

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



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE UN ELEMENTO MÓVIL  
BACTERIANO EN EL GENOMA DE *Trypanosoma rangeli* Y OTROS  
TRYPANOSOMATIDAE.**

**Trabajo Especial de Grado.**

Presentado ante la ilustre Universidad Central de  
Venezuela, por el Br. Alejandro García, como requisito  
Parcial para optar al título de Licenciado en Biología.

Tutor: Dra. Palmira Guevara Trejo.

**LABORATORIO DE GENÉTICA MOLECULAR**

**IBE-UCV**

**Caracas, Septiembre del 2012**

## INDICE GENERAL

<b>Índice General</b>	i
<b>Índice de Figuras</b>	iv
<b>Índice de Tablas</b>	vi
<b>Índice de <i>Abreviaturas</i></b>	vii
<b>Resumen</b>	viii
<b>1. Introducción</b>	1
1.1 Aspectos Biológicos de <i>Trypanosoma rangeli</i>	1
1.1.1 Ubicación geográfica	4
1.1.2 Ciclo de Vida	5
1.1.3 Relación con el vector y hospedador	8
1.1.3.1 Vector	8
1.1.3.2 Hospedador vertebrado	10
1.2 Genoma de <i>T. rangeli</i>	13
1.2.1 Tamaño y organización	13
1.2.2 Expresión génica	16
1.3 Elementos móviles transponibles	18
1.3.1 Estructura y organización	18
1.3.2 Elementos móviles en Tripanosomátidos	23
1.3.3 Transferencia Horizontal de genes	27
<b>2. Antecedentes</b>	30
<b>3. Objetivos</b>	34
<b>4. Materiales y Métodos</b>	35
4.1 Cultivo de parásitos	35
4.2 Preparación de tacos de ADN cromosomal	36
4.3 Aislamiento de ADN genómico y cromosomal	37
4.4 Análisis de ADN mediante electroforesis en geles de agarosa	38
4.5 Tipificación de los aislados de tripanosoma por medio de PCR	39

4.6 Ensayo de PCR para amplificar una región de 450 pb de la transposasa IS10 en <i>T. rangeli</i> y otros tripanosomátidos	41
4.7 Evaluación de muestras de contenido intestinal proveniente de vectores, preservadas en papel FTA para la presencia de la transposasa IS10	42
4.8 Electroforesis de campo pulsado	43
4.9 Transferencia de ADN por capilaridad	44
4.10 Obtención y marcaje de sondas de ADN	45
4.11 Hibridación de electrocariotipos	46
4.12 Análisis de la secuencia STR107 en los bancos de datos	47
<b>5. Resultados</b>	<b>48</b>
5.1 Tipificación de las cepas de tripanosomátidos utilizadas mediante ensayos de PCR especie específica	48
5.1.1 PCR de secuencia repetitiva P542. <i>T. rangeli</i>	50
5.1.2 PCR de secuencias repetitivas dispersas Clon 6. <i>T. cruzi</i>	53
5.1.3 PCR Kinetoplasto, amplifica una región conservada del ADN mitocondrial de <i>Leishmania</i>	53
5.2 Análisis de la secuencia del recombinante STR107 en los Bancos de datos	57
5.3 Evaluación de la presencia del elemento móvil bacteriano IS10 mediante PCR en diferentes cepas de <i>T. rangeli</i> y otros Tripanosomadidos	59
5.4 Evaluación de la presencia de elemento móvil bacteriano IS10 Mediante PCR en el contenido intestinal del triatomino	67
5.5 Evaluación molecular para descartar la presencia de contaminantes bacterianos en medios de cultivo de <i>T. rangeli</i> como fuente de la transposasa IS10.	71

5.6	Análisis de la ubicación y organización genómica del elemento Móvil bacteriano IS10 mediante hibridación molecular con sondas de ADN marcadas con dogoxigenina, en perfiles de electrocariotipos de diferentes cepas de <i>T. rangeli</i> y otros Tripanosomátidos	73
5.6.1	Marcaje de sondas con digoxigenina	73
5.6.2	Análisis de electrocariotipos de los tripanosomátidos	74
5.6.3	Hibridación molecular con sondas de ADN marcadas con Digoxigenina, en perfiles de electrocariotipos de diferentes cepas de <i>T. rangeli</i> y otros tripanosomátidos.	91
<b>6.</b>	<b>Discusión</b>	94
<b>7.</b>	<b>Conclusiones</b>	109
<b>8.</b>	<b>Bibliografía</b>	111

## INDICE DE FIGURAS

1. Distribución geográfica de <i>Trypanosoma rangeli</i> y <i>Trypanosoma cruzi</i> en el Continente americano.	4
2. Ciclo de vida de <i>T. rangeli</i> en el hospedador invertebrado	7
3. Mecanismo de procesamiento de ARN en tripanosomátidos	17
4. Tipos y estructura de Elementos Móviles	21
5. Anclaje de los oligonucleótidos diseñados sobre la secuencia de la transposasa	32
6. ADN cromosomal aislados de tacos de Agarosa de diferentes tripanosomátidos	51
7. Tipificación de los aislados de <i>T. rangeli</i> mediante PCR P542	52
8. Tipificación de los aislados de <i>T. cruzi</i> mediante PCR clon 6	54
9. PCR P542 para los aislados de <i>T. cruzi</i> .	55
10. Tipificación de los aislados de <i>Leishmania</i> mediante PCR ADNk.	56
11. Secuencia del recombinante STR107 e hibridación los oligos Tr24/Tr25.	60
12. PCR transposasa Tr24/Tr25 del templado STR107.	61
13. Ensayo de PCR para determinar la presencia de transposasa IS10 en diferentes Tripanosomátidos, tacos de agarosa ADN cromosomal	63
14. Ensayo de PCR para determinar la presencia de la transposasa IS10 en diferentes tripanosomátidos. ADNg conservado en TE	65
15. PCR transposasa Tr24/Tr25 utilizando como templado una mezcla entre el recombinante STR107 y ADN cromosomal	66
16. Ensayo de PCR para determinar la presencia de la transposasa. Papel FTA	69
17. Ensayo de PCR para determinar la presencia de la transposasa. Líquido	70
18. Descartar la presencia de contaminantes bacterianos en medios de cultivo	72

19. Marcaje de sondas con digoxigenina. Transposasa y Telomerasa	75
20. Marcaje de sondas con digoxigenina. Telomeros <i>T. rangeli</i> y <i>T. cruzi</i>	76
21. Análisis de electrocaritipos de ADN genómico de diferentes tripanosomatidos Gel N°1	78
22. Análisis de electrocaritipos de ADN genómico de diferentes tripanosomatidos Gel N°2	79
23. Análisis de electrocaritipos de ADN genómico de diferentes tripanosomatidos Gel N° 3	80
24. Análisis de electrocaritipos de ADN genómico de diferentes tripanosomatidos Gel N° 4	81
25. Análisis de electrocaritipos de ADN genómico de diferentes tripanosomatidos Gel N° 5	82
26. Análisis de electrocaritipos de ADN genómico de diferentes tripanosomatidos Gel N° 6	83
27. Análisis de electrocaritipos de ADN genómico de diferentes tripanosomatidos Gel N° 7	84
28. Análisis de electrocaritipos de ADN genómico de diferentes tripanosomatidos Gel N° 8	85
29. Análisis de electrocaritipos de ADN genómico de diferentes tripanosomatidos Gel N° 9	86
30. Análisis de electrocaritipos de ADN genómico de diferentes tripanosomatidos Gel N° 10	87
31. Análisis de electrocaritipos de ADN genómico de diferentes tripanosomatidos Gel N° 11	88
32. Detección del marcaje con digoxigenina	93

## INDICE DE TABLAS

Parámetros epidemiológicos de la Enfermedad de Chagas	3
Distribución de vectores <i>Rhodnius</i> en América	9
Elementos transponibles reportados en tripanosomátidos	24
Aislados de diferentes tripanosomátidos utilizados en este estudio	49
Análisis de la homología en el banco de datos de la secuencia STR107	57
Clasificación de las muestras del contenido intestinal de triatomino	68
Rango de tamaño y número de cromosomas de los tripanosomátidos	90
Casos de secuencias reportadas en el proyecto TriTryp que son de origen Bacteriano	100

## INDICE DE ABREVIATURAS

ADN	Acido Desoxirribonucleico
ADNg	Acido Desoxirribonucleico genómico
ADNk	Acido Desoxirribonucleico del cinetoplasto
ARN	Acido Ribonucleico
ARNm	Acido Ribonucleico mensajero
dNTP	Dideoxynucleotido
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
SDS	Dodecil Sulfato
TAE	Tampón tris-acetato
TE	Tampón tris-sal sódica de etilen dietil tetra acetato
TBE	Tampón tris-borato
EDTA	Sal Sódica de etilen dietil tetra acetato
TAFE	Campos Eléctricos Alternantes Transversales
Dig	Digoxigenina
EnCh	Enfermedad de Chagas
<i>g</i>	Gravedad
pb	Pares de base
kb	Kilopares de base
µg	Microgramo
mg	Miligramo
mL	Mililitro
µL	Microlitro
mM	Milimolar
µM	Micromolar
min	Minutos
seg	Segundos
M	Molar
N	Normal
PM	Peso molecular



## RESUMEN

*Trypanosoma rangeli*, descrito por primera vez en 1920 en Venezuela por Tejera, es un protozoo del subgénero *Herpetosoma*, familia Trypanosomatida, orden *kinetoplastida*. Esta familia incluye parásitos de alta importancia médica, causantes de un espectro de patologías como la Enfermedad de Chagas, causada por *T. cruzi*, la enfermedad del sueño, producida por *T. brucei*, y los diversos cuadros clínicos que generan especies de *Leishmania*. El *T. rangeli* aunque infecta a su hospedador vertebrado, no se ha probado ser patógeno, la importancia médica de los estudios de *T. rangeli* es evaluada en el contexto de su relación con *T. cruzi*, ya que ambos parásitos comparten una distribución geográfica, vectores y hospedadores vertebrados, generando infecciones mixtas en vectores produciéndose así una alta reactividad inmunológica cruzada, dificultando la detección de la enfermedad de Chagas mediante pruebas serológicas cuando está presente *T. rangeli*.

El desarrollo de los proyectos genoma de algunos Tripanosomátidos, como *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania major* (TriTryp), ha permitido obtener una mejor comprensión de las características de su genoma. Un análisis comparativo de los genomas completos de estos tripanosomátidos, revela que tienen un porcentaje del genoma altamente conservado, compuesto de genes para funciones celulares o zonas codantes, y un excedente de ADN extremadamente dinámico y predominantemente compuesto de poblaciones variadas de elementos móviles transponibles (Transposones). Durante los últimos años se ha generado una gran cantidad de evidencia, que describe a los transposones cumpliendo ciertas funciones celulares, permitiendo conocer cuáles son las contribuciones de estos transposones al genoma del hospedador, con especial interés en el papel que juegan en la patogenicidad y virulencia. Por esta razón, en el presente trabajo se ha avanzado en la caracterización molecular de un elemento móvil bacteriano IS10 en el genoma de los tripanosomátidos, por medio de análisis de PCR específicos para amplificar una región del elemento móvil IS10, y por técnicas de hibridación molecular. Los resultados confirman la presencia del elemento móvil IS10 en el genoma de *T. rangeli* Triatomino y *T. rangeli* San Agustín. Se investigó sobre el origen del IS10, evaluando su presencia por medio de PCR en el contenido intestinal de triatominos, y en medios de cultivos de parásitos, descartando que el origen del reporte del IS10 en los tripanosomátidos, se deba a una contaminación bacteriana en los medios de cultivos donde se mantienen las cepas de estudio.

En análisis de los perfiles de electrocariotipos de los tripanosomátidos permitió obtener rangos de tamaños de peso molecular y número de cromosomas de la gran mayoría de las cepas analizadas, desde 400 a 1500 kb para las cepas de *T. rangeli*, entre 500 – 1400 kb para las cepas de *T. cruzi*, y para las cepas de *Leishmania* los tamaños cromosomales se encontraron desde 250 – 1500 kb, además de ser una herramienta muy valiosa que nos permitirá ubicar cromosómicamente la presencia del elemento móvil IS10.

El análisis comparativo en las bases de datos (GenBank) de los reportes para la presencia del elemento móvil IS10 han aumentado en los últimos 2 años (2010-2012), cada vez hay más reportes de este elemento móvil bacteriano en el genoma de organismos eucariotas, lo que fortalece la idea de que estamos ante la presencia de un evento de transferencia lateral de genes entre procariontes y eucariotas.

## I. INTRODUCCIÓN.

En el siguiente trabajo, nos proponemos la caracterización molecular de un elemento móvil de origen bacteriano, en el genoma de *Trypanosoma rangeli* y otros tripanosomátidos. En esta primera parte realizamos una revisión de las características biológicas y moleculares de *Trypanosoma rangeli*, con especial interés en su relación con *Trypanosoma cruzi*. Revisamos el ciclo de vida, la ubicación geográfica, la relación del parásito con el vector y hospedador, enfocándonos en las interacciones moleculares entre ellos. Se hace una descripción de su genoma, denotando la presencia de elementos móviles transponibles descritos para los tripanosomátidos, para finalmente enmarcarnos en el tema central de este trabajo, la transferencia horizontal de genes entre organismos procariontes y eucariotes.

### **1.1 Aspectos Biológicos de *Trypanosoma rangeli*.**

*Trypanosoma rangeli*, descrito por primera vez en Venezuela por Tejera en 1920, es un protozoario del Subgénero *Herpetosoma*, Familia Trypanosomatidae, Orden Kinetoplastida. Dentro de la familia Trypanosomatidae se encuentran parásitos causantes de diferentes enfermedades como la enfermedad de Chagas (EnCh) en el continente americano, causado por el *Trypanosoma cruzi*, también la llamada enfermedad del sueño en África, producida por el *Trypanosoma brucei*, y varias especies del género *Leishmania*

causantes un espectro de enfermedades denominadas leishmaniasis en las regiones tropicales y subtropicales de varios continentes.

La organización mundial de la salud (OMS) para Junio del 2010 estimó que alrededor de 10 millones de personas estaban infectadas con *Trypanosoma cruzi*, entre un 18 - 30 % de esas personas infectadas desarrollan problemas cardíacos y otro porcentaje menor presentan diferentes alteraciones digestivas, neurológicas o ambas. En el 2006 TDR (Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases) publicó en su reporte anual sobre la enfermedad de Chagas, analizando diferentes parámetros epidemiológicos como muertes anuales, casos de infección humana, población en riesgo de infección, entre otros, donde se evidencio un descenso de estos parámetros hasta en un 50 % desde 1990 hasta el 2006 (Tabla 1). En el caso de Venezuela, se estimó que de un total de 7 millones de habitantes, 500 mil estaban infectados por *Trypanosoma cruzi*, en el año 1960 esta cifra fue descendiendo, reportándose un descenso de 45 % a 9,8 % entre 1958-1998 (Ache y Matos, 2001). Sin embargo, parece existir un resurgimiento de la enfermedad, basándose en el análisis serológico para la detección de *T. cruzi* en pacientes desde 1988-2002, se encontró que 57 % (174/304) de pacientes de 10 estados diferentes del país, estaban infectados, con un 38 % de estas infecciones pertenecientes a niños menores de 10 años, lo que sugiere una transmisión activa. (Añes y col., 2004).

Vale la pena mencionar ciertos episodios de contaminación ocurridos en los últimos años en Venezuela, particularmente a través de la ingesta de alimentos contaminados con heces de chipos, reportados en el valle de Caracas (2007 y 2010).

**Tabla 1. Parámetros epidemiológicos de la enfermedad de Chagas**

Parámetros Epidemiológicos	1990 (N° de personas)	2000 (N° de personas)	2006 (N° de personas)
Muertes Anuales	>45,000	21,000	12,500
Casos de Infección Humana	30 Millones	18 Millones	15 Millones
Casos nuevos por año	700,000	200,000	41,200
Población en riesgo	100 Millones	40 Millones	28 Millones
Numero de países	21	21	21

Fuente: Página web “Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases/OMS”.

En el caso de *Trypanosoma rangeli*, se ha encontrado que aunque infecta a los humanos, no se han observado patologías asociadas hasta el momento (D Alessandro-Bacigalupo y Saravia, 1992). Los estudios sobre *Trypanosoma rangeli*, cobran importancia debido a su relación con *Trypanosoma cruzi*, causante de la EnCh, con el cual comparte una ubicación geográfica, reservorios, vectores y hospedadores vertebrados, presentando lo que se conoce como reacción inmunológica cruzada en el hospedador (D Alessandro-Bacigalupo y Saravia, 1999), la presencia de *T. rangeli* interfiere en el diagnóstico y epidemiología de la enfermedad de Chagas.

### 1.1.1 Ubicación Geográfica.

La distribución de *T. rangeli*, al igual que la de *T. cruzi*, se ubica en América Central y del Sur. *T. rangeli* se ubica mayoritariamente en países como Brasil, Colombia, Guatemala, Panamá y Venezuela. (Figura 1) (Guhl y col, 2003). De igual manera se han encontrado reportes de la presencia de *T. cruzi* en Norte América (Karsten y col., 1992; Dorn y col., 2012).



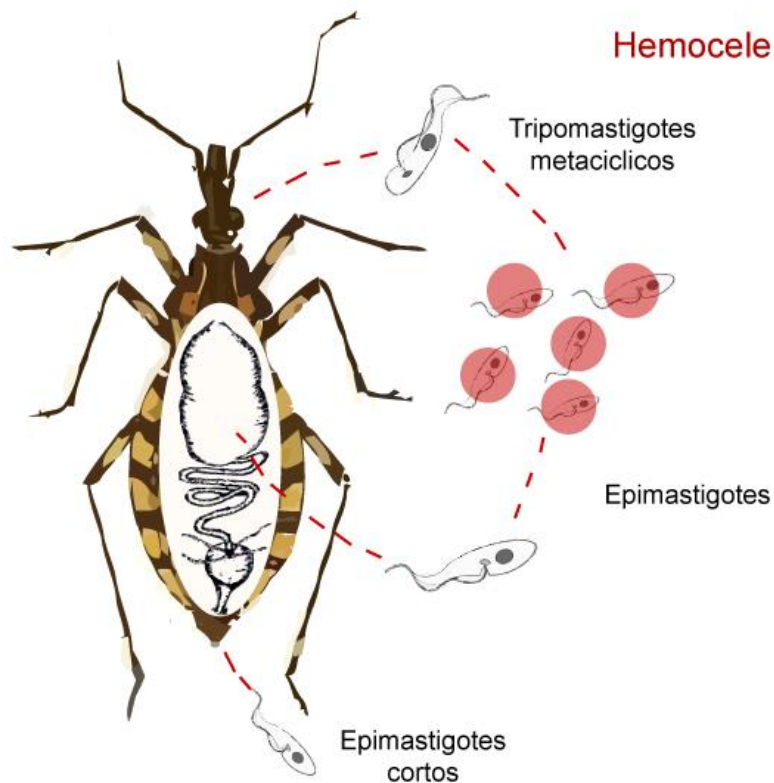
**Figura 1. Distribución geográfica de *Trypanosoma rangeli* y *Trypanosoma cruzi* en el continente americano.** En el mapa, se muestra la distribución geográfica de *T. rangeli*, identificada con la letra "r", *T. cruzi* identificado con la letra "c", observándose la sobreposición de la distribución geográfica de ambos parásitos (Tomado con modificaciones de Grisard y col., 1999).

### 1.1.2 Ciclo de vida

Existen diferencias marcadas entre *T. rangeli* y *T. cruzi* con respecto al ciclo de vida. El ciclo de vida de *T. rangeli* en el hospedador vertebrado es poco conocido, pero en su vector invertebrado se ha descrito con detalle, en la figura 2 se muestra el ciclo de vida de *T. rangeli* en uno de los vectores, el insecto de la familia *Reduviidae*, Triatomino. Independientemente de la cepa, el comportamiento de *T. rangeli* en el vector mantiene un patrón general, (D Alessandro y Saravia, 1992). En condiciones naturales, el vector se infecta a través del proceso de alimentación, cuando toma los tripomastigotes sanguíneos de los reservorios infectados. Estos tripomastigotes se transforman a epimastigotes en la parte media del tracto digestivo, donde se multiplican por fisión binaria. Se ha observado que *T. rangeli* logra invadir la hemolinfa utilizando una ruta intracelular dentro de una vacuola parasitófora pasando así a través del epitelio del intestino (Hecker y col., 1990). Sin embargo, otros autores proponen que *T. rangeli* invade la hemolinfa con un mecanismo distinto al de la vacuola parasitófora, por medio de la adhesión a la pared del intestino para su posterior penetración hacia la hemolinfa, estas observaciones han sido respaldadas por medio de microscopía electrónica, donde se ha podido evidenciar daño celular de la pared intestinal (García y col., 2012). Se ha observado que el tiempo para la invasión a la hemolinfa alcanza un promedio de 50 días después de la infección, para un intervalo de 15-180 días, dependiendo de la cepa de *T. rangeli* y el vector (D Alessandro y Saravia, 1999). Vale acotar que algunos parásitos logran alcanzar el recto y son rápidamente excretados, pero no colonizan la pared rectal, esto representa una de las

diferencias con *T. cruzi* el cual si coloniza la pared rectal alcanzado su forma infectiva (D Alessandro y Saravia, 1992). Una vez estando el parasito en la hemolinfa, puede ser reconocido al activar el sistema de defensa del vector del cual logra escaparse, colonizando así los hemocitos donde se ha observado su multiplicación, para finalmente alcanzar así las glándulas salivares donde desarrolla su forma infectiva, tripomastigote metacíclico (Feder y col., 1999). El parásito se adhiere a la superficie de las glándulas salivares por medio de ciertos carbohidratos específicos con residuos de N-acetil-glucosamina, manosa, N-acetil-galactosamina y fucosa, cumpliendo funciones de receptores. En este punto se logra la transformación completa hasta tripomastigotes metacíclicos, los cuales son la forma infectiva del parasito (Basseri y col., 2002). Los tripomastigotes metacíclicos de *T. rangeli* no se encuentran en el tracto digestivo del vector, solo se encuentran en las glándulas salivares, los cuales serán liberados a través de la picadura (penetración de la probóscide del triatómino en la epidermis) del insecto al hospedador vertebrado durante el proceso de alimentación, esto representa una gran diferencia con *T. cruzi*, el cual invade exclusivamente el tracto intestinal desarrollándose su forma infectiva en el intestino posterior del vector, estos metacíclicos son liberados posteriormente debido a la presión ejercida por una nueva ingesta de sangre, en un proceso conocido como transmisión contaminativa.





**Figura 2. Ciclo de vida de *T. rangeli* en el hospedador invertebrado.** (Tomado con modificaciones de Rodríguez-Mesa, 2005)

En la figura 2 se representa el ciclo del *T. rangeli* en el vector, insectos, Hemípteros de la familia Reduviidae. Al ingerir sangre infectada del vertebrado durante la picadura, el vector se contamina con *T. rangeli*. El parásito prolifera como epimastigotes en el intestino medio, atraviesa al epitelio intestinal llegando a la hemolinfa en la cual invade a los hemocitos, para luego alcanzar las glándulas salivares donde alcanza su forma infectiva, los tripomastigotes metacíclicos.

### 1.1.3 Relación con el vector y hospedador

Las interacciones moleculares entre el parásito con el vector y el hospedador, son de gran importancia para entender los mecanismos que operan en estos sistemas, en el caso de los parásitos patógenos para el hospedador vertebrado, colocamos especial interés en los mecanismos que intervienen en el establecimiento de la infección, y de esta manera poder desarrollar técnicas para su diagnóstico, prevención y elaboración de fármacos que contrarresten las manifestaciones clínicas producto de la presencia de este parásito.

#### 1.1.3.1 Hospedador Vector

Los insectos triatóminos (*Triatominae*), subfamilia Reduviidae del orden Heteroptera/Hemiptera, son los vectores principales de transmisión de la enfermedad de Chagas. 12 de las 15 especies de *Rhodnius* (tabla 2), han sido probados biológicamente como vectores de *T. rangeli*, siendo capaces de desarrollar tripomastigotes metacíclicos en sus glándulas salivares (Guhl y col., 2003).

Se ha observado de manera experimental, la presencia de *T. rangeli* en el intestino de otras especies de triatóminos como: *Cavernicola*, *Eratyrus*, *Dipetalogaster*, *Panstrongylus* y *Triatoma*, pero no se han detectado en la hemolinfa, ni tampoco tripanosomas en sus formas metacíclicas. (Guhl y col., 2003). A nivel experimental, estudios recientes muestran que otros triatóminos como *Triatoma infestans*, *Triatoma sordida*, *Triatoma braziliensis*, *Triatoma vitticeps*, *Pastrongylus megistrus* y *Rhodnius neglectus*, son susceptibles a la infección con *T. rangeli*, llegando a desarrollar niveles de mortalidad entre 3 – 40 %.

Tabla 2. Distribución de vectores de *T. rangeli* en América. (Tomado de Guhl, 2003).

