión pLew13.** Se muestra las ubicaciones de los genes *ARNpT7*, *NEO* y *TetR*, así como las secuencias de β tubulina en los extremos del vector linealizado y las señales para la transcripción: aldolasa (ALD) y actina (ACT).

mediante la adición de secuencias específicas del espaciador intergénico ribosomal de este parásito (Figura 6). Los vectores de expresión condicional pTuBUC y pGTBUC (insertados en el locus de α tubulina y ribosomal respectivamente), portan el gen *Luc* bajo el control del promotor ribosomal regulado por dos copias de la región OTetR, localizado dos nucleótidos aguas arriba del sitio de iniciación de la transcripción, además estos vectores presentan el gen de resistencia a bleomicina (Figura 6). Estos sistema permitieron determinar que la expresión del gen luciferasa, fue distinta dependiendo de la ubicación del promotor ARN ribosomal (ARNr), siendo cuarenta veces mayor desde el contexto ribosomal con respecto al locus de α tubulina. También se determinó que la expresión del gen reportero fue ocho veces más en estos sistemas que en las construcciones que presentan el promotor PARP.

En otra especie del género leishmania; *L. tarantolae*, Kushnir y colaboradores (2005) expresaron la ARNpT7 y el TetR, al integrar cada uno de los genes en vectores separados en el ADN ribosomal, siendo estos vectores pF4T7pol.4sat#1 y pF4TR1.4hyg#1 respectivamente. Para completar este sistema se creó un plásmido con el promotor para la ARNpT7, seguido de la región OTetR, e incluido el gen reportero que codifica para la proteína fluorescente verde (GFP), este estuvo dirigido a la inserción en el locus de β tubulina. Estos vectores crearon el fondo genético para la inducción del gen reportero *GFP* en *Leishmania tarentolae*.

En el 2007 Yao y col, crearon la primera línea de *Leishmania chagasi* con un sistema inducible por tetraciclina regulado por la ARNpT7, en donde utilizaron tres vectores, el primero pTupactet conteniendo al gen *PAC* y *TetR*, el segundo pTuT7RpolHyg

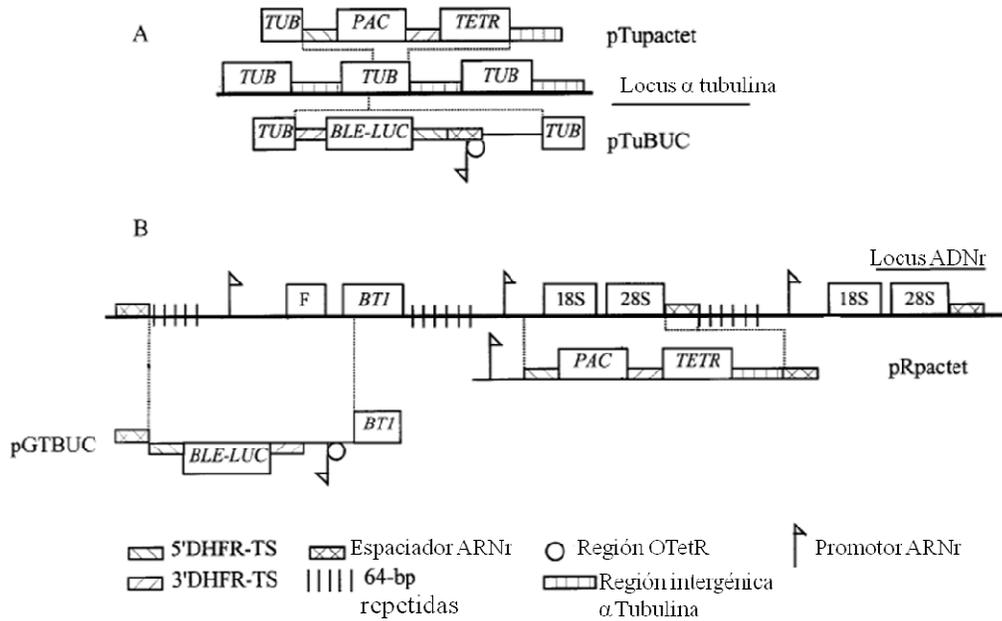


Figura 6.

Sistemas de expresión condicional desarrollados en el parásito *L. donovani* bajo el control del promotor ribosomal.

- A. Vectores de expresión dirigidos al locus de tubulina. B. vectores de expresión dirigidos a la integración en el espaciador intergénico ribosomal.** *TUB*. Gen de α tubulina de *L. donovani*. *PAC*: gen de resistencia a puromicina. *TetR*: gen para la proteína represora de tetraciclina. *BLE*: gen de resistencia a bleomicina. *LUC*: gen reportero luciferasa. **Bandera**: promotor para la ARNp I.

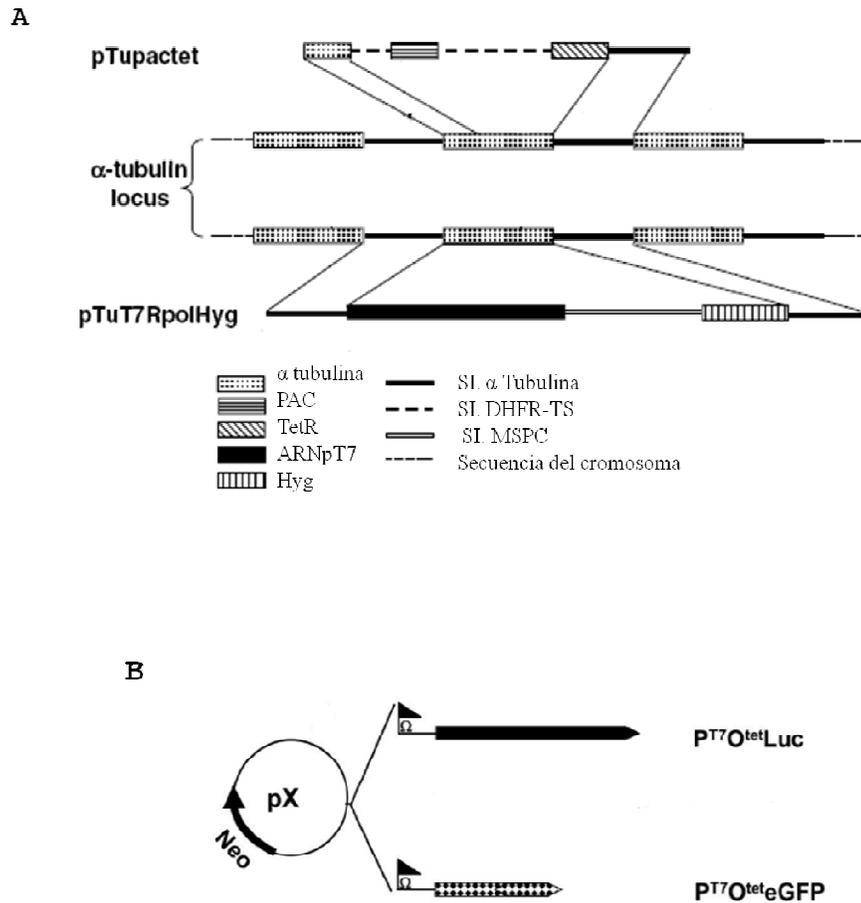


Figura 7.

Sistema inducible utilizado en *Leishmania chagasi* por Yao y colaboradores en el 2007.

A. Esquema de integración de los vectores pTupactet y pTuT7RpolHyg. Se muestra la integración de ambos vectores en el locus de α tubulina de *L. chagasi*. Abajo está representada la identificación de cada uno de los bloques que conforman el sistema. **α tubulina:** gen alfa tub de *L. chagasi*. **PAC:** gen de resistencia a puromicina. **TetR:** gen del represor de tetraciclina. **ARNpT7:** gen de la ARNpT7. **Hyg:** gen de resistencia a hygromicina. **SI:** secuencias intergénicas. **DHFR-TS:** dihidrofolato reductasa/timidilato sintetasa. **MSPC:** región intercodante de la proteasa de la superficie mayor. **B. esquema de los vectores PT7OtetGFP y PT7OtetLUC.** Se muestra la estructura de los vectores de expresión condicional transfectados episomalmente en *L. chagasi*.

conteniendo a la ARNpT7 y el gen *Hyg*, ambos fueron integrados al locus de α - β tubulina del genoma del parásito (Figura 7). El tercer vector PT7OteteGFP/LUC, el cual presenta el gen de resistencia *Neo*, fue transfectado de forma episomal, utilizando como genes reporteros a la *GFP* o *LUC*, bajo el control de la región OTetR para la ARNpT7, en este sistema se presento fuga de los genes reporteros, sin embargo con el sistema inducido la expresión de los genes *GFP* o *LUC* incremento 3 a 16 veces con respecto al sistema reprimido.

Los trabajos en *T. cruzi* se inician con Wen y colaboradores en el 2001, quienes reportaron la adaptación de dos sistemas inducibles, el primero de ellos utilizando los vectores pPATAN y prRNA-Tet-CAT, ambos dirigidos a la inserción en el ADNr (Figura 8A y 8B), el segundo sistema inducible empleado contempló el uso de los vectores prRNA-T7p-Zeo y pT7-Tet-Cat (Figura 8C y 8D). El primer sistema donde solo actúa la ARNp I presentó fugas de la expresión de la cloranfenicol acetyl transferasa (*CAT*) en las líneas no inducidas con tetraciclina, sin embargo al inducir con este antibiótico al sistema se obtuvo un incremento de aproximadamente 20 veces en la expresión de esta proteína con respecto a las líneas no inducidas. El segundo sistema inducible empleado en *T. cruzi* regulado por la ARNpT7 estableció, la estricta expresión de *CAT* solo cuando se inducía el sistema con tetraciclina, siendo 150 veces superior con respecto al primer sistema. Además los resultados de este trabajo revelaron la actividad prolongada de la ARNpT7, al reinducir el sistema una vez que se eliminó la tetraciclina del medio.

En el 2006 Taylor y Kelly, transfectaron secuencialmente en *T. cruzi* al vector de expresión pLew13 en forma episomal y a el vector pTcIndex-RFP para su integración al

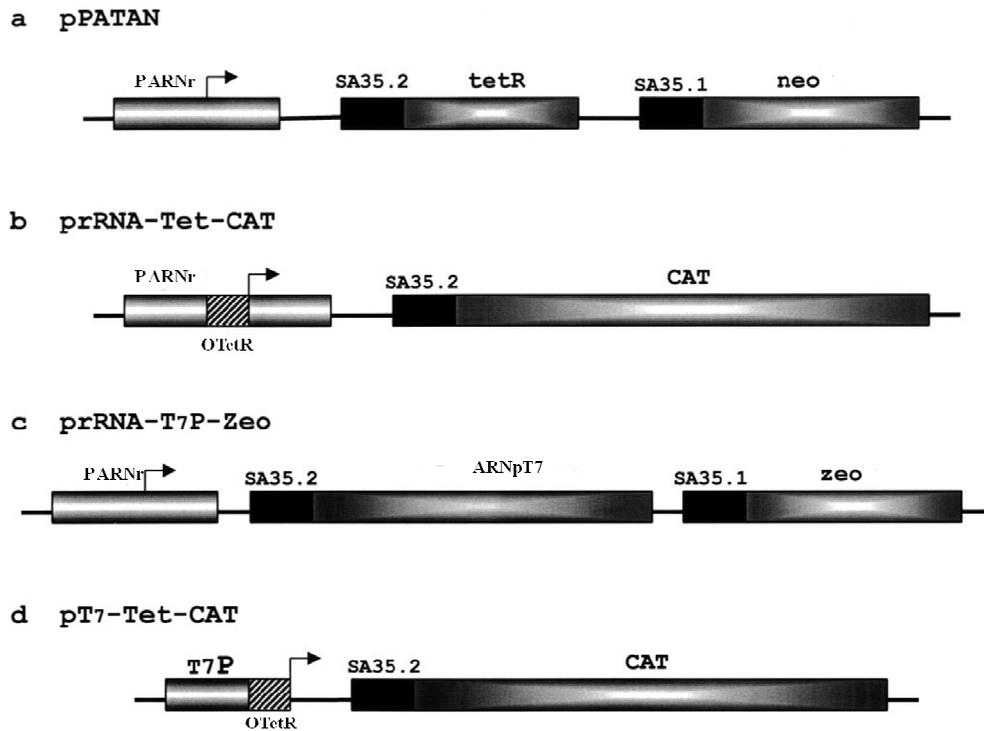


Figura 8.

Sistema de inducción empleado en *T. cruzi* utilizado por Wen y colaboradores en el 2001. A. Esquema de organización de pPATAN. B. Esquema de organización de prRNA-Tet-CAT. C. Esquema de organización de prRNA-T7p-Zeo. D. Esquema de organización de pT7-Tet-Cat. PARNr. Promotor para la ARNp I. **TetR.** Gen codificante de la proteína represora de tetraciclina. **NEO.** Gen de la Neomicin fosfotransferasa. **OTetR.** Región operadora de la proteína represora de tetraciclina **CAT.** Gen de la cloranfenicol acetyl transferasa. **ZEO.** Gen de resistencia a la Zeocina. **T7P.** Promotor de la ARNpT7.

genoma del parásito, específicamente en el espaciador intergénico ribosomal. Con esta estrategia solucionaron los inconvenientes de expresión temporal y de integración a regiones activas del genoma que complican al análisis funcional de los genes.

En el 2007 por primera vez se demostró la factibilidad del sistema de expresión condicional de genes mediado por tetraciclina en *T. rangeli* utilizando los vectores pLew13/pTcIndex-RFP originalmente diseñados para *T. cruzi* (Campelo, 2007). Ambos vectores fueron transfectados episomalmente y se detectó un 60% de expresión de la proteína de fluorescencia roja (RFP), transcurrida 72 horas una vez iniciada la inducción del sistema.

Desde su descubrimiento hace casi una década, los mecanismos de ARN antisentido y ARNi han venido evolucionado como herramientas moleculares determinantes en el estudio de la biología de los Kinetoplastida. Fire y Mello (1998), fueron los primeros investigadores en reportar y demostrar que la inyección de ARNdc sintetizado *in vitro* en las gónadas del nemátodo *Caenorhabditis elegans*, generaba un silenciamiento génico secuencia-específico y estable.

En el mismo año, Ngo y Tschudi reportaron que la electroporación de ARNdc en *T. brucei*, disparaba el silenciamiento génico de forma específica pero temporal, pues sólo se presentaba en un ciclo celular. Desde entonces el potencial de los mecanismos de ARN antisentido y ARNi en el análisis funcional de genes en Kinetoplastida se ha intensificado, lo cual ha impulsado el desarrollo de un gran número de vectores de expresión que poseen la capacidad de producir tanto ARN doble cadena, como ARN antisentido de forma estable.

A partir de estos vectores de expresión, con los cuales se han creado sistemas de expresión condicional, se han desarrollado tres estrategias básicas para la producción *in vivo* tanto de ARNdc como ARN antisentido en tripanosomatídeos. La primera de ellas (Figura 9A) implica el clonamiento de un fragmento del gen de interés entre dos regiones promotoras de la ARNpT7 orientadas en direcciones opuestas (Wang y col, 2000; Liang y

col, 2003; Alibu y col, 2005). La segunda (Figura 9B), se basa en la inducción de la expresión de una estructura de horquilla específica del gen a silenciar mediante el clonamiento de la secuencia de interés en ambas direcciones sentido y antisentido, separadas por una secuencia tipo “relleno” no traducida (“*stuffer*”), todas bajo el control de una región promotora única de la ARNpT7 (Wang y col., 2000). La tercera de las estrategias (Figura 9C) está dirigida a la producción de ARN antisentido por medio del clonamiento de un fragmento de la secuencia del gen de interés en dirección opuesta a la que se encuentra el gen selectivo, ambas secuencias bajo el control del promotor de la ARNpT7 y el OTetR que respondan a la concentración intracelular de tetraciclina (Liang y col, 2003).

En este trabajo propusimos ahondar en la aplicación del sistema inducible ARNpT7/TetR en *T. rangeli*, estabilizando los genes reguladores del sistema inducible *ARNpT7* y *TetR*, al insertar el vector pLew13 en el genoma. Planteamos evaluar la existencia del sistema de enzimas del mecanismo ARN antisentido, expresando una versión antisentido del gen α tubulina bajo el control del sistema ARNpT7/TetR en el vector pTcIndex-RFP.

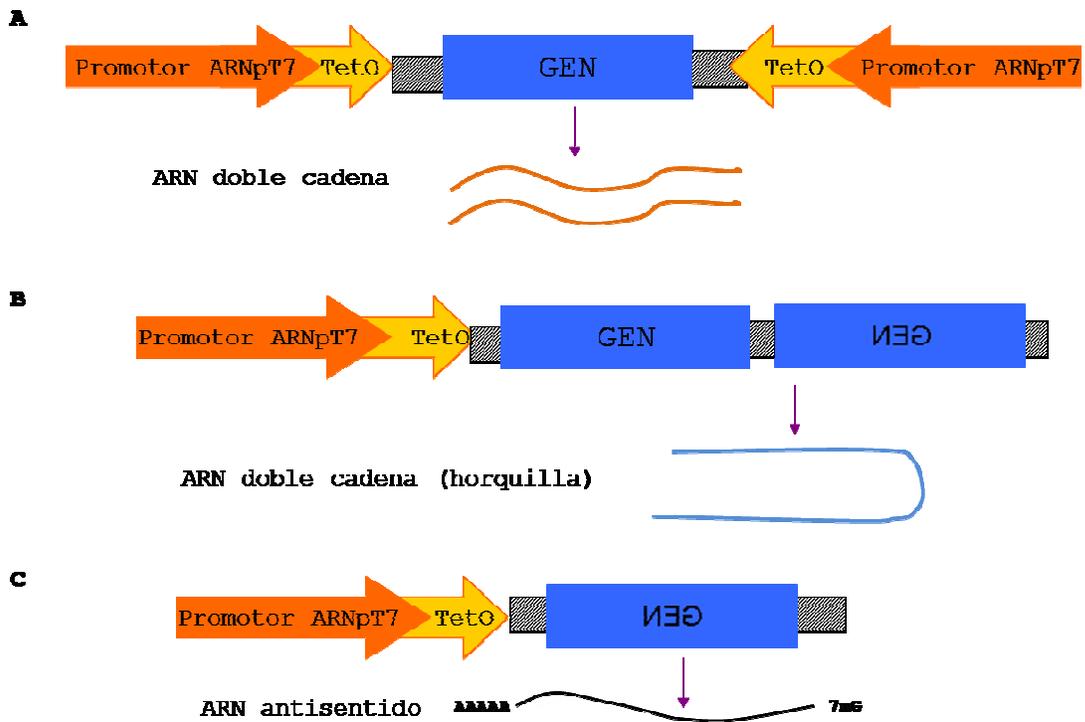


Figura 9.

Estrategias para la producción de ARNdc y ARN antisentido in vivo en tripanosomatideos. **A.** producción de ARNdc. **B.** Producción de ARNdc en horquilla. **C.** Producción de ARN antisentido. En la flecha naranja se señala el promotor para la ARNpT7, en la flecha amarilla se señala la región operadora (TetO) para la proteína represora de tetraciclina (TetR), en el bloque azul se señala el gen blanco para la producción de ARNdc y ARN antisentido. En bloques grises se muestran las regiones para el procesamiento de la transcripción.

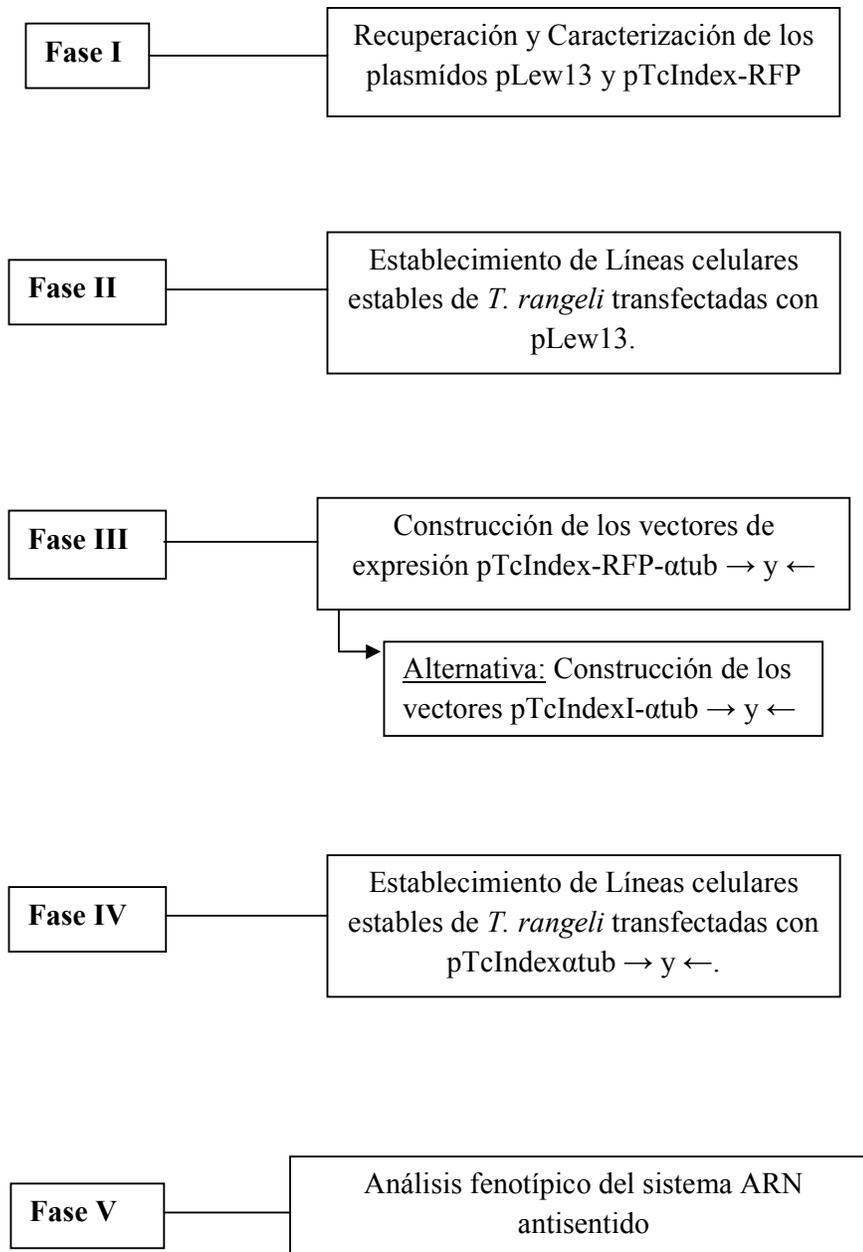
3.1 OBJETIVO GENERAL.