País	<i>bre</i> (1)	<i>col</i> (2)	<i>dal</i> (3)	<i>dom</i> (4)	<i>ecu</i> (5)	<i>nas</i> (6)	<i>neg</i> (7)	<i>nei</i> (8)	<i>pal</i> (9)	<i>pic</i> (10)	<i>pro</i> (11)	<i>ro</i> (12)	<i>mil</i>	<i>par</i>	<i>stal</i>
México											+				
Guatemala											+				
Belize															
Honduras											+				
El Salvador											+				
Nicaragua											+				
Costa Rica											+				
Panamá									+		+				
Colombia		+	+					+	+	+	+	+			
Ecuador					+					+	+	+			
Perú					+					+		+			
Bolivia				+						+	+	+			
Brazil	+					+	+			+	+	+			
Fr. Guayana										+	+	+			
Surinam										+	+				
Guyana										+	+				
Venezuela								+		+	+	+			
Trinidad										+					

*bre*: *brethesi*; *col*: *colombiensis*; *dal*: *dalessandroi*; *dom*: *domesticus*; *ecu*: *ecuadoriensis*; *neg*: *neglectus*; *nas*: *nasutus*; *nei*: *neivai*; *pal*: *pallenscens*; *pic*: *pictipes*; *pro*: *prolixus*; *ro*: *robustus*; *mil*: *milesi*; *par*: *paraensis*; *stal*: *stali*; (1) Vargas et al. (2000); (2) Vallejo et al. (2002); (3) D'Alessandro & Saravia (1999); (4) Machado et al. (2001); (5) Cuba-Cuba (1975); (6) Machado et al. (2001); (7) Machado et al. (2001); (8) D'Alessandro & Hincapié (1986); D'Alessandro-Bacigalupo & Gore-Saravia (1999); (9) D'Alessandro-Bacigalupo & Gore-Saravia (1999); (10) D'Alessandro-Bacigalupo & Gore-Saravia (1999); (11) D'Alessandro-Bacigalupo & Gore-Saravia (1999); (12) D'Alessandro-Bacigalupo & Gore-Saravia (1999)

En la tabla se muestran la distribución geográfica en el continente americano de los vectores capaces de desarrollar formas metacíclicos de *T. rangeli* en las glándulas salivares.

La infección del vector con *T. rangeli*, puede ocurrir en ambos sexos, al igual que en cualquiera de los estados ninfales. Esta infección puede ser de por vida, a menos que el insecto sea privado de alimento durante varios meses (D'Alessandro, 1976). Los efectos patológicos que produce *T. rangeli* en el vector, han sido estudiados principalmente en especies de *Rhodnius*, estos efectos dependen en gran parte del grado de parasitemia, y el estadio del vector. En general, las infecciones con *T. rangeli* producen complicaciones en el vector, entre las cuales podemos nombrar la dificultad del triatómino para detectar los vasos sanguíneos normalmente durante la picadura, la deformación de los tubos de Malpighi, el ensanchamiento del intestino y el recto debido a la pérdida de contractibilidad, la lisis de las células musculares del intestino medio, pérdida del cuerpo graso, e imposibilidad de realizar el proceso de muda. Estas alteraciones eventualmente la causan la muerte al triatómino y disminuye el tiempo de vida media (D' Alessandro, 1976; Watkins, 1971).

#### **1.1.3.2. Hospedador Vertebrado.**

Como mencionamos anteriormente, una de las características de *T. rangeli*, es que aunque es patógeno para el vector, no se ha probado su patogenicidad en humanos. La infección comienza cuando los parásitos ingresan al hospedador vertebrado durante la picadura del vector, el cual ha desarrollando en las glándulas salivales la forma altamente infectiva (tripomastigotes metacíclicos). Una vez en el hospedador vertebrado el parasito se encuentra circulando en la sangre en forma de tripomastigotes sanguíneos, luego los niveles de parasitemia comienzan a descender, y se mantienen así alrededor de 2-3

semanas en la mayoría de los casos, sin embargo, se ha observado que se pueden mantener por 7-12 meses en ratones y hasta 3 años en animales más grandes (D'Alessandro-Bacigalupo y Savaria, 1992). Existe una controversia con respecto a la proliferación del parásito en el hospedador vertebrado, en este sentido, se ha reportado que hay un incremento del porcentaje de parásitos luego de la picadura o inoculación artificial, describieron una parasitemia 7 veces mayor a la inoculada inicialmente en ratones (Urdaneta-Morales y Tejero, 1985), estos mismos autores reportaron en 1996, formas amastigotes en cortes de tejido del tejido de corazón, hígado y vaso tomados de rata, previamente inoculados con la cepa Perro-82. No obstante, se han realizado análisis histopatológicos a más de 150 ratones infectados con *T. rangeli*, y no se pudo observar ninguna lesión o forma intracelular del parásito (Herbig-Sandreuter, 1955). De igual manera se han estudiado las interacciones de diferentes cepas de *T. rangeli*, con macrófagos de ratón, VERO, L-929 y J-744-13, observando que menos del 10 % de dichas células presentaron formas intracelulares similares a los amastigotes, reportaron también que la parasitema desapareció en un periodo de 2 a 5 días luego de la infección (Grisard y col., 1999). Otros estudios histopatológicos de los órganos de los animales infectados con *T. rangeli*, no han podido observar la presencia de los mismos en los diferentes órganos (Osorio y col., 1995; Zuñiga y col., 1997).

Se han dirigido estudios tratando de demostrar la falta de virulencia de *T. rangeli* en el huésped vertebrado, los cuales han demostrado la existencia de formas “amastigote-like” en vertebrados que diferían en el tamaño significativamente con los amastigotes de *T.*

*cruzi*, pero reportaron la falta de multiplicación intracelular de *T. rangeli* durante el tiempo de duración del experimento (Osorio y col., 1995). Este bajo porcentaje de *T. rangeli* en las células del hospedador mamífero, se podría relacionar con el costo evolutivo que ha tenido que pagar el parásito y probablemente tenga alguna relación con la pérdida de las enzimas neuroaminidasas de membrana, las cuales aparentemente están involucradas en el paso del parásito a través de la hemolinfa del vector, también comprometiendo la invasión de las células del vertebrado mamífero por parte de *T. cruzi* (D'Alessandro-Bacigalupo y Savaria, 1999)

A pesar de que *T. rangeli* no es patógeno para el vertebrado, se produce de igual manera una respuesta inmunológica, produciendo altos niveles de anticuerpos, lo cual es de alta importancia médica cuando lo estudiamos en el contexto de *T. cruzi*, debido a que ambos parásitos comparten ciertas características antigénicas, alrededor del 60 % de sus antígenos, es por esta razón que se complica el diagnóstico de *T. cruzi* cuando se está en presencia de *T. rangeli* (Mejía y col., 2005).

Debido a esta estrecha relación entre *T. cruzi* y *T. rangeli*, muchos autores se han dedicado a investigar el posible rol que puede jugar *T. rangeli* en la EnCh. Se ha sugerido que la infección previa con *T. rangeli* produce una respuesta inmune en el paciente, que puede moderar la severidad de la EnCh frente a una subsecuente infección con *T. cruzi* (Guhl y col., 1987). En este sentido, se han dirigido estudios para observar el efecto que tiene una infección previa con *T. rangeli* sobre una subsecuente infección con *T. cruzi* en ratones

BALB/c, encontrando una reducción en la parasitemia en aquellos ratones que fueron infectados previamente con *T. rangeli* en comparación con los ratones que solo fueron infectados con *T. cruzi* (Basso y col, 2008)

## **1.2 Genoma de *T. rangeli***

### **1.2.1. Tamaño y organización.**

En los Tripanosomátidos el genoma está contenido en dos compartimientos celulares bien definidos, el núcleo y la mitocondria. En cuanto a la organización del genoma nuclear, los estudios realizados con electroforesis de campo pulsado han permitido analizar los cromosomas de *T. rangeli*, los cuales difieren principalmente en tamaño y el número de bandas cromosomales. La alta variabilidad que se observa en los electrocariotipos, depende principalmente de la cepa del parásito analizada y de las condiciones de la corrida electroforética. Algunos reportes indican que el genoma está compuesto por 16 a 24 cromosomas de 350 a 3130 kb (Henrikson y col., 1996) (Tolado y col., 2001), 14 cromosomas de 350 a 2000 kb (Tanaka y col., 1994).

La variabilidad en la organización genómica también se puede evidenciar en la ubicación de ciertas secuencias codificantes. Algunos ejemplos puntuales serían: La cisteína proteinasa (Martínez y col., 1995), proteínas fijadores de calcio TrCaBP (Porcel y col., 1996).

El cinetoplasto es una característica particular del orden Kinetoplastea, y consiste en una red compacta de ADN extranuclear que se encuentra dentro de una mitocondria. El cinetoplasto (ADNk) representa el genoma mitocondrial de estos parásitos y constituye un 10-20 % del ADN total. El ADNk está constituido por 2 tipos de moléculas, maxicírculos y minicírculos. Los maxicírculos, son moléculas de ADN circulares relativamente conservadas, codifican para enzimas mitocondriales y ARN, tienen un tamaño entre 20-38 kb, y se repiten unas 20-50 copias por genoma (Thomas y col., 1993). Los minicírculos son moléculas de ADN circular que poseen un tamaño entre 0,7-2,5 kb, con 5000 y 10000 copias por genoma (Thomas y col., 1993). En *T. rangeli* se han encontrado 3 tipos diferentes de minicírculos que se caracterizan por la presencia de regiones conservadas, Kp1 (1,764 pb) contiene una copia de la región conservada, Kp2 (1587 pb) contiene dos copias de la región conservada y Kp3 (1600 pb) con cuatro copias de la región conservada, (Vallejo y col., 1994); (Vallejo, 1998). La presencia de las regiones conservadas Kp1, Kp2 y Kp3, parecen jugar un papel en la relación del parásito con su vector. Se ha observado en estudios realizados en Colombia, que los parásitos que poseían los 3 tipos de minicírculos Kp1, Kp2 y Kp3 estaban principalmente asociados con el vector *R. prolixus*, mientras que los parásitos que tenían Kp2 y Kp3 pero no Kp1, denominados como Kp1(-), estaban asociados a *R. pallescens*, sugiriendo una coevolución entre el parásito y el vector (Urrea y col, 2006). Los aislados provenientes de Venezuela poseen el tipo de minicírculo Kp1, que se han reportado también en Colombia, Honduras y Brasil.



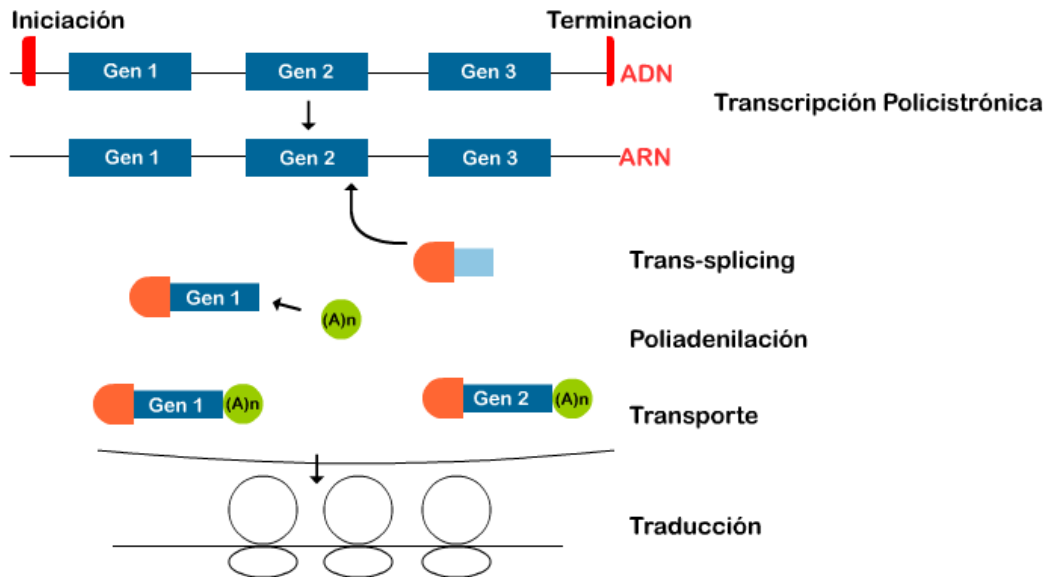
Se han reportado muy pocos estudios sobre el ADN nuclear en *T. rangeli* en comparación a otros tripanosomátidos, por ejemplo; el desarrollo de los proyectos genoma de algunos Tripanosomátidos, como *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania major* (TriTryp), permitió tener un mayor conocimiento sobre sus genomas. Aunque *T. rangeli* no está incluido en este proyecto TriTryp, estudios recientes han apuntado a investigar su genoma. Recientemente se realizó un análisis transcriptómico de 4208 secuencias, de las cuales hubo 972 secuencias que no obtuvieron similitud en las bases de datos consultadas, lo que podría indicar que son únicas de *T. rangeli* (Grisard y col., 2011). Dentro de las secuencias descritas en ese análisis transcriptómico, se pudo observar genes que juegan un papel fundamental en la virulencia (cistein proteasa, Oligopeptidasa B, Transialidasa, metaloproteasa GP63), de igual manera se definieron genes correspondiente a la edición de RNA. En ese estudio, también se estimó que el genoma completo de *T. rangeli*, constaba alrededor de 8500 genes.

Muchos investigadores han dirigido su atención sobre el estudio de secuencias altamente repetitivas, los cuales han sido de gran importancia para la identificación, y determinación de las relaciones filogenéticas de *T. rangeli*. Vale la pena mencionar el estudio sobre la secuencia repetitiva P542 (Vargas y col., 2000). Esta secuencia repetida de 542 pb fue la base para el diseño de una prueba de PCR que se utiliza actualmente para la identificación de *T. rangeli*.

Por medio de la evaluación los minisatélites (VNTR) se ha evidenciado la existencia de dos grupos en las poblaciones de *T. rangeli*, uno conformado por cepas pertenecientes Centro América, Colombia y Venezuela, y otro grupo de cepas pertenecientes al sur de Brasil (Macedo y col., 1993). También el estudio sobre los genes codificantes para los ARN ribosomales que se encuentra repetidos en el genoma del parásito, los cuales están separados por lo que se denomina espaciadores transcritos internos, han servido para análisis filogenéticos de *T. rangeli* y su determinación taxonómica. (Hernández y col., 1993).

### **1.2.2. Expresión génica.**

En los tripanosomátidos, las regiones codificantes se encuentran agrupadas en unidades policistrónicas, ubicadas en tándem. A diferencia de los eucariotas superiores, cuyos transcritos son procesados a través del “cis-splicing”, en los tripanosomátidos ocurre un proceso de maduración de pre-ARN denominado “trans-splicing” (splicing entre 2 moléculas de ARN). Durante el “trans-splicing” el “Splice Leader” ARN (ARN donador) proporciona una secuencia de 39 nucleótidos en el extremo 5’ de cada ARNm. La secuencia líder del ARN donador, tiene un residuo de 7-metil guanosina trifosfato (mGppp) en el extremo 5, cuya función es estabilizar al ARNm, por lo cual este mecanismo proporciona el “capping” al transcrito naciente (revisado por Graham, 1995). Esta reacción de trans-esterificación requiere de la presencia de un dinucleótido de AG conservado en el extremo 3’ de la región intergénica del pre-ARN, conocido como sitio de empalme (Figura 3).



**Figura 3. Mecanismo de procesamiento de ARN en tripanosomátidos.** (Tomado con modificaciones Graham, 1995)

En tripanosomátidos, el “transplicing” y la poliadenilación son procesos involucrados en la biogénesis del ARNm. El “trans-splicing” genera transcritos monocistronicos a partir de una unidad transcripcional policistronica. La secuencia de ARN donadora, cede una secuencia de 39 nucleótidos en el extremo 5’ de cada ARNm. La secuencia líder del ARN donador, tiene un residuo de 7-metil guanósina trifosfato (mGppp) en el extremo 5, cuya función es estabilizar al ARNm.

### **1.3. Elementos móviles transponibles: Estructura y organización genómica.**

Descritos por primera vez por Barbara McClintock y Marcus Rhoades entre años 1930-1950 en la regulación de la expresión génica y transmisión de los caracteres parentales en plantas de maíz, los elementos transponibles, o transposones, son segmentos de ADN con la capacidad de moverse a posiciones nuevas dentro del mismo cromosoma o hacerlo a un cromosoma diferente, incluso entre diferentes genomas. Una considerable fracción del genoma de los eucariotas está compuesta de transposones, que alcanza un 40 % de estos genomas y en maíz representa más de la mitad del genoma. Se pensaba que los transposones eran secuencias de ADN que solo producían copias de ellos mismos y llegaron a catalogarse como ADN “egoísta” y “Basura genómica”. Sin embargo, durante los últimos años se ha generado una gran cantidad de evidencia, que describe a los transposones cumpliendo ciertas funciones celulares, por ejemplo, se considera que participan en la regulación de la transcripción hasta ser parte codificante de una proteína. Incluso se ha estado considerando el rol de los transposones en eventos de especiación (Bohne y col., 2008), jugando un papel de vital importancia en la plasticidad genómica, siendo una de las principales fuentes de mutación y contribuyendo a la generación de variabilidad genética (Haren y col., 1999).

#### **1.3.1. Estructura y organización**

Los transposones se dividen principalmente en 2 grupos, basándose en su mecanismo de transposición. El primer grupo está compuesto por elementos que utilizan directamente a

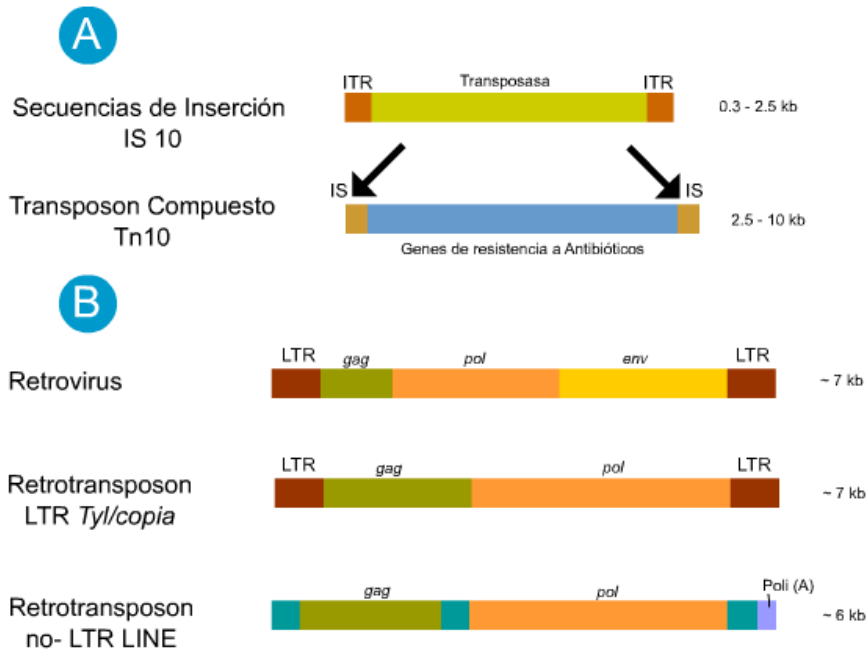
la copia de ADN para su transposición, incluye los transposones compuestos y las secuencias de inserción (IS). El segundo grupo está compuesto por los retroelementos, los cuales se mueven por acción de la transcripción reversa de un ARN intermediario, utilizando la enzima transcriptasa reversa, e incluye los retrotransposones LTR (Long Terminal Repeat) y los retrotransposones que no son LTR, denominados “no-LTR” (Figura4).

Las secuencias de inserción son segmentos de ADN de 600-1500 pb, que codifican principalmente los genes esenciales para su proceso de transposición, especialmente contiene secuencias de ADN que se recombina activamente y que define los extremos del elemento, conocidos como repetidos invertidos teloméricos, en conjunto con una enzima que reconoce y procesa los extremos durante la transposición, esta enzima es la transposasa. Usualmente poseen secuencias cortas de repetidos invertidos, que rodean a la secuencia que codifica para la transposasa (Mahillon y Chandler, 1998). En algunos casos se ha reportado tener secuencias promotoras, que podrían activar la transcripción de un gen contiguo que estaba inactivo antes de la transposición del elemento.

Los transposones son elementos un poco más complejos en cuanto a su organización, de un mayor tamaño, básicamente son dos secuencias IS que rodean a un segmento de ADN que codifica para alguna función, como por ejemplo, resistencia a un antibiótico. Además, contienen todas las secuencias necesarias para su propia transposición. Un ejemplo de estos serían los factores de transferencia de resistencia (RTF), que poseen información

para la resistencia a antibióticos, como es el caso del elemento transponible Tn10, el cual contiene el gen que codifica para la resistencia de tetraciclina, flanqueado por dos copias de la secuencia de incursión denominada IS10. Una característica de este tipo de transposones, es que puede moverse desde un plásmido al cromosoma bacteriano, o de un plásmido a otro plásmido y así generar múltiples plásmidos resistentes (Lewin, 2004).

Se conocen como retrotransposones, los elementos móviles que utilizan la transcriptasa reversa para transponerse mediante un intermediario de RNA del transposon, el cual es copiado a ADN, previo a su integración al genoma. Son particularmente abundantes en plantas, donde en muchos casos es el componente principal de ADN en el núcleo, por ejemplo en maíz, el 48-78% del genoma está compuesto de retrotransposones. (Sanmiguel y col, 1996). Los retrotransposones poseen algunas características similares a los llamados retrovirus (Brown, 2002), el genoma de los retrovirus acaba en repeticiones directas y el proceso de retrotranscripción los convierte en repeticiones terminales largas (LRT). Por su parte, los no-LTR, no tienen una función conocida, no presentan repeticiones terminales y no codifican proteínas de transposición. Se encuentran con mayor frecuencia en los mamíferos, por ejemplo los elementos intercalados cortos, SINE (short interspersed sequences), y los elementos intercalados largos LINE (Long interspersed nuclear elements), los cuales son los más abundantes, el genoma humano tiene más de 20000 a 40000 LINES, y alrededor de 400000 SINE.



**Figura 4. Tipos y estructura de los Elementos Móviles.** (Tomado con modificaciones de Brown, 2002)

A) Transposones de ADN. El gen que codifica para la transposasa esta flanqueado por secuencias cortas de invertidos repetidos. (ITR). Los transposones compuestos llevan un gen resistente a antibióticos flanqueado por secuencias de inserción IS.

B) Tipos de retroelementos. Los retrovirus y los retrotransposones LTR poseen largos repetidos flanqueando al elemento. El gen *gag* codifica proteínas localizadas en el “core” del virus; el gen *pol* codifica para una transcriptasa reversa y *env* codifica para una de las proteínas de la cubierta del virus. Los retrotransposones no-LTR presentan una cola de poli (A) en uno de sus extremos

El análisis de la secuencia completa de ADN de un organismo, nos brinda información sobre su genoma en un tiempo determinado, pero es a través de la comparación de genomas completos que podemos observar las diferencias entre el éxito de los tipos de transposones. Las variaciones se encuentran en el número, composición y locación de los transposones de los diferentes genomas, sin embargo, se han podido observar ciertos patrones en la distribución de los transposones, por ejemplo, los humanos, macacos, ratones y perros, comparten una gran similitud en cuanto a los patrones de composición de transposones (Pace y Feschotte, 2007). De igual manera, los análisis de secuenciación del genoma de 12 especies de *Drosophila* separadas por 40 millones de años de evolución, mostraron que los retrotransposones eran predominantes, por encima de los transposones de ADN, que ocupaban en todos los casos, menos del 20 % del total de los transposones (Clark y col., 2007). Muchos autores se preguntan si estos patrones son simplemente producto de pérdida y ganancia aleatoria de material genético, o por el contrario son el resultado de fuerzas evolutivas que actúan influenciando la distribución de transposones, moldeando el genoma.

Las propiedades moleculares de los transposones podrían intervenir en las posibilidades de colonización de los transposones (Pritham, 2007), en este sentido podemos utilizar como ejemplo podríamos mencionar que los retrotransposones LTR y transposones de ADN, parecen tener mayor potencial para el movimiento horizontal que los retrotransposones denominados no-LTR, esto puede deberse a la inestabilidad de la forma del ARN con respecto al ADN, de igual manera la mayoría de retrotransposones no-



LTR, pierden promotores en su proceso de transposición, inhibiendo cualquier propagación futura.

### **1.3.2. Elementos móviles en Tripanosomátidos.**

Se han encontrado elementos transponibles en varios organismos protozoarios, en parasito se han reportado en *Giardia Lamblia*, *Crithindia fasciculata* y *Entameoba histolytica*, cada transposon exhibiendo diferentes propiedades (Revisado por Bhattacharya, 2002). En la tabla 3, se resumen algunos de los elementos transponibles descritos para tripanosomátidos. En *T. cruzi* se han descrito diferentes tipos de transposones, en su mayoría son tipo LTR, (Requena y col., 1996). En los Trypanosomas africanos se han encontrado elementos transponibles del tipo no-LRT, INGI. Resultados recientes han encontrado 3 potenciales retrotransposones: *Trypanosoma vingi* encontrado en *Trypanosoma vivax* y *Trypanosoma conigi* y por último L1TCo, encontrados en *Trypanosoma congolense*. Vale destacar que *T. congolense* es el primer tripanosomátido que contiene 2 clases de potenciales retrotransposones INGI (Bringaud y col., 2009)

En especies de *Leishamnia* últimamente se han estado reportando secuencias que corresponden a elementos móviles. Se han identificado dos grandes familias de los elementos móviles LmSIDER1 (785 copias) y LmSIDER2 (1,073 copias) (Bringaud y col., 2009). En especies del genero *Leishamnia* se han descrito los elementos SIDER y DIRE para *L. braziliensis* (Smith y col, 2009), y en *L. major* se han reportado 52 copias degeneradas del elemento DIRE (El-Sayed, 2005).