Investigar la factibilidad del sistema ARN antisentido para la inactivación funcional de genes en *Trypanosoma rangeli*, utilizando el gen de α tubulina acoplado al sistema de expresión condicional de genes ARNpT7/TetR.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- 3.2.1. Recuperar y caracterizar los vectores de expresión pLew13 y pTcIndex-RFP.
- 3.2.2. Obtener líneas celulares estables de *T. rangeli* expresando la ARNpT7, la proteína TetR y el gen de neomicina fosfotransferasa (*NPT*) desde el contexto cromosómico, a partir de la transfección del vector de expresión pLew13 lineal.
- 3.2.3. Caracterizar molecularmente la inserción de pLew13 en el genoma de *T. rangeli* en las líneas celulares estables.
- 3.2.4. Detectar la presencia de la proteína ARNpT7 en las líneas *T. rangeli* [pLew13].
- 3.2.5. Construir los vector de expresión pTcIndex- α tub \rightarrow y pTcIndex- α tub \leftarrow , (sentido y antisentido respectivamente).
- 3.2.6. Obtener mediante transfección las líneas celulares estables de *T. rangeli* [pLew13]-[pTcIndex- α tub \rightarrow] y [pLew13]-[pTcIndex- α tub \leftarrow].
- 3.2.7. Evaluar la funcionalidad del mecanismo de ARN antisentido mediante la expresión condicional del gen α tubulina \rightarrow/\leftarrow , en líneas celulares *T. rangeli* [pLew13]-[pTcIndex- α tub \rightarrow] y [pLew13]-[pTcIndex- α tub \leftarrow] inducidas con tetraciclina.

Esquema general de Metodología



4.1. Fase I: Recuperación y Caracterización de los plásmidos pLew13 y pTcIndex-RFP

4.1.1. Preparación de células competentes: para la preparación de las células químicamente competentes se utilizó el protocolo de Sambrook y col (1989), con algunas modificaciones. Se utilizó la cepa *DH10β* de *Escherichia coli* (Gibco-BRL): $F^- mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mrcBC) \phi80dlacZ\Delta M15 \Delta lacX74 deoR recA1 endA1 araD139 \Delta(ara, leu) 7697 galU galK \lambda rpsL nupG$. Partiendo de una colonia aislada se inocularon 2 mL de caldo LB, los cuales fueron incubados toda la noche a 37°C con agitación. Este precultivo se diluyó 1/5, con caldo LB fresco hasta un volumen de 10 mL, posteriormente se incubó por 1h a 37°C. Seguidamente, las células se recuperaron por centrifugación a 4000 g, a 4° C por 10 minutos. Este sedimento celular se lavó con solución salina estéril (NaCl 0,85%) dos veces, finalmente el sedimento celular se resuspendió en 10 mL de CaCl₂ 50 mM estéril a 4° C. La suspensión celular se incubó en hielo durante 1 hora. Las células fueron recuperadas por centrifugación a 4000 g por 10 minutos, y el sedimento se resuspendió en 500 μL de CaCl₂ 50 mM estéril a una temperatura de 4° C, concentrando las células 50X. Esta suspensión celular se utilizó inmediatamente para llevar a cabo la transformación.

4.1.2. Transformación de células competentes: se utilizó el protocolo descrito por Sambrook y col, en 1989 con algunas modificaciones. Cien microlitros de la suspensión de células competentes (sección 4.1.1), fueron mezcladas con aproximadamente 10 ng de ADN plasmídico contenido en un volumen no mayor a 10 μL. Esta mezcla fue incubada en hielo por 1 hora. Transcurrido este tiempo se aplicó un choque térmico a 45° C por 90 segundos. Inmediatamente las células fueron resuspendidas en 1 mL de LB e incubadas por 1 hora a 37°C con agitación. Las células fueron concentradas mediante centrifugación, y resuspendidas en 200 μL de LB, e inoculadas en dos placas de Agar LB suplementadas con el antibiótico selectivo (100 μL de cultivo en cada placa). Luego de una incubación de

12 a 18h a 37°C, se observó el crecimiento de las células transformantes las cuales fueron aisladas por agotamiento en placas de LB+antibiótico.

4.1.3. Aislamiento de ADN plasmídico mediante miniprep: Este protocolo fue tomado, de Sambrook y col, 1989. Partiendo de una colonia aislada del recombinante de interés se inocularon en 4 mL de caldo LB, los cuales fueron incubados por 18h a 37°C con agitación constante. Las células se recuperaron por centrifugación durante 2 minutos a 15000 g. El sedimento celular fue lavado dos veces con solución salina (NaCl 0,85%) estéril. Las células se resuspendieron en 100 µL de Solución de Lisis I (glucosa 50 mM; Tris-HCl pH 8,0; EDTA 10mM) y se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente se añadieron 200 µL de la Solución II (SDS 1%; NaOH 0,2 N) con la finalidad de lisar las células, la suspensión se mezcló por inversión e incubó en hielo por 10 minutos. Finalmente se añadieron 150 µL de la Solución de Lisis III (Acetato de Sodio 3 M; pH 5,2), y luego de mezclar se incubó la suspensión en hielo por 10 minutos. Luego de centrifugar a 15000 g por 10 minutos se recuperó el sobrenadante, al cual se le realizó una extracción con la mezcla CHCl₃: Fenol (1:1). Una vez recuperada la fase acuosa mediante centrifugación se le añadieron dos volúmenes de Etanol 99%, seguido de un incubación de 30 minutos a -20 °C. El ADN plasmídico fue recuperado por centrifugación a 15000 g por 15 minutos. El sedimento de ácidos nucleicos fue lavado con Etanol 70%, secado al vacío y finalmente resuspendido en un volumen no mayor a 50 µL de Tampón TE (Tris HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM).

4.1.4. Digestión de ADN plasmídico con enzimas de restricción: El ADN plasmídico fue digerido con enzimas de restricción, como parte de la caracterización y el análisis de los vectores de expresión y de los recombinantes obtenidos. Estas reacciones se llevaron a cabo bajo las condiciones recomendadas por las casas comerciales en cuanto a: concentración de la enzima por µg de ADN a digerir, concentración final del tampón, temperatura y tiempo de

incubación. Utilizando un volumen final de 20 μ L para digestiones no preparativas, y en el caso de digestiones preparativas el volumen final utilizado fue de 70 μ L.

4.1.5. Análisis de ADN mediante electroforesis en geles de agarosa: La integridad y la concentración del ADN aislado, así como el tamaño de los fragmentos de ADN producto de la digestión con enzimas de restricción, se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa. La escogencia de la concentración de agarosa utilizada se basó en el tamaño de los fragmentos a analizar. Inicialmente las muestras fueron cargadas en los bolsillos de los geles, luego de ser mezcladas con tampón de carga 6x (Azul de bromofenol 0,25%; cianol xileno 0,25%; Sacarosa 40%), se utilizó una relación muestra: tampón de 5:1. Las corridas electroforéticas se realizaron en tampón TAE 1X (Tris-acetato 40 mM; EDTA 1 mM pH 8,0) utilizando un voltaje no mayor a 5V/cm. Luego de la corrida, los geles fueron teñidos en Bromuro de Etidio (0,5mg/mL), y el ADN fue visualizado bajo luz Ultravioleta en un transiluminador acoplado a un sistema Gel-Doc 1000® (BioRad) a una longitud de onda de 302 nm. El registro de las imágenes se llevó a cabo con un sistema de digitalización de imágenes utilizando el programa de computación Quantity One® (BioRad).

4.1.6. Tratamiento con ARNsa: Para eliminar el ARN presente en la muestra, a las muestras de ADNp o ADNg se le añadió ARNsa A (10 mg/mL en Agua miliQ) a una concentración final de 100 μ g/mL.

4.1.7. Cuantificación por espectrofotometría: El protocolo fue tomado del Manual del laboratorio Identificación y Diagnóstico Molecular de Microorganismos (Guevara, 2007) con algunas modificaciones. Se realizó una dilución 1/50 de la muestra de ADN plasmídico aislado utilizando tampón TE. Se calibró a cero el espectrofotómetro con agua destilada autoclavada. Seguidamente se añadieron 2,5 μ L de la muestra de ADNp, y finalmente se registró el valor de la D.O. a 260 nm y 280 nm. Para el cálculo de la concentración se utilizó la siguiente relación: D.O._{260nm} igual a 1.0 equivale a 50 μ g/mL de ADN doble cadena (Sambrook y col, 1989).

4.2. Fase II: Establecimiento de líneas celulares estables de *T. rangeli* transfectadas con pLew13.

4.2.1. Mantenimiento de los cultivos de parásitos: el aislado venezolano de *T. rangeli* RHO/VE/98/TRIAT-1 *T. rangeli* triatomino, fue cultivado en medio bifásico NNN (cuya fase sólida consistió en agar sangre (DIFCO) suplementada con 15% de sangre de conejo desfibrinada; y una fase líquida compuesta de NaCl 0,1463%, KCl 0,045%, CaCl₂ 0,05% y NaHCO₃ 0,019% a pH 7,2) suplementada con 100 µg/mL de ampicilina, 40 µg de estreptomycin y 1000 u/mL de penicilina, e incubados a 28°C. Se realizó una curva de crecimiento para evaluar la dinámica de crecimiento de la cepa *T. rangeli* Triat-1, y para determinar el momento de la fase exponencial de estos parásitos en este medio.

4.2.2. Aislamiento de ADNg de *T. rangeli*: El ADN genómico de la cepa de *T. rangeli* Triat-1 fue aislado a partir de 5 mL de un cultivo de parásitos en fase exponencial. Las células fueron recolectadas por centrifugación a 4000 g por 10 minutos a temperatura ambiente. El sedimento celular se lavó 2 veces con solución salina (NaCl 0,85%). Posteriormente el sedimento celular fue resuspendido en 1 mL de Tampón de Lisis (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, NaCl 100 mM, SDS 0,5%, EDTA 1 mM), A esta suspensión celular se le añadió proteinasa K a una concentración final de 10 µg/mL y se incubó de 12 a 18 h a 37°C. La suspensión fue extraída dos veces con una mezcla Cloroformo: fenol 1:1, agitando suavemente hasta formar una emulsión, seguida de una centrifugación a 5000g durante 15 minutos a temperatura ambiente. La fase acuosa producto de la segunda centrifugación fue mezclada con 2,5 volúmenes de etanol 99%, e incubada durante 2 horas a -20°C, y luego la mezcla se centrifugó por 15 min a 10000 g a 10°C. El sedimento de ADN fue resuspendido en tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 8; EDTA 1 mM).

4.2.3. Tipificación de los aislados de *T. rangeli* mediante los ensayos de PCR p542 y clon6. Con la finalidad de determinar la identidad de las cepas utilizadas en este trabajo, se

realizaron ensayos de PCR especie-específicos capaces de discriminar entre *T. cruzi* y *T. rangeli*, las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador MJ RESEARCH modelo PTC-200.

PCR anclado sobre la secuencia repetitiva P542: el producto de este ensayo es de 450 pb provenientes de secuencias repetitivas en el genoma de *T. rangeli* (Vargas y col, 2000). Los oligonucleótidos que se emplearon en este ensayo son: **P542-R1** 5'-CGC GGC TCG CAC TGC ACC TC- 3'y **P542-R2** 5'-GGC GCA TCC ACC GAG CAC TG-3', a una concentración final de 1 µM; las condiciones de la reacción de amplificación fueron: 1.25 U de la enzima *Taq* polimerasa (Invitrogen); Tampón de la enzima 1X (Invitrogen); MgCl₂ 4 mM; dNTP's 0,2 mM y 20 ng de ADN genómico, en un volumen final de 25 µL. Los parámetros de ciclaje empleados fueron: un primer ciclo de desnaturalización a 94°C por 4 minutos, 29 ciclos de tres pasos c/u a 94°C por 1 minuto, 65°C por 1 minuto y 72°C por 1 minutos, un ciclo de extensión final de 75 °C por 5 minutos.

PCR anclado sobre las secuencias repetitivas dispersas, clon 6: el producto de este ensayo es de 325 pb proveniente de los elementos repetitivos localizados en el genoma de *T. cruzi* (Araya y col, 1997). Los oligonucleótidos a empleados fueron: **clon6 F** 5'- GAT GCG CAT TTG TTA CGA-3' y **clon6 R** 5'-CTG GCT GGC CTT GTA TCC-3', a una concentración final de 0,4 µM. Las condiciones de la mezcla de reacción fueron: 1,25 U de la enzima *Taq* polimerasa (Invitrogen); Tampón de la enzima 1X (Invitrogen); MgCl₂ 1,9 mM; dNTP's 100 µM y 20 ng de ADN geonómico, en un volumen final de 50 µL. Los parámetros de ciclaje fueron: un primer ciclo de desnaturalización a 95°C por 5 minutos, 10 ciclos de de tres pasos c/u: 95°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto, 25 ciclos de tres pasos: 94°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto, posteriormente 50°C por 1 minuto y un ciclo de extensión final de 72°C por 5 minutos.

4.2.4. Obtención de líneas transfectantes: Las experiencias de transfección de parásitos se realizaron siguiendo el protocolo de Hariran y colaboradores, 1993, con algunas

modificaciones. Partiendo de un cultivo de las formas epimastigotes de la cepa *T. rangeli* Triat-1 de *T. rangeli* en fase logarítmica de crecimiento (10^7 - 10^8 células/mL), se lavaron las células en solución salina estéril (NaCl 0,85%) dos veces y se resuspendieron en medio LIT sin hemina (triptosa 1,5%, infusión de Hígado 0,2%, extracto de levadura 0,5%, glucosa 0,4%, NaCl 0,9%, KCl 0,04%, Na_2HPO_4 0,75% a pH 7,4) y sin suero fetal bovino, a una concentración final de 10^9 células/mL. Un volumen de 350 μL de esta suspensión celular fue colocado en cubetas de electroporación BTX® de 2mm pre-incubadas en hielo por 10 minutos. Las células fueron mezcladas con 100 μg del ADN plasmídico contenidos en un volumen no mayor a 40 μL . La mezcla se incubó en hielo por 10 minutos para luego proceder a la electroporación utilizando el Gene Pulser II BioRad®, bajo las siguientes condiciones: 1 pulso simple de 300 V, 1000-1500 μF y 25-100 Ω de resistencia. Luego de la electroporación las células fueron incubadas 10 minutos en hielo y luego transferidas a viales con 5 mL de medio NNN sin antibiótico, e incubadas a 28°C por 48 horas. Pasado este tiempo, se añadió al cultivo el antibiótico G418 (Sigma) a una concentración final de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los cultivos fueron incubados de 7 a 10 días a 28°C. Cumplido este lapso los parásitos fueron transferidos a un medio de cultivo sin droga e incubados durante 7 a 10 días a 28°C, repitiéndose este ciclo de incubación alternado en presencia y ausencia de presión selectiva, hasta que se obtuvo poblaciones estables expresando el marcador de resistencia.

4.2.5. Clonamiento de líneas celulares: con el objetivo de obtener una población homogénea de *T. rangeli*[pLew13] se realizó la selección clonal partiendo de cultivos estables transfectados el vector pLew13. A partir de cultivos en fase logarítmica, se realizaron diluciones seriadas en placas de 24 pozos, desde 10^5 células/pozo hasta alcanzar una concentración aproximada de 1 célula por pozo en un volumen final de 1 mL. Estas placas fueron incubadas en una cámara húmeda estéril por dos semanas a 28°C. Para el clonamiento de la línea [pLew13] -[pTcIndexI- αtub ←] se procederá de forma similar.

4.2.6. Obtención y marcaje de sonda. La sonda utilizada corresponde al fragmento del gen de β tubulina de *T. brucei* presente en el plásmido pLew13, el cual fue obtenido mediante digestión con enzimas las enzimas de restricción *EcoRI* y *PvuII*, y una vez ubicado en un gel preparativo de agarosa al 1.5%, fue aislado mediante el método del papel DE81. Para ello se insertó un rectángulo de papel DE81 de aproximadamente 1 cm x 0,5 cm en el gel antes del fragmento de interés, de manera que al correr el gel en polaridad opuesta, el fragmento quedó retenido en el papel. Posteriormente se lavó el papel con 200 μ L de NaCl 0,1M y se recuperó el ADN con NaCl 1 M. El ADN fue precipitado añadiendo al eluato de 400 μ L, acetato de sodio a una concentración final de 0,08 M, 1 mL de etanol absoluto y glicógeno al 0,001%. La mezcla se incubó por 2 h a -20 °C, y transcurrido este tiempo se centrifugó por 15 minutos a 1200 g. Finalmente el ADN se resuspendió en un volumen no mayor a 50 μ L de TE. El marcaje de sonda se realizó por Random primer con el estuche comercial “DIG DNA labeling kit, Boehringer Mannheim”. La eficiencia de marcaje fue evaluada mediante el protocolo descrito en el Manual de Laboratorio (Guevara y col, 2007).

4.2.7. Southern blots. El ADN genómico de alto peso molecular de *T. rangeli* Triat-1 fue digerido con enzimas de restricción y separado mediante electroforesis en geles de agarosa. Estos perfiles de restricción fueron transferidos a membranas de nylon Hybond-plus (Amershan) (Sambrook y col, 1989). Las membranas se pre-hibridaron durante 3 horas a 37° C con solución de hibridación (Formamida 50%; SSC 5x; SDS 0,02%; N-Lauryl sarcosinato 0,01%; SDS 0,2% y agente bloqueante 1%). Las membranas se hibridaron a 37°C con rotación, durante toda la noche con la sonda marcada a una concentración de 10 ng/mL, en un *Micro Hybridization Incubator*, modelo 2000 (Robbins Scientific®). Posteriormente se realizaron 2 lavados sucesivos de 15 minutos cada uno a temperatura ambiente con una solución SSC 2X, SDS 0.1%, 4 lavados a 65° C con una solución SSC 1x, SDS 0.1% y 1 lavado a 65° C con una solución SSC 0.2X, SDS 0.1%. En las membranas hibridadas con la sonda marcada con digoxigenina, la detección se realizó con un anticuerpo anti-digoxigenina

conjugado a la enzima fosfatasa alcalina, de acuerdo a las especificaciones del estuche de detección del ADN marcado con digoxigenina (DIG DNA labeling detection kit, Boehringer Mannheim). Las membranas se expusieron a películas BIOMAX MS (Kodak) por un tiempo de 30 min a 3 h. Transcurrido este tiempo las películas fueron reveladas utilizando solución reveladora, agua y solución fijadora, y finalmente se observó el resultado.

4.2.8. Aislamiento de proteínas de *T. rangeli*. Este procedimiento se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Harlow y colaboradores (1989), con algunas modificaciones. A partir de 5 mL del cultivo en fase logarítmica (10^7 - 10^8 cel/mL), las células fueron recuperadas por centrifugación a 5000 g por 5 minutos. El sedimento celular se lavó dos veces con 1 mL de PBS 1X (NaCl 0,8%; KCl 0,02%; Na_2HPO_4 0,144%; KH_2PO_4 0,024%) utilizando las mismas condiciones de centrifugación. Este sedimento se resuspendió en 100 μL de Tampon de Carga de proteínas 6X (Tris-HCl 0,6M pH 8,7; SDS 12%; Glicerol 90%; 2- β -Mercaptoetanol 12%; Azul Bromofenol 0,6%), se mezcló por inversión y se incubó a 100°C por 5 minutos. El ADN genómico fue fragmentado mecánicamente pasando la muestra 5 veces por una jeringa de insulina, finalmente se añadió un coctel de inhibidores de proteasas a una concentración final de 1X (DTT, PMSF y Leupeptina). Las muestras fueron alicuotadas y almacenadas a -20°C.

4.2.9. Electroforesis de proteínas totales aisladas de poblaciones clonadas de *T. rangeli* [pLew13]. El análisis de las proteínas totales aisladas de las poblaciones clonales de *T. rangeli* [pLew13] se llevó a cabo mediante corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida al 12% bajo condiciones desnaturalizantes. De las muestras preparadas según la sección 4.2.8, 15 μL fueron cargadas en los bolsillos del gel de apilamiento al 5%, una vez mezcladas con 2 μL del tampón de carga 6X y calentadas a 100°C por 5 minutos. La corrida electroforética se realizó en tampón de corrida 1X (Tris 250 mM-SDS1%-Glicina1,92 M) a 150 V por aproximadamente 15 min y 200V por 1 hora a 4°C. Este procedimiento se realizó por duplicado, de esta manera uno de los geles fue teñido durante 15 minutos con solución

de Azul de Coomassie (Coomassie Blue Brilliant 0,25%; metanol 50%; Ácido acético glacial 10%), con la finalidad de observar las proteínas, y el segundo gel fue utilizado para transferir las proteínas a una membrana de nitrocelulosa.

4.2.10. Detección de la proteína ARNpT7 en poblaciones clonadas de *T. rangeli* [pLew13].

Previo a la detección mediante anticuerpos de la proteína ARNpT7 en las poblaciones clonadas de *T. rangeli* [pLew13], se realizó la transferencia de las proteínas separadas en el SDS-PAGE a membranas de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell), con un tamaño de poro 0,45 µm, utilizando la unidad de Trans-Blot del Mini-Protean[®] Tetra Cell (BioRad). La electrotransferencia se llevó a cabo en tampón 1X durante 2 horas a 200V y a 4°C. La eficiencia de transferencia se verificó por tinción de la membrana con una solución de Rojo Ponceau (0,5% 3-hidroxi-4-[2-sulfo-4(sulfofenilazo)fenilazo]-2,7-naftaleno ácido disulfónico, 1% ácido acético). Este tipo de coloración es reversible.

La membrana se incubó en solución de bloqueo (5% leche descremada en polvo en TBS-T 1X) por 1 hora en agitación constante a temperatura ambiente. Se descartó la solución de bloqueo y se incubó la membrana por 1 hora con el anti-ARNpT7 a la dilución 1:5000 en solución de bloqueo. Posteriormente se lavó la membrana 2 veces con TBS-T 1X por 10 min c/lavado. La membrana se incubó con el anticuerpo secundario por 1 hora a la una dilución 1:2000, en solución de bloqueo. Se lavó la membrana 2 veces con TBS-T 1x por 10 min c/lavado. La detección de la proteína se llevó a cabo con la adición del sustrato BICP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato) a una concentración de 30 mg/mL, en 10 mL del tampón de la fosfatasa alcalina (Tris-HCl 0,1 M pH 9,5; MgCl₂ 0,5 mM) durante 30 minutos.

4.3. Fase III: Construcción de los recombinantes de expresión pTcIndex- alfa tub sentido y antisentido.

Para realizar la construcción del vector de expresión con el gen de de alfa tubulina de *T. rangeli* Triat en sentido y antisentido, se procedió en primer lugar a la inserción de la secuencia alfa tub en el vector de expresión condicional pTcIndex-RFP. La estrategia y los pasos de este clonamiento se describen a continuación.

4.3.1. Aislamiento del gen de α tubulina: el gen de α tubulina se obtuvo mediante amplificación por PCR utilizando como templado a los recombinantes pTrTriatalfatub 3 y pTrTriatalfatub 4, conteniendo al gen de α tubulina proveniente de *T. rangeli* Triat-1. Los oligos utilizados fueron $\alpha 1$ (5'- AGT ACT CCT CGA CGT CCT CC-3') y $\alpha 2$ (5'-CAT GCG TGA GGC TAT CTG CA-3'), diseñados inicialmente para amplificar el gen de α tubulina de *L. amazonensis*, dando un producto de 1,4 kb. Las condiciones de la reacción de amplificación fueron las siguientes: oligos a una concentración final de 0,4 μ M; las condiciones: 1.25 U de la enzima *PFU* polimerasa (Fundaim) por reacción de 50 μ L; Tampón de la enzima 1X (fundaim); $MgCl_2$ 3 mM; dNTP's 0,3 mM y 20 ng de ADN genómico. Los parámetros de ciclaje empleados fueron: un primer ciclo de desnaturalización a 94°C por 4 minutos, 35 ciclos de tres pasos c/u a 94°C por 1 minuto, 54°C por 1 minuto y 72°C por 5 minutos, un ciclo de extensión final de 72 °C por 10 minutos. Una vez obtenido el fragmento de interés de 1,4 kb, se procedió al asilamiento del mismo por el método del papel DE81 descrito en el punto 4.2.6.

4.3.2. Fosforilación del fragmento α tubulina: para fosforilar los extremos 5' del inserto α tubulina, se utilizó la enzima T4 PNK (USB), siguiendo las especificaciones del fabricante. El ADN con la enzima se incubó por 1 hora a 37°C.

4.3.3. Defosforilación del vector: el vector pTcIndex-RFP previamente linearizado con la enzima *EcoRV*, se sometió a la defosforilación con la enzima Fosfatasa Alcalina de Camarón (Amersham), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial, brevemente para 1 μ g de vector linearizado se empleo 0,2 U de la enzima, para extremos romos la reacción fue de 1 hora a 37°C.

4.3.4. Reacción de ligamiento: se realizó en un volumen final de 10 μ L, con la enzima T4 DNA Ligasa (USB), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial, brevemente para extremos romos se utilizaron relación vector:inserto 1:5 a 1:10. Se añadió PEG (polietilenoglicol) a una concentración final de 5% y NaCl a 200 mM, con la finalidad de estimular la reacción de ligamiento, con una incubación de 16°C durante 16 horas.

En un segundo intento para insertar el gen de alfa tubulina en el vector pTcIndex-RFP, se dirigió el clonamiento al extremo C-terminal del gen reportero *RFP*, utilizando dos enzimas del sitio múltiple de clonamiento ubicado aguas abajo del este gen, las cuales fueron: *XbaI* y *BamHI*, ambas utilizados según las recomendaciones de cada una de las casas comerciales a las cuales pertenecen.

En un tercer intento para realizar el clonamiento dirigido, se utilizó a las enzimas *NotI* y *BamHI*, para linearizar al vector pTcIndexI y para obtener el fragmento de alfa tubulina de los recombinante pTrTriat alfa tub 3 y pTrTriat alfa tub 4.

RESULTADOS

5.1. Recuperación y caracterización de los vectores de expresión pLew13, pTcIndex-RFP y pTcIndexI.

Con el objetivo de caracterizar los vectores a utilizar en los ensayos propuestos en este trabajo, se procedió a realizar el análisis de los patrones de restricción de los plásmidos pLew13 y pTcIndex-RFP. La evolución del trabajo reveló la necesidad de incluir en esta caracterización al vector pTcIndexI. Para ello una vez aislado el ADN plasmídico de cada uno de los vectores, se sometió al ADN a la digestión con diferentes endonucleasas de restricción, ubicadas en los mapas físicos de cada uno de estos vectores (Figuras 10, 11 y 12, sección A).

Los patrones generados para pLew13, pTcIndex-RFP y pTcIndexI, se muestran en las figuras 10, 11 y 12, sección B. Para el vector pLew13 se utilizaron las enzimas *NotI* y, *BamHI*, la primera solo presenta un sitio de corte en el plásmido, con el cual se obtiene una única banda de 9,3 kb (Figura 10B, carril 3). La segunda enzima de restricción utilizada fue *BamHI*, quien reconoce tres sitios de corte, generando tres fragmentos, el primero de 1 kb correspondiente al gen de la proteína *TetR*; el segundo de 1,2 kb el cual contiene el gen de la *NPT*, y un tercer fragmento de 7,2 kb que corresponde al resto del vector (Figura 10B, carril 4).

Para el caso del vector de expresión condicional pTcIndex-RFP, se utilizaron las enzimas *NotI* y *EcoRI*. La primera enzima tiene un solo sitio de corte en este vector, y generó una única banda de 8,6 kb correspondiente al tamaño total del plásmido (Figura 11B, carril 3). La segunda enzima utilizada para esta caracterización fue *EcoRI*, la cual generó tres fragmentos, uno de 1,9 kb que contiene al gen de resistencia a higromicina (*HYG*), un segundo fragmento de 2,1 kb correspondiente al espaciador intergénico ribosomal de *T.*

cruzi, y un último fragmento de 4,6 kb que corresponde al resto del plásmido (Figura 11B, carril 4).

Al realizar la caracterización del vector pTcIndexI, se obtuvo una única banda de 8,4 kb al digerir con la enzima *BamHI* (Figura 12B, carril 3). La digestión del vector con la segunda enzima de restricción *SacI*, generó tres bandas (figura 12B, carril 4), la primera de con un tamaño de 2,1 kb que contiene al espaciador intergénico ribosomal de *T. cruzi*, una segunda banda de 6,3 kb que corresponde al resto del plásmido y una banda de 8,3 kb que representa al vector linearizado, lo que indica que hubo una digestión incompleta.

Con estos resultados finalizó la primera fase de la metodología planteada, verificando que los vectores aislados corresponden con los vectores de expresión (pLew13), y vectores de expresión condicional (pTcIndexRFP y pTcIndexI) obtenidos en estado preparativo para ser utilizados en las fases posteriores.

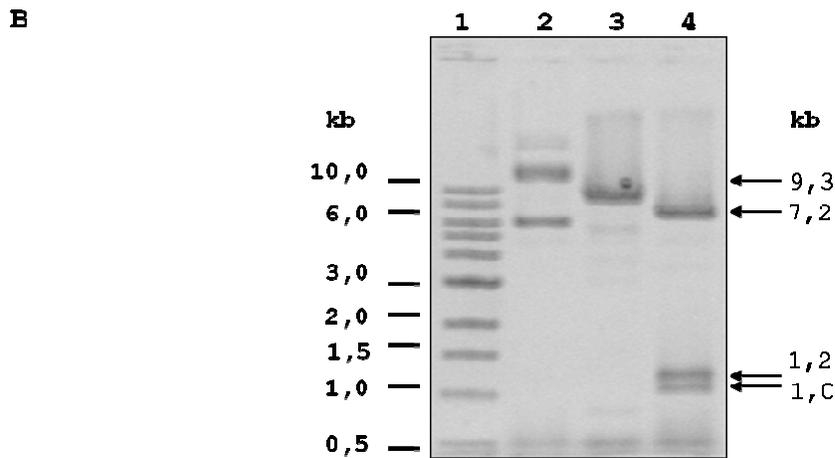
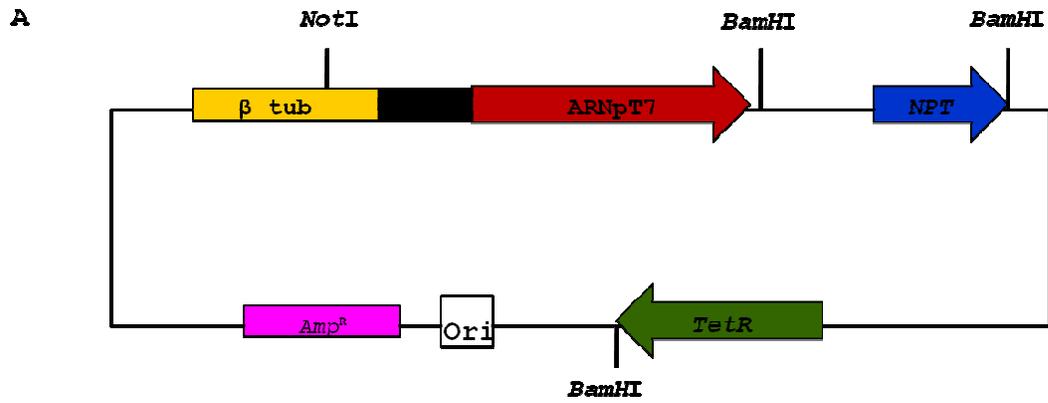


Figura 10.
Análisis de los patrones de restricción del vector pLew13.

A. Mapa físico de pLew13. Flecha rojo: gen de la *ARNpT7*; Flecha azul gen de la neomicin fosfotransferasa *NPT*; Flecha verde: gen de la proteína represora de tetraciclina (*TetR*); Bloque rosado: gen de resistencia a ampicilina proveniente de pUC19; Bloque amarillo: secuencia de β -tubulina de *T. brucei*. En el mapa se indica los sitios de restricción utilizados para el análisis. **B. Patrones de restricción del ADN plasmídico aislado de las células transformantes con pLew13.** Electroforesis en gel de agarosa 0,8% en TAE 1X, de las digestiones de pLew13. **Carril 1:** Marcador de tamaño molecular, escalera 1 kb (Biolabs). **Carril 2:** pLew13 sin digerir. **Carril 3:** pLew13 digerido con la enzima *NotI*. **Carril 4:** pLew13 digerido con la enzima *BamHI*. Las flechas a la derecha indican el tamaño molecular en kb de las bandas generadas al caracterizar a pLew13.

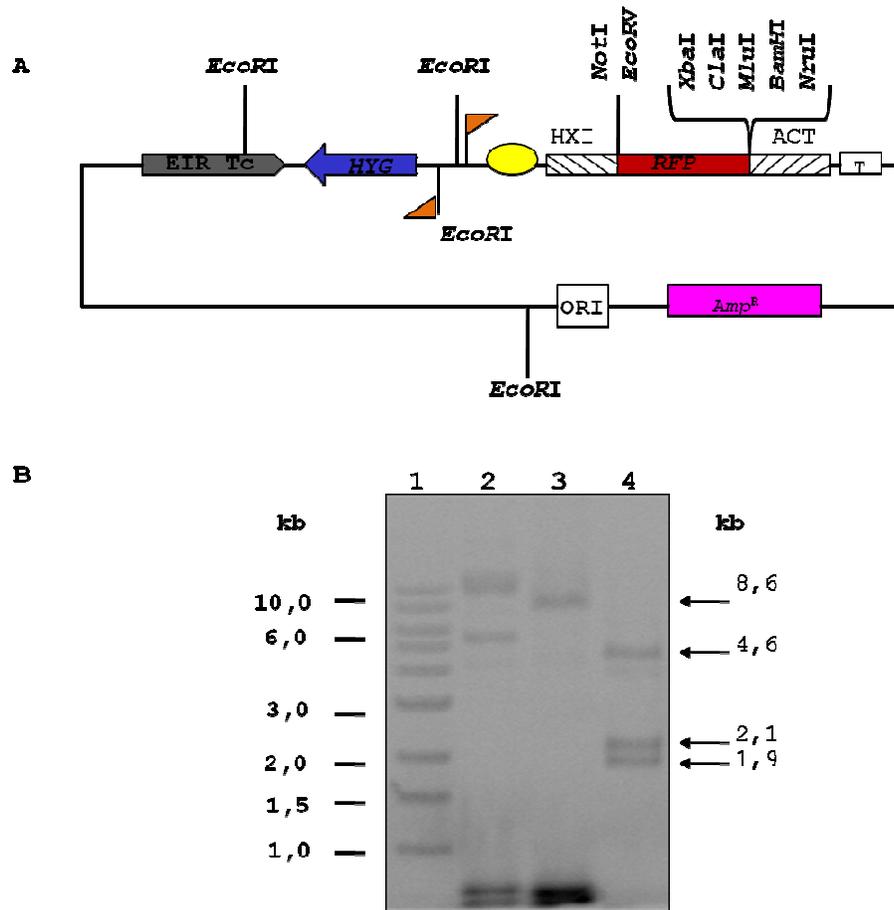


Figura 11.

Análisis de los patrones de restricción del vector pTcIndex-RFP.

A. Mapa Físico de pTcIndex-RFP. Bandera naranja: región promotora de la ARN polimerasa del bacteriofago T7 (ARNpT7); HX1: región intergénica de la proteína ribosomal de *T. cruzi* P2β H1.8; Bloque rojo: gen de la proteína de fluorescencia roja (*RFP*); *ACT*: región intergénica del gen de la actina de *T. cruzi*; Bloque rosado: gen de resistencia a ampicilina de pUC19. Bloque gris: Espaciador Intergénico Ribosomal (EIR) de *T. cruzi*. Flecha azul: gen de resistencia a higromicina (*HYG*); En el mapa se indican los sitios de corte de las enzimas utilizadas para el análisis de restricción y las enzimas en el sitio múltiple de clonamiento están en la llave. **B. Patrones de restricción del ADN plasmídico aislado de las células transformantes con pTcIndex-RFP.** Electroforesis en gel de agarosa 0,8% en TAE 1X. **Carril 1:** Marcador de tamaño molecular, escalera 1 kb (Biolabs). **Carril 2:** pTcIndex-RFP sin digerir. **Carril 3:** pTcIndex-RFP digerido con la enzima *NotI*. **Carril 4:** pTcIndex-RFP digerido con la enzima *EcoRI*. Las flechas a la derecha indican el tamaño molecular en kb de las bandas generadas al caracterizar a pTcIndex-RFP.

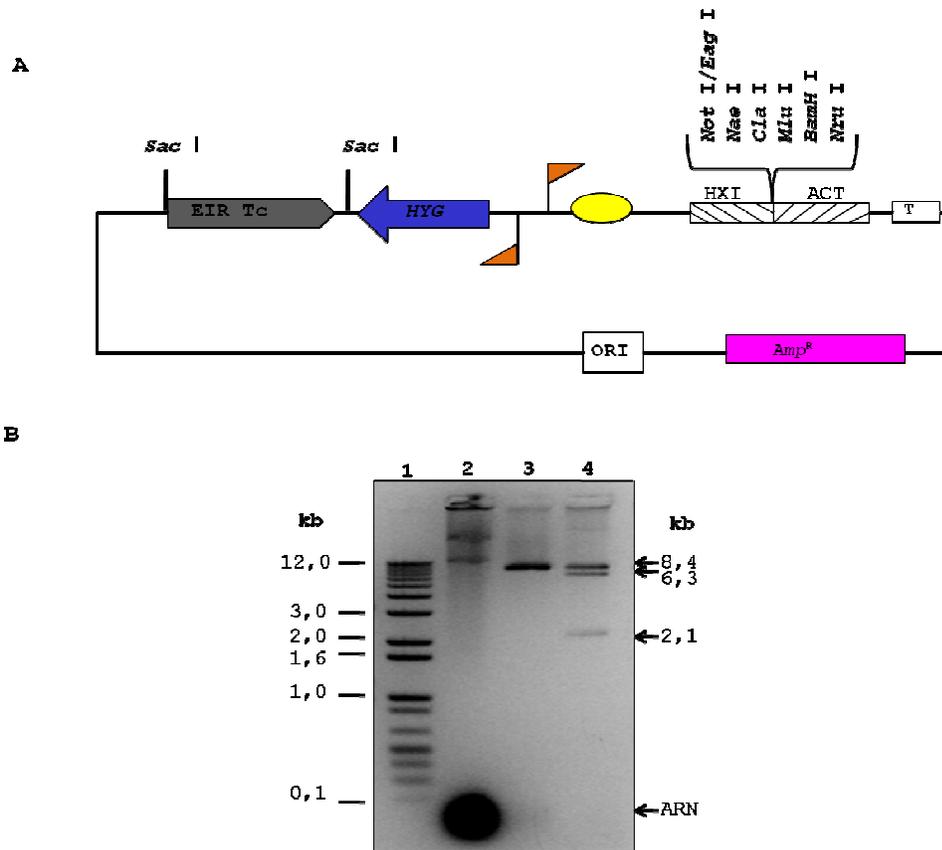


Figura 12.

Análisis de los patrones de restricción del vector pTcIndexI.

A. Mapa Físico de pTcIndex-I. Bandera naranja: región promotora de la ARN polimerasa del bacteriofago T7 (ARNpT7); HX1: región intergénica de la proteína ribosomal de *T. cruzi* P2β H1.8; ACT: región intergénica del gen de la actina de *T. cruzi*; Bloque rosado: gen de resistencia a ampicilina de pUC19. Bloque gris: Espaciador Intergénico Ribosomal (EIR) de *T. cruzi*. Flecha azul: gen de resistencia a higromicina (*HYG*); En el mapa se indican los sitios de corte de las enzimas utilizadas para el análisis de restricción y las enzimas del sitio múltiple de clonamiento se indican en la llave. **B. Patrones de restricción del ADN plasmídico aislado de las células transformantes con pTcIndex-I.** Electroforesis en gel de agarosa 0,8% en TAE 1X. **Carril 1:** Marcador de tamaño molecular, escala 1 kb (Biolabs). **Carril 2:** pTcIndexI sin digerir. **Carril 3:** pTcIndexI digerido con la enzima *BamHI*. **Carril 4:** pTcIndexI digerido con la enzima *SacI*. Las flechas a la derecha indican el tamaño molecular en kb de las bandas generadas al caracterizar a pTcIndexI.

5.2. Obtención de líneas celulares estables de *T. rangeli* expresando la ARNpT7, la proteína TetR y el gen *NPT* desde el contexto cromosómico, a partir de la transfección del vector de expresión pLew13 lineal.

5.2.1. Tipificación de la cepa *T. rangeli* Triat-1.

Previo a la transfección de la cepa *T. rangeli* Triat-1 con el vector de expresión pLew13, se corroboró su identidad mediante dos ensayos de PCR: el primero denominado P542 (Vargas y col, 2000), el cual amplifica de forma especie específica secuencias repetidas en el genoma de la especie *T. rangeli*. El segundo PCR denominado Clon6 (Araya y col, 1997), amplifica de forma especie específica elementos repetitivos del genoma de *T. cruzi*. En la figura 13 se muestra los resultados obtenidos en ambos ensayos. En el caso de P542 se observa la banda de 450 pb, generada solo en el ADNg control de *T. rangeli* Triatomino utilizado como control (carril 3), así como en el ADNg de las muestras evaluadas provenientes de los cultivos de Triat-1 (carriles 4 al 7). El control negativo del ADNg de la cepa *T. cruzi* YBM no mostró amplificación (carril 2). En el caso de la prueba específica para la especie *T. cruzi* Clon6, solo se obtuvo un amplicón de 325 pb en el ADNg de cepa *T. cruzi* YBM (carril 10), con resultados negativos para el ADNg de *T. rangeli* Triat-1 (carril 10), y con el ADNg de las muestras evaluadas (carriles 12 al 15).

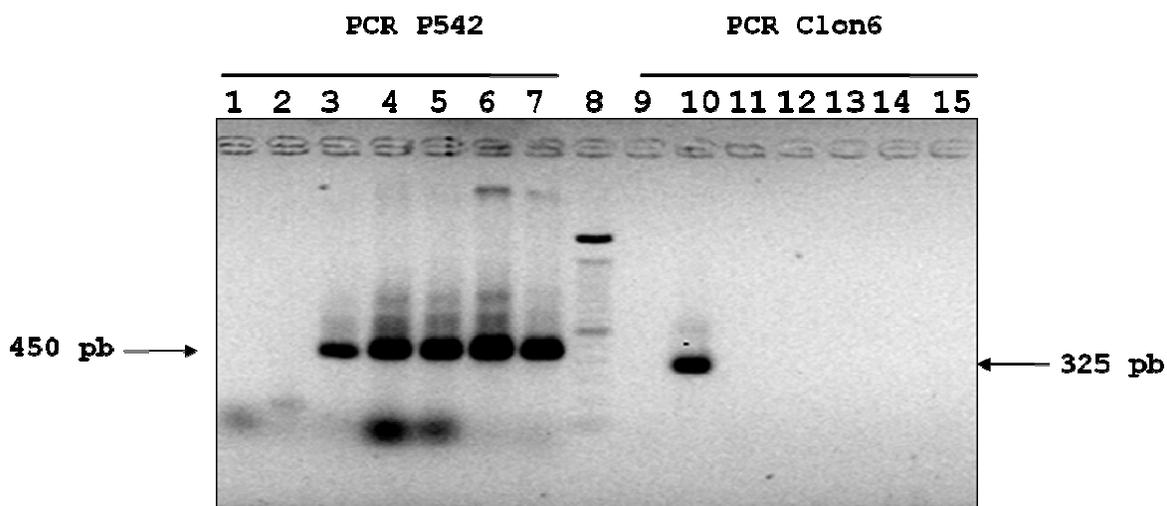


Figura 13.

Tipificación especie específica de los cultivos de *T. rangeli* Triat-1 mediante ensayos de PCR.

Corrida electroforética de amplicones, producto de la evaluación de muestras de ADN extraído de los cultivos de la cepa Triat-1 con los ensayos PCR P542 y PCR Clon6. Electroforesis en gel de agarosa 2% en TAE 1X.

Las muestras de los carriles del 1 al 7 corresponden al ensayo PCR P542, y las muestras en los carriles del 9 al 15 corresponden al ensayo PCR Clon6. Las flechas indican el tamaño de los amplicones, a la izquierda 450 pb del amplicon PCR P542 de *T. rangeli* y a la derecha 325 pb del amplicon del PCR Clon6 de *T. cruzi*.

Carril 1 y 9. Control negativo de reactivos (H₂O MiliQ). **Carril 2 y 10.** Control ADNg de *T. cruzi* cepa YBM. **Carril 3 y 11.** Control ADNg *T. rangeli* cepa Triat-1. **Carriles 4-7 y 12-15.** ADNg *T. rangeli* cepa Triat-1 cultivadas en este trabajo. **Carril 8.** Marcador de tamaño molecular, escalera 100 pb.

5.2.2. Preparación del vector pLew13.

Un segundo paso previo a la transfección de *T. rangeli* Triat-1, fue la linearización, mediante la digestión completa y preparativa del vector de expresión pLew13 con la enzima

NotI (Mapa de pLew13 en la Figura 10A). La figura 14 muestra el resultado de la digestión preparativa de pLew13, en el carril 3 se observa la banda de 9,3 kb, correspondiente al vector linearizado.

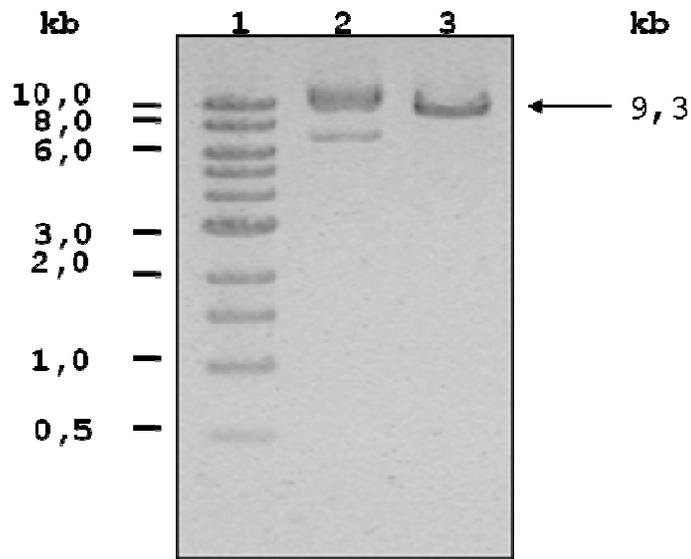


Figura 14.