**Tabla 3. Elementos transponibles reportados en Tripanosomátidos.**

Organismo	Nombre	Tamaño (pb)	Número de copias
<i>T. cruzi</i>	L1tc	4,736	320
	TcDire	50,00 aprox.	257
	NARTc	260	133
	CZAR	7,237	30-40
	SIRE	428	1500-3000
	VIPER	2539	300
<i>T. brucei</i>	TbIngi	5,250	115
	TbDIRE	50,000 aprox.	73
	TbRIME	500	86
	TbSLACS	6678	9
	TbTbSIDER	570 aprox.	22
<i>T. congolense</i>	Tcoingi	5,404	56
	L1tco	4,733 aprox.	12
	TcoDIRE	50,000 aprox.	173
<i>T. vivax</i>	TvIngi	5,419	756
	TvDIME	50,000 aprox.	108
	TvRIME	1,030	58
<i>L. Major</i>	LmDIRE	50,000 aprox	52
	LmSIDER	550 aprox.	1858
<i>L. Braziliensis</i>	LbDIRE	50,000 aprox.	65
	LbSIDER	550 aprox.	1986

Fuente: (Bringaud y col, 2009; Bhattacharya y col, 2002; Smith y col, 2009; Requena y col, 1996). Los diferentes elementos móviles transponibles presentes en los tripanosomátidos. Se muestra su tamaño y el número de copias que se ha encontrado. A los nombres de los diferentes elementos móviles se le colocaron iniciales para diferenciarlos con los demás tripanosomátidos, por ejemplo “tbDIRE” es la secuencia DIRE en *T. brucei* (tb)

La secuenciación completa del genoma de *T. cruzi* confirmó que al menos el 50 % del genoma estaba constituido por elementos repetitivos, (El sayed y col., 2005). Un 5 % aproximadamente del ADN nuclear de *T. cruzi* está compuesto por retrotransposones LTR y no-LTR (Requena y col., 1996). Siendo los elementos más abundantes los L1Tc y los NARTc. Los L1Tc son secuencias de 4.9 kb, que codifican para endonucleasas, transcripasa reversa, implicadas en su propia transposición, también se ha reportado recientemente la presencia de promotores RNA-pol que activan la transcripción de genes (Heras y col., 2006). Los elementos NARTc tienen un tamaño de 0.25kb, y posiblemente utilizan las enzima codificadas en L1Tc para su propia transposición (Bringaud y col., 2006). La distribución parece ser un poco aleatoria, sin embargo, los análisis indican que se encuentran preferencialmente en regiones conservadas (Bringaud y col., 2002). De igual manera, el elemento móvil SIRE (Short Interspersed Repeat Element) se encuentra distribuido en todos los cromosomas, frecuentemente asociado a los telómeros (Chiurillo y col., 2002), el cual esta usualmente asociado un retroelemento denominado VIPER (Vestigial Interposed Retroelement), de 1259 pb (Vazquez y col., 2000). Recientemente se reporto que el elemento SIRE se encuentra interrumpiendo el locus específico H18, de la proteína ribosomal Tcp2 $\beta$ , lo que provoca un decaimiento en la transcripción de esta proteína.

El proyecto genoma de *T. brucei*, reveló que cerca de 1/5 de cada cromosoma está compuesto de secuencias repetitivas que incluyen transposones del grupo "ingi" y RIME. Las secuencias SLACS, por sus siglas en ingles "Spliced Leader associated conserved

sequence", son bastante frecuentes también (Aksoy, 1991). El elemento Ingi, es un no-LTR, posee un tamaño de 5,2 kb y está flanqueado por 250 pb en los extremos del elemento RIME, por sus siglas en ingles "ribosomal inserted mobile element". Anteriormente se pensaba que las secuencias ingi/RIME se encontraban distribuidas de una manera aleatoria, sin embargo un análisis detallado de las secuencias reportadas por el proyecto genoma de *T. brucei*, indicó que se encontraban rodeado por patrones de ADN altamente conservados, y podría ser el sitio de reconocimiento para las endonucleasas codificadas en las secuencias INGI (Bringaud y col., 2009). Por su parte las secuencias SLACS presentan un tamaño de 6.8 kb y codifica par 2 marcos abiertos de lectura ORF por sus siglas en ingles "open reading frame" (Aksoy y col., 1990).

En *T. rangeli*, recientemente fueron descritos por primera vez elementos móviles transponibles, retrotransposones del tipo RSH, (Hot spot protein), de la subfamilia RHS1, RHS2 y RHS4. Estas secuencias habían sido anteriormente reportadas para *T. brucei*, y caracterizadas para *T. cruzi* (Grisard y col., 2010). En cuanto a secuencias repetitivas se tienen muy pocos reportes sobre secuencias repetitivas encontradas. Uno de los reportes sobre secuencias repetitivas lo mencionamos anteriormente (Vargas y col., 2000), el caso del elemento repetitivo P542, de 542 pb específico de *T. rangeli*, el cual posee una distribución dispersa en el cromosoma, y se encuentra representado en  $10^3$  copias por genoma haploide.

### **1.3.3 Transferencia Horizontal de genes (THG).**

La transferencia horizontal o lateral de genes, como su nombre lo indica, es la transferencia de material genético entre organismos diferentes, que no son descendencia directa, y usualmente son de diferentes especies. Actualmente la transferencia horizontal de genes es aceptada como un mecanismo que ha tenido un gran impacto en la evolución de genomas eucariotas, ha sido ampliamente estudiada en el caso de las bacterias que transfieren genes para la resistencia a antibióticos. A medida que se han ido desarrollando los proyectos genoma de varios organismos, la transferencia horizontal de genes se detecta con mayor frecuencia algunos segmentos de ADN bacterianos en genomas de eucariotas, en el caso del genoma humano, se ha determinado que alrededor de 112-223 de nuestros genes podrían ser de origen bacteriano (Salzberg y col., 2001)

Es interesante analizar este evento de transferencia de genes desde un punto de vista evolutivo, es decir, no es solo considerar el hecho de que pueda existir la transferencia lateral de material genético, si no que este material genético se ha logrado fijar en el genoma del organismo, modificando su información genética la cual va a pasar a la siguiente generación. Si bien, evolutivamente las mutaciones siempre ocurren, uno de los factores determinantes para fijar la mutación es la funcionalidad o “ventaja evolutiva” que las mutaciones puedan ofrecer al organismo. Alternativamente, las mutaciones podrían poseer características “egoístas”, como por ejemplo la capacidad de duplicarse y transponerse (Salsberg y col., 2001)

Posiblemente todavía este muy lejos el comprender las razones “evolutivas” de esta transferencia de genes, pero se podría empezar por observar si este material genético transferido lateralmente se está expresando. Ha habido relativamente poca evidencia sobre la funcionalidad de los genes transferidos. De los genes transferidos que se han reportado hasta el momento, solo pocos presentan bajos niveles de expresión en el organismos al cuales fueron transferidos, los cuales han sido interpretados como “ruido”, la gran mayoría de casos reportados de transferencia de genes, se ha observado una alta expresión. (Hotopp y col., 2007), (Blaxter, 2007).

De igual manera se ha observado que en la semilla *Acyrtosiphon pisum* existen dos genes de la bacteria *Wolbachia* o muy similar a esta (Nikoh y Nakabachi, 2009), estos autores demostraron que ambos genes transferidos están siendo altamente expresados y fundamentales para el funcionamiento de la planta.

Otro ejemplo lo podemos encontrar en la transferencia entre Mosquito *Aedes aegypti* y la bacteria *Wolbachia*, ambos presentan similitud para un segmento de ADN, se conoce que en el mosquito, este segmento de ADN codifica para una proteína de glándula salivar de superficie (SGS, salivary gland surface), el cual juega un rol en la internación del insecto con el plasmodium, reportándose una alta expresión del gen. La función de este gen en Bacteria permanece sin conocerse, al igual que existen dudas sobre la dirección de la transferencia, si la bacteria transfirió material genético al mosquito en el curso de la evolución, o si el mosquito transfirió ADN hacia la bacteria. (Klasson y col., 2009).

Analizando las características de los transposones, particularmente su habilidad para moverse de un genoma a otro, se perfilan como un buen candidato para explicar cómo puede ocurrir la transferencia lateral de genes.

## II. ANTECEDENTES.

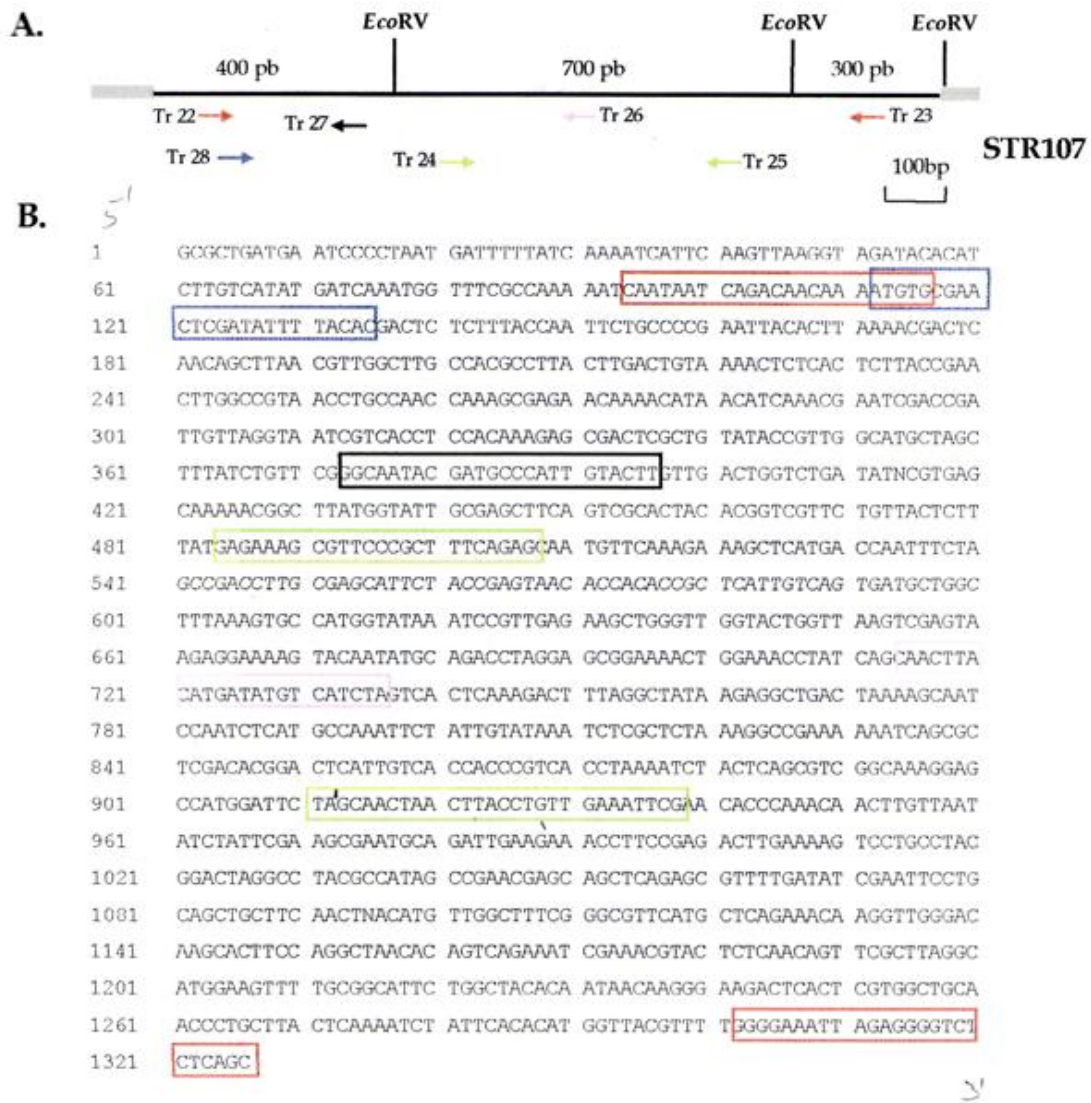
El transposon Tn10, reportado originalmente en bacterias, es un transposon compuesto, por lo que se encuentra flanqueado por 2 secuencias de inserción. En un principio, cuando se describía originalmente el Tn10, se identificó que las secuencias de inserción eran IS3 (Ptashne, y Cohen, 1975; Sharp y col., 1976). Sin embargo, una serie de experimentos indicaban que la secuencia de inserción del Tn10 no era completamente similar al IS3, diferían en ciertos aspectos moleculares, como por ejemplo los sitios de restricción para *HindIII* (Ohtsubo y co., 1977). Posteriormente se demostró por medio de hibridaciones moleculares, que las secuencias de inserción del Tn10 no eran IS3, y denominaron a estas secuencias IS10 (Donald y col., 1979).

Una primera aproximación que tenemos sobre el estudio del transposon IS10 en *T. rangeli*, fue realizado en el 2005 por Rodríguez. Su trabajo estuvo enfocado principalmente en la caracterización molecular de un clon (STR107) procedente de una genoteca de sustracción de *T. rangeli*. La secuencia parcial de algunos clones específicos de *T. rangeli* y su análisis *in silico*, evidenció como el clon STR107 presentó una gran similitud con las regiones 5' y 3' de la transposasa IS10, anteriormente reportada para *T. brucei*. La secuenciación total del segmento de 1,4 kb, (Figura 5), mostro una homología con el transposon IS10 reportado en diferentes organismos, por ejemplo: 99% de



identidad con *Salmonella entérica*, *E. Coli*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus epidermis* y *Caenorhabditis elegans*. De igual manera, la secuenciación de otros dos recombinantes de la misma genoteca, mostraron contener al gen de la transposasa IS10, el recombinante STR191 de 1,6 kb, y STR24 de 1,2 kb.

En este trabajo se logro identificar la secuencia completa del transposon IS10, que incluyo un marco abierto de lectura para la transposasa putativa, los repetidos invertidos asociados a los extremos de la transposasa y secuencias truncadas de una proteína ribosomal L44 flanqueando al gen putativo. Posteriormente se logro detectar la región del transposon IS10 en cepas de *T. rangeli* Triatomino, *T. cruzi* JMP y *Leishmania* LBT0016, mediante un PCR utilizando los oligos Tr24 y Tr25 los cuales amplifican una región de 450 pb en la secuencia de la transposasa IS10. Este resultado fue confirmado mediante hibridaciones sobre el ADN genómico *T. rangeli* Triatomino, *T. cruzi* JMP y *Leishmania* LBT0016, utilizando una sonda marcada especifica para la identificación del transposón IS10.



**Figura 5. Anclaje de los oligonucleótidos diseñados sobre la secuencia de la transposasa putativa de *T. rangeli*.**

Mapa del recombinante STR107 **(A)**. Se señalan los sitios de corte para la enzima de restricción EcoRV. Las flechas indican el sitio de anclaje de cada oligonucleótido, los colores de las flechas coinciden con los recuadros en **(B)**, en donde se señala la ubicación y secuencia de cada oligonucleótido. (Rodríguez, 2005)

Existen ciertos reportes sobre la presencia de la transposasa de Tn10 en *T. brucei*, (Pagina web tritryps, “kinetoplastid genome research”). Esta secuencia fue reportada en el genoma de este parásito en dos localizaciones, la primera en el cromosoma 3 (Tb03.27F10.210) interrumpiendo una proteína putativa, y la segunda localización en el cromosoma 6 (Tb06.1I18.660), flanqueada por glicoproteínas de superficie (VSG) putativas. Sin embargo, los autores argumentaron posteriormente que la presencia de la secuencia de la transposasa en *T. brucei*, se trataba simplemente de un error experimental, alegando que en el momento de la clonación de un segmento de ADN de *T. brucei*, la secuencia del transposón IS10 (presente en una gran variedad de bacterias) pudo haberse insertado en la secuencia de *T. brucei*, y por ende no se encontraba originalmente en el genoma del parásito.

Tomando en consideración los datos que tenemos hasta ahora sobre el elemento móvil IS10, este trabajo de investigación se propone evaluar mediante hibridación molecular de perfiles de electrocaritipos de diferentes cepas de tripanosomátidos, la presencia y organización cromosómica del transposon IS10, con la finalidad de enriquecer el conocimiento del genoma de *T. rangeli*.

### III. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo General:

- Evaluar la presencia y organización genómica de un elemento móvil de origen bacteriano (IS10) en cepas de *Trypanosoma rangeli* y otros Tripanosomátidos.

#### 3.2 Objetivos específicos.

- Analizar la presencia del elemento móvil bacteriano IS10 mediante PCR en diferentes cepas de *T. rangeli* y otros Tripanosomátidos.
- Analizar mediante hibridación molecular con sondas de ADN marcadas con digoxigenina, la ubicación del transposasa IS10 en perfiles de electrocariotipos de diferentes cepas de *T. rangeli* y otros Tripanosomátidos.
- Descartar la presencia de contaminantes bacterianos en medios de cultivos de *T. rangeli*, mediante PCR ARN 16s Ribosomal.
- Evaluar la presencia de la transposasa IS10 en el contenido intestinal de triatomíneos, preservados en papel FTA.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Cultivo de parásitos.

En este estudio se utilizaron los aislados de *T. rangeli*: Dog-82 (M/CAN/VE/82/DOG-82), y Triatomino (RHO/VE/98/TRIAT-1). Estas cepas fueron obtenidas por el Dr. Nestor Añez del Grupo de Investigaciones Parasitológicas "J.F. Torrealba", de la Universidad de los Andes (ULA-m Mérida). Se incluyeron también en este trabajo, cepas de diferentes tripanosomátidos pertenecientes al laboratorio de Biología Molecular del IBE, conservadas en buffer TE, de igual manera se utilizaron muestras de ADN cromosomal en tacos de agarosa de los diferentes tripanosomátidos, conservadas en EDTA (Tabla 4).

Las cepas que se llevaron en el laboratorio, fueron cultivadas en viales de 25 cm<sup>3</sup> en un medio Bifásico NNN. La fase solida estuvo compuesta de: 75% de agar sangre (al 4%) suplementado con 15% de sangre desfibrinada de conejo, adquirida en el instituto de Higiene de Venezuela. La fase liquida está compuesta por: NaCl 0,1463 %; KCl 0,045%; CaCl<sub>2</sub> 0,05 % y NaHCO<sub>3</sub> 0,019%, disueltos en agua desmineralizada a un pH final de 7.2. En cada vial se colocaron 5 ml de fase solida (agar sangre), realizándose pruebas de esterilidad a temperatura ambiente durante 2 días, para comprobar la esterilidad de los viales, posteriormente fueron almacenadas a 4°C hasta su utilización.

Los viales estériles fueron inoculados con parásitos en el orden de  $10^6$ , fueron incubados a temperatura ambiente hasta alcanzar la fase logarítmica, aproximadamente entre 5-7 días.

#### **4.2 Preparación de tacos de ADN cromosomal.**

Partiendo de 25 mL de un cultivo de parásitos en fase logarítmica, se recolectaron por centrifugación a 4000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente, para luego lavarse con solución salina. El sedimento celular producto de la centrifugación, se resuspendió en 10 mL de solución salina, y se determinó el título de las células utilizando una cámara de Neubauer. Se ajustó la concentración final a  $3-4 \times 10^8$  células/mL. La suspensión celular se mezcló en una relación 1:1 (v/v) con agarosa de bajo punto de fusión al 2% en tampón PSG ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 15mM, pH 8.0; NaCl 65 mM; glucosa 1%). Esta mezcla se mantuvo a 28 °C. Para formar los tacos de agarosa, se utilizaron los moldes rectangulares de 1 x 0,5 cm, donde se vertió la mezcla de agarosa-suspensión celular, y se mantuvo a temperatura ambiente hasta que se solidificaron los tacos, para luego ser encubados en solución de lisis (EDTA 0,5 M, pH 9.0; N-Lauryl sarcosinato de sodio 1%; proteinasa K (2mg/ml) a 37 °C durante toda la noche. Posteriormente, los tacos de ADN fueron lavados dos veces con EDTA 0,5 pH 9.0 durante 24 horas a 4° C y almacenados en esta solución (a 4 °C) hasta su utilización.

### 4.3 Aislamiento de ADN Genómico y Cromosomal

El ADN genómico de las cepas *T. rangeli* se aisló utilizando 2 métodos. El primero fue el método conocido como “cloroformo-fenol” este se utilizó para la extracción de ADNg a partir de cultivos de parásitos. Se tomaron 5 ml del cultivo de parásito en fase logarítmica, y se centrifugaron a 4000 g durante 10 min a temperatura ambiente para recolectar las células que se depositaron en el sedimento, el mismo fue lavado 2 veces con solución salina (NaCl 0,85%). Luego se procedió a lisar las células, al ser resuspendidas en 2 mL de Tampón de Lisis (Tris-HCL 10mM pH7,5; NaCl 100 mM; SDS 0,5%; EDTA 1mM). A esta solución se le agregó proteinasa K a una concentración final de 10 ug/mL, la resuspensión fue incubada toda la noche (10-18 horas) a 37 °C y posteriormente fue extraída dos veces con una mezcla de Cloroformo: Fenol 1:1, agitando moderadamente hasta observarse una emulsión, seguida de una centrifugación de 5000 g durante 15 min a temperatura ambiente. La fase acuosa resultante de la segunda centrifugación se mezcló con 2,5 volúmenes de Etanol 99 % y posteriormente incubada durante 2 horas a -20 °C para promover la precipitación de los ácidos nucleídos. Finalmente se centrifugó durante 10 minutos a 1000 g a 10°C. El sedimento de ADN resultante fue resuspendido en tampón TE (Tris-HCL 10mM pH8; EDTA 1mM).

El segundo método de extracción de ADN se utilizó para la extracción de ADN cromosomal, a partir de tacos de Agarosa. Este método se realizó mediante la utilización de un Kit de extracción de ADN “Gel Extraction System” N° Catálogo 11456, de la marca

comercial Life Technologies. El método consistió de una primera etapa de solubilización del taco de agarosa a 50°C durante 15 min utilizando el buffer de solubilización del kit “L1”, mezclando cada 3 min para garantizar la solubilización, posteriormente se realizó una centrifugación a 12000 g durante 1 minuto, luego se realizó una fase de lavado, utilizando el buffer de lavado del Kit “L2”, incubándolo durante 5 min, y centrifugándolo a 12000 g durante 1 minuto. Finalmente se colectó el ADN añadiendo 50 µl de buffer TE, incubándolo durante 1 minuto y aplicando una última centrifugación de 12000 g durante 2 minutos.

#### **4.4 Análisis de ADN mediante electroforesis en geles de agarosa.**

La evaluación de la integridad del ADN aislado por ambos métodos, así como los diferentes productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa. La concentración de la agarosa utilizada, se determinó basándose en el tamaño de los productos a analizar. Inicialmente, se mezcló la muestra a analizar con tampón de carga 6x (azul de bromofenol 0,25%; Cianol xileno 0,25%; Sacarosa 40 %), utilizando una relación muestra-tampón de 5:1, posteriormente las muestras fueron cargadas en los bolsillos de los geles. El tampón utilizado para las corridas electroforéticas fue TAE 1x (Tris-acetato 40 mM; EDTA 1mM pH 8,0) utilizando un voltaje no mayor a 5v/cm. Una vez finalizada la corrida, los geles fueron teñidos utilizando una solución de Bromuro de Etidio (0.5µg/ml). La visualización del ADN se realizó en un



transiluminador acoplado al sistema GEL-DOC 1000 (BioRad). El registro digital de las imágenes se realizó con el programa de computación QUANTITY ONE (BioRad).

#### **4.5 Tipificación de los aislados de tripanosoma por medio de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

Las cepas de *T. rangeli*, *T. cruzi* y *Leishmania*, fueron tipificadas por 3 ensayos de PCR especie-específica.

La prueba sobre la **secuencia repetitiva P542** se utilizó para identificar a *T.rangeli*. El producto de este ensayo de PCR es un segmento de 450 pb (Vargas y col, 2000). Los oligonucleótidos utilizados en esta prueba serán: P542 5' CGC GGC TCG CAC TGC ACC TC 3' y P542-R2 5' GGC GCA TCC ACC GAG CAC TG 3'. Los parámetros del ciclaje fueron: Un primer ciclo de desnaturalización a 94 °C por 4 minutos, 29 ciclos de tres pasos cada uno a 94 °C por 1 minuto, 65 °C por 1 minuto y 72 °C por 1 minuto y un ciclo de extensión final de 75 °C durante 5 minutos. Las condiciones que se utilizaron para la amplificación fueron: 1,25 U de Taq polimerasa (Invitrogen) en tampón de reacción (KCL 500 mM; Tri- HCL 200mM, pH 8.4) (Invitrogen), dNTPs 200 µM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM y los oligos a 1 µM. La reacción se llevó a cabo en un Termociclador Terminal Minicycler M.J Research PTC-200.

La prueba denominada **CLON6**, se utilizó para identificar a *T.cruzi*, es un PCR anclado sobre las secuencias repetitivas dispersas del espaciador ribosomal, con un producto de

325 pb (Araya y col., 1997). Los oligonucleótidos empleados fueron: Clon 6 F 5'GAT GCG CAT TTG TTA CGA 3' y Clon 6 R 5'CTG GCT GGC CTT GTA TCC 3'. Los parámetros de ciclaje empleados fueron: Un primer ciclo de desnaturalización a 95 °C durante 5 minutos, 10 ciclos de tres pasos cada uno: 95 °C durante 1 minuto, 50 °C durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto, 25 ciclos de tres pasos: 94°C durante 1 minuto, 50 °C durante 1 minuto y 72 °C durante 1 minuto, posteriormente 50 °C durante 1 minuto y un ciclo extensión final de 72°C durante 5 minutos. Las condiciones que se utilizaron para la amplificación fueron: 1,25 U de Taq polimerasa (invitrogen) en tampón de reacción (KCL 500 mM; Tri-HCL 200mM, pH 8.4) (invitrogen), dNTPs 200 µM, MgCl<sub>2</sub> 1,9 mM y los oligos a 0,4 µM. La reacción se llevo a cabo en un Termocilcador Terminal Minicycler M.J Research PTC-200.

Las diferentes cepas de *Leishmania* fueron tipificadas por medio del **PCR del Kinetoplasto** (Rodgers y col., 1990). Este PCR amplifica una región conservada del ADN mitocondrial de 120 pb, presente exclusivamente en *Leishmanias* del Nuevo Mundo. Los parámetros de ciclaje empleados fueron: Un primer ciclo de desnaturalización a 94 °C durante 2 minutos, 30 ciclos de tres pasos cada uno: 95 °C durante 1 minuto, 50 °C durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto, 25 ciclos de tres pasos: 94°C durante 30 segundos, 50 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 1 minuto, posteriormente 50 °C durante 1 minuto y un ciclo extensión final de 72°C durante 30 segundos. Las condiciones que se utilizaron para la amplificación fueron: 1,25 U de Taq polimerasa (invitrogen) en tampón de reacción (KCL 500 mM; Tri- HCL 200mM, pH 8.4) (invitrogen), dNTPs 200 µM, MgCl<sub>2</sub> 1,9 mM y los oligos

a 2  $\mu$ M cada uno (Hmd1, Hmd2 y Hmd3). La reacción se llevo a cabo en un Termocilcador Terminal Minicycler M.J Research PTC-200.