Análisis de la digestión preparativa de pLew13 con la enzima *NotI*. Electroforesis en gel de Agarosa 0,8% en TAE 1X, digestión pLew13 con *NotI*. Carril 1. Marcador de tamaño molecular, escalera 1 kb (Biolabs). Carril 2. plew13 control negativo (sin digerir). Carril 3. pLew13 digerido con la enzima *NotI*. La flecha a la derecha indica el tamaño molecular en kb del vector pLew13 linearizado.

5.2.3. Obtención de líneas estables *T. rangeli* Triat-1[pLew13]

Finalizada la tipificación de el aislado *T. rangeli* Triat-1, así como la preparación del vector pLew13 lineal, se procedió a la transfección de la cepa *T. rangeli* Triat-1. Una vez concentrados los cultivos de epimastigotes en fase logarítmica en una suspensión de 10^9 cel/mL, se transfectaron cuatro réplicas con el vector pLew13 linearizado, dos réplicas

controles de electroporación con el plásmido pTrexn-GFP5 (Guevara y col, 2005), y dos replicas sin plásmido para el control de viabilidad. Las células transfectadas se mantuvieron en medio bifásico agar sangre-NNN por 48 horas, posterior a ello se le agregó el antibiótico selectivo G418 a una concentración de 500 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a los cultivos transfectados con pLew13 y pTrexn-GFP5. Las células pasaron por ciclos alternos de 10 días de incubación, en presencia y ausencia de presión selectiva, hasta obtener líneas estables. Se tomó como criterio de estabilidad del cultivo transfectado, la viabilidad de un 90% de la población una vez expuesto al medio selectivo en presencia de G418. En cada cambio de medio se registró el crecimiento celular cualitativamente, estimando el % promedio de células viables (móviles) en cinco campos al microscopio de luz, en un aumento de 400X. El seguimiento de los cultivos mostró que en las primeras semanas, luego de la transfección y de la adición del antibiótico, el número de parásitos disminuyó en todas las líneas celulares en un rango del 80 % al 90 %, con respecto a los controles negativos (Figura 15A, día 10), en los cuales la viabilidad disminuyó hasta llegar a un 100% de mortalidad al cabo de 20 días. Las oscilaciones en la viabilidad de todos los cultivos transfectados con los vectores anteriormente mencionados, fueron observadas hasta la cuarta ronda de replicación (día 40), la disminución de viabilidad de las líneas 1 a la 6, fue mayor en los cambios de medio donde se añadió el factor selectivo, el antibiótico G418. La disminución de la viabilidad, producto de la adición del factor selectivo fue disminuyendo en los siguientes ciclos, obteniendo de esta manera líneas celulares estables. Las primeras líneas en alcanzar la estabilidad a los 40 días fueron las líneas 1 y 3 transfectadas con pLew13 y la línea 5 transfectada con pTrexn-GFP5 (Figura 15A, día 40. Tabla 2). El resto de las líneas celulares comenzaron a ser estables transcurridos 60 días, la estimación cualitativa de viabilidad se realizó hasta los 70 días; tiempo en el cual todas las líneas celulares se mantuvieron estables.

En todas las líneas transfectadas, donde se dirigió la inserción de pLew13 al locus de β tubulina, se observó una morfología sin alteración, similar a la del cultivo parental, lo cual

se muestra en la figura 16, donde cada uno de los clones ocho semanas después de la transfección no muestran alteración en su morfología.

Paralelamente a la viabilidad se evaluó la expresión de la proteína de fluorescencia verde GFP (Figura 15B), a través del seguimiento de la fluorescencia al microscopio, se observó que la línea 5 inició la expresión de la *GFP* al día 10 en un 40% de las células, tiempo menor con respecto a la línea 6 donde se observó la expresión de la GFP a la 40 días en un 10% de la población. Ambas líneas presentaron un incremento exponencial de la expresión de la proteína, la cual alcanzó cerca del 100% de expresión a los 50 días. En la figura 17 se observa el fenotipo de los parásitos transfectados con pTrexn-GFP5, donde se muestra la expresión de la proteína verde.

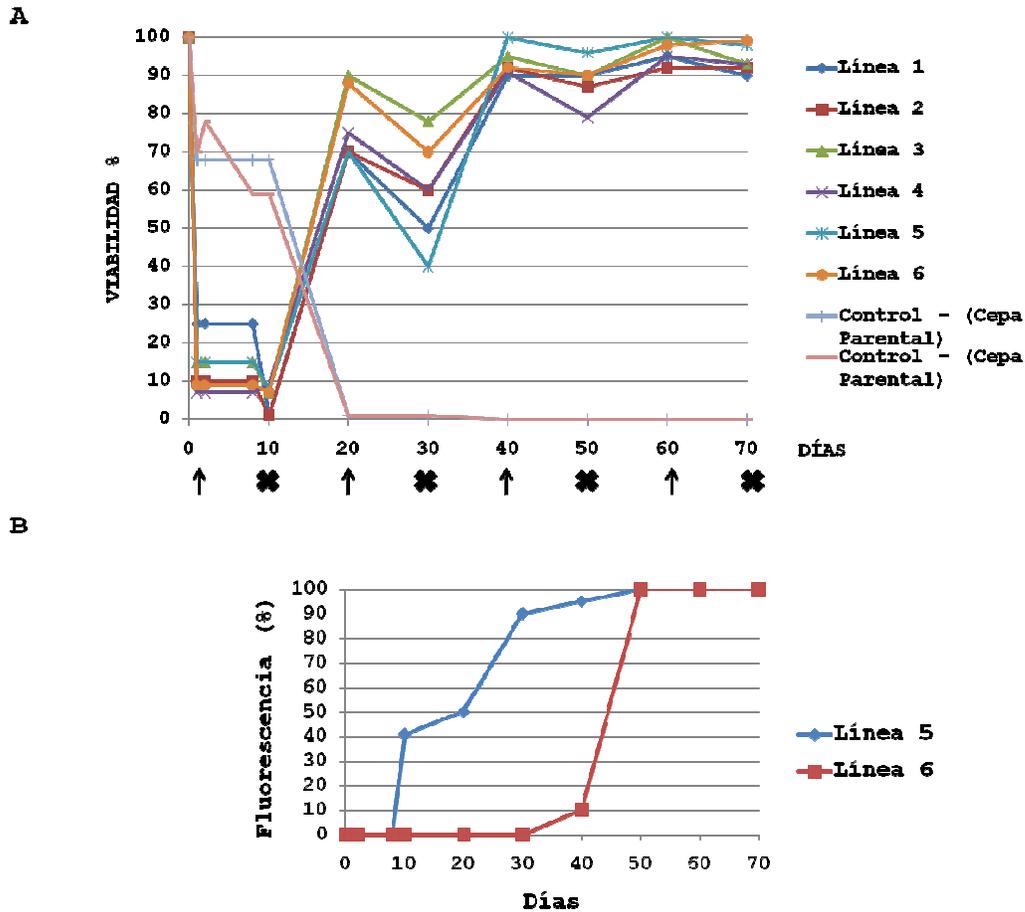


Figura 15.

Seguimiento del comportamiento de los cultivos de *T. rangeli* Triat-1 parentales y líneas transfectadas con pLew13 y pTrex-GFP5 luego de la transfección.

A. Curvas de crecimiento celular de las Líneas de *T. rangeli* transfectadas con pLew13, pTrexn-GFP5 y cultivos parentales. En el gráfico se muestra los cambios en cuanto al % de viabilidad de cada uno de los cultivos durante 70 días a partir de la transfección. Las flechas con dirección hacia arriba, señalan los días en que se realizó el cambio de medio agregando el antibiótico G418 y las * señalan los cambios a medio sin antibiótico. **Líneas 1 a la 4**, Cultivos de *T. rangeli* transfectados con pLew13; **Líneas 5 y 6**, Cultivos de *T. rangeli* transfectados con pTrex-GFP5; **Control -**. Cepa parental de *T. rangeli* Triat-1.

B. Seguimiento de la expresión de la proteína de fluorescencia verde GFP, en líneas *T. rangeli* transfectadas con pTREXn-GFP5. En el gráfico se muestra la expresión del gen reportero *GFP* como el % de fluorescencia observado en las líneas durante 70 días. **Líneas 5 y 6**. Cultivos de *T. rangeli* transfectadas con pTrexn-GFP5.

Tabla 2. Registro de los resultados obtenidos en las experiencias de transfección de *T. rangeli* Triat-1 con los vectores de expresión pLew13 y pTrexn-GFP5.

Línea celular	Vector de Expresión	Genes reporteros		Tiempo de Estabilización
		<i>NPT</i>	<i>GFP</i>	
1	pLew13	+	-	40 días
2	pLew13	+	-	60 días
3	pLew13	+	-	40 días
4	pLew13	+	-	60 días
5	pTrexn-GFP5	+	+	40 días
6	pTrexn-GFP5	+	+	40 días

+: Presencia del gen en la réplica celular proveniente del vector transfectado.

- : Ausencia del gen en la réplica celular.

El tiempo de estabilización del cultivo se determinó como el momento cuando > 90% de las células eran viables, visualizadas al microscopio de luz en un aumento de 400X.

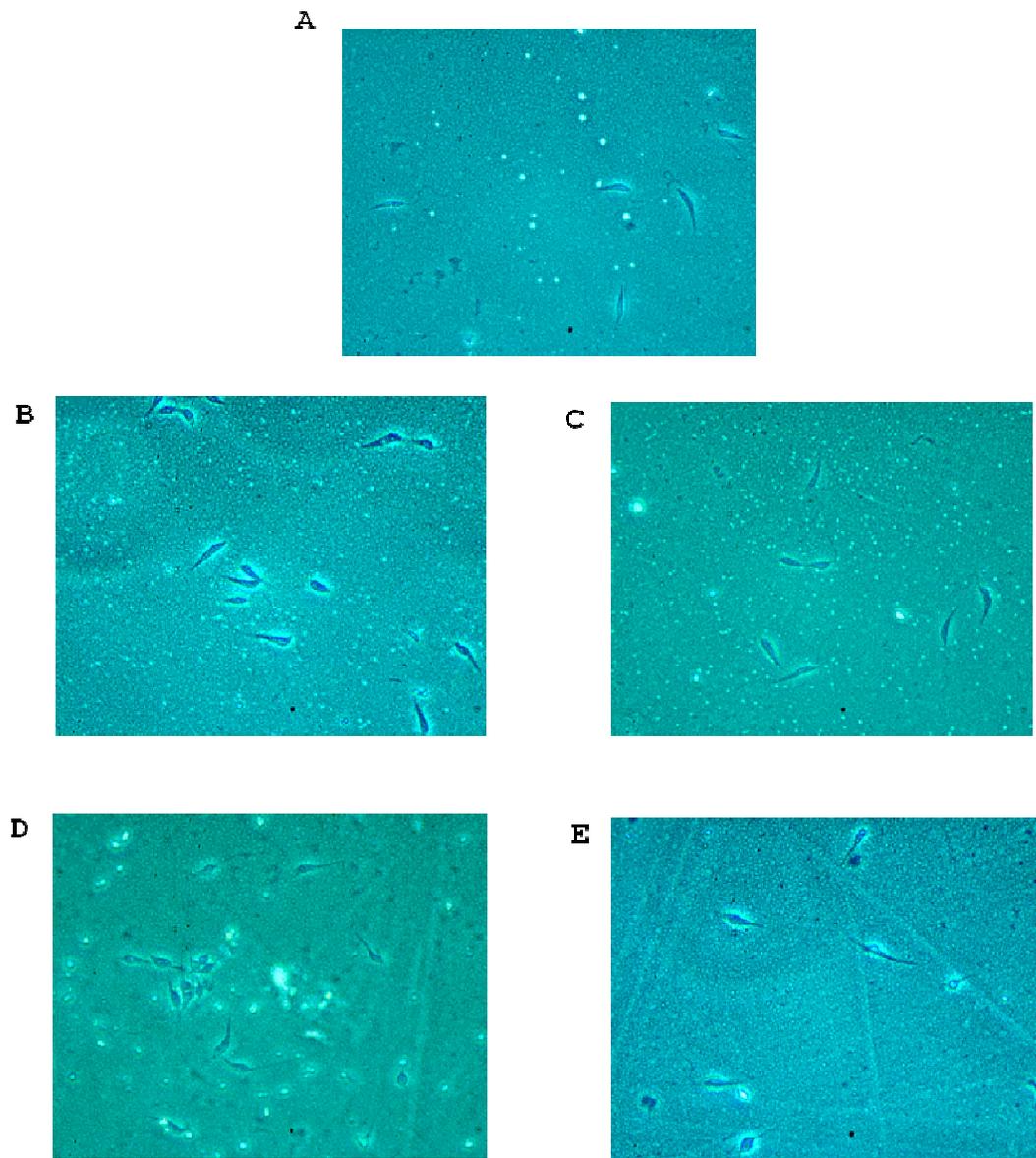


Figura 16.

Seguimiento del comportamiento de los cultivos de *T. rangeli* Triat-1 parentales y líneas transfectadas con pLew13 y pTrexn-GFP5 luego de la transfección.

Microscopía de luz de los cultivos *T. rangeli* Triat-1[pLew13] y línea parental. Aumento 400X. **A.** Control de viabilidad de la transfección, epimastigotes de *T. rangeli* Triat-1. **B, C, D y E.** Epimastigotes de *T. rangeli* Triat-1[pLew13] expresando el gen *NPT*, línea 1, 2, 3 y 4 respectivamente.

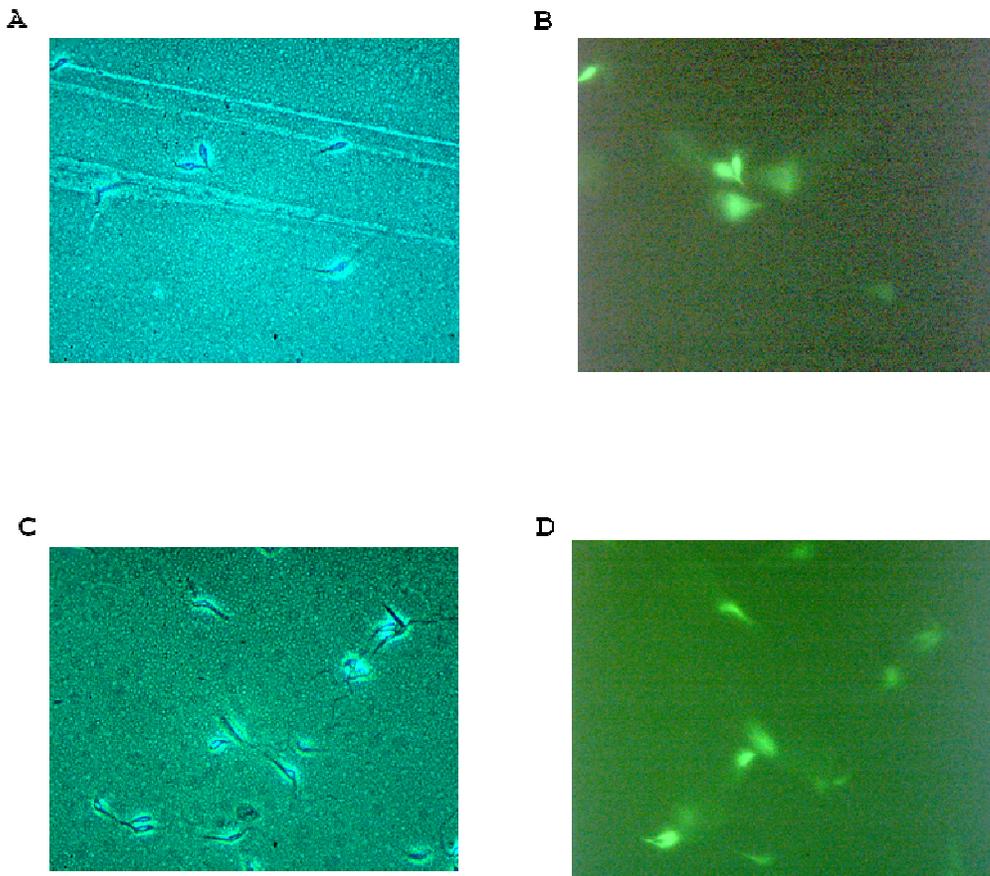


Figura 17.

Evaluación al microscopio de Líneas celulares de *T. rangeli* Triat-1 ocho semanas después de la transfección con el vector pTrexn-GFP5.

A, B, C y D. Control de la transfección: Epimastigotes de *T. rangeli* Triat-1 [pTrexn-GFP] expresando los genes *NPT* y *GFP*. **A y B.** Línea 5. **B y C.** Línea 6. **A y C.** Microscopía de Luz. **B y D.** Microscopía de Fluorescencia. Aumento 400X.

5.2.4. Clonamiento poblacional de las líneas estables de *T. rangeli* Triat-1[pLew13].

Con el objetivo de obtener una población homogénea de *T. rangeli* [pLew13], se procedió a realizar la selección clonal, a partir de cultivos en fase logarítmica, de líneas estables *T. rangeli* [pLew13] mediante la siembra de diluciones seriadas desde 10^5 parásitos/pozo hasta 1 parásito/pozo (Figura 18). El crecimiento celular fue evaluado mediante el registro al microscopio de luz tomando alícuotas de las diluciones 100, 10 y 1 parásito/pozo luego de dos semanas de incubación. En todas las réplicas de las líneas transfectantes estables (reportadas en la Tabla 2) se obtuvo una línea clonal derivada de la dilución de 10 parásito/pozo. En la figura 19 se muestra las diferentes líneas transfectadas con pLew13 (Figura 19, B, C, D y E) así como a línea parental (Figura 19A), donde se observa, tanto en un aumento de 400X así como en inmersión, que la morfología de las líneas es similar entre ellas, demostrando así que después de 10 semanas luego del clonamiento en los parásitos no se ha alterado la morfología con respecto a la línea parental. Además en la figura 20 A y B, se sigue observando la expresión de la proteína GFP en las líneas transfectadas con pTrexn-GFP5, después de 10 semanas de haberse realizado el clonamiento, sin embargo se visualiza que la expresión de esta proteína no presenta la misma intensidad en todos los parásitos observados en ambas líneas.

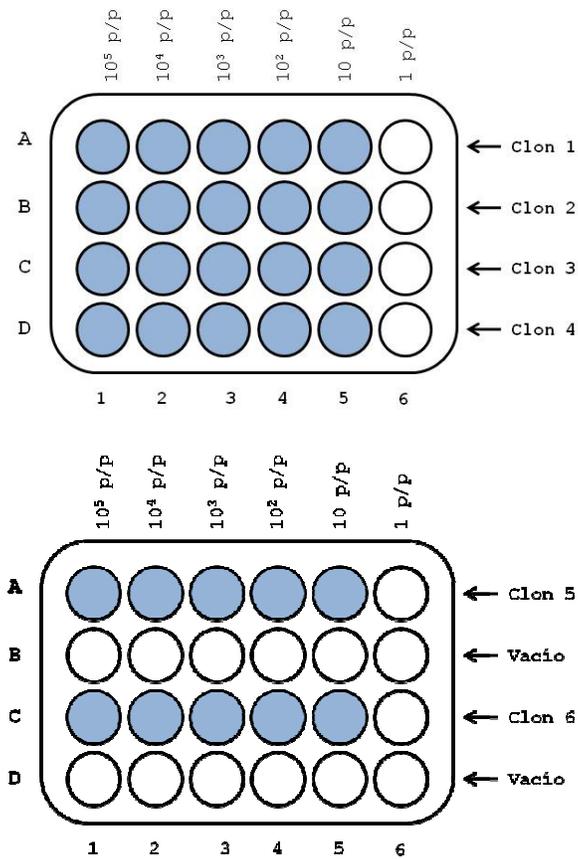


Figura 18.

Registro esquemático del resultado del Clonamiento por dilución seriada, diagrama del clonamiento poblacional de las líneas celulares estables de *T. rangeli* Trait-1 transfectadas con pLew13 y pTrexn-GFP5. Clon 1, Clon proveniente de línea 1. Clon 2, Clon proveniente de línea 2. Clon 3, Clon proveniente de línea 3. Clon 4, Clon proveniente de línea 4. Clon 5, Clon proveniente de línea 5. Clon 6, Clon proveniente de línea 6. Las letras A a la D indican la ubicación de la línea celular, y la numeración 1 al 6 indican la ubicación de las columnas que referencian la posición de cada pozo en las placas de cultivo. En la parte superior se indica el número de parásitos sembrados por pozo (p/p) en cada caso. Los ● muestran el crecimiento luego de dos semanas y los círculos ○ señalan la ausencia del crecimiento de células.

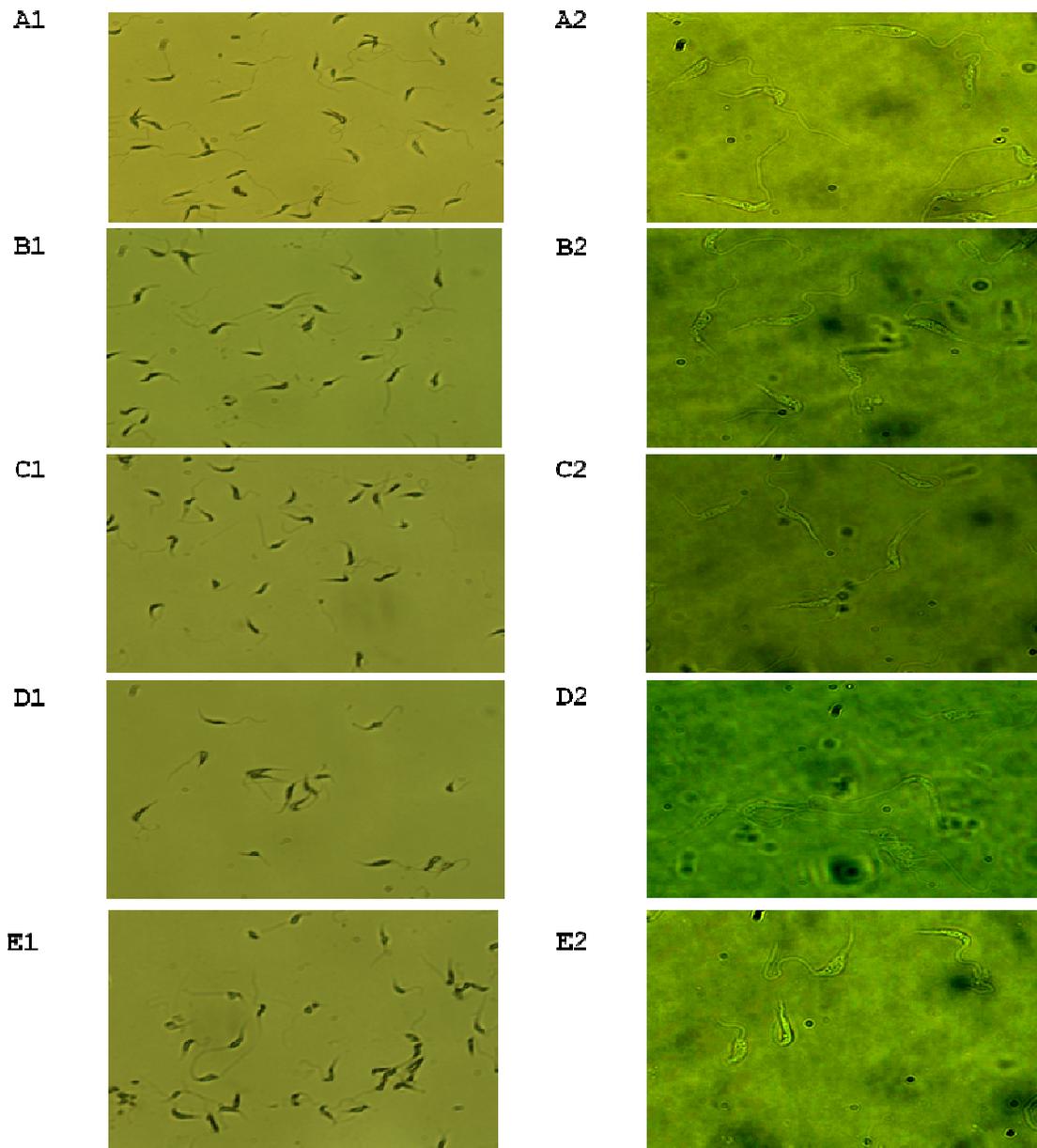


Figura 19.

Evaluación al microscopio de la morfología de las líneas celulares de *T. rangeli* Triat-1 parentales y *T. rangeli* Triat-1[pLew13] diez semanas después del clonamiento. Microscopía de luz de los cultivos *T. rangeli* Triat-1[pLew13] y línea parental. A, B, C, D y E, Sección 1, Aumento 400x. A, B, C, D y E, Sección 2, Aumento 1000x. A. Control de viabilidad de la transfección, epimastigotes de *T. rangeli* Triat-1. B, C, D y E. Epimastigotes de *T. rangeli* Triat-1[pLew13] expresando el gen *NPT*, línea 1, 2, 3 y 4 respectivamente.

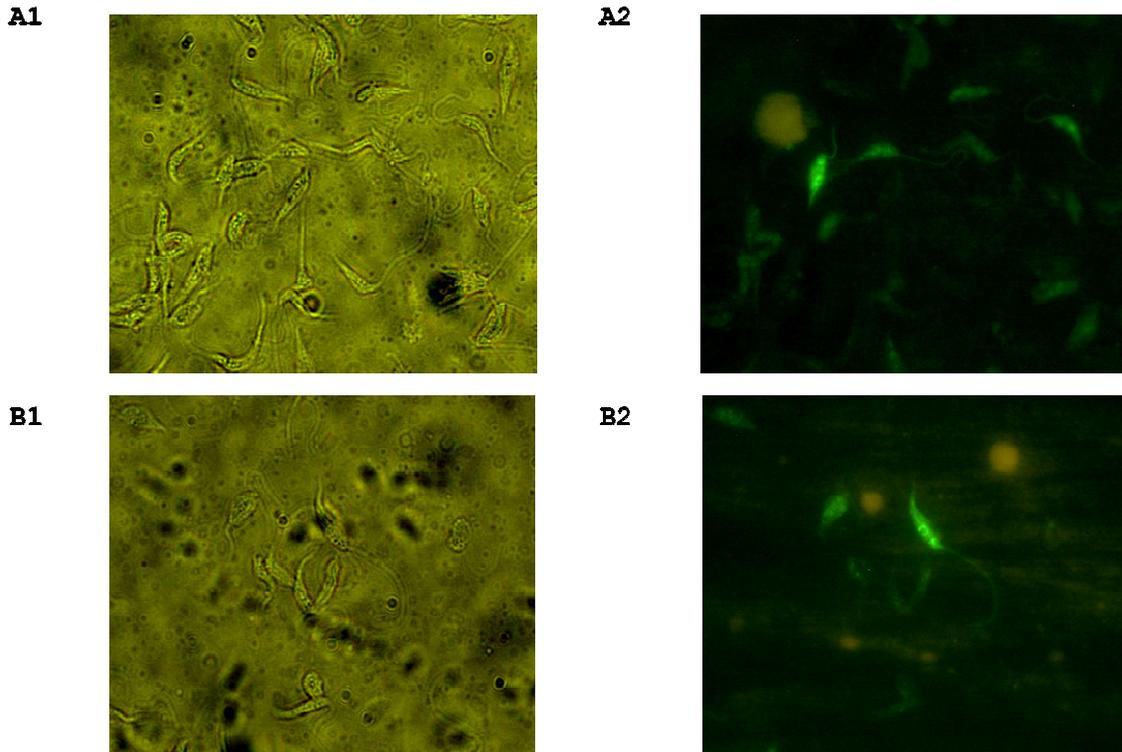


Figura 20.

Evaluación al microscopio de Líneas celulares de *T. rangeli* Triat-1[pTrexn-GFP5] diez semanas después del clonamiento.

A y B. Control de la transfección: Epimastigotes de *T. rangeli* Triat-1 [pTrexn-GFP], expresando los genes *NPT* y *GFP*, línea 5 y 6 respectivamente. **A1 y B1.** Microscopía de Luz. Aumento 1000x. **A2 y B2.** Microscopía de Fluorescencia. Aumento 1000x.

5.3. Caracterización molecular de la inserción de pLew13 en el genoma de *T. rangeli* en las líneas clonales estables *T. rangeli* Triat-1[pLew13].

5.3.1. Verificación del mapa del locus α - β tubulina de *T. rangeli* Triat-1. Previo a la caracterización de la inserción de pLew13 en el genoma de *T. rangeli*, se procedió a la verificación del mapa del locus α - β tubulina en *T. rangeli* reportado por Esquenazi y colaboradores (1989) (Figura 21A). Para ello se aisló el ADNg de la cepa parental Triat-1 y se digirió con las enzimas de restricción *Bam*HI, *Hind*III y *Pst*I. Los perfiles de restricción obtenidos en el gel se transfirieron a una membrana de Nylon y se hibridaron individualmente con las sondas de β tubulina proveniente de pLew13 y α tubulina derivada del ADNg de *T. rangeli*. El resultado de los Southern blots con cada sonda se muestra en la figura 21, secciones B y C. En todas las digestiones y en concordancia con el mapa físico reportado para la cepa *T. rangeli* venezolana, las sondas α y β tubulina identificaron una banda predominante de 3,8 kb en la digestión *Bam*HI, una banda mayor a 23,1 kb en la digestión *Hind*III, y una banda de 2 kb en la digestión *Pst*I. Las digestiones con *Bam*HI, así como la digestión con *Pst*I que mostraron digestiones parciales para el ADNg hibridado tanto con la sonda de α como β tubulina, sin embargo se observaron bandas de mayor intensidad de 3,8 kb para la digestión con *Bam*HI y de 2 kb para la digestión con *Pst*I. En una sobrexposición de 3 horas en la digestión *Bam*HI, la sonda de β tubulina reconoció una banda de 1,5 kb (resultados no mostrados y reportados en la tabla 3). El mapa físico de *T. rangeli* Triat-1 generado a partir de estos ensayos se muestra en la figura 21D.

Para determinar si el sitio de restricción *Hind*III, está asociado a algún polimorfismo en el gen de α tubulina de la cepa venezolana *T. rangeli* Triat-1, se utilizaron herramientas

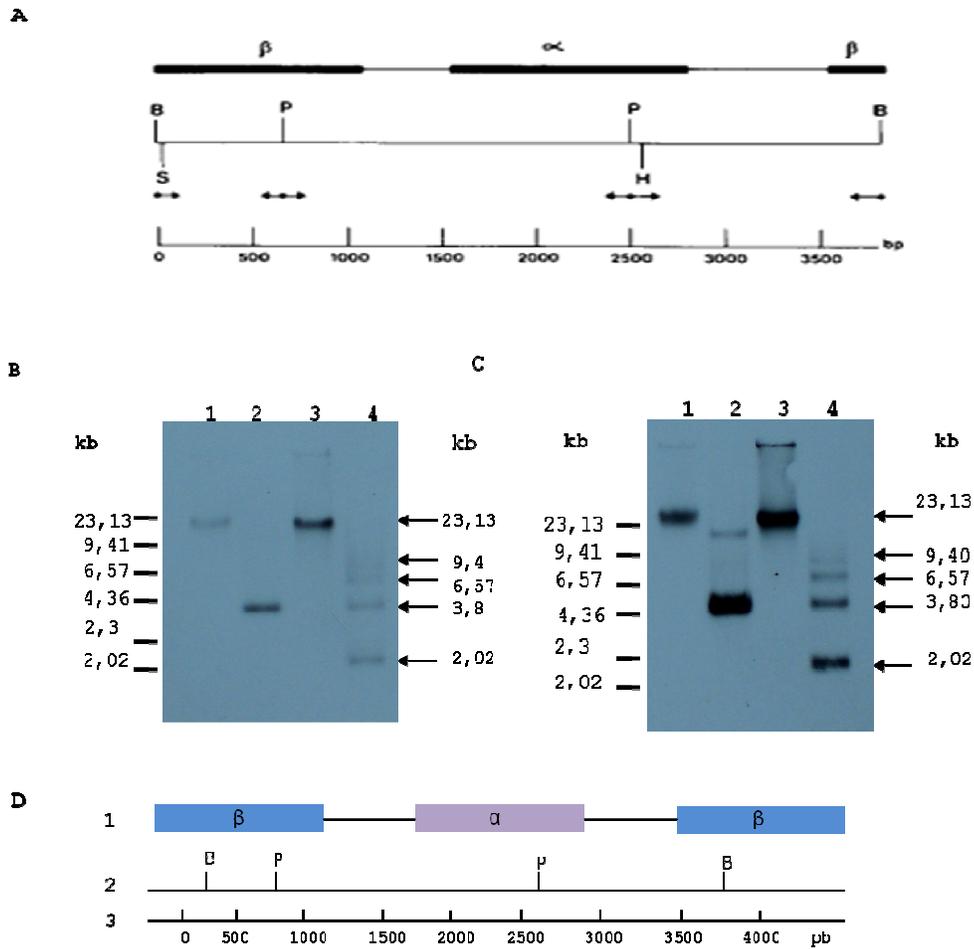


Figura 21.

Verificación del mapa de restricción de la región α - β de *T. rangeli* Triat-1.

A. Mapa Físico de la ubicación de las enzimas de restricción *Bam*HI (B), *Hind*III (H), *Pst*I (P) y *Sal*I (S) en el locus α - β tubulina de *T. rangeli*, tomado de Esquenazi y col. (1989). **B.** Southern blot de las digestiones en el ADNg de *T. rangeli* Triat-1, hibridadas con la sonda de β tubulina de *T. brucei* proveniente de pLew13. **C.** Southern blot de las digestiones en el ADNg de *T. rangeli* Triat-1, hibridadas con la sonda de α tubulina de *T. rangeli*. **Carril 1.** ADNg de *T. rangeli* Triat-1. **Carril 2.** ADNg *T. rangeli* Triat-1 digerido con *Bam*HI. **Carril 3.** ADNg *T. rangeli* Triat-1 digerido con *Hind*III. **Carril 4.** ADNg *T. rangeli* Triat-1 digerido con *Pst*I. Las flechas a la izquierda muestran el patrón de tamaños moleculares en kb del ADN de λ *Hind*III, y las flechas a la derecha señalan los tamaños moleculares en kb de las bandas reconocidas por las sondas después de 30 minutos de exposición. **D.** Mapa Físico del locus α - β tubulina de *T. rangeli* Triat-1 derivados de los resultados de los Southern blots.

de bioinformática para analizar la secuencia de los genes de α tubulina de la cepa venezolana *T. rangeli* Triat-1 y la cepa colombiana *T. rangeli* San Agustín (Guevara, resultados no publicados). Se realizó el alineamiento de la secuencia parcial de α tubulina de Triat-1 (905 pb) y la secuencia completa de α tubulina de San Agustín (1380 pb) (Figura 22A). En el alineamiento se señala la ubicación del sitio de restricción para la enzima *Hind*III en la secuencia de la cepa San Agustín, el cual corresponde a la posición 496, y está ausente en la secuencia parcial de la cepa Triat-1. Según estos resultados se derivó un mapa físico del locus de α tubulina con respecto al sitio de restricción de *Hind*III para ambas cepas, el cual se muestran en la figura 22, secciones B y C.

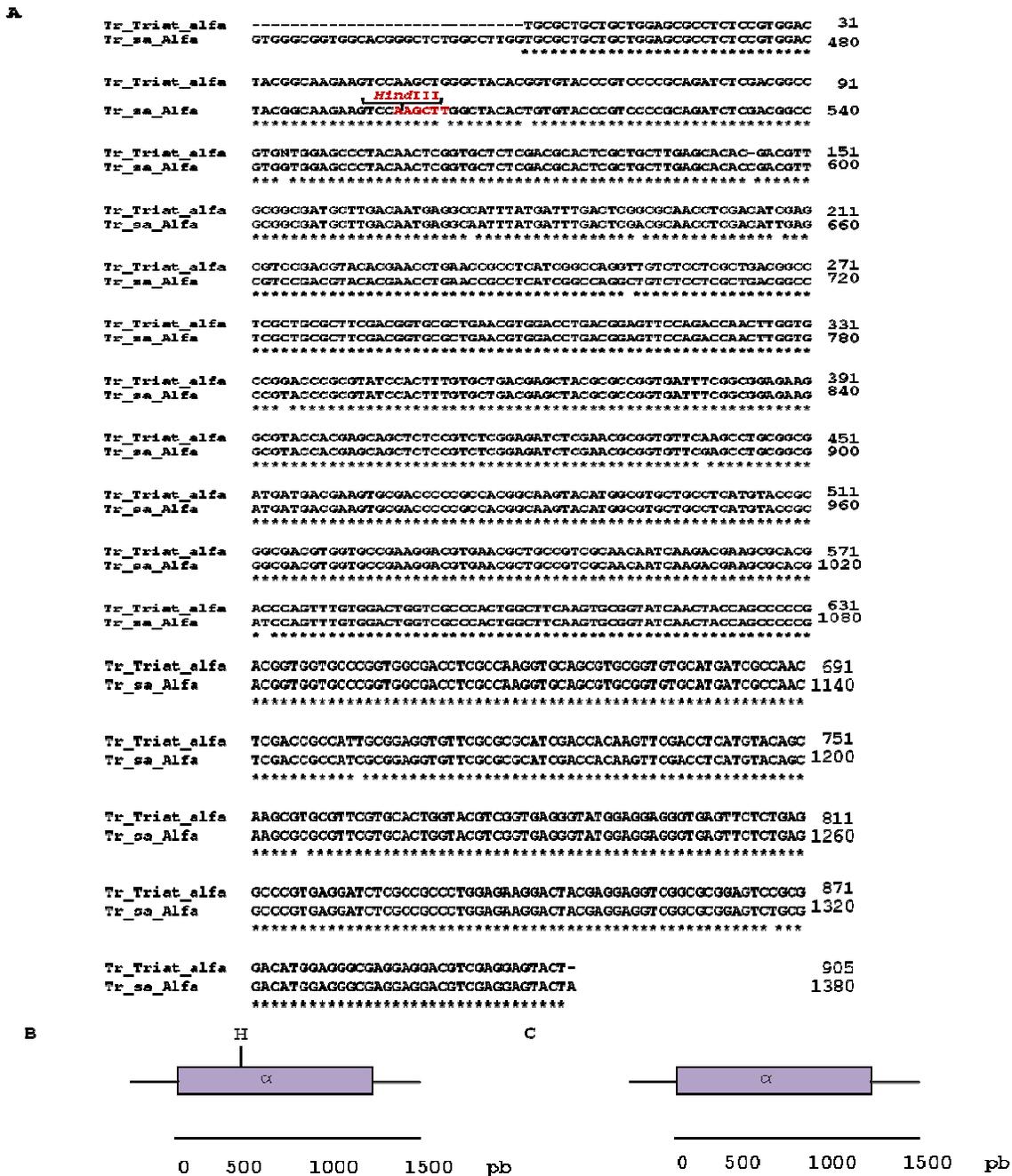


Figura 22.

Análisis del polimorfismo del sitio *HindIII* en el locus de α tubulina de las cepas *T. rangeli* Triat-1 y San Agustín (SA). A. Alineamiento de la secuencia de *T. rangeli* Triat-1 y *T. rangeli* San Agustín. En rojo se muestra el sitio de restricción para la enzima *HindIII* en la secuencia de la cepa SA. **B y C,** locus de α tubulina de SA y Triat-1 respectivamente, señalando la ubicación del sitio de restricción para la enzima *HindIII*.

5.3.2. Evaluación de la Inserción de el plásmido pLew13 en el genoma de *Trypanosoma rangeli* Triat-1.

5.3.2.1. Modelo de inserción y mapa físico propuesto para la recombinación homóloga.

Previo al análisis de los resultados de la inserción del plásmido pLew13 en el genoma *Trypanosoma rangeli* Triat-1, se propuso un modelo de inserción por recombinación homóloga del vector pLew13 en el genoma del parásito. Basado en el grado de similitud entre los 900 pb de la región del gen de β tubulina de *T. brucei* que cubre 2/3 partes de este locus y que está presente en el vector pLew13, y la única secuencia parcial disponible de 153 pb de la región C-terminal del gen de β tubulina de *T. rangeli* (Esquenazi y col, 1989) (Figura 23A), y considerando la organización del locus α - β tubulina de *T. rangeli*, se propuso un esquema de inserción de pLew13 lineal con el locus de β tubulina de *T. rangeli*, mediante recombinación homóloga descrito en la figura 23B. El segmento amarillo señalado dentro del locus de β tubulina de *T. rangeli*, indica la ubicación de la secuencia parcial del gen de este organismo, y presenta un grado de similitud del 89,5% con respecto al fragmento de 900 pb del gen de β tubulina ubicado en pLew13 en las posiciones 567 y 720. Sin embargo esta estimación de similitud en el gen de β tubulina esta limitada a la única secuencia de 153 pb reportada, y o restringe que en la región restante del gen de β tubulina exista un grado igual o mayor de similitud que permita la recombinación homóloga en otras regiones de este locus.

Tomando en cuenta el modelo de recombinación homóloga propuesto en este trabajo, así como el mapa reportado por Esquenazi y colaboradores (1989) donde se señalan las ubicaciones de distintas enzimas de restricción, se derivó un mapa físico visualizando la

A

```

beta_tub_t.r      -----AACATCAAGTCGTCGGTCTGGGACATCC 28
beta_T.b_plew13  GTCCTACTTCATTGAGTGGATCGATCCCGAACAACATCAAGTCCTCTGTTTGGCGATATCC 595
                  ***** ** ** ** **
beta_tub_t.r      CCCCCAAGGGCCTCAAGATGGCTGTCACCTTCGTTGGCAACAACACCTGCATCCAGGAGA 88
beta_T.b_plew13  CCCCCAAGGGACTCAAGATGGCTGTCACCTTCATTGGCAACAACACCTGCATCCAGGAGA 655
                  * ***** ** ** ** **
beta_tub_t.r      TGTTCGCGCGTGGAGAGCAGTTCACGCTGATGTTCCGAGCGAAGGCC TTCTTGCAC T 148
beta_T.b_plew13  TGTTCGCGCGTGGAGAGCAGTTCACCTCATGTTCCGTCGCAAGGCC TTCTTGCAC T 715
                  ***** ** ** ** **
beta_tub_t.r      GGTAC----- 153
beta_T.b_plew13  GGTACTGGCGAGGGTATGGACGAGATGGAATTCACGAGGCAGAGTCCAACATGAACG 775
                  *****

```

B

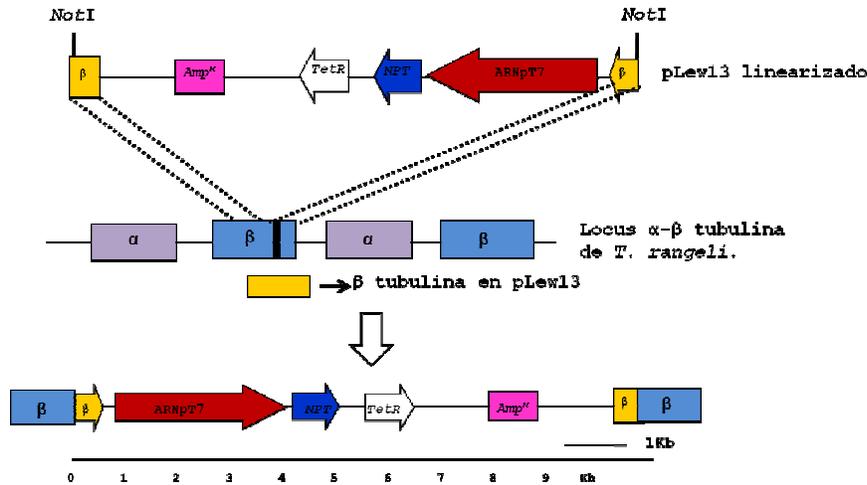


Figura 23.

Estrategia propuesta para la recombinación del vector pLew13 en el locus α - β tubulina de *T. rangeli*. A. Alineamiento de la secuencia de β tubulina de *T. brucei* presente en pLew13 y *T. rangeli*. Los * indican las base con 100% de identidad, entre la secuencia parcial de β tubulina de *T. rangeli* (Esquenazi y col, 1989) y la secuencia de β tubulina de *T. brucei* presente en pLew13 (<http://tryps.rockefeller.edu/Plasmids/pLew13.txt>). B. Esquema de inserción de pLew13 linearizado por *NotI* en el genoma de *T. rangeli*. Mapa de pLew13 linearizado por *NotI* mostrando la secuencia de β tubulina (Bloques amarillos a los extremos), bloque rosado de de resistencia a ampicilina. Flecha blanca: gen de la *TetR*. Flecha azul: gen de la *NPT*. Flecha roja: gen de la *ARNpT7*. En líneas negras se señalan regiones restantes del vector. Con líneas negras discontinuas se señala la región blanco de recombinación para la secuencia de β tubulina en pLew13 con la secuencia en el locus de β tubulina de *T. rangeli*. El bloque negro en el locus de β tubulina representa la secuencia parcial de 153 pb reportada para *T. rangeli*. El bloque amarillo señalado con una flecha ubicado abajo del locus α - β tubulina representa los 900 pb de β tubulina presente en pLew13, y está ubicado hacia el extremo C-terminal del gen de β tubulina de *T. rangeli* y una parte de la región intergénica. La línea inferior con numeraciones del 0 al 9 indica la escala en pb.

inserción de pLew13 en el genoma de *T. rangeli*, el cual se muestra mostrado en la figura 24. En este mapa se señalan las ubicaciones aproximadas de los sitios de corte de las enzimas de restricción utilizadas en el Southern Blot, específicamente los sitios *Bam*HI, *Hind*III y *Pst*I, así como los posibles fragmentos generados al digerir con cada una de estas enzimas. Así mismo se señala la ubicación de la sonda de β tubulina utilizada para realizar el Southern blot (bloque verde). En este sentido según el mapa físico derivado en el presente trabajo, se puede observar que al digerir con la enzima *Bam*HI se deben obtener dos bandas que hibridan con la sonda de β tubulina, una de aproximadamente 6,5 kb y otra de 10,2 kb. Al digerir con la enzima *Hind*III se debe obtener dos bandas que hibridan con la sonda cuyos tamaños aproximados son deben ser mayores a 13 kb. Y finalmente al digerir con la enzima *Pst*I se deben obtener dos fragmentos de 3,7 kb y 5,1 kb que hibridan con la sonda específica. Esta propuesta no excluye la generación de otros patrones que se deriven de inserciones alternativas en la región del locus de β tubulina.