#### **4.6 Ensayo de PCR para amplificar una región de 450 pb de la transposasa IS10 en *T. rangeli* y otros tripanosomátidos.**

Los oligos que se utilizaron para el ensayo de PCR, fueron diseñados por Rodríguez (2005), basándose en la secuencia del gen de la transposasa putativa (Figura 5). Se emplearon los oligonucleótidos Tr24y Tr25, los cuales amplifican un producto de 450 pb dentro de la región de la transposasa. Como templado se utilizó ADN genómico de diferentes cepas de *T. rangeli*, *T. cruzi* y *Leishmania*, de igual manera se utilizaron extracciones de ADN cromosomal de los tacos de agarosa de los diferentes tripanosomátidos.

La mezcla de la reacción de PCR estuvo compuesta por: 1x tampón de reacción Taq polimerasa (invitrogen) (KCl 500 mM; Tris-HCl200mM, pH 8.4), dNTPs 200 $\mu$ M, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ M de cada oligo y 0.5 de Taq polimerasa (Sambrook, 1989). El programa que se utilizó en la amplificación fue: Un primer ciclo de 95°C durante 2 min, seguido de 35 ciclos que incluyen: 95 °C durante 30 seg, 65 °C durante 30 seg; 72°C durante 1 minuto y un último ciclo de 95°C durante 3 seg, 65°C durante 30 seg, 72°C durante 5 min.

#### **4.7 Evaluación de muestras del contenido intestinal, provenientes de vectores, preservadas en papel FTA para la presencia de la transposasa Is10.**

Los triatomíneos recibidos en el Laboratorio de Genética molecular del Instituto de Biología Experimental, durante el periodo 2008-2010, fueron registrados con los datos de especie, sexo, localidad donde fue capturado y hora de captura. Adicionalmente, se le añadieron otros renglones que nos permitía saber si el triatomíneo se encontraba vivo o muerto al momento del análisis. De igual manera se observó al microscopio una muestra del contenido intestinal de cada triatomíneo y se clasificaron con respecto a la presencia de parásitos circulantes.

Las muestras intestinales fueron obtenidas mediante disección, cortando la parte terminal del abdomen, a través de esta incisión, se inyectó solución salina (0,85%) con una jeringa de 1 ml, que permitía diluir el contenido intestinal. El líquido resultante de la cavidad abdominal, fue colocado sobre un papel especializado para la recolección de fluidos denominado papel FTA (Flinders Technology Associates) de la casa comercial Whatman. El papel FTA fue picado en trozos pequeños, luego se dejó secar a temperatura ambiente. Los papeles de FTA fueron sometidos a un lavado con un reactivo de purificación FTA y tampón TE. Paralelamente, se tomó una gota del contenido intestinal, para la observación de la muestra al microscopio de luz. Adicional al almacenamiento del contenido intestinal en papel FTA, se almacenó directamente el líquido resultante del lavado intestinal con solución salina, en tubos de microcentrifuga de 1,5 ml de capacidad.

Posteriormente, tanto los papeles de FTA, como las muestras líquidas, fueron utilizados como ADN diana para la prueba de PCR de la transposasa para la ubicación del fragmento de 450 pb en la región del IS10, utilizando las condiciones descritas en la sección 4.6

#### **4.8 Electroforesis de Campo Pulsado.**

Los tacos de ADN cromosomal, almacenados a 4° C en una solución de EDTA 0,5 pH 9.0 fueron analizados mediante electroforesis de campo pulsado. Implementando un nuevo método en el laboratorio de Genética Molecular del IBE, la electroforesis de campo pulsado utilizando una mini cámara electroforética denominada TAFE “Campos eléctricos Alternantes Transversales”, de la marca comercial Guefast.

Como paso principal se procedió a la elaboración de geles de agarosa 1,5 X con buffer TBE 0.5 X. El gel mide 5cm de ancho x 7 cm de largo, y se utilizó un peine de 12 posillos. En estos posillos, se colocaron los moldes de agarosa de ADN cromosomal. Posteriormente, se llena la minicámara con 900 ml de Buffer TBE 0.5 X, y se colocó el gel dentro de ella. La temperatura de la corrida se estableció en 20 °C. Las condiciones de la corrida que se utilizaron fueron: Un campo eléctrico de 10 V/cm, voltaje de 140V, y una rampa que estaba comprendida entre 400 – 700 pulsos, con una duración de cada pulso de 30 segundos. Vale la pena acotar que a medida que se incrementa la cantidad de pulsos (en un rango entre 400 – 700 ) el tiempo de corrida fue mayor.

Los geles fueron teñidos con Bromuro de Etidio, y visualizados con luz U.V con la ayuda de un transiluminador acoplado a un sistema GEL-DOC (BioRad). Las imágenes de los electrocariotipos fueron almacenadas digitalmente utilizando el sistema de computación QUANTITY ONE (BioRad).

#### **4.9 Transferencia de ADN por capilaridad.**

Los electrocariotipos obtenidos mediante la electroforesis de campo pulsado CHEF, se transfirieron a membranas de nylon (Hybond-plus) mediante capilaridad. Se utilizaron 2 soluciones de transferencias diferentes. Una primera transferencia se llevo a cabo bajo condiciones alcalinas, utilizando una solución de transferencia NaOH 0,4 N, lo cual desnaturizara el ADN facilitando la eficiencia de la transferencia (Sambrook et al, 1989). La segunda solución de transferencia que se utilizo fue SSC Solución de Citrato 20 X, pH 7. Posteriormente, se midió el área del gel que se desea transferir (5cm x 7 cm), se recorto una membrana del mismo tamaño, esta membrana se humedeció en la solución de transferencia durante 5 minutos. La transferencia se realizo sobre una bandeja, la cual se dispuso con la solución de transferencia, sobre un soporte se colocaron las hojas de papel Whatman N° 1 asegurándose que esté en contacto con la solución de transferencia. Luego, se cubrió el gel a transferir con la membrana previamente humedecida y sobre este se coloco una cantidad adecuada de servilletas. Sobre este montaje se posiciono un

peso aproximadamente de medio Kilo, y dejando un tiempo prudencial 24-42 horas para la transferencia.

#### **4.10 Obtención y marcaje de sondas de ADN.**

Las sondas de ADN que se utilizaron en las hibridaciones para reconocer la transposasa IS10, fueron obtenidas mediante PCR de la transposasa, utilizando como templado el recombinante STR107. Para la obtención de la sonda se utilizaron los oligonucleótidos Tr24 y Tr25, diseñadas por Rodríguez, (Laboratorio Genética Molecular 2005), que amplifican una región de 450 Pb.

La sonda que ancla en los telómeros de *T cruzi*, se obtuvo utilizando el PCR Tc189, el cual amplifica un fragmento de 100 pb de la secuencia telomérica Tc189 de *T cruzi*, utilizando como ADN templado *Tc JMP*, utilizando los oligos T189Fw2 (5'-CCAACGCTCCGGGAAAAC-3') y Tc189Rv3 (5'-GCGTCTTCTCAGTATGGACTT-3'). El programa que se utilizó en la amplificación fue: Un primer ciclo de 95°C durante 2 min, seguido de 35 ciclos que incluyen: 95 °C durante 30 seg, 55 °C durante 45 seg; 72°C durante 45 segundos y un último ciclo de 72°C durante 10 min.

La sonda que ancla en la región telomérica de *T rangeli*, se obtuvo utilizando un PCR que amplifica un fragmento de 170 pb en la región conservada de los telómeros de *T. rangeli*,

se utilizo ADNg de la cepa Tr triat como templado, los oligos utilizados fueron TrF3 (5'-CCCCATACAAAACACCCTT-3') y TrR8 (5'-TGGAATGACGGTGC GGCGAC-3'). El programa que se utilizo en la amplificación fue: Un primer ciclo de 95°C durante 2 min, seguido de 35 ciclos que incluyen: 95 °C durante 30 seg, 57 °C durante 45 seg; 72°C durante 45 segundos y un último ciclo de 72°C durante 10 min.

La metodología de marcaje de las sondas fue no-radioactivo. Utilizándose una molécula de digoxigenina, mediante la incorporación en el ADN del nucleótido dUTP unido a la molécula de digoxigenina. En los PCR para obtener las sondas, se emplearon dinucleótido marcados con digoxigenina, que provee el estuche de marcaje de ADN "DIG DNA labeling kit" de la marca comercial Boehringer Mannheim. La eficiencia del marcaje se determino utilizando el protocolo descrito en el manual de identificación y diagnostico molecular de microorganismos (Guevara y col., 2004), utilizando el estuche "DIG DNA DETECTION KIT", de la marca comercial Boehringer Mannheim.

#### **4.11 Hibridación de los electrocariotipos**

Las membranas de los electrocariotipos resultantes de la transferencia de ADN por capilaridad, fueron colocadas en el horno a 80°C durante 2 horas. Una vez fijado el ADN a las membranas, se procedió a prehibridarlas durante 3 horas a 65°C con solución de hibridación (Formamida 50%; SSC 5x; SDS 0,2%; N-layryl sarcosinato 0,1 %; Agente bloqueante 1 %). Seguidamente se agrego una mezcla entre la solución de hibridación y



los oligos marcados con digoxigenina, en condiciones de alta estrictez durante toda la noche, a 37° C con agitación durante toda la noche. Posteriormente se realizo un lavado a 60° C durante 15 minutos con una solución de SSC 2x; SDS 0,1 %. Luego se realizaron 4 lavados con solución SSC 1x; SDS 0,1%. Un ultimo lavado durante 15 min a 60°C con una solución de SCC 0,2X; SDS 0,1%. La detección de la sonda hibridada, se realizo con el anticuerpo Anti-digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina, siguiendo las especificaciones del Kit comercial "DIG DNA DETECTION KIT" de la casa comercial Boehringer Mannheim. Como paso final, las membranas fueron expuestas en un Chemidoc XRS acomplado al sistema de computación QUANTITY ONE de Biorad.

#### **4.12 Análisis de la secuencia del recombinante STR107 en los bancos de datos.**

La secuencia del recombinante STR107 fue utilizada para hacer análisis comparativos en los bancos de datos GenBank y GenDB. Se tomaron en cuenta los organismos que presentaron un porcentaje de identidad mayor a 97% con la secuencia STR107. De igual manera se comparo la cantidad de organismos que presentaron similitud en análisis que se hizo en el año 2010 con el que se hizo en el año 2012.

## V. Resultados

### 5.1 Tipificación de las cepas de tripanosomátidos utilizadas mediante ensayos de PCR especie específica.

La caracterización molecular del elemento móvil bacteriano IS10 en las diferentes cepas de los tripanosomátidos *T. rangeli*, *T. cruzi* y *Leishmania*, contempla una serie de pasos a seguir, como es determinar la presencia del gen de la transposasa por medio de PCR y su posterior ubicación cromosómica por medio de hibridaciones en membranas de nylon. Sin embargo, como paso inicial es necesario garantizar la identidad de las cepas de estudio, por medio de ensayos de PCR especie específicos para los diferentes tripanosomátidos.

El ADN de las diferentes cepas de tripanosomátidos utilizadas en este trabajo, pertenecen a una colección del laboratorio de Genética molecular del Instituto de Biología Experimental (IBE) (Tabla 4). El ADN cromosomal de las cepas se encuentran preservadas en tacos de agarosa embebidas en EDTA (0,5 – 1 mM). Estos tacos de agarosa fueron sometidos a una extracción de ADN, utilizando un estuche comercial de Life Technologies específico de extracción a partir de tacos de Agarosa. El resultado de la extracción se verificó en geles de agarosa 1 % (Figura 6). De igual manera se utilizaron otras cepas las cuales se encontraban aisladas previamente, ADN genómico resuspendido en buffer TE, así como también se obtuvieron cepas por medio del aislamiento de ADN directamente del cultivo de parásitos llevados en el laboratorio en agar sangre (Tabla 4).

**Tabla 4. Aislados de los diferentes tripanosomátidos utilizados en este estudio**

Especie	Preservación	<sup>a</sup> TCC	Aislado/Cepa	Origen	<sup>b</sup> Grupo
<i>T. rangeli</i>	Taco/ADNg/Cultivo	---	Triatomino	Venezuela	A
<i>T. rangeli</i>	Taco/ADNg/Cultivo	---	Perro	Venezuela	A
<i>T. rangeli</i>	Taco	021	CH	Colombia	A
<i>T. rangeli</i>	Taco/ADNg	---	Tocuyo	Venezuela	A
<i>T. rangeli</i>	Taco/ADNg	382	Roma	Brasil	A
<i>T. rangeli</i>	ADNg	022	Palma	Venezuela	A
<i>T. rangeli</i>	Taco	--	Mono	Venezuela	A
<i>T. rangeli</i>	Taco/ADNg	---	San Agustín	---	B
<i>T. rangeli</i>	Taco/ADNg	014	PG	Panamá	C
<i>T. rangeli</i>	Taco	---	Racoon /	Costa Rica	C
<i>T. rangeli</i>	Taco	023	SC58	Brasil SC	D

Especie	Preservación	Aislado / Cepa
<i>T. cruzi</i>	Taco/ADNg	JMP
<i>T. cruzi</i>	Taco/ADNg	CL Brener
<i>T. cruzi</i>	Taco/ADNg	YBM
<i>T. cruzi</i>	Taco/ADNg	“Recuperado de
<i>T. cruzi</i>	ADNg	“196 C”
<i>T. cruzi</i>	ADNg	DM28

Especie	Preservación	Aislado / Cepa
<i>Leishmania</i>	Taco	<i>L. donovani</i> .
<i>Leishmania</i>	Taco / ADNg	<i>L. braziliensis</i> .
<i>Leishmania</i>	Taco / ADNg	<i>L. amazonensis</i> .
<i>Leishmania</i>	Taco / ADNg	<i>L. chagasi</i> .
<i>Leishmania</i>	Taco /ADNg	<i>L. trujillo</i> .
<i>Leishmania</i>	Taco	<i>L. DD8</i> .
<i>Leishmania</i>	Taco	<i>L. Y9</i> .
<i>Leishmania</i>	Taco	<i>L. PP75</i> .
<i>Leishmania</i>	Taco	<i>L. I245</i> .
<i>Leishmania</i>	Taco	<i>L. IE4</i> .

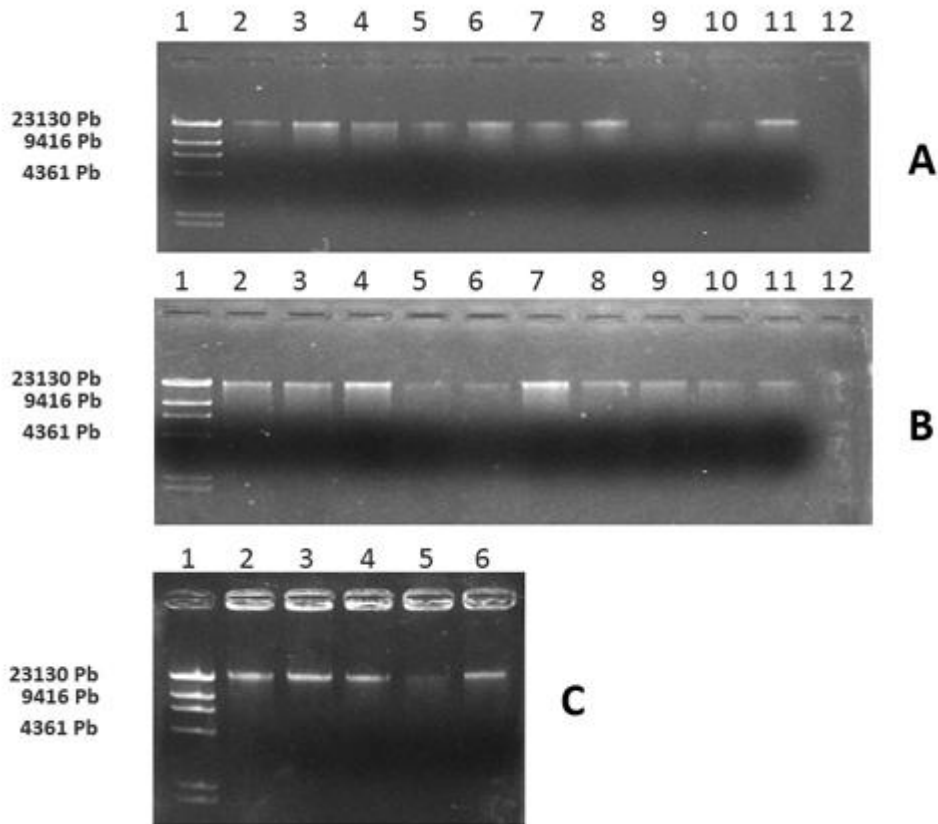
<sup>a</sup> TryCC: Código de la Colección de cultivos de tripanosomatídeos, Departamento de Parasitología, ICB, USP, Sao Paulo-Brasil.

<sup>b</sup> Clasificación en grupos A, B, C y D según Maia da Silva y col., 2004A y b.

### 5.1.1 PCR anclado de secuencia repetitiva P542. *T. rangeli*

Posterior a la extracción de ADN de los tacos de agarosa, se procedió a la verificación de su identidad mediante el ensayo de PCR denominado P542 (Vargas y col., 2000) el cual identifica de manera específica secuencias repetidas en el genoma de *T. rangeli*. En la figura 7 se observa la amplificación del producto esperado de 450 pb para la mayoría de las muestras. En el caso de las cepas aisladas de los tacos de agarosa, resultaron todas positivas (figura 7-A), mientras que las cepas que se encontraban previamente aisladas, pertenecientes al cepario del Laboratorio de Genética Molecular, solo Palma obtuvo un resultado negativo (figura 7-B). Tampoco se obtuvo amplificación los controles negativos de la reacción, ni para la cepa JMP de *T. cruzi*.

Todas las muestras de las cepas de *T. rangeli*, fueron sometidas un PCR Clon 6, específico para *T. cruzi*, ninguna de las cepas que se encontraban preservadas en tacos de agarosa, resultaron positivas a este PCR, de esta manera no solo confirmamos la identidad de las cepas de *T. rangeli*, si no que descartamos la presencia de ADN de *T. cruzi* en las cepas de *T. rangeli* (Resultados no mostrados).

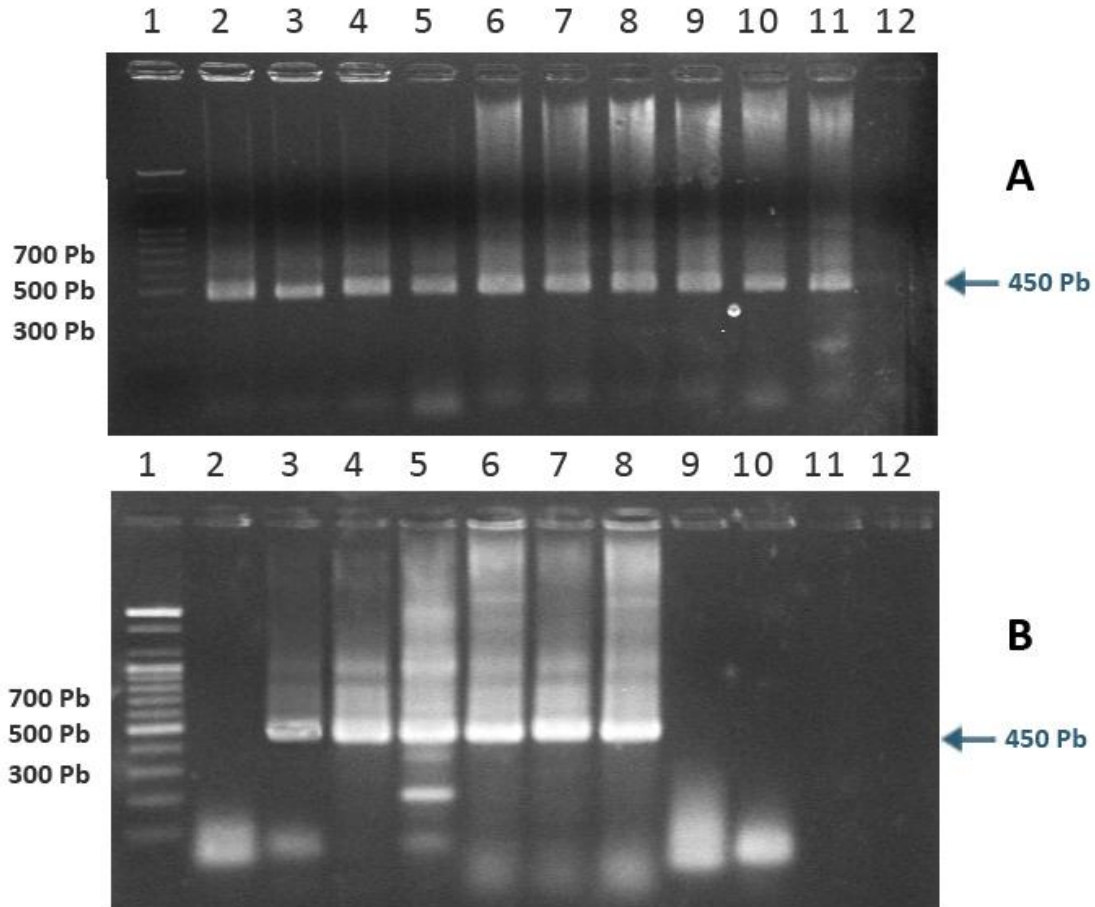


**Figura 6. ADN Cromosomal aislado de tacos de agarosa.** Corrida electroforética de ADN cromosomal de las diferentes cepas de *T rangeli*, *T cruzi* y *Leishmania*. La corrida se efectuó a 50 V, en un gel de 2 % de agarosa, tampón TE 1 X. El gel fue teñido con Bromuro de etidio (0,5ug/mL).

**A. Carril 1.** Marcador peso molecular  $\lambda$ /HindIII **Carril 2** *Tr* Triat. **Carril 3** *Tr* SC58. **Carril 4** *Tr* PG **Carril 5** *Tr* Perro. **Carril 6** *Tr* CH. **Carril 7** *Tr* Racoon. **Carril 8** *Tr* Tocuyo. **Carril 9** *Tr* Roma. **Carril 10** *Tr* JRM. **Carril 11.** *Tr* San Agustín. **Carril 12.** Control negativo del kit de extracción

**B. Carril 1.** Marcador peso molecular  $\lambda$ /HindIII **Carril 2** *L donovani*. **Carril 3** *L braziliensis*. **Carril 4** *L amazonensis*. **Carril 5** *L chagasi*. **Carril 6** *L trujillo*. **Carril 7** *L DD8*. **Carril 8** *L Y9*. **Carril 9** *L PP75*. **Carril 10** *L I245*. **Carril 11** *L IE4*. **Carril 12.** Control negativo del kit de extracción

**C. Carril 1.** Marcador peso molecular  $\lambda$ /HindIII **Carril 2** *Tc* JMP. **Carril 3** *Tc* Cl Brener. **Carril 4** *Tc* YBM. **Carril 5** *Tc* Y. **Carril 6** *Tc* "Recuperado de Chipo".



**Figura 7. Tipificación de los aislados de *T. rangeli* mediante PCR P542.** Corrida electroforética de los productos de PCR P542 sobre diferentes cepas de *T. rangeli*. La corrida se efectuó a 50 V, en un gel de 2 % de agarosa, tampón TE 1 X. El gel fue teñido con bromuro de etidio (0,5ug/mL).

**A.** ADN Cromosomal de Tacos. **Carril 1.** Marcador peso molecular 100 pb **Carril 2** *Tr* Triat. **Carril 3** *Tr* SC58. **Carril 4** *Tr* PG **Carril 5** *Tr* Perro. **Carril 6** *Tr* CH. **Carril 7** *Tr* Racocon. **Carril 8** *Tr* Tocuyo. **Carril 9** *Tr* Roma. **Carril 10** *Tr* JRM. **Carril 11.** *Tr* San Agustín. **Carril 12.** Control negativo la reacción de PCR.

**B.** ADNg previamente aislados. **Carril 1.** Marcador peso molecular 100 pb **Carril 2** *Tr* Palma. **Carril 3** *Tr* Roma. **Carril 4** *Tr* San Agustín **Carril 5** *Tr* Perro. **Carril 6** *Tr* PG. **Carril 7** *Tr* Sc58. **Carril 8** *Tr* Triatomino. **Carril 9** *Tc* JMP. **Carril 10** Control Negativo de la reacción.