5.3.3.2. Southern blot en líneas parentales y líneas clonadas *T. rangeli*[pLew13].

Como un control experimental para conocer el patrón de bandas provenientes de la hibridación del vector pLew13 con la sonda de β tubulina (fragmento de 745 pb de β tubulina proveniente de pLew13, ver sección 4.2.6 de materiales y métodos), se realizaron digestiones con las enzimas *Bam*HI, *Hind*III y *Pst*I sobre el ADN plasmídico del vector, los perfiles de restricción obtenidos en los geles se transfirieron a una membrana de Nylon y fueron hibridados con la sonda, dando como resultado el patrón de bandas mostradas en la figura 25C, el patrón de bandas esperado para la hibridación con la sonda, en cada una de las enzimas debió mostrar una banda única de 7 kb en la digestión con *Bam*HI, y una banda

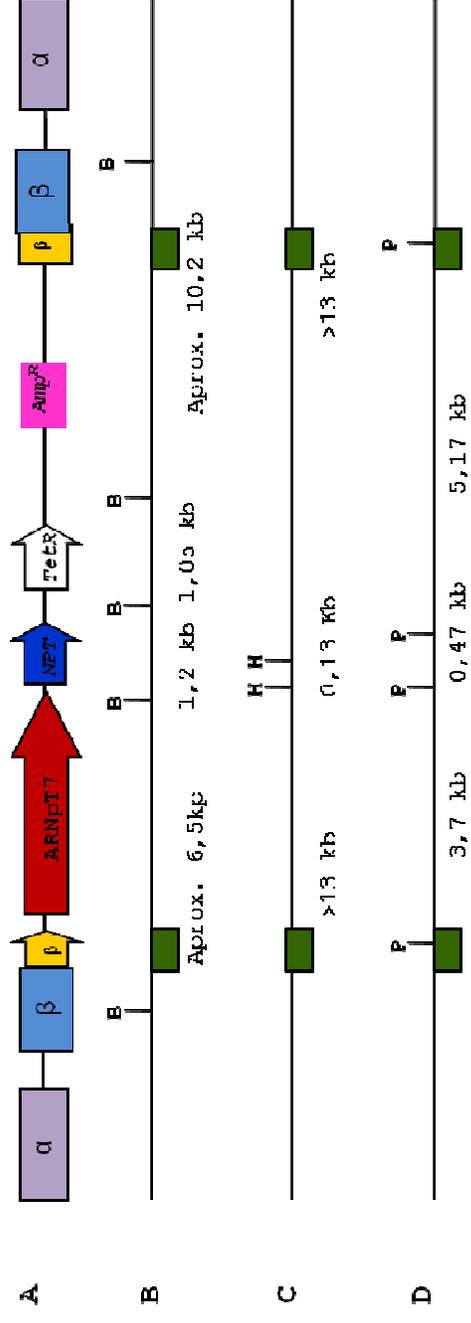


Figura 24.

Esquema de patrones de restricción en *T. vaginalis* con pLew13 insertado.

A. Se muestra el vector pLew13 inserto en el locus de α - β tubulina. Los bloques morados y azules muestran el locus de α - β tubulina. Los bloques amarillos señalan el fragmento de β tubulina presente en pLew13. Flecha roja: gen de la ARNpT7. Flecha azul: gen de la NPT. Flecha rosada: gen de resistencia a ampicilina. **B. Sitios de restricción para *Bam*HI (B).** C. **Sitios de restricción para *Hin*dIII (H).** D. **Sitios de restricción para *Pst*I (P).** El bloque verde sobre cada línea doble se señala la ubicación de las enzimas de restricción, representa el sitio de hibridación por la sonda β tubulina.

de 9,1 kb con la digestión *HindIII*, y bandas de 5,2 kb y 3,7 kb para la digestión con *PstI*. Sin embargo la hibridación con la sonda muestra un patrón similar al visualizado en las digestiones en geles (Figura 25B), sugiriendo que además de contener el fragmento de 745 pb correspondiente al fragmento del gen de β tubulina, la sonda esta contaminada con otras secuencias de pLew13. Sin embargo esta contaminación no debe interferir al analizar los resultados obtenidos en el Southern blot de las líneas clonadas de *T. rangeli* Triat-1[pLew13].

Los resultados del Southern blot de los cuatro clones de *T. rangeli* transfectados con pLew13 se presentan en la figura 26, el ADNg de cada uno de los clones fue digerido con las enzimas *BamHI*, *HindIII* y *PstI* e hibridados con la sonda de β tubulina. Para el análisis de la organización de pLew13 en el genoma de *T. rangeli* tomamos en cuenta: i) el patrón de hibridación con la sonda β tubulina de la cepa parental (Figura 21B); ii) el esquema de inserción propuesto y los patrones de bandas reconocidos por la sonda (Figura 24) y iii) los perfiles de bandas generados por el plásmido pLew13 (Figura 25C).

Al comparar las bandas reconocidas por la sonda β tubulina en cada una de las líneas clonales *T. rangeli* Triat-1[pLew13] observamos: i) un patrón de bandas similar a la del plásmido pLew13, sugiriendo una organización episomal y ii) un patrón de fondo que corresponde al generado por la tanda α - β tubulina.

En general todos los clones presentan las bandas de > 23 kb y 6,5 kb que corresponden al ADNg y ADN plasmídico respectivamente sin digerir (Figuras 26, A, B, C y D, carril 1), con lo que se podría deducir que el plásmido se encuentra en condición episomal. Además todos los clones en la digestión con *BamHI* presentan una banda que

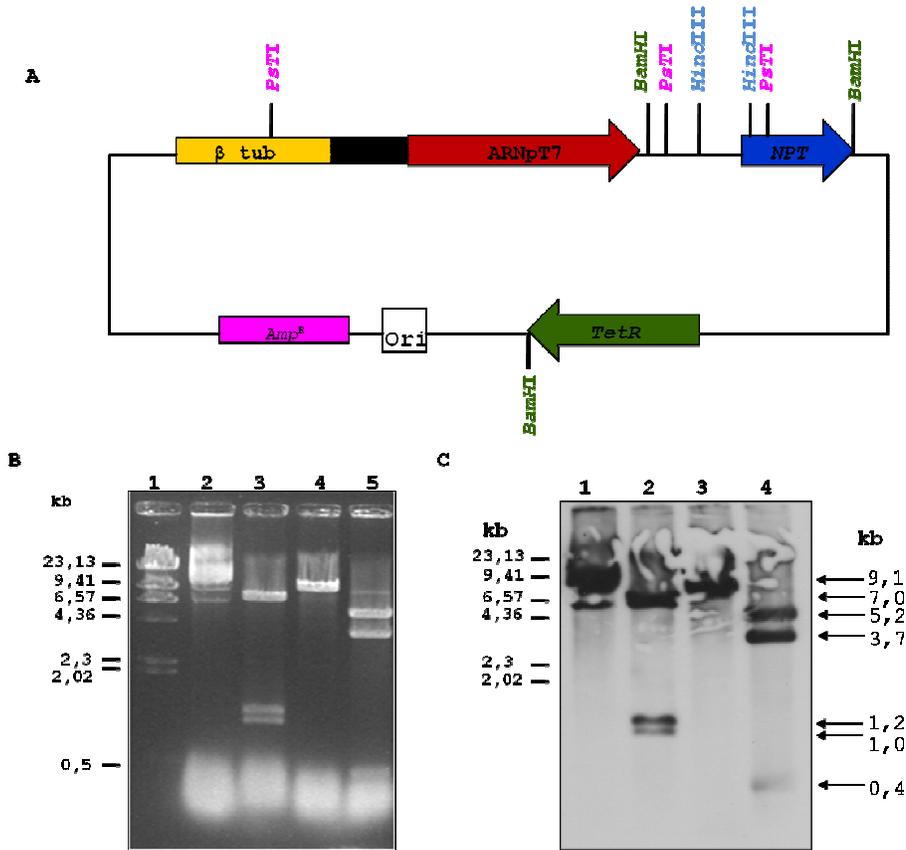


Figura 25.

Análisis Southern Blot de los patrones de restricción pLew13 hibridados con la sonda de β tubulina.

A. Mapa físico de pLew 13. Flecha rojo: gen de la *ARNpT7*; Flecha azul gen de la *NPT*; Flecha verde: gen de la proteína represora de tetraciclina (*TetR*); Bloque rosado: gen de resistencia a ampicilina proveniente de pUC19; Bloque amarillo: secuencia de β -tubulina de *T. brucei*. En verde se señalan los sitios de corte para *BamHI*, en azul se señala los sitios de corte para *HindIII*, y en rosado se muestran los sitios de corte para la enzima *PstI*. **B. Patrones de restricción de pLew13.** Electroforesis en gel de agarosa 0,8% en TAE 1X. **Carril 1.** ADN sin digerir de pLew13. **Carril 2.** ADNp pLew13 digerido con *BamHI*. **Carril 3.** ADNp pLew13 digerido con *HindIII*. **Carril 4.** ADNp pLew13 digerido con *PstI*. **C. Southern Blot pLew13 con la sonda de β tubulina.** **Carril 1.** ADN sin digerir de pLew13. **Carril 2.** ADNp pLew13 digerido con *BamHI*. **Carril 3.** ADNp pLew13 digerido con *HindIII*. **Carril 4.** ADNp pLew13 digerido con *PstI*. Las flechas a la derecha de la figura señalan los tamaños moleculares en kb de las bandas reconocidas por la sonda de β tubulina después de 16 horas de exposición.

está en un rango de 1,3 a 1,5 kb, la cual podría corresponder a la banda presente en el control pLew13 digerido con esta enzima, la cual tiene un tamaño de 1,2 kb (Figura 26, A, B, C y D, carril 2). Otra banda de interés que se observa en todos los clones con la digestión con *BamHI*, es la que se encuentra en un rango de 3,7 a 4 kb, la cual corresponde a la banda generada en la cepa salvaje de 3,8 kb, indicando que las copias del gen β tubulina de la banda α - β tubulina están intactas. En tres de los clones (Figura 26. A, C y D, carril 2) se observa la presencia de una banda de 7 kb que corresponde a la banda generada con la digestión de *BamHI* en control pLew13.

Para el caso de las digestiones con la enzima *HindIII*, en todos los clones se observa la banda de alto peso molecular de 23,13 kb que corresponde a la ubicación del locus α - β tubulina en el ADNg sin digerir, revelando la ausencia del sitio *HindIII* en esta cepa de *T. rangeli* (Figura 26, A, B, C y D, carril 3), además se observa una banda en un rango de 9 a 9,2 kb, las cuales corresponden a la banda generada en el plásmido pLew13 digerido con esta enzima. Sin embargo en el clon 2 (Figura 26B, carril 3) se observa una banda de 5,6 kb, que podría corresponder a una de los tamaños esperados aproximados (6,34 kb) del vector inserto en el genoma.

Finalmente las digestiones con la enzima *PstI*, generaron la banda de 2 kb característica de la cepa parental, en todos los clones (Figura 26. A, B, C y D, carril 4) se observaron bandas de 3,7 kb y 5,2 kb generadas al digerir pLew13. Todas las otras bandas generadas en estos Southern blots son de mayor tamaño, y ninguna corresponde a las obtenidas si se inserta el vector en el genoma del protozoario. Sugerimos que estas bandas corresponden a digestiones parciales tanto del vector pLew13 episomal como de ADNg.

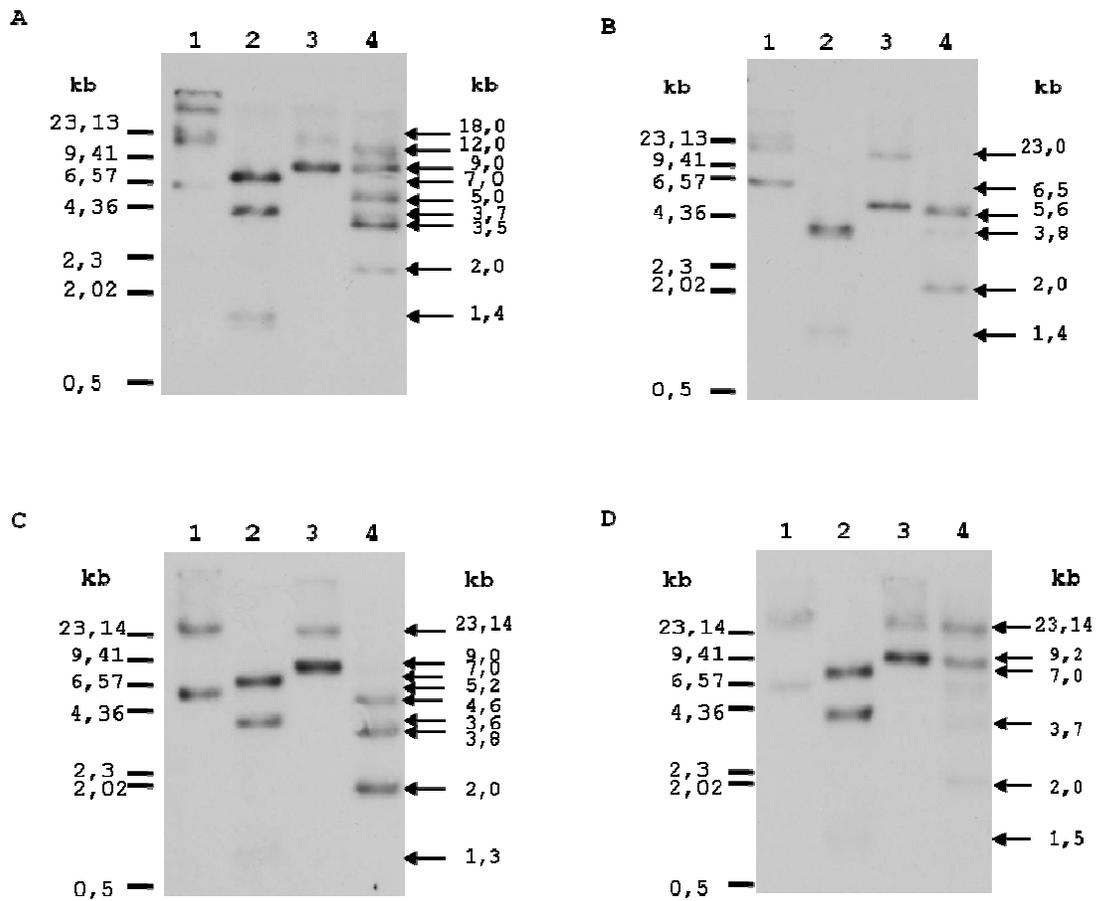


Figura 26.

Organización genómica de pLew13 en las líneas clonales de *T. rangeli* Triat-1[pLew13].

Las figuras A, B, C y D, muestran los Southern blots de las líneas clonales 1, 2, 3 y 4 respectivamente. **Carril 1.** ANDg de *T. rangeli* Triat-1 sin digerir. **Carril 2.** ADNg *T. rangeli* Triat-1[pLew13] digerido con *Bam*HI. **Carril 3.** ADNg *T. rangeli* Triat-1[pLew13] digerido con *Hind*III. **Carril 4.** ADNg *T. rangeli* Triat-1[pLew13] digerido con *Pst*I. En las flechas a la derecha se señalan los tamaños moleculares en kb de las bandas reconocidas por la sonda de β tubulina después de 16 horas de exposición.

Para confirmar si pLew13 se encontraba de forma episomal en las líneas clonales, se procedió a transformar el ADN total aislado de cada uno de los clones en la cepa de *E. coli* DH10 β , y posteriormente a aislar el ADNp de las colonias observadas en las placas con el marcador de resistencia a ampicilina. En la figura 27 se observa el ADNp aislado de las colonias obtenidas en este ensayo. Solo se obtuvo crecimiento de las transformantes Amp^R con el ADN de los clones 1, 3 y 4. Para corroborar que el ADN plasmídico aislado se correspondía con pLew13 se procedió a realizar un análisis de restricción, para ello se utilizaron las enzimas *KpnI* y *HpaI*, las cuales tienen cada una un sitio único de corte en el plásmido pLew13 (Figura 28A), y en la digestión mixta generan dos fragmentos, uno de 770 pb que contiene parte del gen de la ARNpT7 y otro de 8,5 kb que corresponde al resto del plásmido. Este patrón de bandas fue observado en el ensayo de restricción para tres de los ADN plasmídicos aislado de los clones, el cual se muestra en la figura 28B.

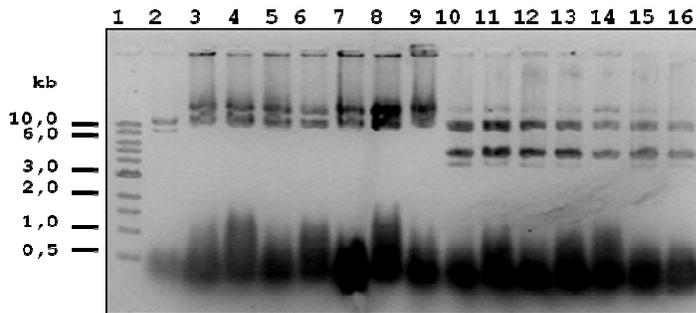


Figura 27.

Análisis de plásmidos obtenidos de los clones *T. rangeli* Triat-1[pLew13] a través de transformación bacteriana.

Electroforesis en gel de Agarosa 0,8% en TAE 1X. **Carril 1.** Marcador de tamaño molecular, escalera 1 kb. **Carril 2:** pLew13. **Carriles 3 al 10.** ADNp aislado de colonias provenientes del ADN del clon 1. **Carril 11 al 13.** ADNp aislado de colonias provenientes del ADN del clon 3. **Carril 14 al 16.** ADNp aislado de colonias provenientes del ADN del clon 4.

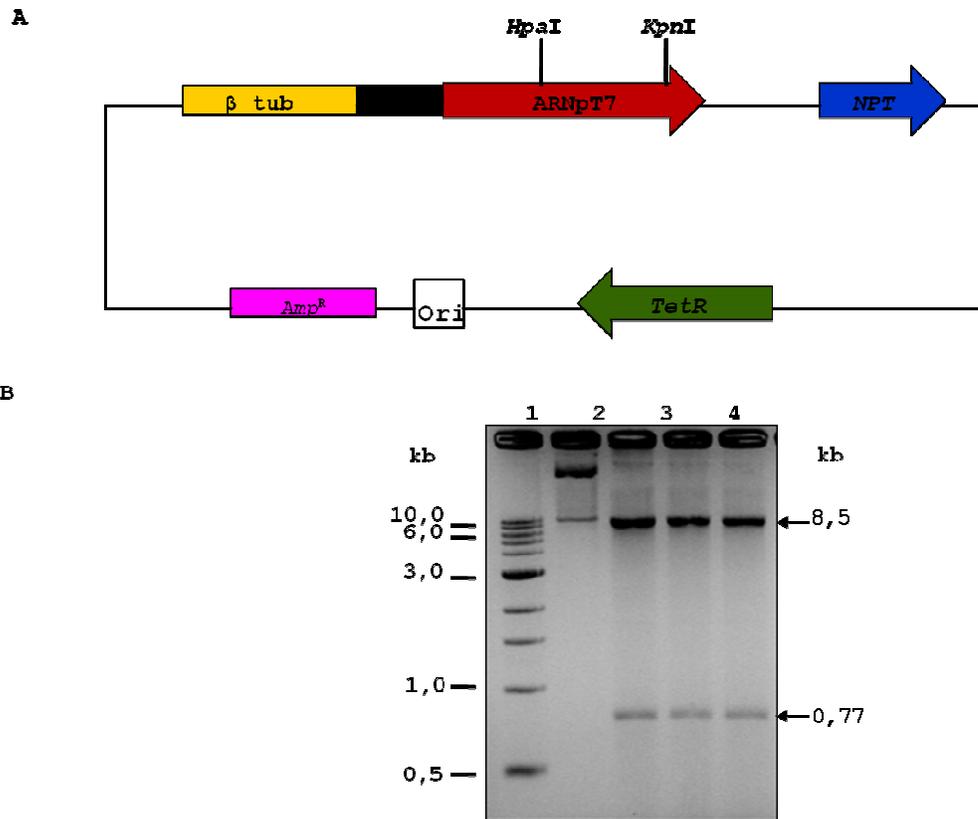


Figura 28.

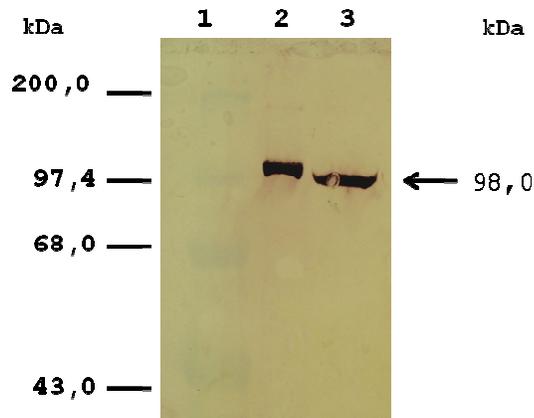
Caracterización mediante análisis de restricción del ADN plasmídico aislado de los clones *T. rangeli* Triat-1[pLew13].

A. Mapa físico de pLew13. Flecha rojo: gen de la *ARNpT7*; Flecha azul gen de la *NPT*; Flecha verde: gen de la proteína represora de tetraciclina (*TetR*); Bloque rosado: gen de resistencia a ampicilina proveniente de pUC19; Bloque amarillo: secuencia de β -tubulina de *T. brucei*. Se muestran los sitios de corte para las enzimas *HpaI* y *KpnI*. **B.** Patrones de restricción *HpaI* y *KpnI* del ADN plasmídico en diferentes clones. Electroforesis en gel de Agarosa 0,8% en TAE 1X. **Carril 1.** Marcador de tamaño molecular, escala 1 kb. **Carril 2:** pLew13. **Carril 3.** ADNp aislado del clon 1 digerido con *HpaI* y *KpnI*. **Carril 4.** ADNp aislado del clon 3 digerido con *HpaI* y *KpnI*. **Carril 5.** ADNp aislado del clon 4 digerido con *HpaI* y *KpnI*. Las flechas a la derecha indican el tamaño molecular en kb de las bandas generadas a digerir el ADNp con *HpaI* y *KpnI*.

5.4. Detección de la proteína ARNpT7.

Posteriormente se realizó la detección de la expresión de la ARNpT7 de las cuatro líneas clonales *T. rangeli*[pLew13]. En primer lugar se establecieron las condiciones para realizar el Western blot en cuanto a diluciones del anticuerpo primario (1/5000) y anticuerpo secundario (1/2000), así como el tiempo de incubación de la membrana con el sustrato para la fosfatasa alcalina (5 min en adelante), el resultado de esta estandarización se muestra en la figura 29A, donde se muestran las señales para la proteína ARNpT7 purificada utilizada como control positivo (Figura 29A, carril 2) y la señal de la proteína control al estar en una mezcla con proteínas totales de la cepa parental (Figura 29A, carril 3), este último ensayo se realizó con el objetivo de observar la migración de la proteína ARNpT7 en presencia de las proteínas totales del parásito. Una vez establecidas las condiciones del Western blot, las proteínas totales aisladas de cada uno de los clones fueron corridas en un gel de acrilamida, luego estas proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se realizó la inmunodetección, cuyo resultado se muestra en la figura 29B, donde se muestra la inmunodetección de las proteínas totales aisladas de 29×10^6 parásitos para la cepa parental (Figura 29B, carril 2), 39×10^6 parásitos para la línea clonal 1 (Figura 29B, carril 3), 51×10^6 parásitos para la línea clonal 2 (Figura 29B, carril 4), 31×10^6 parásitos para la línea clonal 3 (Figura 29B, carril 5), 48×10^6 parásitos para la línea clonal 4 (Figura 29B, carril 6). Estos resultados muestran que la proteína de 98 kDa se está expresando en los clones 1, 3 y 4 (Figura 29B, carriles 3, 5 y 6) y no se registró señal de la expresión de esta proteína para el clon 2 (Figura 29B, carril 4). En base a los resultados se observa que la señal más alta de esta proteína se presenta para el clon 3, cuya expresión es el doble con respecto a los clones 1 y 4. En este resultado se observan bandas de menor

A



B

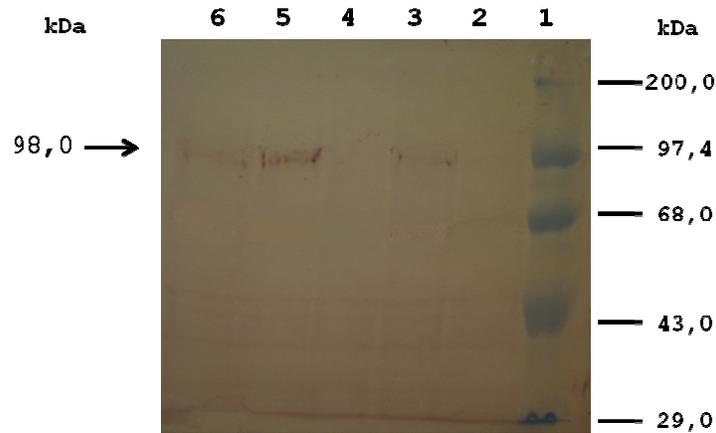


Figura 29.

Inmunodetección de la proteína ARNpT7 en controles y líneas clonales *T. rangeli* Triat-1[pLew13]. **A. Control de la inmunodetección.** Carril 1. Marcador de peso molecular (Gibco). Carril 2. Control de detección ARNpT7 (Gibco) diluida 1/10. Carril 3. Control de detección ARNpT7+Proteínas totales de la cepa parental. **B. Inmunodetección de las líneas clonales *T. rangeli* Triat-1[pLew13].** Carril 1. MPM. Carril 2. Proteínas de la cepa parental. Carril 3. Proteínas de la línea clonal 1. Carril 4. Proteínas de la línea clonal 2. Carril 5. Proteínas de la línea clonal 3. Carril 6. Proteínas de la línea clonal 4. Las flechas a la derecha de la figura A y a la izquierda de la figura B señalan el peso molecular de la proteína detectada luego de la inmunodetección.

peso molecular que corresponden a otras proteínas, las cuales no se destiñeron completamente finalizada la tinción con rojo ponceau.

5.5. Construcción del vector de expresión condicional incorporando al gen de alfa tubulina.

En esta sección se reportan los resultados del análisis de los sitios de clonamiento disponibles en diferentes versiones del vector pTcIndex, y las diferentes estrategias de clonamiento ensayadas para la inserción del gen de α tubulina, dirigida a obtener el vector de expresión condicional pTcIndex α tubulina en ambos sentidos, necesario para evaluar la funcionalidad del ARN antisentido.

5.5.1. Primera Estrategia de Clonamiento. Para la construcción del segundo vector a ser utilizado en la inducción del sistema de ARN antisentido, se planteó como primera estrategia el uso del vector de expresión pTcIndex-RFP y el gen de α tubulina proveniente de los recombinante pTrTriatalfatub 3 y pTrTriatalfatub 4. Estos vectores fueron construidos a partir de la inserción de un fragmento amplificado conteniendo el gen de 1,4 kb de alfa tubulina de la cepa de *T. rangeli* Triat-1 en el vector de clonamiento pCR[®]2.1-Topo[®] (Guevara, resultados no publicados). El desarrollo de esta estrategia se describe a continuación.

Para amplificar el gen de α de *Trypanosoma rangeli* Triat-1, se emplearon los oligos $\alpha 1$ y $\alpha 2$ que flanquean el gen de α tubulina de *Leishmania amazonensis* y originan un producto de 1,4 kb (Guevara y col, resultados no publicados). En este trabajo se utilizaron como ADN molde a los vectores pTrTriatalfatub 3 y pTrTriatalfatub 4 y la enzima para amplificar el gen de α tubulina fue la polimerasa *Pfu*, la cual genera extremos romos. Este inserto posteriormente fue purificado a partir del gel por el método del papel DE81, y posteriormente fue fosforilado, para finalmente incluirlo en la reacción de ligamiento necesaria para la construcción del vector pTcIndex-RFP- α Tub.

Para la reacción de ligamiento, se procedió a linearizar el vector pTcIndex-RFP con la enzima *EcoRV* la cual genera extremos romos, posterior a este ensayo se procedió a defosforilar al vector con la finalidad de evitar su recircularización. Una vez preparado el vector se procedió a realizar el ligamiento, para ello se determinó cualitativamente las concentraciones del vector e inserto, a partir de las intensidades de las bandas en el gel con respecto a las intensidades dadas por un control de ADN. Esta estimación se realizó para establecer las relaciones de los volúmenes de vector-inserto para el ensayo de ligamiento, tomando como referencia que en ligamiento de extremos romos la relación vector:inserto debe estar en un rango de 1:5 a 1:10. Una vez culminado el ligamiento según el protocolo descrito en el punto 4.3.4, se procedió a transformar químicamente el producto del ligamiento. Este procedimiento se realizó tres veces, sin obtener recombinantes con el inserto α tubulina. Se realizó un cuarto intento, electroporando el producto del ligamiento, en la figura 30 se muestran las condiciones de las partes de este intento de ligamiento donde se puede observar que en cuanto a la relación inserto:vector, el primero duplicó al vector a ser utilizado en el ensayo de ligamiento. Sin embargo en este ensayo de ligamiento no se consiguieron recombinantes.

5.5.2. Segunda Estrategia de Clonamiento. En base a los resultados negativos obtenidos en la primera estrategia para la construcción del vector pTcIndex-RFP- α Tub, se propuso

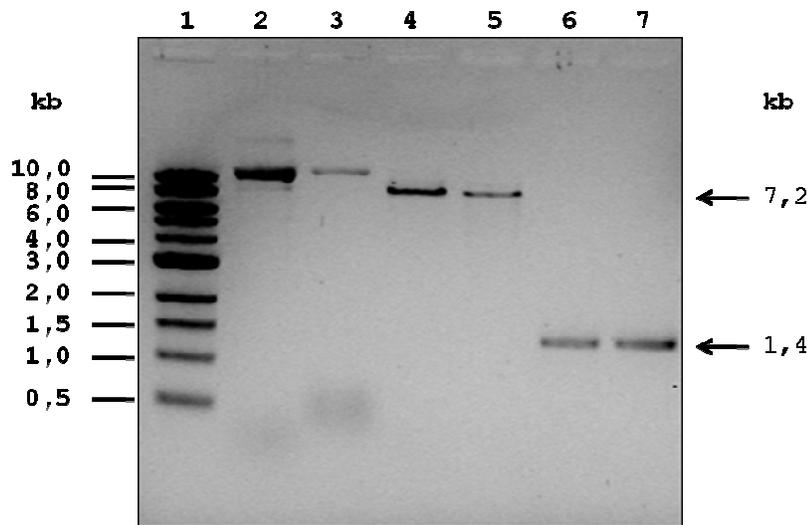


Figura 30.

Clonamiento de la región α tubulina en pTcIndex-RFP; Primera estrategia.

Electroforesis en gel de agarosa 0,8% en TAE 1X. **Carril 1.** Marcador de tamaño molecular, escalera 1 kb. **Carril 2.** pTcIndex-RFP. **Carril 3.** pTcIndex-RFP diluido 1/20. **Carril 4.** pTcIndex-RFP digerido con *EcoRV*. **Carril 5.** pTcIndex-RFP digerido con *EcoRV* y desfosforilado. **Carril 6.** α tubulina. **Carril 7.** α tubulina desfosforilada. Las flechas a la derecha señalan el tamaño molecular en kb de las partes a utilizar en el clonamiento.

una segunda estrategia planteando un clonamiento dirigido del gen de alfa tubulina, utilizando los sitios de las enzimas *XbaI* y *BamHI* presentes en el vector pTcIndex-RFP (Taylor y col, 2006) y en los recombinantes del vector topo, pTrTriatalfatub 3 y pTrTriatalfatub 4. En la figura 31 se presenta el esquema de esta segunda estrategia de clonamiento, donde se señala la ubicación de los sitios de corte para las enzimas de restricción a utilizar, tanto en los vectores recombinantes de Topo como en el vector pTcIndex-RFP. El gen de alfa tubulina en los recombinantes 3 y 4 puede estar insertado en dirección 5'-3' o 3'-5' con respecto sitio múltiple de clonamiento, en este sentido si el inserto está en la dirección 5'-3', el fragmento α tub generado con las enzimas *XbaI* y *BamHI* se

insertará en la dirección 3'-5'. Para el caso en que el gen α tub este en dirección 3'-5' en el vector topo, una vez insertado en el vector pTcIndex-RFP éste quedará insertado en la dirección 5'-3'.

El primer paso para realizar este clonamiento, fue identificar la dirección en que se encontraba el gen de alfa tubulina en los vectores pTrTriatalfaTub 3 y pTrTriatalfaTub 4. Para ello se ubicó el sitio *PstI* en la secuencia de alfa tubulina de *T. rangeli* utilizando el programa DNAMAN y luego se analizó el patrón de restricción *PstI* en los recombinantes pTrTriatalfatub 3 y 4.

Los resultados del análisis teórico propuesto en la 31 (A y B) se confirman con los resultados experimentales presentados en la figura 31C, donde el recombinante pTrTriatalfaTub 3 (figura 31C, carril 4) una vez digerido con la enzima *PstI*, generó un fragmento de 3,72 kb y otro de aproximadamente 1,2 kb. Este patrón de bandas coincide con el esperado de acuerdo al mapa físico del recombinante que tiene inserto del gen α

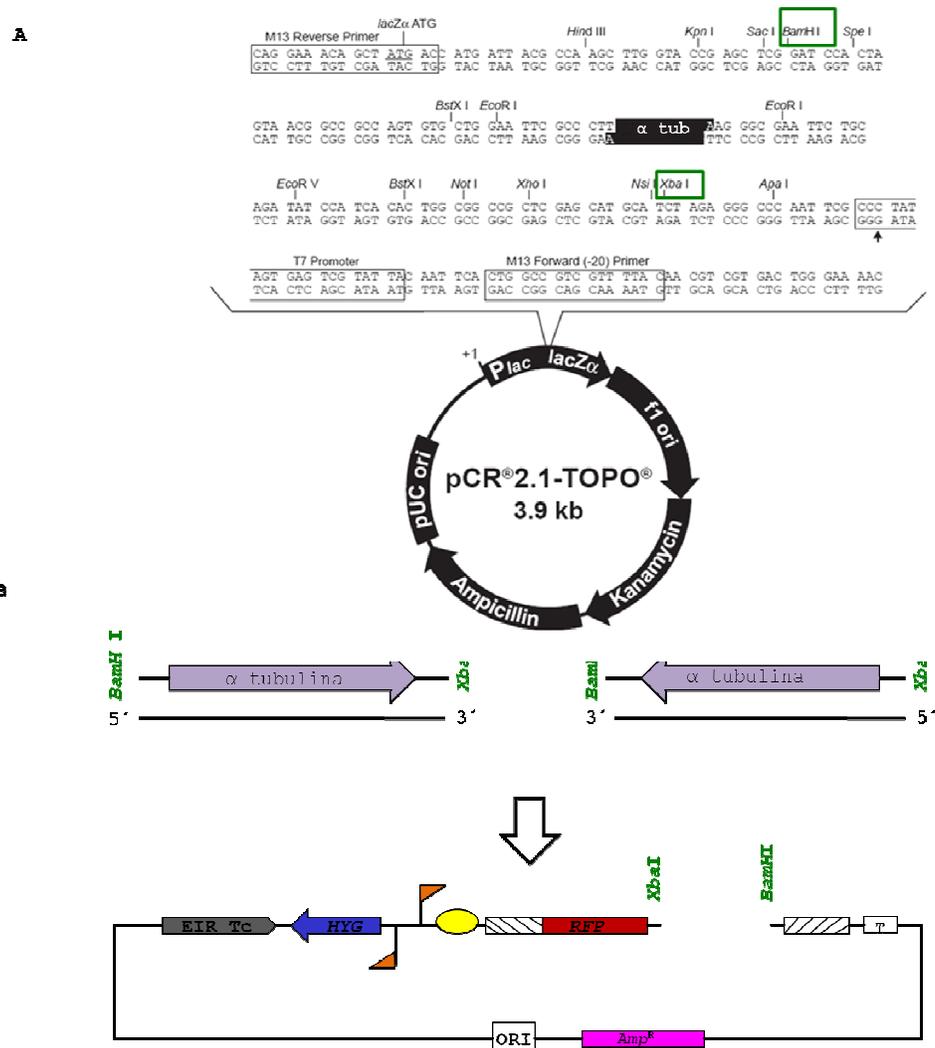


Figura 31.

Clonamiento de la región α tubulina en pTcIndex-RFP, esquema de la segunda estrategia.

A. Mapa Físico del vector pCR[®]2.1-Topo[®], se señala la ubicación del inserto de α tub, así como el sitio múltiple de clonamiento del vector, donde se destacan en recuadros los sitios *Bam*HI y *Xba*I. **B. Clonamiento dirigido del inserto α tubulina en el vector pTcIndex-RFP.** El esquema muestra la ubicación del inserto α tubulina en relación a las enzimas *Bam*HI y *Xba*I y la orientación de inserción propuesta en el vector pTcIndex-RFP.

tubulina en dirección 3'-5' (Figura 31B), exceptuando la banda de 452 pb, la cual no se pudo evidenciar por las bajas concentraciones de ADN utilizado en la reacción. Por otra parte el recombinante pTrTriatalfaTub 4 generó tres bandas claramente identificadas (Figura 31C, carril 5), las cuales presentan tamaños de 3,12 kb, 1,2 kb y 1,01 kb, correspondientes al patrón representado en el mapa físico del recombinante pTrTriatalfaTub que contiene al gen α tubulina en dirección 5'-3' (Figura 31A). Una vez comprobada la orientación del gen de α tubulina, se disponen de los dos recombinantes para obtener el gen α tubulina e insertarlo en el vector pTcIndex-RFP.

El próximo paso fue la linealización del vector pTcIndex-RFP con las enzimas *Bam*HI y *Xba*I, para el clonamiento dirigido del gen de alfa tubulina. El patrón observado arrojó resultados inesperados, en cuanto a la verificación de los sitios de restricción de ambas enzimas (Figura 33A). Según el mapa físico del vector pTcIndex-RFP los sitios de restricción para *Bam*HI y *Xba*I se encuentran en el sitio múltiple de clonamiento, por lo cual se esperaba que al cortar dicho vector con estas enzimas, se genere un solo fragmento de aproximadamente 8,6 kb que corresponde al tamaño del plásmido. En la figura 33B, se muestra la digestión del vector con ambas endonucleasas de forma secuencial.

Al digerir a pTcIndex-RFP primeramente con *Xba*I (Figura 31B, carril 3) o con *Bam*HI (Figura 31B, carril 5), ambas enzimas por separado linealizan al vector. Posteriormente el producto de cada una de estas digestiones se trató por separado con cloroformo:fenol, con la finalidad de eliminar a la primera enzima, se precipitó y se resuspendió en H₂O miliQ, para luego someter este producto a la digestión de la segunda enzima. El producto de digestión de *Xba*I se digirió nuevamente con la enzima *Bam*HI, y el

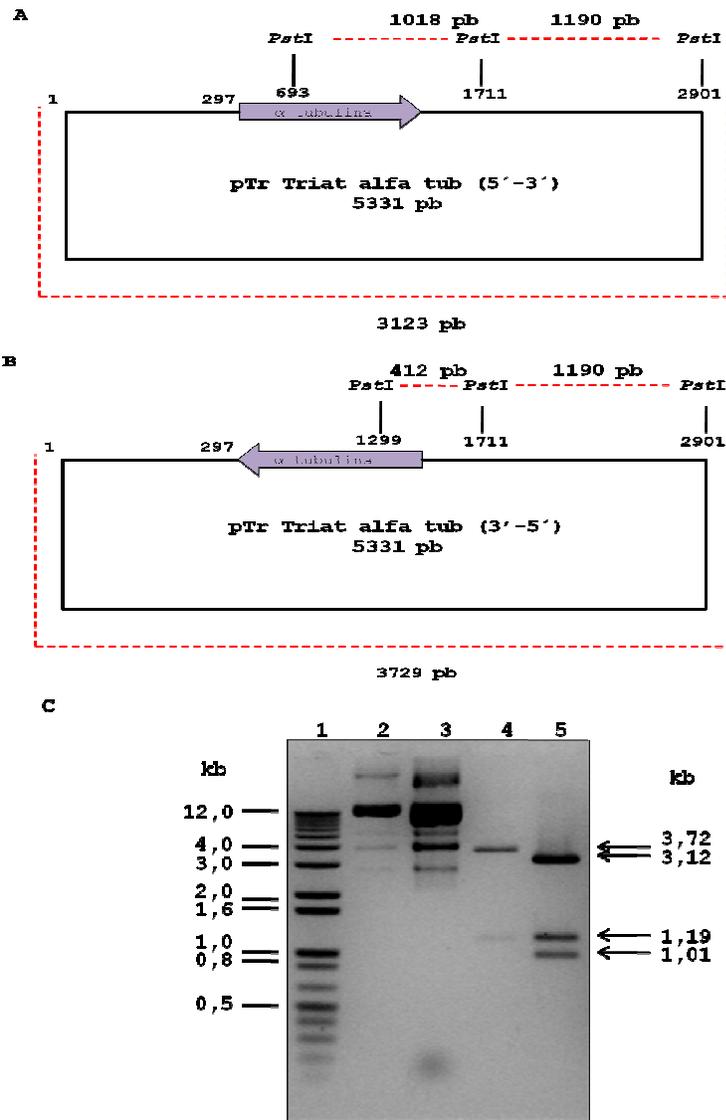


Figura 32.

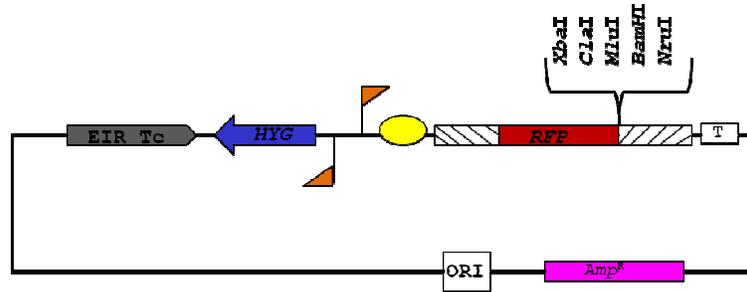
Caracterización de la dirección del gen alfa tubulina en los recombinantes pTrTriatalfaTub. **A.** Mapa Físico de pTrTriatalfatub con el gen α tub insertado en dirección 5'-3'. **B.** Mapa Físico de pTrTriatalfatub con el gen α tub insertado en dirección 3'-5'. En ambos mapas se señala la ubicación de los sitios de restricción para la enzima *PstI* y los tamaños de los fragmentos generados por su digestión en pb. **C. Patrón de restricción de los recombinantes pTrTriatalfatub 3 y pTrTriatalfatub 4 con la enzima PstI.** Electroforesis en gel de agarosa 1% en TAE 1X. **Carril 1.** Marcador de tamaño molecular, escalera 1 kb. **Carril 2.** pTrTriatalfatub 3. **Carril 3.** pTrTriatalfatub 4. **Carril 4.** pTrTriatalfatub 3 digerido con *PstI*. **Carril 5.** pTrTriatalfatub 4 digerido con *PstI*. Las flechas a la derecha indican el tamaño molecular en kb de los fragmentos generados al digerir ambos recombinantes con *PstI*.

producto de *BamHI* se digirió con *XbaI*. Estos dos ensayos generaron resultados similares (Figura 31B, carriles 4 y 6), observándose las bandas de 1,6 kb y 7 kb, lo que indica que ambas enzimas, si bien presentan un sitio único de restricción en el vector pTcIndex-RFP, ambas no se encuentran en el sitio múltiple de clonamiento según lo descrito en el mapa suministrado por Taylor y colaboradores, 2006. Los sitios de corte *XbaI* y *BamHI* están separados por 1600 pb, esta ubicación en los sitios de corte impidió la realización del clonamiento dirigido.

5.5.3. Tercera estrategia de clonamiento.

En base a los resultados observados en la segunda estrategia de clonamiento y evaluando otros sitios para un clonamiento dirigido se propone al plásmido pTcIndexI (previamente caracterizado, Figura 12B) como vector de clonamiento, para insertar al gen de alfa tubulina proveniente de los recombinantes pTrTriatalfaTub 3 y pTrTriatalfaTub 4, empleando en este caso las enzimas de restricción *BamHI* y *NotI*, las cuales generan extremos cohesivos. Ambas enzimas se encuentran ubicadas en el sitio múltiple de clonamiento del vector pTcIndexI, de esta manera se tienen las bases para realizar el clonamiento dirigido.

A



B

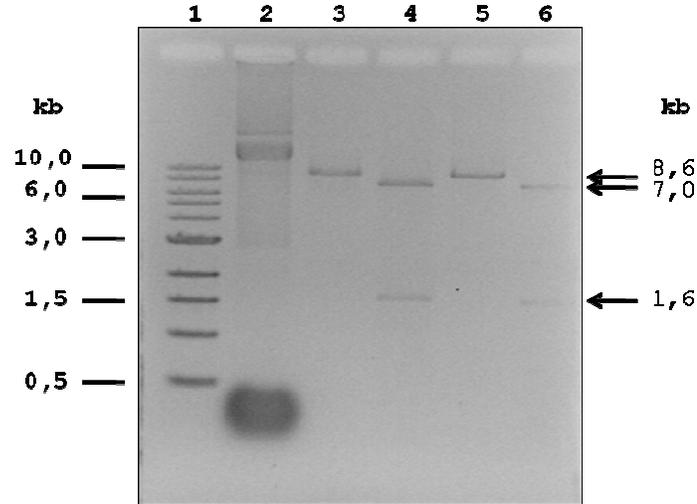


Figura 33.