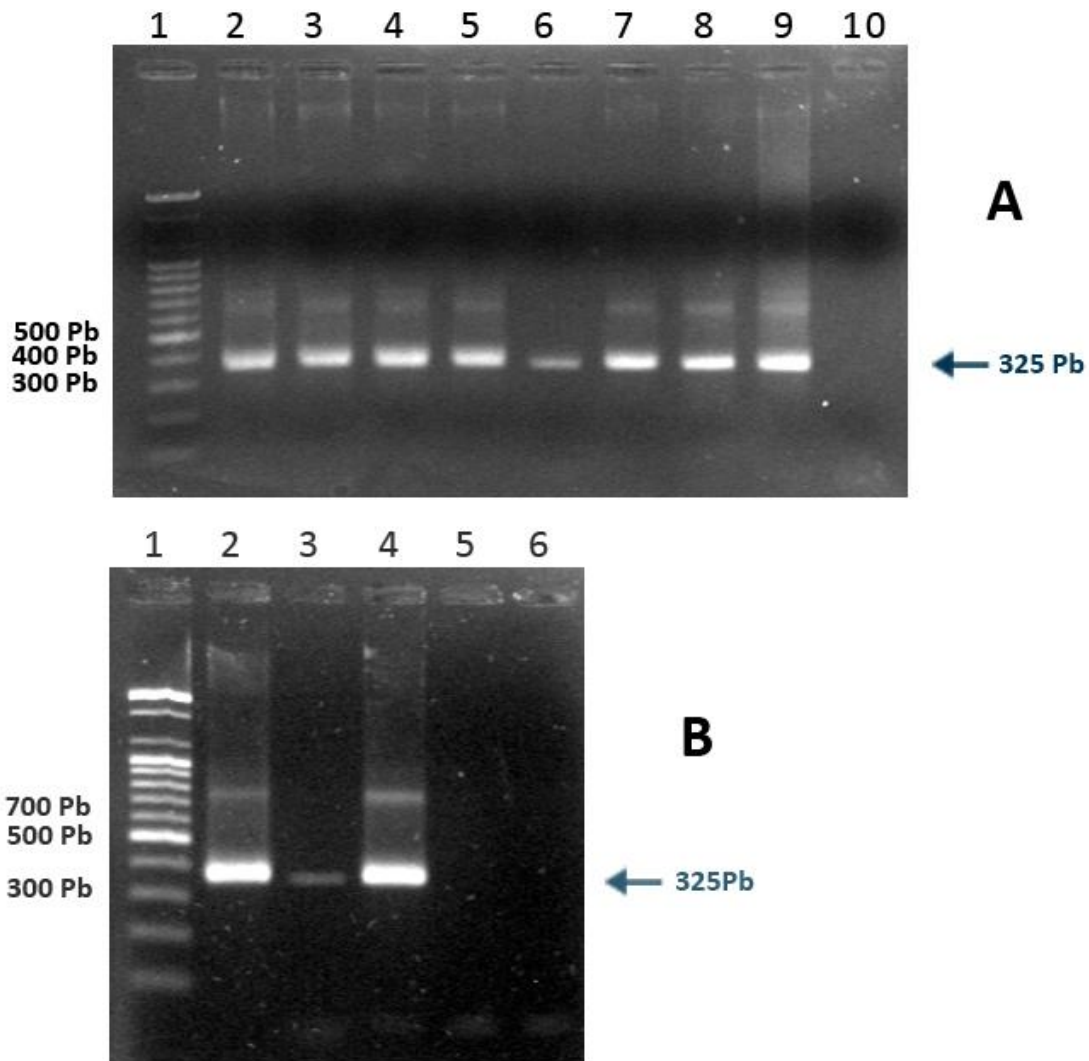
### **5.1.2 PCR de secuencias repetitivas dispersas, Clon 6. *T. cruzi***

El PCR denominado Clon 6, es utilizado para la identificar las cepas de la especie *T. cruzi*, el cual amplifica una región de 325 pb. Como se puede observar en la figura 8, todas las cepas aisladas de los tacos de agarosa resultaron positivas (Figura 8 A carriles 2-6), de igual manera las muestras de ADNg de *T. cruzi* que se encontraban previamente aisladas, amplificaron el producto de 325 pb (Figura 8A carriles 7-9). No se observó amplificación en el control negativo, ni tampoco en la cepa de *T. rangeli* Triatomino.

Se realizó un PCR P542 específico para la especie *T. rangeli* sobre el ADN de las cepas de *T. cruzi* resultantes de la extracción de tacos de agarosa, y se encontró que la cepa denominada “recuperada de chipo”, presentó la amplificación de la banda de 450 Pb (Figura 9), específica para *T. rangeli*. La evaluación con los ensayos de PCR de tipificación Clon 6 y P542 fueron repetidos, observándose que la muestra “Recuperado de Chipo” amplificó para ambos ensayos de PCR.

### **5.1.3 PCR Kinetoplasto, región conservada del ADN mitocondrial de *Leishmania*.**

Para la identificación de las cepas de *Leishmania*, se realizó un PCR del Kinetoplasto (Rodgers y col., 1990). Este PCR amplifica una región de 120 pb. En la figura 10, se observó como todas las muestras de *Leishmania* amplificaron la región de 120 pb, ni el control negativo de la reacción, ni la cepa *Tr.* Triatomino presentó amplificación. De igual manera se realizó el PCR a las muestras de ADNg previamente aisladas, pertenecientes al cepario del LGM del IBE, y se corroboró la identidad de las diferentes cepas de *Leishmania* (figura 10-b).

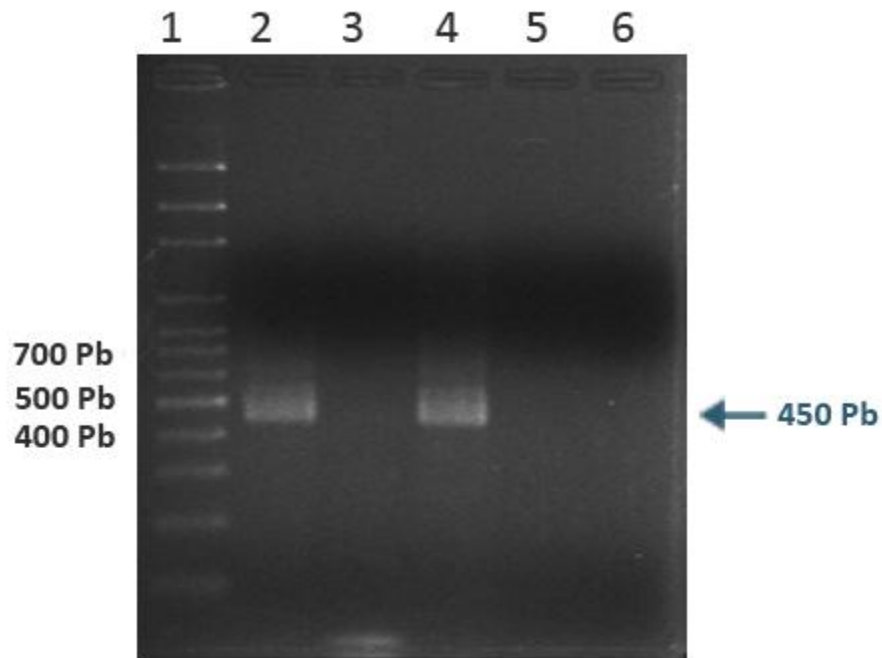


**Figura 8. Tipificación de los aislados de *T. cruzi* mediante el PCR "Clon 6".** PCR específico de las secuencias repetitivas dispersas del espaciador ribosomal para la reconocer a *T. cruzi*. Corrida electroforética de los productos de PCR Clon 6 sobre diferentes cepas de *T. cruzi*. La corrida se efectuó a 50 V, en un gel de 2 % de agarosa, tampón TE 1 X. El gel fue teñido con bromuro de etidio (0,5ug/mL).

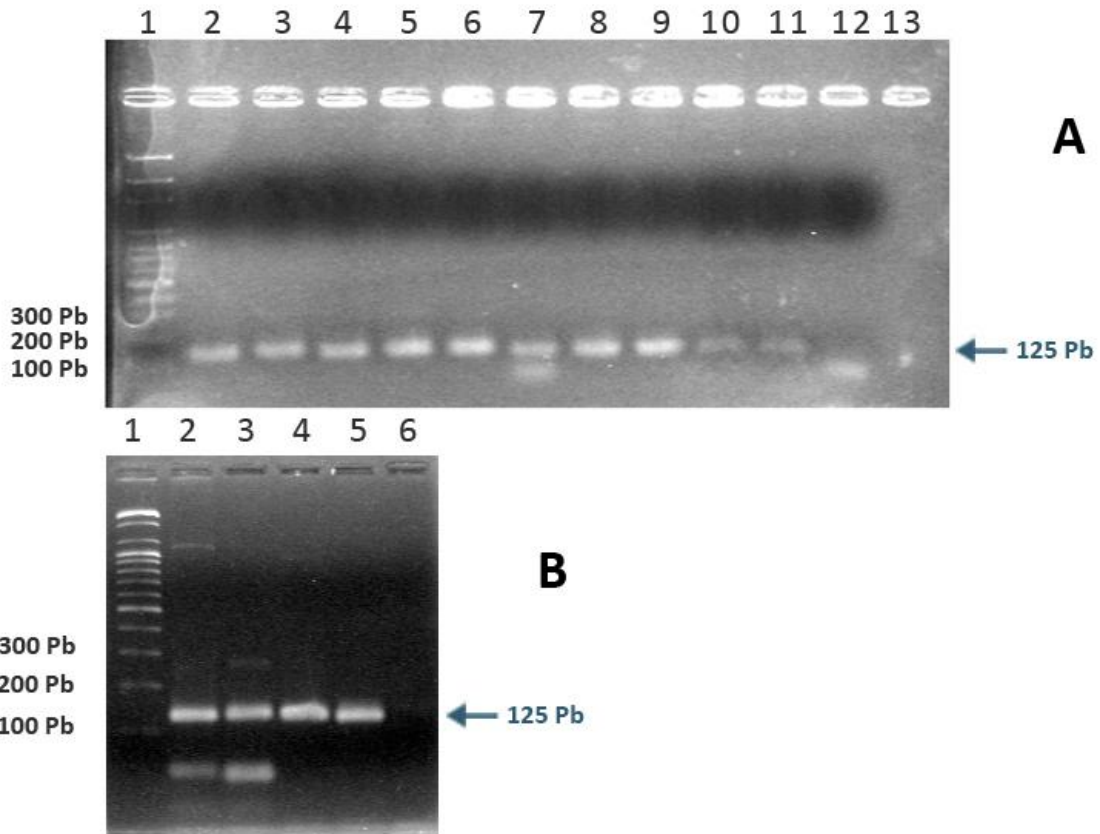
**A. Carril 1.** Marcador peso molecular 100 pb **Carril 2** *Tc* JMP. **Carril 3** *Tc* Cl Brener. **Carril 4** *Tc* YBM. **Carril 5** *Tc* Y. **Carril 6** *Tc* "Recuperado de Chipó". **Carril 7.** *Tc* JMP **Carril 8** *Tc* Cl Brener. **Carril 9** *Tc* YBM. **Carril 10** Control Negativo de la reacción.

**B. Carril 1** Marcador peso molecular 100 pb **Carril 2** *Tc* JMP. **Carril 3** *Tc* 196. **Carril 4** *Tc* DM28. **Carril 5** *Tr* Triatomino. **Carril 6** Control negativo de la reacción





**Figura 9. PCR P542 para los aislados de *T. cruzi*.** Se utilizó el PCR P542 específico para identificar *T. rangeli*, sobre cepas de *T. cruzi*. La corrida se efectuó a 50 V, en un gel de 2 % de agarosa, tampón TE 1 X. El gel fue teñido con bromuro de etidio (0,5ug/mL). **Carril 1.** Marcador de peso Molecular 100 pb. **Carril 2.** Control positivo, *Tr* Triatomino. **Carril 3.** *Tc* YMB. **Carril 4.** *Tc* "recuperado de Chipó". **Carril 5.** *Tc* Cl Brener. **Carril 6.** Control negativo de la reacción.



**Figura 10. Tipificación de los aislados de *Leishmania* mediante PCR del Kinetoplasto.** PCR ADNk específico para reconocer a especies de *Leishmania* del nuevo mundo. Corrida electroforética de los productos de PCR en diferentes cepas de *Leishmania*. La corrida se efectuó a 50 V, en un gel de 2 % de agarosa, tampón TE 1 X. El gel fue teñido con bromuro de etidio (0,5ug/mL).

**A. Carril 1.** Marcador peso molecular 100 pb **Carril 2** *L. donovani*. **Carril 3** *L. braziliensis*. **Carril 4** *L. amazonensis*. **Carril 5** *L. chagasi*. **Carril 6** *L. trujillo*. **Carril 7** *L. DD8*. **Carril 8** *L. Y9*. **Carril 9** *L. PP75*. **Carril 10** *L. I245*. **Carril 11** *L. IE4*. **Carril 12.** Control negativo del kit de extracción

**B. Carril 1.** Marcador peso molecular 100 pb **Carril 2** *L. braziliensis*. **Carril 3** *L. trujillo*. **Carril 4** *L. chagasi*. **Carril 5** *L. amazonensis LBT0016*. **Carril 6** Control negativo de la reacción.

## 5.2 Análisis de la secuencia del recombinante STR107 en los bancos de datos.

En la tabla 5 se muestra el resultado del análisis de la secuencia de 1335 pb del recombinante STR107 en los bancos de datos. Tomando en cuenta aquellos organismos en los que se encontró similitud mayor a 97%, de igual manera se describe su ubicación.

**Tabla 5.** Análisis de homología en el banco de datos (GenBank) de la secuencia del recombinante STR107.

<u>Organismo</u>	<u>Gen</u>	<u>Num. Acceso</u>	<u>Identidad</u>
<i>Mus musculus</i>	Hidrolasa Trifosfato	<a href="#">AH010680.2</a>	1316/1335 (99%)
<i>Solanum lycopersicum</i>	Cromosoma 2, clon C02SLe0011K05	<a href="#">AC215445.1</a>	1315/1334 (99%)
<i>Homo sapiens</i>	Haplotipo RSH KIR A KIR cluster de genes	<a href="#">GU182356.1</a>	1314/1333 (99%)
<i>Gallus gallus</i>	cromosoma 1, p-arm region cerca del centromero	<a href="#">AB556732.1</a>	1314/1333 (99%)
<i>Glycine max</i>	cDNA, clon	<a href="#">AK245587.1</a>	1314/1333 (99%)
<i>Solanum lycopersicum</i>	cromosoma 2 clon C02SLe0011K05	<a href="#">AC215445.1</a>	1315/1334 (99%)
<i>Oryza sativa</i>	cDNA, clon: J043031P17	<a href="#">AK287494.1</a>	1314/1333 (99%)
<i>Rhesus Macaque</i>	BAC CH250-148I19	<a href="#">AC196378.4</a>	1314/1333 (99%)
<i>Canis Familiaris</i>	cromosoma 2, clon XX- 440P16	<a href="#">AC190114.4</a>	1314/1333 (99%)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	mRNA para una proteína hipotética	<a href="#">AK229478.1</a>	1314/1333 (99%)
<i>Shigella flexneri</i>	2a str. 301, genoma completo	<a href="#">AE005674.1</a>	1318/1337 (99%)
<i>Escherichia coli</i>	Secuencia de inserción IS10 transposasa (tnp10 gen)	<a href="#">AM269884.1</a>	1317/1336

			(99%)
<i>Salmonella enterica</i>	Typhimurium plasmido R64 DNA	<a href="#">AP005147.1</a>	1315/1334 (99%)
<i>Bacillus cereus</i>	Gen para la transposasa complete cds	<a href="#">AB083420.1</a>	1306/1327 (98%)
<i>Staphylococcus</i>	SR1 clone step.1052g06	<a href="#">AF270188.1</a>   <a href="#">AF270188</a>	1314/1333 (99%)
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	IP 31758, genoma completo	<a href="#">CP000720.1</a>	1309/1334 (98%)
<i>Aspergillus niger</i>	Contig Genomico	<a href="#">AM270199.1</a>	1312/1337 (98%)
<i>Carica papaya</i>	clon MSY BAC PH41F24	<a href="#">EF625817.1</a>	1310/1335 (98%)
<i>Macaca mulatta</i>	BAC CH250-361C3	<a href="#">AC202726.6</a>	1309/1334 (98%)
<i>Bos taurus</i>	46-kDa precursor colectina (CL-46)	<a href="#">AF509589.1</a>	1308/1334 (98%)
<i>Triticum aestivum</i>	cromosoma 3B-especifico BAC	<a href="#">FN564434.1</a>	1308/1335 (98%)
<i>Sus scrofa</i>	Transposasa tipo-DDE proteina mRNA	<a href="#">AY864607.1</a>	1309/1335 (98%)
<i>Chinchilla lanigera</i>	IS10 transposasa-like proteina mRNA	<a href="#">AY533233.1</a>	1301/1335 (97%)
<i>Drosophila melanogaster</i>	BAC CH223-5O10	<a href="#">AC125292.4</a>	1300/1334 (97%)
<i>Felis catus</i>	Secuencia proximal y central de secuencia Clase, región genómica.	<a href="#">EU153401.1</a>	1300/1334 (97%)

Utilizando la herramienta informática BLASTn, se realizó una búsqueda de la secuencia de STR107, escogiendo los resultados que obtuvieron un porcentaje mayor a 97%. (Consultado Agosto-Septiembre 2012).

### **5.3 Evaluación de la presencia del elemento móvil bacteriano IS10 mediante PCR en diferentes cepas de *T. rangeli* y otros Tripanosomátidos.**

Con el propósito de determinar la presencia del elemento móvil IS10 en el genoma de diferentes tripanosomátidos, se realizaron pruebas de PCR las cuales amplificaron una banda específica de 450 pb en la secuencia de la transposasa de IS10, utilizando los oligos Tr24/Tr25 (Figura 11). Se utilizó el recombinante STR107 como control positivo de la reacción de PCR. Por trabajos anteriores se conocía la secuencia completa de este recombinante, motivo por el cual se procedió a realizar un análisis de su secuencia en el banco de datos GenBank. En la tabla 5 se observan los resultados obtenidos, se evidenció que la secuencia del STR107 presenta una alta similitud a la transposasa IS10, que se encuentra en una gran variedad de organismos. Vale la pena resaltar que para el genoma de *T. brucei* (TriTryp) se reportó la ubicación de esta secuencia en el cromosoma 3 (Tb03.27F10.210), interrumpiendo una proteína putativa. También se reportó en el cromosoma 6 (Tb06.1I18.660), donde se encuentra flanqueada por glicoproteínas de superficie (VSG) putativas.

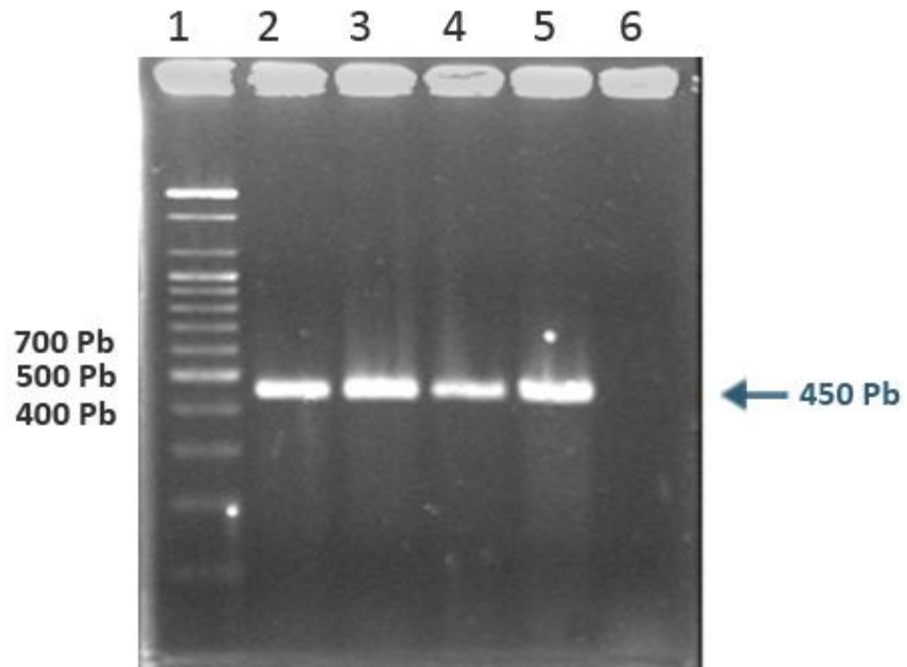
Las condiciones de la reacción de PCR habían sido previamente establecidas (Rodríguez 2006). En la figura 12 se muestra el resultado del PCR Transposasa utilizando el recombinante STR107, observándose la región de 450 pb producto de la amplificación de los oligos Tr24/Tr25. Se probaron diferentes 4 aislados del recombinante STR107 (Figura 12, carril 2-5) para constatar que estuvieran en buen estado.

```

1      GCGCTGATGA ATCCCCTAAT GATTTTTATC AAAATCATTC AAGTTAAGGT AGATACACAT
61     CTTGTCATAT GATCAAATGG TTTTCGCCAAA AATCAATAAT CAGACAACAA AATGTGCGAA
121    CTCGATATTT TACACGACTC TCTTTACCAA TTCTGCCCCG AATTACACTT AAAACGACTC
181    AACAGCTTAA CGTTGGCTTG CCACGCCTTA CTTGACTGTA AAACCTCTCAC TCTTACCGAA
241    CTTGGCCGTA ACCTGCCAAC CAAAGCGAGA ACAAACATA ACATCAAACG AATCGACCGA
301    TTGTTAGGTA ATCGTCACCT CCACAAAGAG CGACTCGCTG TATACCGTTG GCATGCTAGC
361    TTTATCTGTT CGGGCAATAC GATGCCCATT GTACTTGTTG ACTGGTCTGA TATNCGTGAG
421    CAAAAACGGC TTATGGTATT GCGAGCTTCA GTCGCACTAC ACGGTCGTTC TGTTACTCTT
481    TATGAGAAAG CGTTCCCGCT TTCAGAGCAA TGTTCAAAGA AAGCTCATGA CCAATTTCTA
541    GCCGACCTTG CGAGCATTCT ACCGAGTAAC ACCACACCGC TCATTGTCAG TGATGCTGGC
601    TTTAAAGTGC CATGGTATAA ATCCGTTGAG AAGCTGGGTT GGTACTGGTT AAGTCGAGTA
661    AGAGGAAAAG TACAATATGC AGACCTAGGA GCGGAAAACCT GGAAACCTAT CAGCAACTTA
721    CATGATATGT CATCTAGTCA CTCAAAGACT TTAGGCTATA AGAGGCTGAC TAAAAGCAAT
781    CCAATCTCAT GCCAAATTCT ATTGTATAAA TCTCGCTCTA AAGGCCGAAA AAATCAGCGC
841    TCGACACGGA CTCATTGTCA CCACCCGTCA CCTAAAATCT ACTCAGCGTC GGCAAAGGAG
901    CCATGGATTC TAGCAACTAA CTTACCTGTT GAAATTCTG CACCCAAACA ACTTGTTAAT
961    ATCTATTCTGA AGCGAATGCA GATTGAAGAA ACCCTCCGAG ACTTGAAAAG TCCTGCCTAC
1021   GGACTAGGCC TACGCCATAG CCGAACGAGC AGCTCAGAGC GTTTTGATAT CGAATTCCTG
1081   CAGCTGCTTC AACTNACATG TTGGCTTTTCG GCGGTTTCATG CTCAGAAACA AGGTTGGGAC
1141   AAGCACTTCC AGGCTAACAC AGTCAGAAAT CGAAACGTAC TCTCAACAGT TCGCTTAGGC
1201   ATGGAAGTTT TGCGGCATTC TGGCTACACA ATAACAAGGG AAGACTCACT CGTGGCTGCA
1261   ACCCTGCTTA CTCAAATCT ATTACACAT  GGTTACGTTT TGGGGAAATT AGAGGGGTCT
1321   CTCAGC

```

**Figura 11. Secuencia del recombinante STR107, e hibridación de los oligos que amplifican una región de la transposasa IS10.** Los recuadros señalan la secuencia de los oligos Tr24 “forward” en azul y Tr 25 “reverse” en rojo. Los oligos fueron diseñados para amplificar un segmento de 450 pb.

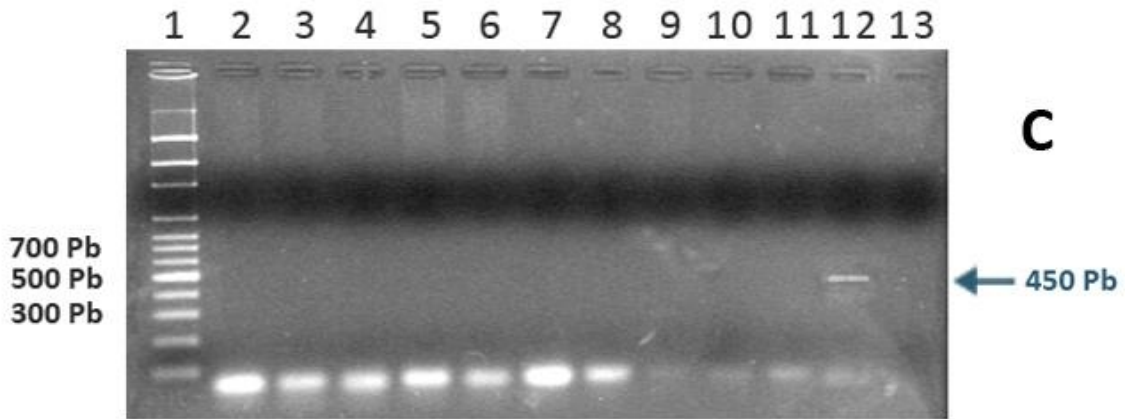
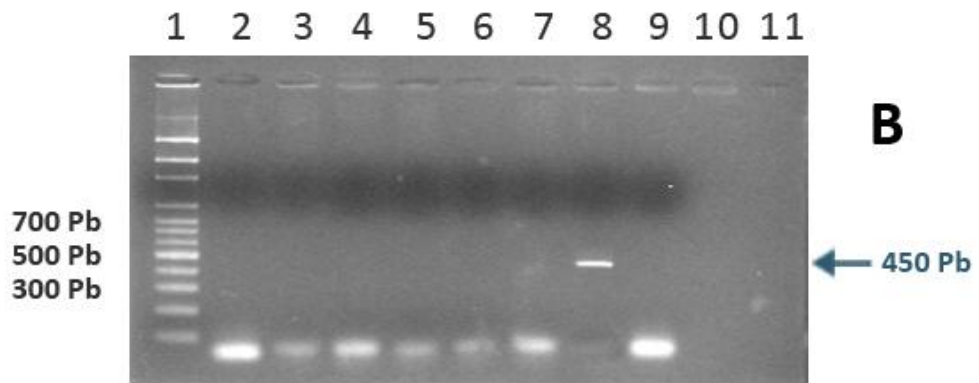
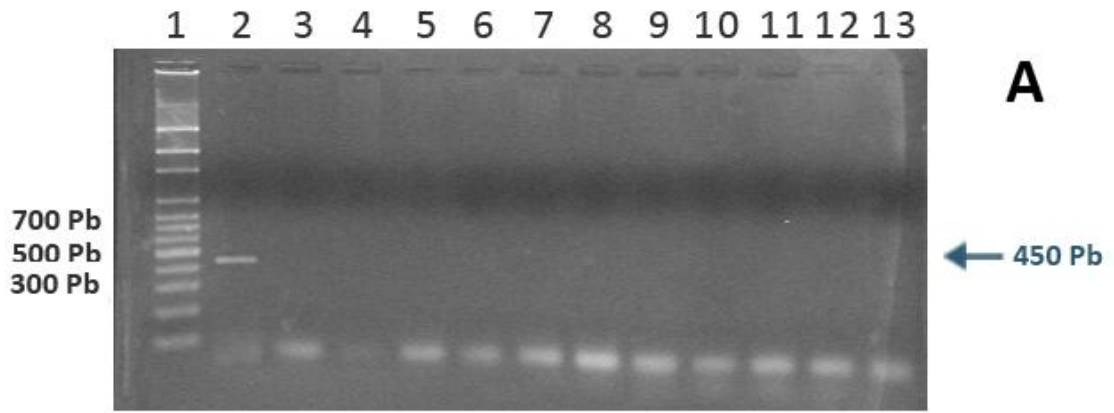


**Figura 12 PCR Transposasa Tr24/Tr25 utilizando como templado el Recombinante STR107.** La corrida se efectuó a 50 V, en un gel de 2 % de agarosa, tampón TE 1 X. El gel fue teñido con bromuro de etidio (0,5ug/mL). **Carril 1.** Marcador peso molecular 100 pb. **Carril 2 al Carril 5** Recombinante STR107 **Carril 6** Control negativo de la reacción. La flecha señala la banda de 450 pb correspondiente a una región de la transposasa IS10.

Inicialmente se evaluaron las muestras provenientes de la extracción de ADN cromosomal a partir de tacos de agarosa para detectar la presencia del fragmento de 450 pb de la transposasa IS10. Si bien se observó en todos los casos la amplificación de la banda de 450 pb del control positivo, el recombinante STR107 (Figura 13 A, B y C), se puede observar como no hay amplificación para las muestras de diferentes cepas de *T. rangeli*, *T. cruzi* y *Leishmania* (Figura 13 A, B y C respectivamente). Se procedió a analizar las cepas de ADNg previamente aisladas, pertenecientes al cepario del Laboratorio de Genética Molecular del IBE (figura 14), en estas muestras si se puede observar la amplificación del fragmento de 450 pb para las muestras *Tr. Triatomino* y *Tr. Seattle SA* (Figura 14 A, carriles 4 y 6; Figura 14 B, carriles 4 y 8). De igual manera, se observó amplificación para el control positivo.

Con la finalidad de evaluar si el método de extracción de ADN cromosomal en tacos de agarosa podría tener algún efecto inhibitorio sobre el PCR de la transposasa, se diseñó un ensayo de PCR donde el ADN diana fue una mezcla entre una cantidad constante del control positivo (el recombinante STR107) y cantidades crecientes de ADN aislado de los tacos. En la figura 15 se observó como a medida que se incrementó la concentración del ADN aislado, el producto de 450 pb del control positivo parecer disminuir la intensidad de la banda. Considerando que los tacos de ADN cromosomales han sido preservados en EDTA >0,5 M; pH 9, se realizó un proceso de diálisis en tampón TE (pH 8.0) por el transcurso de una semana, con cambios del buffer cada 48 horas, previo al aislamiento del ADN. Sin embargo, los resultados obtenidos fueron negativos, no se observó amplificación para ninguna de las cepas de *T. rangeli*, *T. cruzi* y *Leishmania* (Resultados no mostrados).



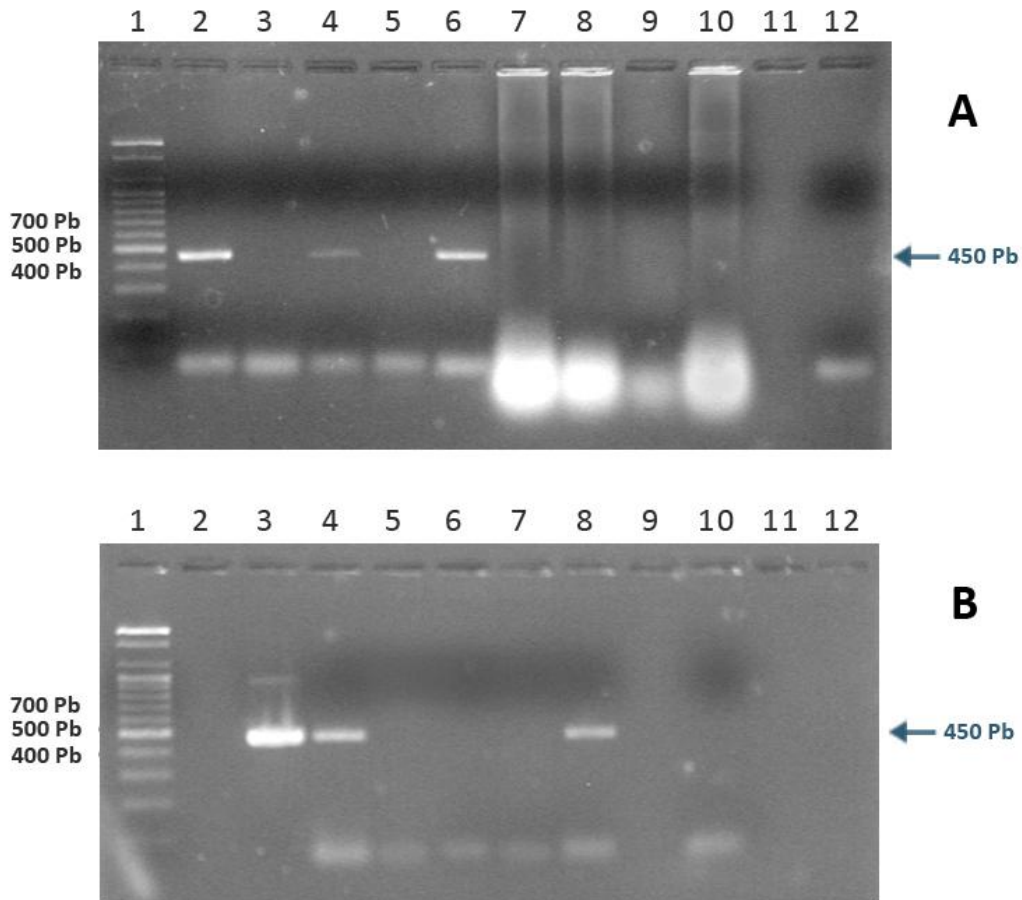


**Figura 13. Ensayo de PCR para determinar la presencia de la transposasa en tripanosomátidos.** PCR utilizando los oligos Tr24/Tr 25, los cuales amplifican una secuencia de 450 pb dentro de la secuencia de la transposasa. Las muestras utilizadas fueron las resultantes de la extracción de ADN cromosomal de los tacos de agarosa. La corrida se efectuó a 50 V, en un gel de 2 % de agarosa, tampón TE 1 X. El gel fue teñido con bromuro de etidio (0,5ug/mL).

**A. Carril 1.** Marcador peso molecular 100 pb. **Carril 2** Control Positivo (STR107) **Carril 3** *Tr* Triat. **Carril 4** *Tr* SC58. **Carril 5** *Tr* PG **Carril 6** *Tr* Perro. **Carril 7** *Tr* CH. **Carril 8** *Tr* Racoon. **Carril 9** *Tr* Tocuyo. **Carril 10** *Tr* Roma. **Carril 11** *Tr* JRM. **Carril 12.***Tr* San Agustín. **Carril 13.** Control negativo de la reacción.

**B. Carril 1.** Marcador peso molecular 100 pb **Carril 2** *Tc* JMP. **Carril 3** *Tc* Cl Brener. **Carril 4** *Tc* YBM. **Carril 5** *Tc* Y. **Carril 6** *Tc* "Recuperado de Chipo". **Carril 7** *Tc* JMP . **Carril 8** Control Positivo (STR107). **Carril 9.** Control negativo de la reacción.

**C. Carril 1.** Marcador peso molecular 100 pb. **Carril 2** *L. donovani*. **Carril 3** *L. braziliensis*. **Carril 4.** *L. amazonensis*. **Carril 5** *L. chagasi*. **Carril 6** *L. trujillo*. **Carril 7** *L. DD8*. **Carril 8** *L. Y9*. **Carril 9** *L. PP75*. **Carril 10** *L. I245*. **Carril 11** *L. IE4*. **Carril 12.** Control Positivo (STR107) **Carril 13.** Control negativo de la reacción.

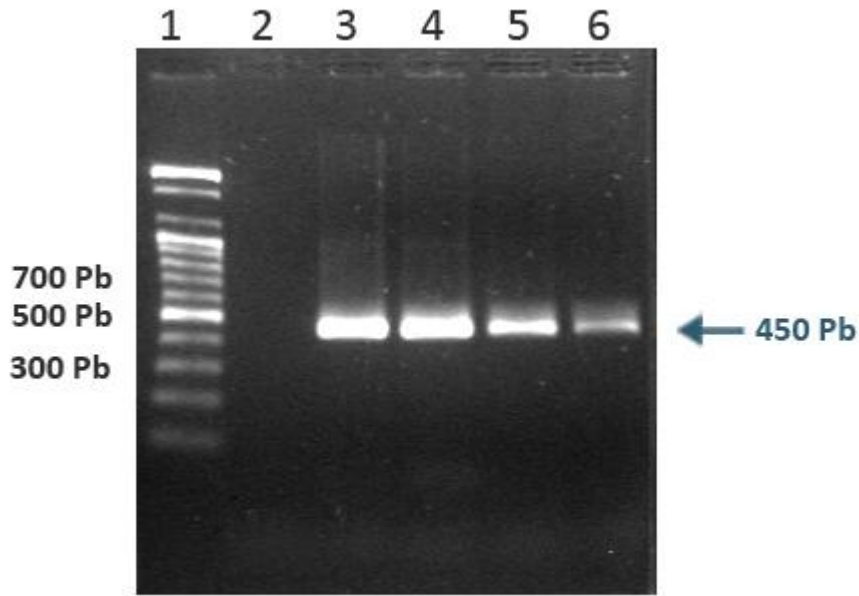


**Figura 14. Ensayo de PCR para determinar la presencia de la transposasa.** PCR utilizando los oligos Tr24/Tr 25, los cuales amplifican una secuencia de 450 pb dentro de la secuencia de la transposasa. Las muestras utilizadas pertenecen al cepario del laboratorio de genética molecular del IBE. La corrida se efectuó a 50 V, en un gel de 2 % de agarosa, tampón TE 1 X. El gel fue teñido con bromuro de etidio (0,5ug/mL).

**A. Carril 1.** Marcador peso molecular 100 pb. **Carril 2** Control Positivo (STR107) **Carril 3** *Tr* SC58. **Carril 4.** *Tr* Triat. **Carril 5** *L. amazonensis*. *LBT1006* **Carril 6** *Tr* Seattle. **Carril 7** *Tr* PG. **Carril 8** *Tr* Carmen H. **Carril 9** *Tr* Tocuyo. **Carril 10** *Tr* Roma. **Carril 11** ---. **Carril 12.** Control negativo de la reacción.

**B. Carril 1.** Marcador peso molecular 100 pb **Carril 2** ---. **Carril 3** Control Positivo (STR107). **Carril 4** *Tr* triat. **Carril 5** *Tr* Dog. **Carril 6** *Tc* Cl Brener". **Carril 7** *Tc* JMP . **Carril 8** *Tr* San Agustín. **Carril 9** ---. **Carril 10.** Control negativo de la reacción.

\* "----"Significa que no se colocó muestra en el carril.



**Figura 15 PCR Transposasa Tr24/Tr25 utilizando como templado una mezcla entre el Recombinante STR107 y ADN cromosomal extraído de tacos de agarosa.** PCR para determinar efecto inhibitorio de la metodología de extracción, sobre el PCR tr24/25. La corrida se efectuó a 50 V, en un gel de 2 % de agarosa, tampón TE 1 X. El gel fue teñido con bromuro de etidio (0,5ug/mL).

**Carril 1.** Marcador de peso molecular 100 pb. **Carril 2.** Control negativo de la reacción.

**Carril 3.** 2 µl del control positivo STR107; **Carril 4.** 2 µl del control positivo STR107 + 2 µl de ADN cromosomal *Tr* Triatomino; **Carril 5.** 2 µl del control positivo STR107 + 4 µl de ADN cromosomal *Tr* Triatomino; **Carril 6.** 2 µl del control positivo STR107 + 8 µl de ADN cromosomal *Tr* Triatomino.

#### **5.4 Evaluación de la presencia del elemento móvil bacteriano IS10 mediante PCR en contenido intestinal de triatomino.**

Los Triatominos que se utilizaron para la evaluación, fueron recolectados en el valle de Caracas y enviados al Laboratorio de Genética Molecular por miembros de la comunidad, posteriormente se identificó a la especie a la que pertenecían y se clasificaron según la presencia o ausencia, al microscopio, de parásitos circulantes en una muestra tomada directamente del contenido estomacal del Triatomino. Tal como se describió en la metodología, las muestras fueron almacenadas de dos maneras, en papeles FTA, y directamente el contenido líquido.

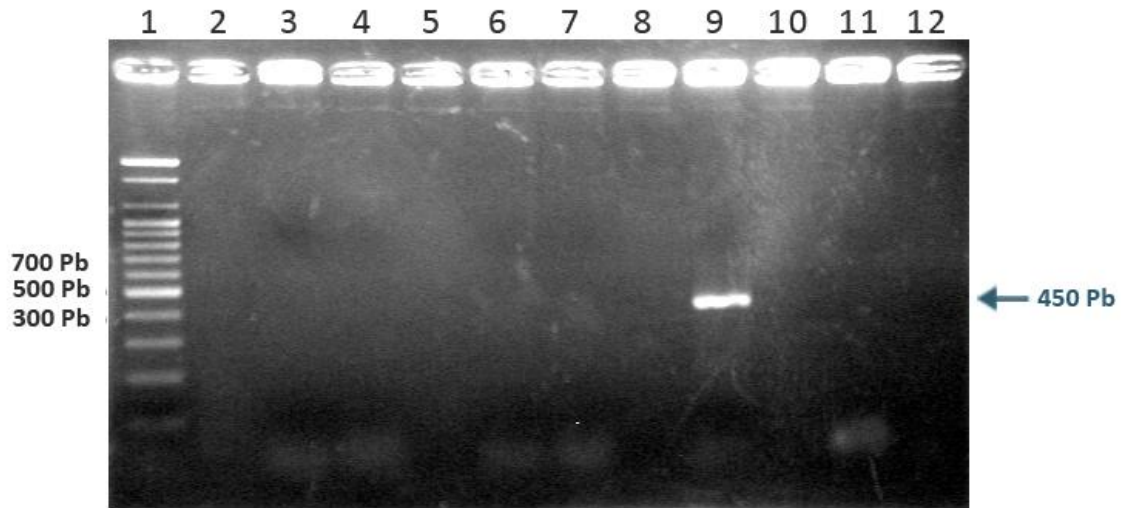
En el caso del papel FTA, luego del procesamiento con el reactivo de purificación, se analizaron 5 muestras (tabla 6), y se realizó el PCR para evaluar la presencia de la transposasa. En ninguna de las muestras se observó la amplificación del producto de 450 pb (Figura 16). Si se observó la amplificación del control positivo, utilizando el recombinante STR107.

Se evaluó la presencia de la transposasa IS10 a las muestras del contenido intestinal almacenado en estado líquido, para aquellas muestras que hayan resultado ser positivas a la presencia de parásitos circulantes al microscopio (tabla 6), los resultados se muestran en la figura 17, donde no se observó amplificación para la secuencia de la transposasa en ninguno de los casos. Si se observó la amplificación del control positivo, STR107.

**Tabla 6.** Clasificación de las muestras del contenido intestinal de los chipos disectados.

Registro de Triatomíneos incluidos en la evaluación para la presencia de la transposasa IS10 en el contenido intestinal.

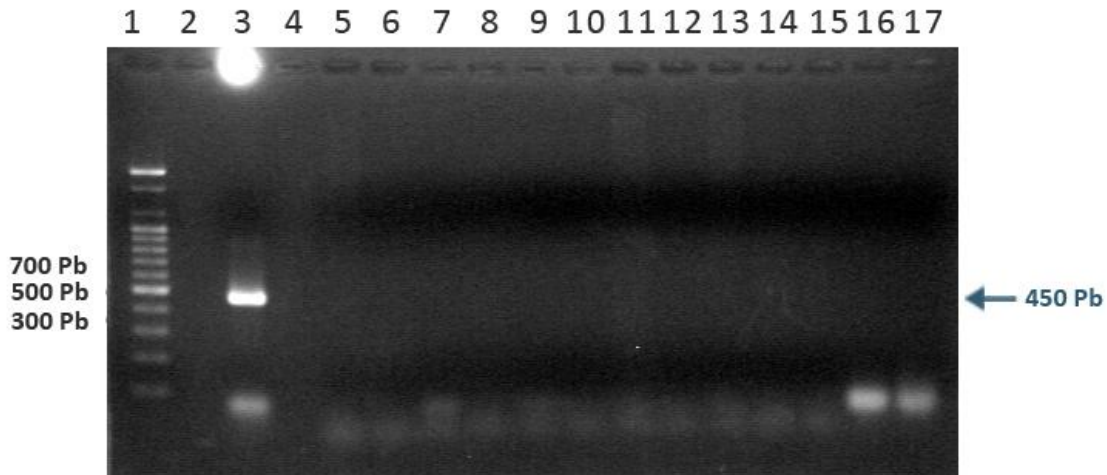
Código LGM	Fecha	Municipio	Especie	Examen microscópico de Heces
127	12/05/2010	Libertador	<i>P. geniculatus</i>	positivo
128	11/05/2010	Libertador	<i>P. geniculatus</i>	positivo
129	11/05/2010	Libertador	<i>P. geniculatus</i>	positivo
130	12/05/2010	Libertador	<i>P. geniculatus</i>	positivo
131	08/05/2010	Baruta	<i>P. geniculatus</i>	positivo
132	12/05/2010	Libertador	<i>P. geniculatus</i>	positivo
133	21/05/2010	Baruta	<i>P. geniculatus</i>	negativo
134	19/05/2010	-	<i>P. geniculatus</i>	negativo
145	18/06/2010	Baruta	<i>P. geniculatus</i>	positivo
147	21/05/2010	Baruta	<i>P. geniculatus</i>	positivo
160	19/05/2010	-	<i>P. geniculatus</i>	negativo
168	18/06/2010	Baruta	<i>P. geniculatus</i>	negativo
181	21/05/2010	Baruta	<i>P. geniculatus</i>	positivo
182	19/05/2010	-	<i>P. geniculatus</i>	positivo
196	18/06/2010	Baruta	<i>P. geniculatus</i>	positivo



**Figura 16. Ensayo de PCR para determinar la presencia de la transposasa.** PCR de la transposasa de las muestras de contenido intestinal preservadas en papel FTA, utilizando los oligos Tr24/Tr 25.

**Carril 1.** Marcador de peso molecular 100 pb. **Carril 2** ---. **Carril 3** Muestra papel FTA, proveniente de contenido intestinal de chipo, con presencia de parásitos circulantes al microscopio. **Carril 4.** Muestra papel FTA, proveniente de contenido intestinal de chipo, con presencia de parásitos circulantes al microscopio. **Carril 5** ---. **Carril 6** Muestra papel FTA, proveniente de contenido intestinal de chipo, con ausencia de parásitos circulantes al microscopio. **Carril 7.** Muestra papel FTA, proveniente de contenido intestinal de chipo, con ausencia de parásitos circulantes al microscopio. **Carril 8** ---. **Carril 9** Control Positivo (STR107). **Carril 10** ---. **Carril 11** Control negativo de la reacción. **Carril 12** ---.

\* "----" Significa que no se colocó muestra en el carril.



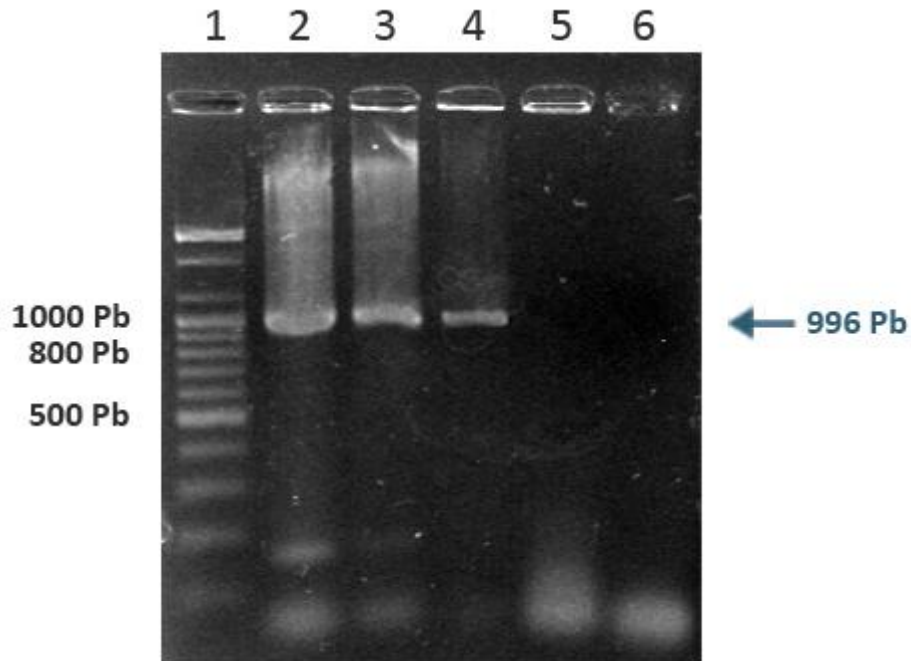
**Figura 17. Ensayo de PCR para determinar la presencia de la transposasa.** PCR utilizando los oligos Tr24/Tr 25, los cuales amplifican una secuencia de 450 pb dentro de la secuencia de la transposasa. Se utilizaron muestras de contenido intestinal, preservadas en forma líquida.

**Carril 1.** Marcador de peso molecular 100 pb. **Carril 2** ---. **Carril 3** Control Positivo STR107. **Carril 4.** ---. **Carril 5** Muestra del contenido intestinal de chipo, con presencia de parásitos circulantes al microscopio N° 127. **Carril 6** Muestra del contenido intestinal de chipo, con presencia de parásitos circulantes al microscopio N° 128. **Carril 7.** Muestra del contenido intestinal de chipo, con presencia de parásitos circulantes al microscopio N° 128. **Carril 8** Muestra del contenido intestinal de chipo, con presencia de parásitos circulantes al microscopio N° 129. **Carril 9** Muestra del contenido intestinal de chipo, con presencia de parásitos circulantes al microscopio N° 130. **Carril 10** Muestra del contenido intestinal de chipo, con presencia de parásitos circulantes al microscopio N° 145. **Carril 11** Muestra del contenido intestinal de chipo, con presencia de parásitos circulantes al microscopio N° 147. **Carril 12** Muestra del contenido intestinal de chipo, con presencia de parásitos circulantes al microscopio N° 181 **Carril 13** Muestra del contenido intestinal de chipo, con presencia de parásitos circulantes al microscopio N° 182 **Carril 14** Muestra del contenido intestinal de chipo, con presencia de parásitos circulantes al microscopio N° 196 **Carril 15** Muestra del contenido intestinal de chipo, con presencia de parásitos circulantes al microscopio N° 132 **Carril 16** Control Negativo del kit de extraccion **Carril 17** Control negativo de la reacción de PCR.



### **5.5 Evaluación molecular para descartar la presencia de contaminantes bacterianos en medios de cultivos de *T. rangeli* como fuente de la transposasa IS10.**

Consultado la base de datos GenBank, se observó como el elemento transponible IS10 está presente en una gran variedad de bacterias (tabla 5). Con el objetivo de descartar que el origen de las secuencias IS10 en el ADNg de *T. rangeli* surja de la contaminación con bacterias durante el cultivo de parásitos, evaluamos la presencia de contaminantes bacterianos en los medios de cultivo, bajo dos condiciones, primero medios de cultivo de *T. rangeli* con contaminantes bacterianos observados al microscopio de luz y por último medios de cultivos de *T. rangeli* sin contaminantes bacterianos según la evaluación con el microscopio de Luz. En la figura 18, se muestran los resultados del PCR ARN 16-S sobre ambos medios de cultivo (contaminados y no contaminados) de las cepas *Tr* Triat, y *Tc* JMP, utilizando como control positivo ADNg de *E. Coli*. Se puede evidenciar como tanto el medio de cultivo con contaminantes bacterianos al microscopio, como el control positivo ADNg *E. Coli*, amplifican un producto de 996 pb, mientras que el medio no contaminado al microscopio y el control negativo de la reacción, no amplifican. Esta experiencia se realizó por duplicado obteniendo los mismos resultados.



**Figura 18. Descartar presencia de contaminantes bacterianos en los medios de cultivos.**

PCR de la unidad ribosomal pequeña, ARNr 16s presente en todas las eubacterias. La corrida se efectuó a 50 V, en un gel de 2 % de agarosa, tampón TE 1 X. El gel fue teñido con bromuro de etidio (0,5ug/mL).

**Carril 1.** Marcador peso molecular 100 pb **Carril 2** *E. Coli*. **Carril 3** *E. Coli*. **Carril 4** Medio contaminado al microscopio. **Carril 5** Medio no contaminado al microscopio. **Carril 6** Control negativo de la reacción.