Caracterización de los sitios *BamHI* y *XbaI* en pTcIndex-RFP.

A. Mapa Físico de pTcIndex-RFP, se señala la ubicación de las enzimas presentes en el sitio múltiple de clonamiento según el mapa suministrado por Taylor y colaboradores (2006). **B. Patrones de restricción de pTcIndex-RFP**. Electroforesis en gel de agarosa 1% en TAE 1X. **Carril 1**. Marcador tamaño molecular, escalera 1 kb. **Carril 2**. pTcIndex-RFP. **Carril 3**. pTcIndex-RFP digerido con *XbaI* (1). **Carril 4**. Producto de digestión pTcIndex-RFP/*XbaI* (1) digerido con *BamHI*. **Carril 5**. pTcIndex-RFP digerido con *BamHI* (1). **Carril 6**. Producto de digestión pTcIndex-RFP/*BamHI* (1) digerido con *XbaI*. Las flechas a la derecha indican el tamaño molecular en kb de las bandas generadas al digerir pTcIndex-RFP con *BamHI* y *XbaI*.

DISCUSIÓN

La incorporación de diversas herramientas para manipular los genomas de los Tripanosomatídeos, se ha venido desarrollando desde hace más de 12 años, constituyendo alternativas para el abordaje al estudio de las funciones de genes, que van desde el análisis de fenotipos hasta la pérdida de funciones, así como la localización de los mismos. Un área de particular interés es el estudio de la función de los genes implicados en la transmisión y virulencia de estos parásitos. Desde 1998 (Fire y Mello), se introdujo al grupo de herramientas genéticas, mecanismos de silenciamiento post-transcripcional vinculando a los sistemas de ARN de interferencia y ARN antisentido, los cuales permiten silenciar la expresión de un gen independientemente del número de copias presentes en el genoma. Estas valiosas herramientas, son utilizadas bajo una estructura compleja de un sistema que permita activar o inactivar los genes a voluntad. Por esta razón, en este trabajo nos hemos planteado crear las bases para una herramienta genética que no ha sido aplicada a *T. rangeli*, nos hemos enfocado en el “Knock-out” funcional mediante el mecanismo de ARN antisentido, acoplado al sistema de expresión condicional de genes ARNpT7/TetR (Campelo, 2007) en la cepa *T. rangeli* Triat-1, siendo el blanco para demostrar su funcionalidad el gen de α tubulina.

La factibilidad de funcionamiento del sistema de expresión condicional fue inicialmente demostrada por Campelo en el 2007, quien logró la expresión de fluorescencia roja condicionada a la inducción con tetraciclina, utilizando los vectores pLew13 episomal y pTcIndex-RFP.

Nuestro objetivo planteo la integración al genoma de los elementos de regulación de la transcripción, la ARNpT7 y el gen represor de tetraciclina (*TetR*), y la demostración del sistema ARN antisentido mediante la expresión condicional del gen de α tubulina en vectores derivados de pTcIndex.

Para lograr las bases del sistema de ARN antisentido, en primer lugar se procedió a la caracterización de los vectores a utilizar. Los perfiles de restricción obtenidos para los tres vectores analizados: pLew13, pTcIndex-RFP y pTcIndexI, correspondieron a los patrones esperados con cada una de las enzimas utilizadas, según reportado por Wirtz y colaboradores en 1999 para pLew13, así como los mapas reportados para pTcIndexI y pTcIndex-RFP por Taylor y Kelly en el 2006, con lo cual se evidenció que los vectores analizados corresponden a pLew13, pTcIndexI y pTcIndex-RFP.

Aún cuando estos vectores no fueron diseñados originalmente para *T. rangeli*, se ha demostrado que todos los elementos que lo conforman son capaces de condicionar la expresión del gen reportero bajo el control del promotor de la ARNpT7, la proteína represora TetR y la región operadora teto en este protozooario (Campelo, 2007).

Posterior a esta caracterización de los vectores, se procedió a la construcción de la línea estable *T. rangeli* Triat-1[pLew13], expresando los genes *NPT* y *ARNpT7*. La transfección de pLew13 estuvo dirigida a su inserción en el genoma del parásito, considerando la homología existente entre la región de β tubulina presente en el vector pLew13 proveniente de *T. brucei* y la secuencia parcial de β tubulina de *T. rangeli*. De esta transfección se obtuvieron cuatro líneas resistentes al antibiótico G418, lo que sugirió que las formas epimastigotes de cada uno de los clones transfectados con pLew13 están expresando el gen *NPT*. Estas líneas representaron la base que contienen los elementos necesarios para actuar en el sistema de ARN antisentido una vez que se transfecten con el vector de expresión condicional.

El análisis de la inserción del plásmido pLew13 en el genoma del protozooario, se realizó mediante un Southern Blot, cuyos resultados revelaron la presencia del plásmido de forma episomal en tres de los clones (clones 1, 3 y 4). Exceptuando al clon 2 donde se encontró un patrón de bandas diferentes, sugiriendo una inserción del vector en el genoma

del parásito. El análisis de la presencia de ADN plasmídico en las líneas clonales transfectadas con pLew13, así como la caracterización molecular de estos plásmidos determinaron que pLew13 se encontraba en forma episomal y que estaba presente el gen de la *ARNpT7*. Estos resultados fueron complementados con la detección de la ARNpT7, donde se pudo observar la expresión de la proteína en todos los clones a excepción del clon 2, aún cuando este clon era la línea donde pLew13 parecía haberse integrado al locus de β tubulina del parásito, no fue posible detectar la expresión del gen de la *ARNpT7*, polimerasa esencial para la inducción del sistema ARN antisentido propuesto.

Los resultados del Western blot (Figura 29B, carril 5), indicaron que el clon tres está expresando la ARNpT7 dos veces más en comparación a los clones 1 y 4, sugiriendo que esta línea es la adecuada para ser utilizada en las próximas fases de la determinación del sistema ARN antisentido.

En el análisis de las líneas *T. rangeli* Triat-1[pLew13], la expresión del gen *ARNpT7*, es una evidencia funcional de que las secuencias intergénicas del gen de la enzima aldolasa y de la actina provenientes de *T. brucei*, presentes a los extremos 5' y 3' del gen *ARNpT7* presentes en pLew13, fueron reconocidas por la maquinaria transcripcional de *T. rangeli*, y aportaron las señales necesarias para los mecanismos de procesamiento del ARN mensajero.

La estrategia de inserción de pLew13 en el genoma, utilizando la región del gen de β tubulina, sugirió la evaluación de la organización genómica del locus α - β tubulina en la cepa venezolana *T. rangeli* Triat-1.

Al realizar el Southern blot para la verificación del mapa de la región β - α de *T. rangeli* Triat-1, se determinó la ausencia del sitio de restricción para la enzima *HindIII* en el gen de α tubulina (grupo A). Este resultado coincidió con el reportado por Esquenazi y colaboradores (1989), quienes describen un polimorfismo en el sitio de corte para *HindIII* en el gen de α tubulina, presente en la cepa del amazonas brasileño, y ausente en la cepa

venezolana incluida en el análisis (Tabla 3). Para confirmar estos polimorfismos se analizó la secuencia de alfa tubulina de la cepa *T. rangeli* San Agustin (grupo B), y se encontró la presencia del sitio de restricción *Hind*III en el gen. Esta correspondencia del polimorfismo en el sitio *Hind*III, ausente en las cepas venezolanas y presentes en las cepas del Brasil, está en concordancia con el polimorfismo observado en las poblaciones naturales de *T. rangeli*, revelado con otros marcadores moleculares con los cuales se han identificado al menos dos grupos asociados a la distribución geográfica, producto de la interacción con las especies de vector (Da Silva y col, 2007). En base a esta correlación de las cepas, recomendamos utilizar este marcador en un número mayor de cepas de *T. rangeli* para determinar la identificación de las distintas sub-especies de *T. rangeli* y su asociación con los grupos poblacionales descritos con los criterios moleculares para la identificación de las distintas cepas de *T. rangeli*.

Tabla 3. Análisis comparativo de los patrones de restricción en el locus α - β tubulina en diferentes cepas de *T. rangeli*.

Cepas	Tamaños de los fragmentos generados e identificadas con las sondas α y β tubulina. (kb)		
	<i>Bam</i> HI	<i>Hind</i> III	<i>Pst</i> I
<i>T. rangeli</i> V (Esquenazi y col.,1989)	3.8 kb (α/β)	> 23,1 Kb (α/β)	2kb (α/β)
<i>T. rangeli</i> J (Esquenazi y col.,1989)	3.8 kb (α/β)	3.8Kb (α/β)	-
<i>T. rangeli</i> Triat-1	18kb (α/β) 8kb (α/β) 3,8kb (α/β) 1,5kb (β)	> 23,13kb (α/β)	8kb(α/β) 6kb (α/β) 3,8kb (α/β) 2kb (α/β)

T. rangeli V: cepa venezolana utilizada en el trabajo de Esquenazi y col, 1989.

T. rangeli J: cepa de la región amazónica del Brasil utilizada en el trabajo de Esquenazi y col, 1989.

T. rangeli Triat-1: cepa Venezolana perteneciente al grupo A (donada por el Dr. Néstor Añez) utilizada en el presente trabajo.

Se señala en paréntesis la sonda o sondas que hibridaron con la banda correspondiente

Por otra parte se trabajó en la construcción del vector de expresión condicional para demostrar la funcionalidad del sistema ARN antisentido en *T. rangeli*. El cual debe contener el gen que va a estar sujeto al efecto del ARN antisentido, en nuestro caso es el gen de α tubulina, siendo este el blanco que genera un fenotipo de células *FAT* si el sistema de ARN antisentido está presente en este protozoarios.

Con el propósito de insertar el gen de alfa tubulina en un vector de expresión condicional, se plantearon tres estrategias de clonamiento. Preferimos utilizar inicialmente al vector pTcIndex-RFP de manera de realizar un seguimiento de la inducción a través de la fluorescencia del gen reportero RFP. Sin embargo como se describió en los resultados las dos primeras estrategias que involucran a este vector fueron descartadas. La primera de ellas dirigida al clonamiento a partir de extremos romos en el extremo N-terminal de RFP, no dio resultados positivos para nuestros fines. La segunda estrategia planteada no se llevó a cabo, debido a que en el análisis de caracterización molecular se determinó que alguna de las dos enzimas a utilizar (*XbaI* y *BamHI*) para el clonamiento dirigido en el vector pTcIndex-RFP no se encuentra en el sitio múltiple de clonamiento. La incompleta descripción de los vectores disponibles, conjuntamente con las dificultades asociadas a los sitios de corte de las enzimas de restricción existentes, incidieron en el fracaso de los dos intentos experimentales planteados como estrategias de clonamiento (clonamiento en la región N-terminal de RFP a través del sitio *EcoRV* y el clonamiento dirigido a través de las enzimas *XbaI* y *BamHI* en el extremo C-termina de RFP). En el análisis alternativo para la obtención del vector para la expresión condicional del gen de α tubulina, hemos propuesto una tercera estrategia que plantea utilizar el vector pTcIndexI, para insertar el gen de α tubulina en dirección 5'-3' y 3'-5', a partir de un clonamiento dirigido utilizando las enzimas de restricción *NotI* y *BamHI*, presentes en los recombinantes pTrTriatalfatub 3 y pTrTriatalfatub 4 y en el sitio múltiple de clonamiento del vector pTcIndexI.

Con la construcción del vector expresión condicional pTcIndexI insertando al gen de alfa tubulina en dirección 5'-3' y 3'-5', y la línea clonal 3 *T. rangeli* Triat-1[pLew13] expresando en gen de la *NPT* y de la *ARNpT7*, se tienen las bases para determinar el sistema de ARN antisentido en la cepa *T. rangeli* Triat-1, siendo este el objetivo futuro de este trabajo, donde se espera que las alteraciones en la morfología celular ("*FAT cells*") sean una evidencia de que ha ocurrido interferencia en la expresión del gen de α tubulina.

La disponibilidad de esta tecnología en *T. rangeli* representa una valiosa herramienta en el análisis funcional de genes propios y de otras especies, involucrados en la patogenicidad y resistencia a drogas, así como la expresión de proteínas de diferentes estadios del ciclo celular, la sobreexpresión de proteínas y generación de mutantes mediante el silenciamiento génico. En este sentido consideramos de gran importancia continuar con el estudio del mecanismo post-transcripcional de ARN antisentido.

CONCLUSIONES

Como parte del proceso en la construcción de herramientas para el estudio genético funcional de los Trypanosomas americanos, en este trabajo avanzamos en la estrategia para demostrar la factibilidad de implementar el sistema de inactivación de genes *Knock out* funcional utilizando ARN antisentido.

Fue posible construir líneas clonales estables de *Trypanosoma rangeli* conteniendo al vector pLew13 de forma episomal, y expresando constitutivamente a los genes *NPT* y *ARNpT7* cubriendo las siguientes etapas:

7.1. Se obtuvieron líneas estables transfectadas con pLew13 de la cepa *T. rangeli* Triat-1.

7.2. Se derivaron líneas clonales de *T. rangeli* Triat-1 en las cuales se determinó la ubicación episomal del vector pLew13, mediante análisis de hibridación Southern y la expresión constitutiva de la ARNpT7 en experiencia de Western blot.

7.3. La construcción del vector condicional para la expresión del ARN antisentido encontró dificultades técnicas y experimentales, y plasmó la implementación de tres estrategias de clonamiento utilizando dos versiones del vector pTcIndex: los vectores pTcIndex-RFP y pTcIndexI. La resolución de estos problemas experimentales demostró que uno de los sitios de corte único de las enzimas *XbaI* y *BamHI*, está ubicado 1600 pb fuera del sitio múltiple de clonamiento del vector pTcIndex-RFP, descartando la posibilidad de utilizarlo en el clonamiento dirigido planteado.

7.4. Como parte del proceso de construcción de un vector de expresión condicional pTcIndex, se determinó la dirección de inserción del gen de α tubulina en el sitio múltiple de clonamiento en los recombinantes pTrTriatalfatub 3 y pTrTriatalfatub 4, como paso previo para su uso en el clonamiento dirigido en el vector pTcIndexI.

7.5. La caracterización molecular del locus α - β tubulina reveló la presencia de un polimorfismo asociados al sitio *Hind*III del locus de α tubulina en las cepas de *T. rangeli*, presente en la cepa de San Agustín y ausente en la cepa Trait-1. Este polimorfismo esta posiblemente asociado los grupos poblacionales descritos en *T. rangeli* y proponemos que sea analizado como un marcador molecular.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alibu, V.P., Storm, L., Haile, S., Clayton, C., Horn, D. 2005. A doubly inducible system for RNA interference and rapid RNAi plasmid construction in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **139**: 75-82.
2. Araya, J., Cano, M., Gomes, H., Novak, E., Requena, J., Alonso, C., Levín, M. y colaboradores. 1997. Characterization of an interspersed repetitive DNA element in the genome of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology.* **115**: 563-570.
3. Basseri, H.R., Tew, I.F., Ratcliffe, N.A. 2002. Identification and distribution of carbohydrate moieties on the salivary glands of *Rhodnius prolixus* and their possible involvement in attachment/invasion by *Trypanosoma rangeli*. *Exp. Parasitol.* **100**:226-234.
4. Beverly, S., Akopyants, N., Goyerd, S.; Matlib, R., Gordon, J., Brownstein, B., Stormo, G. y colaboradores. 2002. Putting the *Leishmania* genome to work: functional genomics by transposon trapping and expression profiling. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* **357**: 47-53.
5. Beverly, S.M. 2003. Protozomics: Trypanosomatid parasite genetics come age. *Nature.* **4**: 11-19.
6. Campbell, D., Thomas, S., Sturn, N. 2003. Transcription in Kinetoplastid protozoa: why be normal?. *Microbes and infection* **5**: 1231-1240.
7. Campbell, D., Thomas, S., Sturn, N. 2007. The untranslated regions of Genes from *Trypanosoma cruzi*: perspectives for functional characterization of strains and isolates. *Mem. Inst Oswaldo Cruz.* **102**: 577-578.
8. Campelo, R. 2007. Adaptación de un sistema de expresión condicional de genes mediado por tetraciclina al parásito americano *Trypanosoma rangeli*. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
9. Cuba C. 1998. Revisión de los aspectos biológicos y diagnósticos de *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **31**: 207-220.
10. D'Alessandro-Bacigalupo, A. 1963. The life cycle of *Trypanosoma rangeli* in triatomid bugs as it occurs in nature. *Bull. Tul. Univ. Med. Fac.* **23**: 21-30.
11. D'Alessandro-Bacigalupo, A., Saravia, N.G. 1992. *Trypanosoma rangeli*. En *Parasitic Protozoa*, Second Edition, Academy Press. **2**:1-54.
12. Da Rocha, W., Otsu, K., Teixeira, S., Donelson, J. 2004. Test of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem.* **113**:175-186.
13. Da Silva, M., Junqueira, A., Campaner, M., Rodrigues, C., Crisante, G., Ramirez, L., Caballero, C. 2007. Comparative phylogeography of *Trypanosoma rangeli* an *Rhodnius*

(Hemiptera:Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vectors. *Mol. Ecol.* **16**: 3361-3373.

14. Dikxhorn, D.M., Novina, C.D., Sharp, P.A. 2003. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nature.* **4**: 457-467.

15. Esquenazi, D., Morel, C., Traub-Cseko., Y. 1989. Characterization of tubulin genes in *Trypanosoma rangeli*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **34**: 253-260.

16. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C. 1998. Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* **391**: 806-811.

17. Giles, R. 2000. Antisense oligonucleotide technology: from EST to therapeutics. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2**: 238-252.

18. Graham, S. 1995. Mechanism of stage-regulates gene expression in Kinetoplastida. *Parasitol. Today.* **11**:217-224.

19. Guevara, P. 2007. Manual de Laboratorio Identificación y Diagnóstico Molecular de Microorganismos. Caracas, Venezuela.

20. Guevara, P., Dias, M., Rojas, A., Crisante, G., Abreu-Blanco, M.T., Umezawa, E., Vazquez, M., Levin, M., Añez, N. y colaboradores. 2005. Expression of Fluorescent Genes in *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): its application to parasite-vector biology. *J. Med. Entomol.* **42**: 48-56.

21. Hariharan, S., Ajioka, J., Swindle, J. 1993. Stable transformation of *Trypanosoma cruzi*: inactivation of the *PUB12.5* polyubiquitin gene by targeted gene disruption. *Mol. Biochem. Parasitol.* **57**:15-30.

22. Harlow, E., Lane, D. 1998. Antibodies: A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press.

23. Kernodle, D.S., Voladri, R.K.R., Menzies, B.E., Hager, C.C., Edwards, K.M. 1997. Expression of antisense *hla* fragments in *Staphylococcus aureus* reduces alpha-toxin production in vitro and attenuates lethal activity in murine model. *Infect. Immun.* **65**: 179-184.

24. Kushnir, S., Gase, K., Breitling, R., Kirill, A. 2005. Development of an inducible protein expression system based on the protozoan host *Leishmania tarentolae*. *Protein. Expres. Purif.* **42**: 37-46.

25. Liang, X., Liu, Q., Michaeli, S. 2003. Small nucleolar RNA interference induced by antisense or double-stranded RNA in trypanosomatids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**: 7521-7526.

26. Ngo, H., Tschudi, C., Gull, K., Ullu, E. 1998. Double stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **35**: 14687-14692.
27. Pifano, F.; Meyer, M. 1949. Hallazgo de formas evolutivas del *Trypanosoma rangeli* en el jugo de la trompa del *Rhodnius prolixus* de Venezuela. *Arch. Venezolanas. Patol. Trop. Parasitol. Med.* **1**:153-158.
28. Puerta, C. 2007. Parásito, genoma y biología. Aproximación molecular al estudio del *Trypanosoma rangeli* y su relación con *Trypanosoma cruzi*. Primera Edición. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia.
29. Rodríguez-Mesa, E. 2005. Identificación y caracterización genética de una transposasa putativa en *Trypanosoma rangeli*. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
30. Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbour Laboratory Press*.
31. Taylor, M., Kelly, J. 2006. pTcIndex: a stable tetracycline-regulated expression vector for *Trypanosoma cruzi*. *BMC Biotechnology*. **6**:32-50.
32. Toaldo, C., Steindel, M., Sousa, M., Tavares, C. 2001. Molecular karyotype and chromosomal localization of genes encoding β -tubulin, cysteine proteinase, hsp 70, and actin in *Trypanosoma rangeli*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **96**:113-121.
33. Tobie, E.J. 1965. Biological factors influencing transmission of *Trypanosoma rangeli* by *Rhodnius prolixus*. *J. Parasitol.* **51**: 837-841.
34. Ullu, E., Tschudi, C., Chakraborty, T. 2004. RNA interference in protozoan parasites. *Cell. Microbiol.* **6**: 509-519.
35. Vargas, N., Souto, R., Carranza, J.C., Vallejo, G. A., Zingales, B. 2000. Amplification of a specific repetitive DNA sequence for *Trypanosoma rangeli*. Identification and its potential application in epidemiological investigations. *Exp. Parasitol.* **96**: 147-159.
36. Wang, Z., Morris, J.C., Drew, M.E., Englund, P.T. 2000. Inhibition of *Trypanosoma brucei* gene expression by RNA interference using an integrable vector with opposing T7 promoters. *J. Bio. Chem.* **275**: 40174-40179.
37. Wen, L., Benegal, G., Carvaho, M., Butler, D., Back, G. 2001. *Trypanosoma cruzi*: Exogenously regulated gene expression. *Exp. Parasitol.* **97**: 196-204.
38. Wirtz, E., Clayton, C. 1995. Inducible gene expression in trypanosomes mediated by prokaryotic repressor. *Science*. **268**: 1179-1183.

39. Wirtz, E., Leal, S., Ochatt, C., Cross, G.A.M. 1999. A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **99**: 89-101.
40. Yan, S., Myler, P., Sturat, K. 2001. Tetracycline regulated gene expression in *Leishmania donovani*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **112**: 61-69.
41. Yao, C., Luo, J., Hsiao, C., Donelson, J., Wilson, M. 2007. *Leishmania chagasi*: a tetracycline-inducible cell line driven by T7 RNA polymerase. *Exp. Parasitol.* **116**: 205-213.
42. Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P., Bartel, D.P. 2000. RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependant cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell.* **101**:25-33.
43. Zeledón, R., Blanco, E. 1965. Relaciones huésped-parásito en *Trypanosoma rangeli*. Infección intestinal y hemolinfática comparativa de *Rhodnius prolixus* y *Triatoma infestans*. *Rev. Biol. Trop.* **13**: 143-165.