## **5.6 Análisis de la ubicación y organización genómica del elemento móvil bacteriano IS10 mediante hibridación molecular con sondas de ADN marcadas con digoxigenina, en perfiles de electrocariotipos de diferentes cepas de *T. rangeli* y otros Tripanosomátidos.**

### **5.6.1 Marcaje de las sondas con Digoxigenina.**

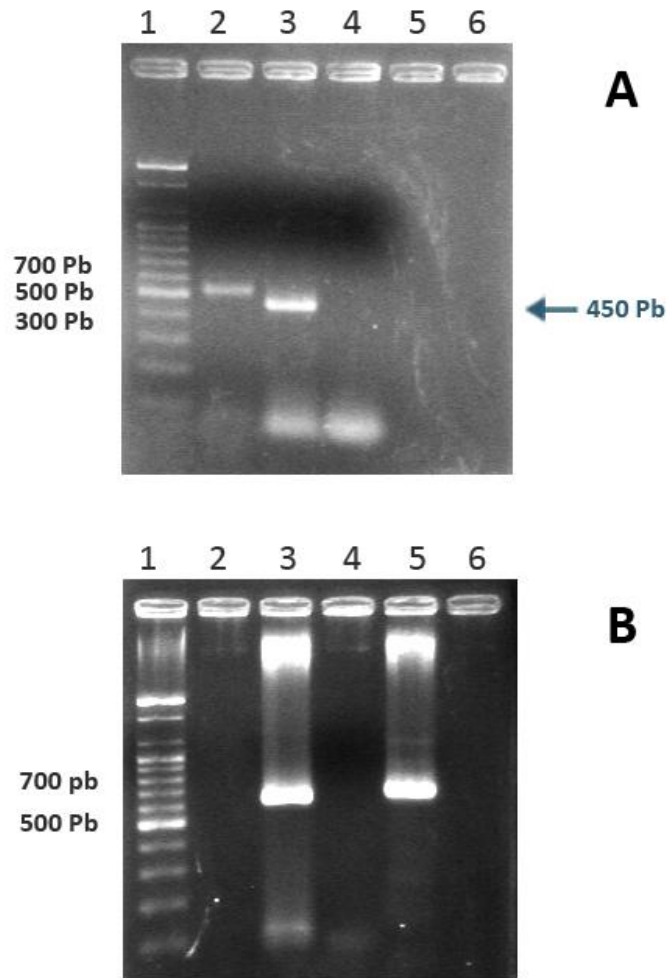
A fin de determinar la ubicación y la organización genómica de la transposasa IS10, se procedió a realizar hibridaciones de una sonda de 450 pb de la transposasa marcada con digoxigenina, sobre los electrocariotipos de diferentes tripanosomátidos. La sonda de 450 pb fue obtenida mediante PCR utilizando los oligos tr24/tr25, se utilizó como ADN templado el recombinante STR107 y una mezcla de nucleótidos conteniendo dUTP como se describió en la metodología. Debido a la falta de conocimiento sobre la organización, distribución y número de copias de la transposasa en el genoma de los tripanosomatidos, se decidió incluir como control de hibridación una secuencia de copia única, como es el caso de la telomerasa, por lo cual se marco con digoxigenina un fragmento de 590 pb.

En la figura Figura 19-A, se muestra la amplificación de la banda de 450 pb de la región de la transposasa IS10, se puede inferir que el marcaje fue efectivo debido a la diferencia de peso que le confieren los dUTP a la secuencia de 450 pb marcada (Figura 19 A, carril 2), en comparación a la secuencia de 450 pb sin los dUTP (Figura 19 A, carril 3). En la figura 19B se observó la amplificación de la sonda marcada de la Telomerasa (Figura 19 B, carril 5), de igual manera podemos inferir que el marcaje fue positivo debido a la diferencia de peso que con respecto a la secuencia amplificada sin los dUTP (Figura 19 B, carril 3).

A manera de tener un control positivo sobre la integridad y la ubicación cromosómica de los telómeros, se marcaron con digoxigenina sondas que amplifican regiones específicas en los telómeros de los tripanosomátidos. En el caso de *T. rangeli* se marcó un fragmento de 170 pb de la región conservada de los telómeros (Figura 20-A), y para *T. cruzi*, se marcó un fragmento de 100 pb de la secuencia Tc189 de los telómeros (figura 20-B).

#### **5.6.2 Análisis de los electrocariotipos de los tripanosomátidos.**

Con el objetivo de localizar cromosómicamente la ubicación del transposon, procedimos a realizar electroforesis de campo pulsado utilizando los tacos de ADN cromosomal de diferentes cepas de tripanosomátidos, utilizando una cámara TAFE, de la marca comercial “Guefast” para obtener los perfiles de electrocariotipos. Como aspectos relevantes de esta cámara electroforética, podemos resaltar el ahorro que proporciona tanto en tiempo como en materiales. Para las muestras de tripanosomátidos, utilizamos 900 mL de tampón TBE 0.5x por corrida, con una duración de 7 horas, mientras que con otros equipos similares, se utiliza mayor cantidad de buffer, y un tiempo que puede variar de 24 a 48 horas.

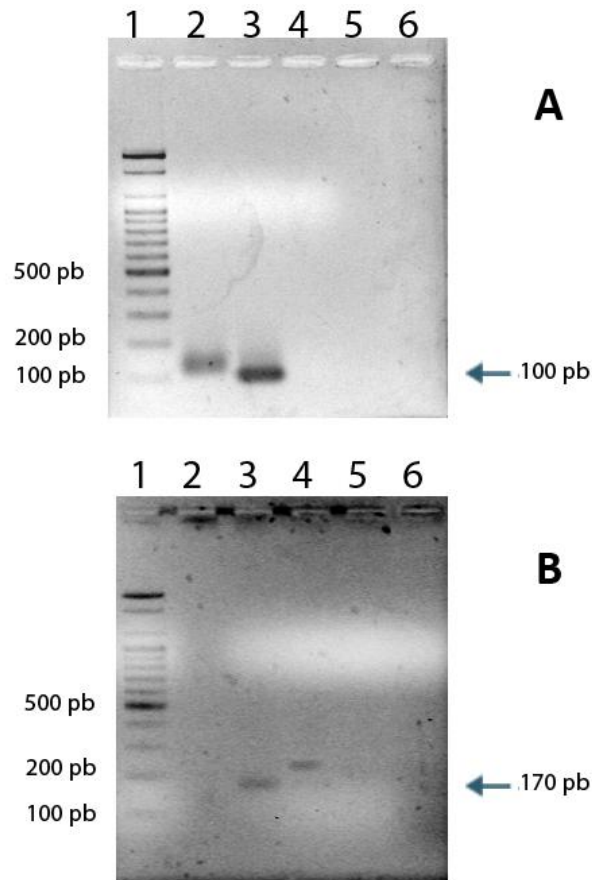


**Figura 19. Marcaje de sondas con digoxigenina.** Se marcó con digoxigenina un fragmento de 450 pb de la transposasa, y un fragmento de 590 pb de la Telomerasa. La corrida se efectuó a 50 V, en un gel de 2 % de agarosa, tampón TE 1 X. El gel fue teñido con bromuro de etidio (0,5mg/mL). Las flechas indican el tamaño del fragmento amplificado. En el caso de los marcajes con digoxigenina, se observa una menor migración debido al incremento en el peso molecular.

**A. Carril 1.** Marcador peso molecular 100 pb **Carril 2.** Sonda 450 pb marcada con digoxigenina. **Carril 3.** Control positivo, sin dUTP-digoxigenina **Carril 4** Control negativo de la reacción. **Carril 5** --- . **Carril 6** ---.

**B. Carril 1.** Marcador peso molecular 100 pb **Carril 2** ---. **Carril 3** Control positivo, sin dUTP-digoxigenina. **Carril 4** Control negativo de la reacción. **Carril 5** Sonda de 590 pb marcada con digoxigenina. **Carril 6** ---.

\* "----" Significa que no se colocó muestra en el carril.



**Figura 20. Marcaje de sondas con digoxigenina.** Se marcó con digoxigenina un fragmento de 100 pb del telomero de *T. cruzi*, y un fragmento de 170 pb de los telómeros de *T. rangeli*. La corrida se efectuó a 50 V, en un gel de 2 % de agarosa, tampón TE 1 X. El gel fue teñido con bromuro de etidio (0,5mg/mL). Las flechas indican el tamaño del fragmento amplificado. En el caso de los marcajes con digoxigenina, se observa una menor migración debido al incremento en el peso molecular

**A. Carril 1.** Marcador peso molecular 100 pb **Carril 2.** Sonda 100 pb marcada con digoxigenina. **Carril 3.** Control positivo, sin dUTP-digoxigenina **Carril 4** Control negativo de la reacción. **Carril 5** --- . **Carril 6** ---.

**B. Carril 1.** Marcador peso molecular 100 pb **Carril 2** ---. **Carril 3** Control positivo, sin dUTP-digoxigenina. **Carril 4** Sonda de 170 pb Marcada con dUTP-digoxigenina. **Carril 5** Control negativo de la reaccion. **Carril 6** ---.

Como estrategia metodológica para obtener la resolución adecuada de los perfiles cromosómicos, se estandarizaron las condiciones de corrida, utilizando como referencia experiencias anteriores con microorganismos cuyos cromosomas tuvieran un tamaño similar al de los tripanosomátidos. Se utilizó como marcador de peso molecular la cepa de levadura 196-2. En las corridas se probaron diferentes valores de voltajes, comenzando con 125 V, pero la corrida no se pudo resolver correctamente. Progresivamente se fueron probando valores de voltaje, obteniendo finalmente que un voltaje de 140 V, un campo eléctrico de 10 V/cm durante un período de 7 horas, nos proporcionaron una corrida electroforética con mejor resolución de las bandas. Desde La figura 21 hasta la 31, se muestran 10 electrocariotipos de los Tripanosomátidos, sin embargo en total se realizaron 22 electrocariotipos. La elección de las cepas de los Tripanosomátidos en cada uno de los geles, estuvo diseñada pensando en la hibridación con la sonda de 450 pb de la transposasa IS10, colocando geles con varias especies de tripanosomátidos como se observa en la figura 21 y la figura 23, donde se están representados *T. cruzi*, *T. rangeli* y *Leishmania* con al menos una cepa. De igual manera se diseñaron geles que contenían mayoritariamente cepas de *T. rangeli* (Figura 24, 28 y 31) *T. cruzi* (Figura 25,29 y 30) y *Leishmania* (Figura 26), para poder estudiar así las posibles diferencias en la ubicación cromosómica de la transposasa entre las diferentes cepas de la misma especie del parásito. En la figura 27, se muestra un gel exclusivamente con cepas de *Tr* Triat, y *Tr* San Agustín La elección de estas 2 cepas únicamente en este gel, se debe a que tanto *Tr triat* como *Tr* San Agustín resultaron positivas a la presencia de la transposasa por ensayo de PCR.

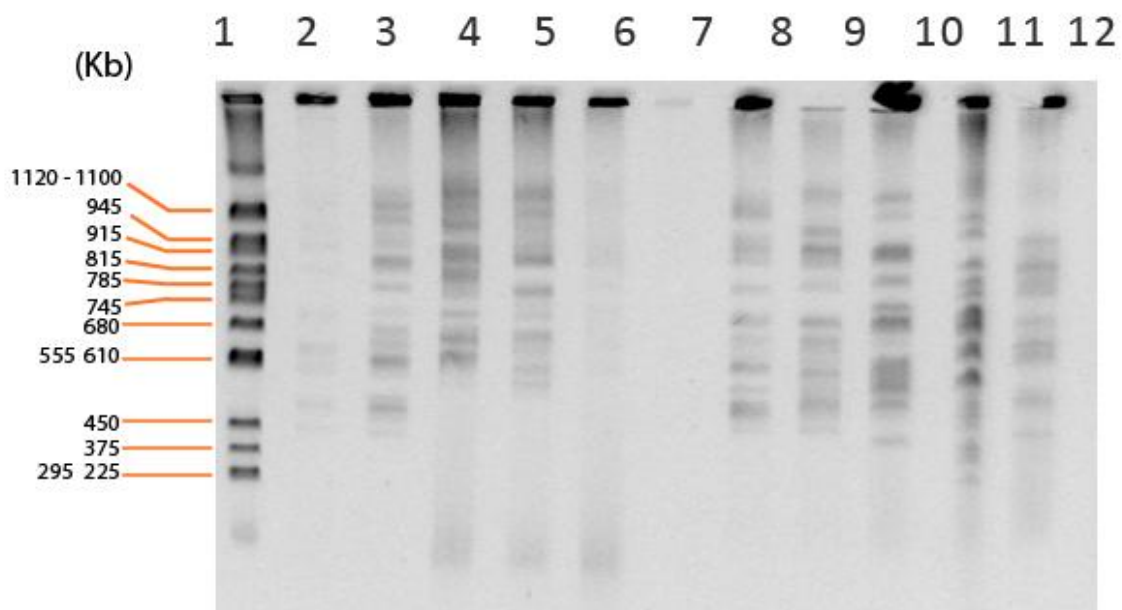


Figura 21. Análisis mediante electrocariotipos de ADN cromosómico de diferentes tripanosomátidos. Se realizó la corrida en una cámara electroforética de campo pulsado, sometiéndose a un campo de 10 V/cm, y un voltaje de 140 V. La corrida duró 7 horas, a una temperatura constante de 18-20°C, en buffer TBE 0.5 X, gel de agarosa (TBE) 1.5 %.

**1.-** *Saccharomyces cerevisiae* (SC) **2.-** *Tr* dog. **3.-** *Tr* triat **4.-** *Tc* IMT. **5.-** *Tc* YBM. **6.-** *Tc* CL Brener. **7.-** *Tc* 196. **8.-** *Tr* Tocuyo. **9.-** *Tr* CH. **10.-** *Tr* 23. **11.-** *L amazonensis*. **12.-** *Tr* Racoon Costa Rica



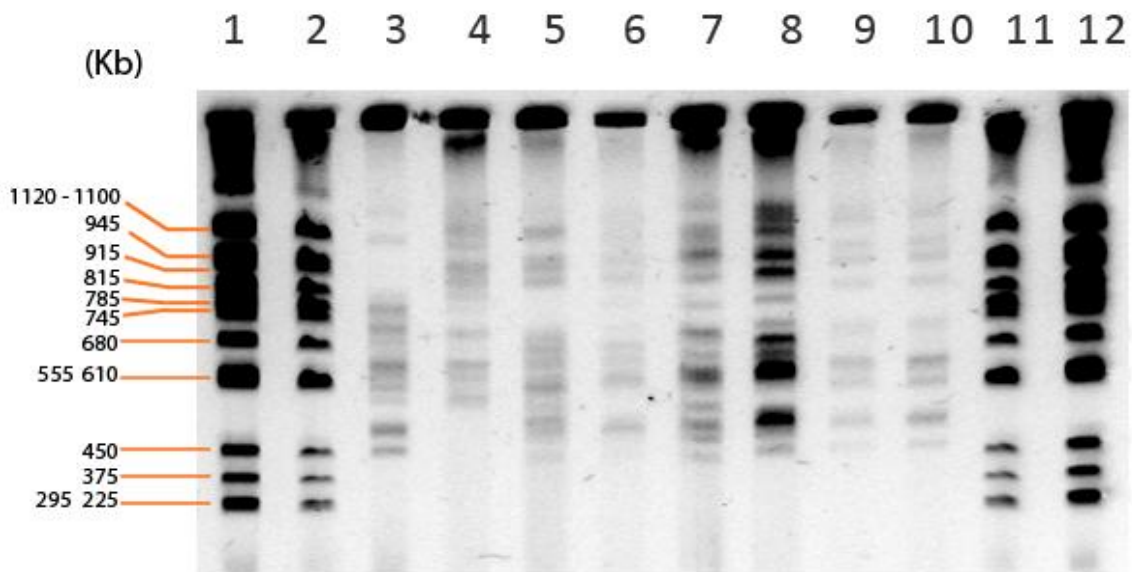


Figura 22. Figura 11. Análisis mediante electrocariotipos de ADN cromosómico de diferentes tripanosomátidos. Se realizó la corrida en una cámara electroforética de campo pulsado, sometiéndose a un campo de 10 V/cm, y un voltaje de 140 V. La corrida duró 7 horas, a una temperatura constante de 18-20°C, en buffer TBE 0.5 X, gel de agarosa (TBE) 1.5 %.

**1.- Sc 2.- Sc. 3.- Tc Cl Brener 4.- Tc Y. 5.- Tr IRM. 6.- Tr triat. 7.- Tr Mono. 8.- Tr Triat. 9.- Tr Perro. 10.- Tr Perro. 11.- Sc 12.- Sc**

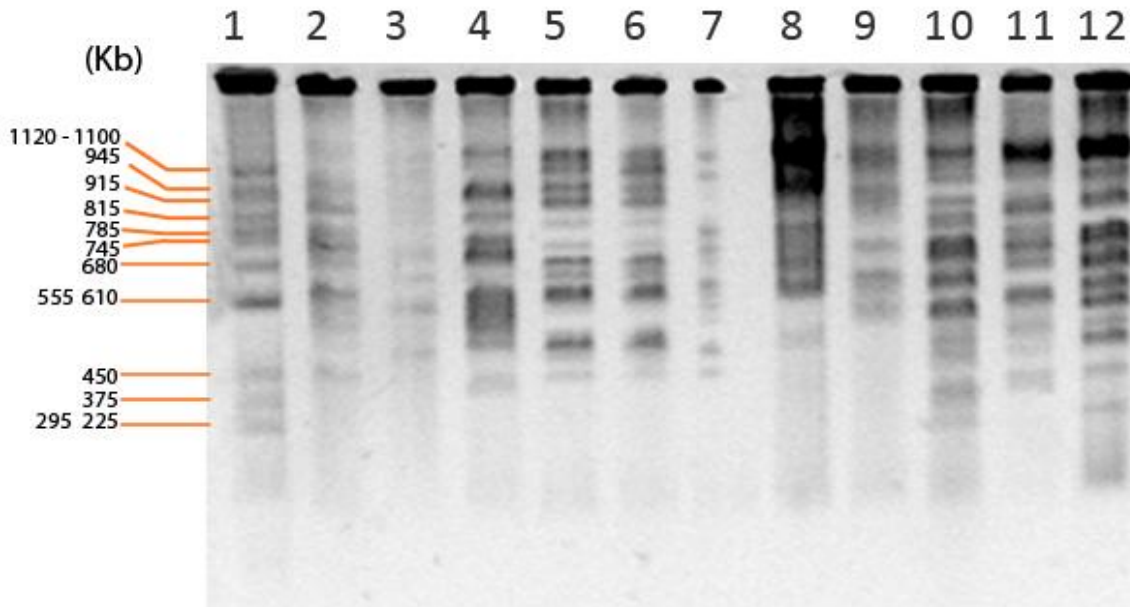


Figura 23. Análisis mediante electrocariotipos de ADN cromosómico de diferentes tripanosomátidos. Se realizó la corrida en una cámara electroforética de campo pulsado, sometiendo a un campo de 10 V/cm, y un voltaje de 140 V. La corrida duró 7 horas, a una temperatura constante de 18-20°C, en buffer TBE 0.5 X, gel de agarosa (TBE) 1.5 %.

**1.- Sc 2.- Tr 14 3.- Tr 382 4.- Tr 23. 5.- Tr Triat. 6.- Tr Dog. 7.- Tr San Agustin. 8.- Tc Cl Brener. 9.- Tc Y. 10.- L amazonensis. 11.- L donovani 12.- L braziliensis**

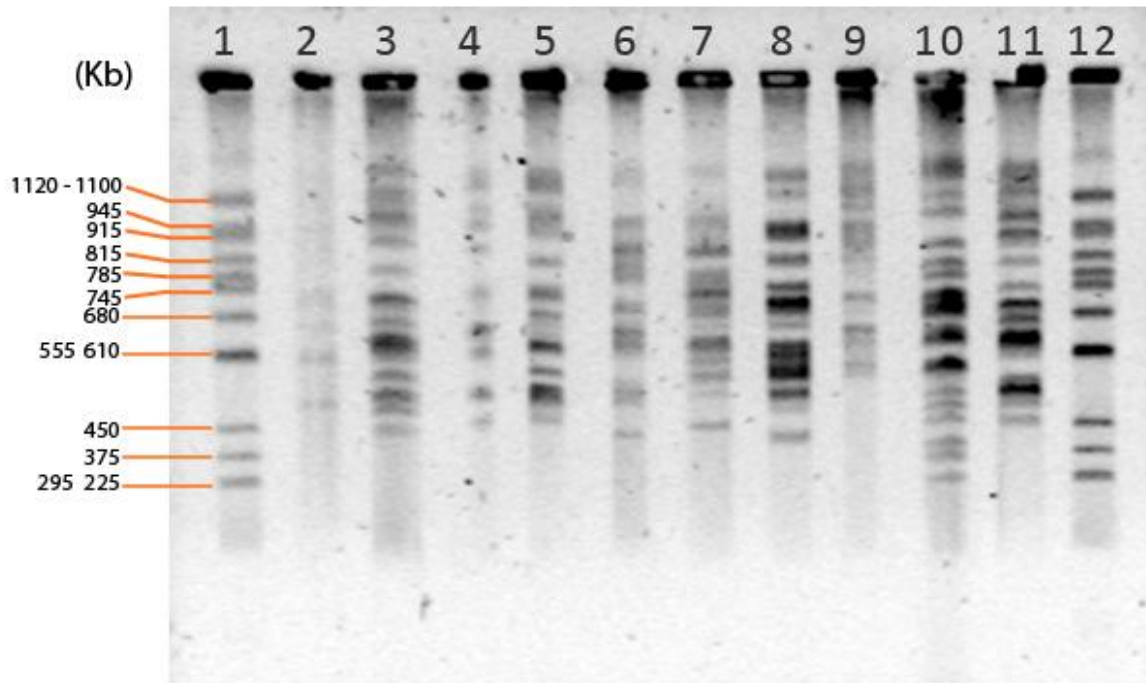


Figura 24. Análisis mediante electrocariotipos de ADN cromosómico de diferentes tripanosomátidos. Se realizó la corrida en una cámara electroforética de campo pulsado, sometiéndose a un campo de 10 V/cm, y un voltaje de 140 V. La corrida duró 7 horas, a una temperatura constante de 18-20°C, en buffer TBE 0.5 X, gel de agarosa (TBE) 1.5 %.

**1.- Sc 2.- Tr 382 3.- Tr Mono 4.- Tr perro. 5.- Tr tocuyo. 6.- Tr Racoon. 7.- Tr 14. 8.- Tr 23 9.- Tc YBM. 10.- L amazonensis. 11.- Tr triat 12.- SC**

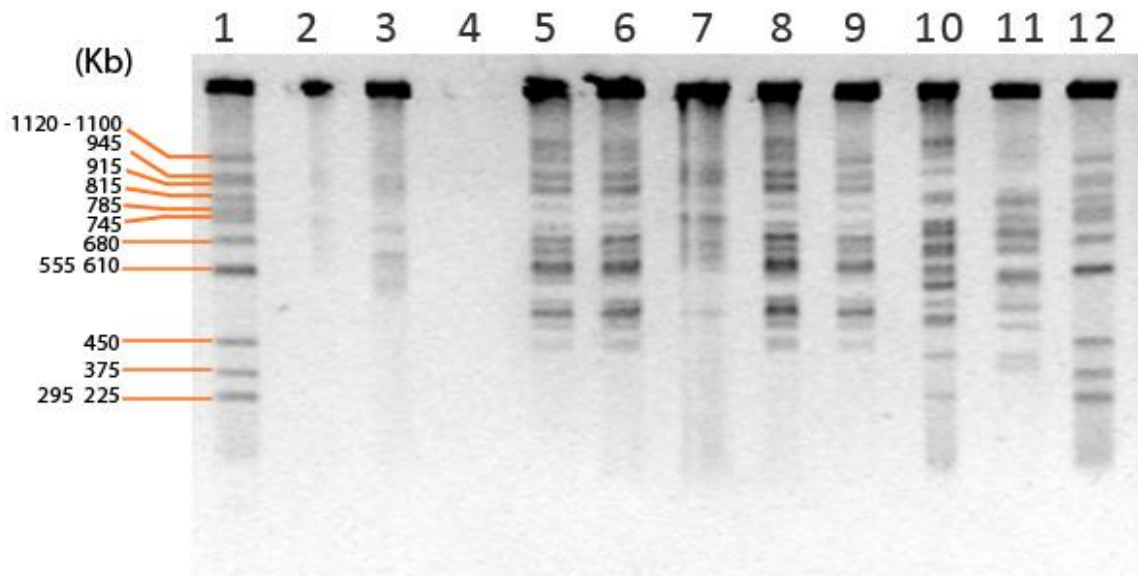


Figura 25. Análisis mediante electrocariotipos de ADN cromosómico de diferentes tripanosomátidos. Se realizó la corrida en una cámara electroforética de campo pulsado, sometiéndose a un campo de 10 V/cm, y un voltaje de 140 V. La corrida duró 7 horas, a una temperatura constante de 18-20°C, en buffer TBE 0.5 X, gel de agarosa (TBE) 1.5 %.

**1.-** *Sc* **2.-** *Tc* "blocks" **3.-** *Tc* Y **4.-** *Tc* "Cheff 1997". **5.-** *Tc* Recuperado de Chipo. **6.-** *Tc* Recuperado de chipo. **7.-** *Tc* Cl Brener. **8.-** *Tr* Triat **9.-** *Tr* Dog. **10.-** *L brasiliensis*. **11.-** *L donovani* **12.-** *SC*

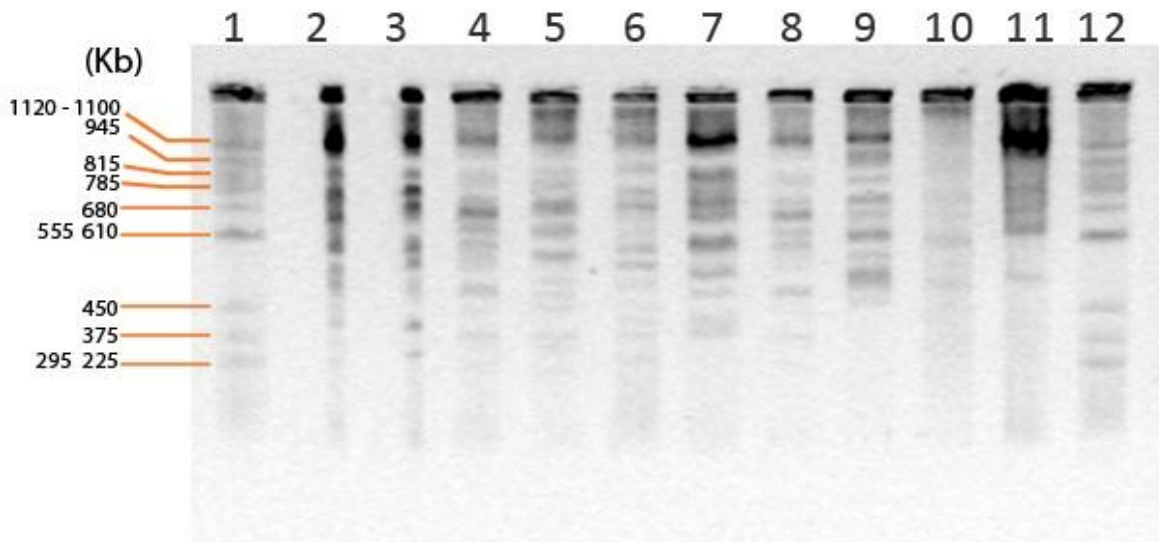


Figura 26. Análisis mediante electrocariotipos de ADN cromosómico de diferentes tripanosomátidos. Se realizó la corrida en una cámara electroforética de campo pulsado, sometiéndose a un campo de 10 V/cm, y un voltaje de 140 V. La corrida duró 7 horas, a una temperatura constante de 18-20°C, en buffer TBE 0.5 X, gel de agarosa (TBE) 1.5 %.

**1.-** *Sc* **2.-** *L braziliensis* **3.-** *L chagasi* **4.-** *L Y9*. **5.-** *L amazonensis* **6.-** *L I245* **7.-** *L donovani* **8.-** LDD8 **9.-** *Tr tocuyo*. **10.-** *Tr 382*. **11.-** *Tc Cl brener* **12.-** *SC*

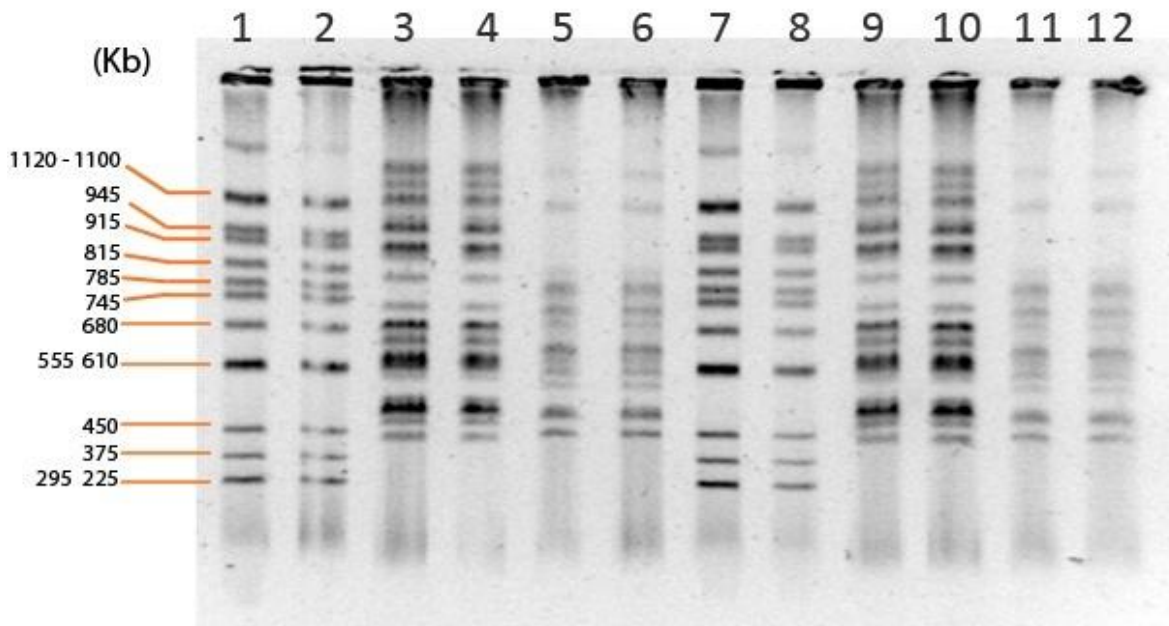


Figura 27. Análisis mediante electrocariotipos de ADN cromosómico de diferentes tripanosomátidos. Se realizó la corrida en una cámara electroforética de campo pulsado, sometiéndose a un campo de 10 V/cm, y un voltaje de 140 V. La corrida duró 11 horas, a una temperatura constante de 18-20°C, en buffer TBE 0.5 X, gel de agarosa (TBE) 1.5 %.

**1.- Sc 2.- Sc 3.- Tr Triat 4.- Tr Triat 5.- Tr San Agustin. 6.- Tr San Agustin. 7.- Sc. 8.- Sc 9.- Tr Triat. 10.- Tr Triat. 11.- Tr San Agustin 12.- Tr San Agustin.**

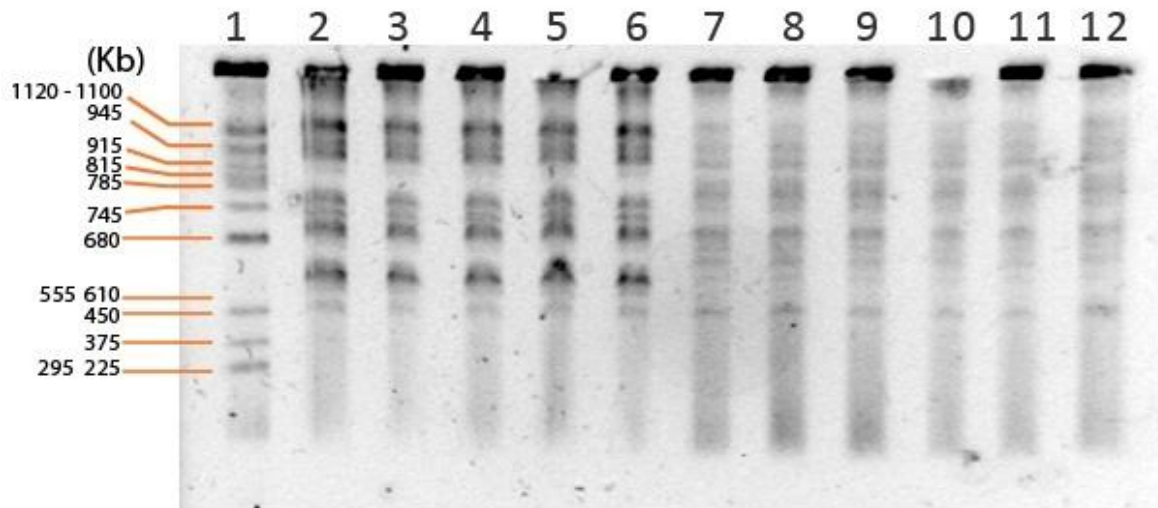


Figura 28. Análisis mediante electrocariotipos de ADN cromosómico de diferentes tripanosomátidos. Se realizó la corrida en una cámara electroforética de campo pulsado, sometiéndose a un campo de 10 V/cm, y un voltaje de 140 V. La corrida duró 11 horas, a una temperatura constante de 18-20°C, en buffer TBE 0.5 X, gel de agarosa (TBE) 1.5 %.

**1.- Sc 2.- Tr Triat 3.- Tr Triat 4.- Tr Triat 5.- Tr Triat . 6.- Tr Triat . 7. Tr 14 8.- Tr 14 9.- Tr 14 10.- Tr 14. 11.- Tr 14 12.- Tr 14**

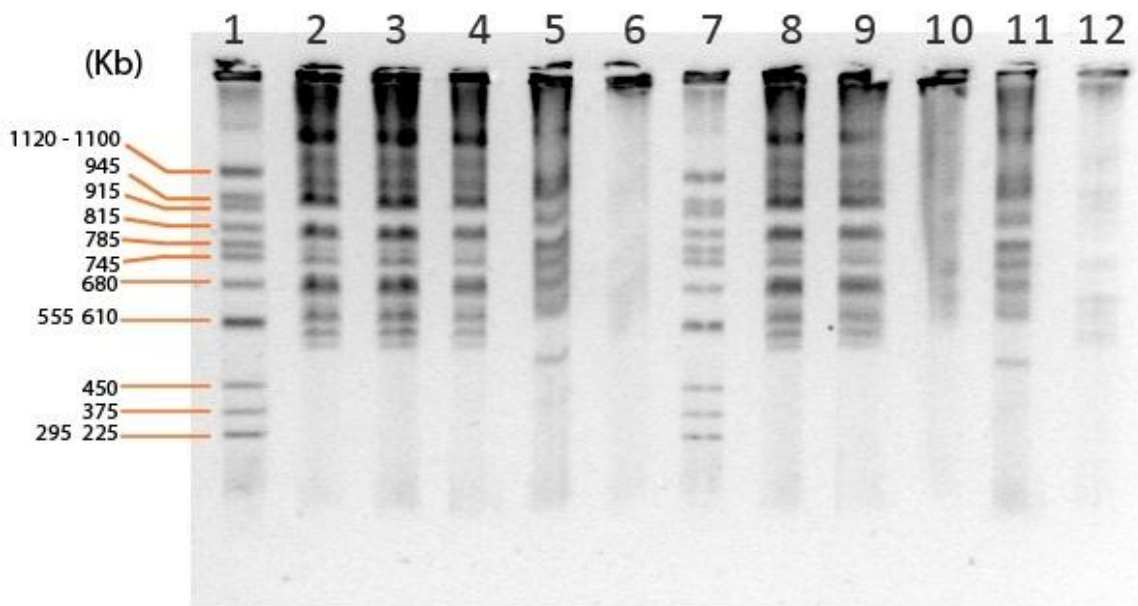


Figura 29. Análisis mediante electrocariotipos de ADN cromosómico de diferentes tripanosomátidos. Se realizó la corrida en una cámara electroforética de campo pulsado, sometiéndose a un campo de 10 V/cm, y un voltaje de 140 V. La corrida duró 11 horas, a una temperatura constante de 18-20°C, en buffer TBE 0.5 X, gel de agarosa (TBE) 1.5 %.

**1.-** *Sc* **2.-** *Tc* JMP **3.-** *Tc* JMP **4.-** *Tc* JMP **5.-** *Tc* Cl Brener. **6.-** *Tc* Y. **7.** SC **8.-** *Tc* JMP **9.-** *Tc* JMP **10.-** *Tc* JMP **11.-** *Tc* Cl Brener **12.-** *Tc* Y.



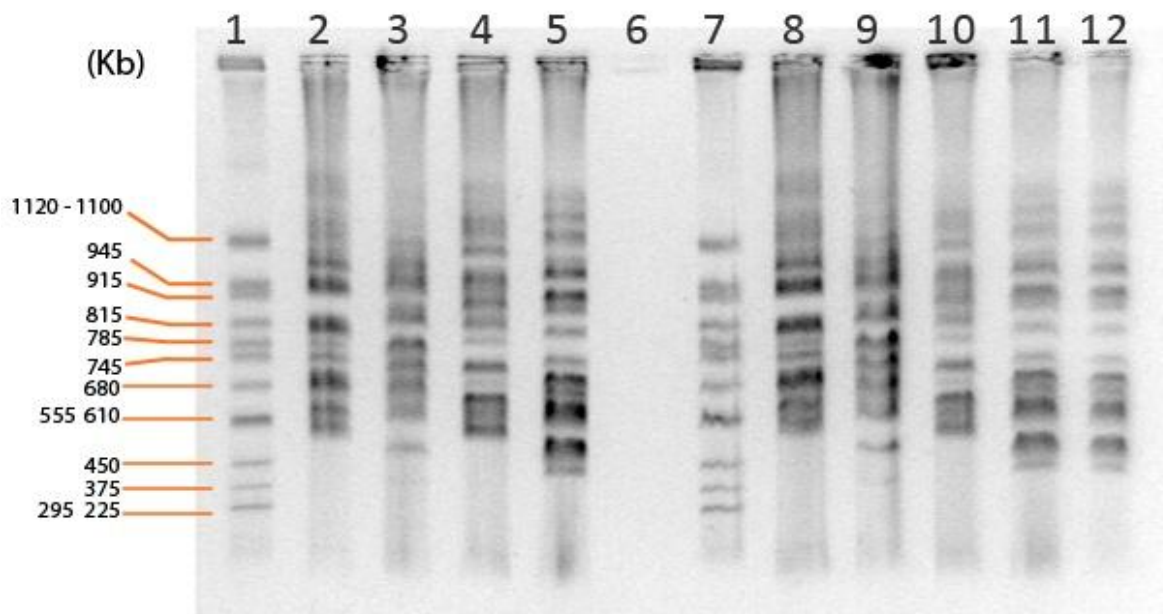


Figura 30. Análisis mediante electrocariotipos de ADN cromosómico de diferentes tripanosomátidos. Se realizó la corrida en una cámara electroforética de campo pulsado, sometiéndose a un campo de 10 V/cm, y un voltaje de 140 V. La corrida duró 11 horas, a una temperatura constante de 18-20°C, en buffer TBE 0.5 X, gel de agarosa (TBE) 1.5 %.

**1.-** *Sc* **2.-** *Tc JMP* **3.-** *Tc Cl Brener* **4.-** *Tc YBM* **5.-** *Tc* Recuperado de Chipó . **6.-** - . **7. SC**  
**8.-** *Tc JMP* **9.-** *Tc Cl Brener* **10.-** *Tc YBM* **11.-** Recuperado de Chipó **12.-** *Tc* Recuperado de Chipó.

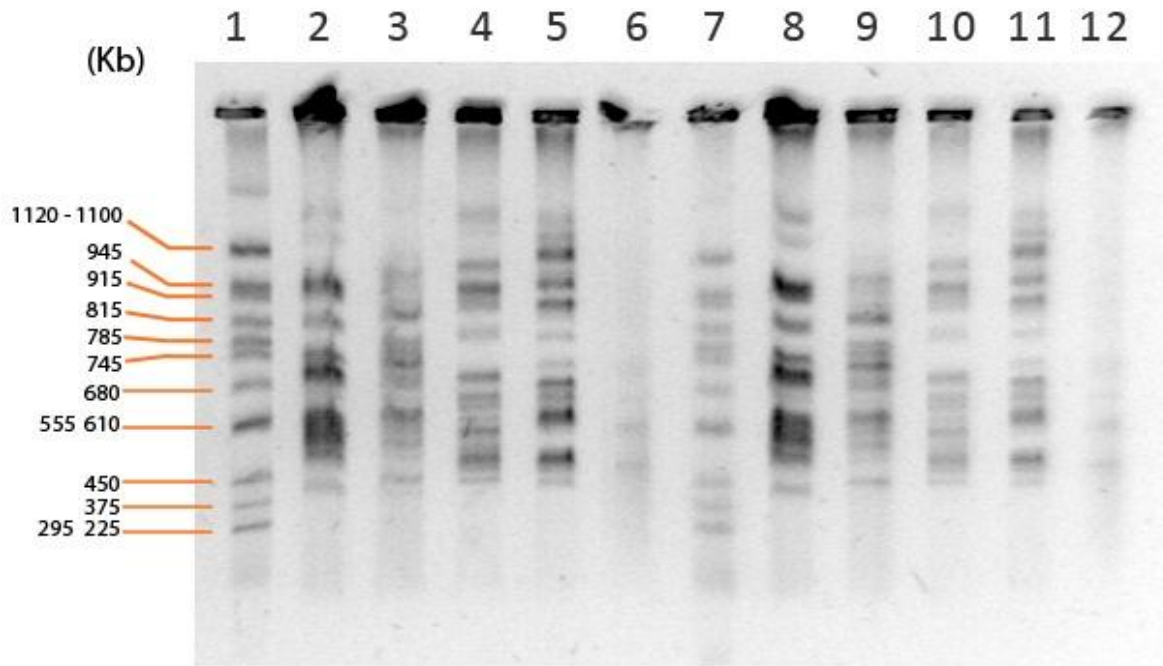


Figura 31. Análisis mediante electrocariotipos de ADN cromosómico de diferentes tripanosomátidos. Se realizó la corrida en una cámara electroforética de campo pulsado, sometiéndose a un campo de 10 V/cm, y un voltaje de 140 V. La corrida duró 11 horas, a una temperatura constante de 18-20°C, en buffer TBE 0.5 X, gel de agarosa (TBE) 1.5 %.

1.- *Sc* 2.- *Tr*23 3.- *Tr* 14 4.- *Tr* CH 5.- *Tr* Perro . 6.- *Tr* 382. 7. *SC* 8.- *Tr* 23 9.- *Tr* 14 10.- *Tr* CH 11.- *Tr* Perro 12.- *Tr* 382.

Los primeros electrocariotipos estuvieron diseñados para constatar la integridad de los tacos de agarosa, verificando que no hubiese degradación y que los cromosomas se resolvieran de manera que podamos contabilizarlos y por ende estimar su tamaño, considerando que muchos de ellos han estado conservados en EDTA por un tiempo prolongado.

En el análisis global de los 10 electrocariotipos mostrados, observamos que la mayoría de las cepas analizadas presentaron un patrón de bandas definidos, a excepción de la cepa *Tr* 382, la cual no se puede diferenciar claramente una distribución de bandas (Figuras 23 (carril 3), 24 (carril 2) y 31 (carril 12), y de la cepa *Tc* 196, figura 25 (carril 3) y figura 28 (carril 6)).

Utilizando como referencia el marcador de peso molecular de levadura proporcionado por (Guefast), se pudo estimar los tamaños de los cromosomas, y con el software “Guefast Scan” se pudo contabilizar el número de cromosomas resueltos en cada perfil (Tabla 7). Para las cepas de *T. rangeli*, observamos que los tamaños de los cromosomas se distribuyen desde 400 a 1500 kb. Para las cepas de *T. cruzi* los tamaños estaban comprendidos entre 500 – 1400 kb, y para las cepas de *Leishmania* los tamaños cromosomales se encontraron desde 250 – 1500 kb. Estos resultados obtenidos en el análisis de los tamaños cromosomales, revela que existe una variabilidad en el patrón de bandas entre los tripanosomátidos, especialmente en los cromosomas de menor peso molecular, donde se puede observar entonces que *Leishmania* presenta

Especie	TCC	Aislado/Cepa	Grupo	Rango de peso (kb)	N° Cromosomas
<i>T. rangeli</i>	---	Triatomino	A	450-1500	13
<i>T. rangeli</i>	---	Perro	A	450-1500	12
<i>T. rangeli</i>	021	CH	A	480-1550	12
<i>T. rangeli</i>	---	Tocuyo	A	460-1500	11
<i>T. rangeli</i>	--	Mono	A	430-1400	13
<i>T. rangeli</i>	---	San Agustín	B	450-1500	12
<i>T. rangeli</i>	---	Racoon /	C	440-1400	11
<i>T. rangeli</i>	014	PG	C	450-1500	11
<i>T. rangeli</i>	023	SC58	D	430-1500	13

Especie	Aislado / Cepa	Rango de peso	N° Cromosomas
<i>T. cruzi</i>	JMP	560-1400	11
<i>T. cruzi</i>	CL Brener	500-1400	10
<i>T. cruzi</i>	YBM	550-1300	11
<i>T. cruzi</i>	"Recuperado de	450-1500	13

Especie	Aislado / Cepa	Rango de peso	N° Cromosomas
<i>Leishmania</i>	L donovani.	250-1450	14
<i>Leishmania</i>	L braziliensis.	350-1500	13
<i>Leishmania</i>	L amazonensis.	260-1500	16

**Tabla 7. Rango de tamaño y número de cromosomas de los tripanosomátidos.** En la figura se muestran los rangos de tamaños obtenidos para algunos de los tripanosomátidos luego de la corrida electroforética de campo pulsado con el equipo Guefast TAFE. Se seleccionaron las cepas cuyas bandas se podían contabilizar y calcular su tamaño fácilmente, se colocaron los rangos de tamaños de los cromosomas al igual que el número total de bandas que pudimos contabilizar bajo las condiciones de corrida. Se tomo como referencia para calcular los tamaños (peso molecular) una cepa de SC 196-2, que se utilizo como marcador de peso molecular en todas las corridas.

bandas cromosomales de menor tamaño (desde 250 kb), mientras que las bandas de menor tamaño observadas en *T. rangeli* son de 400 kb y 500 para *T. cruzi*. Este patrón en la distribución de bandas de menor peso molecular se puede observar reflejado en las figuras 23 y 24, donde las cepas de *Leishmania* presentan bandas de menor peso molecular.

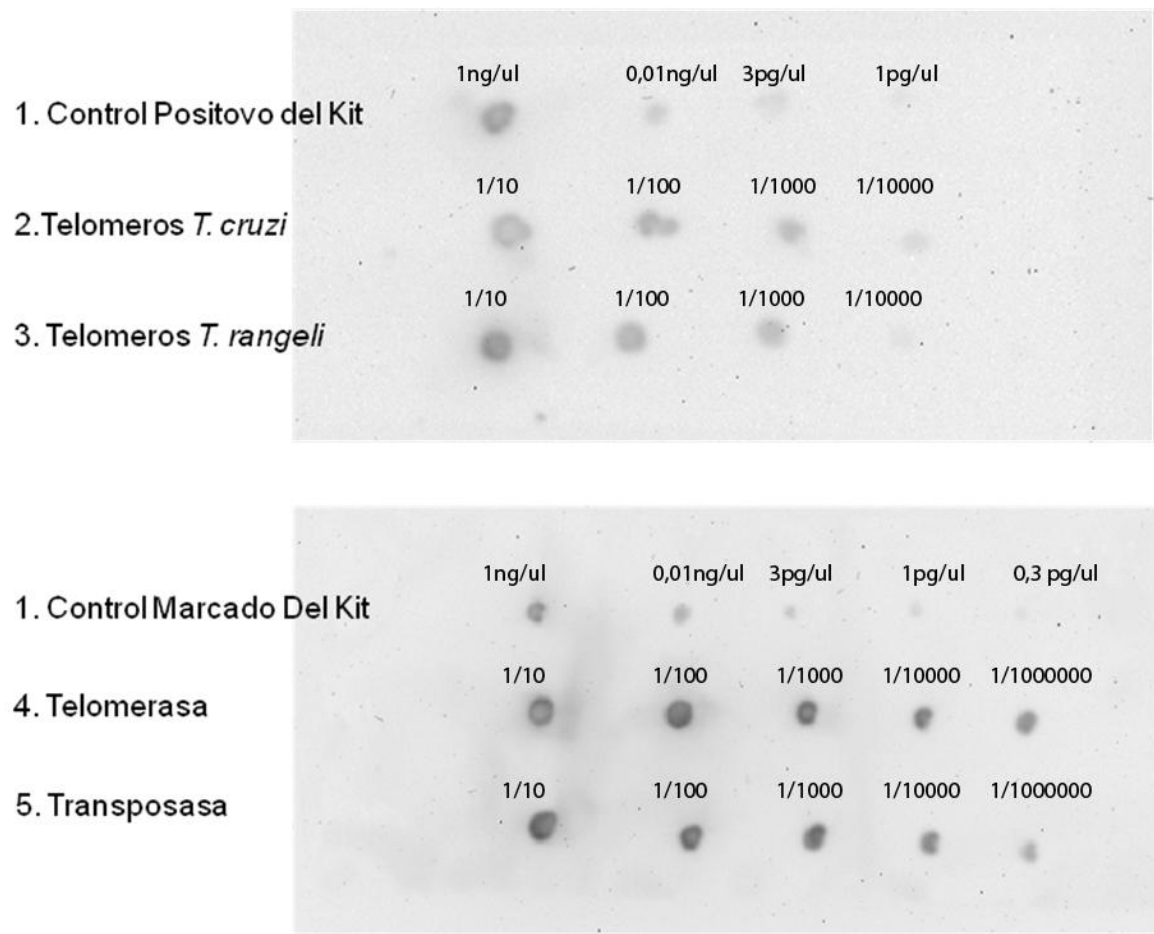
### **5.6.3 Hibridación molecular con sondas de ADN marcadas con digoxigenina, en perfiles de electrocariotipos de diferentes cepas de *T. rangeli* y otros Tripanosomátidos**

Se determinó de la cantidad de sonda que se necesitaría para las experiencias de hibridación. En la figura 32 se muestra la detección del marcaje con digoxigenina (Boehringer Mannheim Biochemica N° catálogo 1363514).

Una vez verificada la detección del marcaje de las sondas, se procedió a hibridar estas sondas con los perfiles de electrocariotipos de los tripanosomátidos, utilizando las condiciones descritas en la metodología. En las primeras experiencias, donde se utilizaron membranas de nylon transferidas por capilaridad utilizando NaOH como solución de transferencia, no se observó señal alguna, ni para la sonda de la transposasa IS10, ni para los controles positivos con las sondas de los telómeros en *T. cruzi*, y *T. rangeli*. Estas experiencias fueron repetidas nuevamente, utilizando esta vez membranas que fueron

transferidas con solución SSC como solución de transferencia, tomando en cuenta la posibilidad de que el NaOH pudiera estar interfiriendo con el enlace de la digoxigenina, sin embargo, los resultados fueron similares a los anteriores, no se observó ninguna señal. Considerando la posibilidad de problemas en el proceso de la transferencia, se repitieron las transferencias por capilaridad con solución SSC y se incrementó el tiempo de incubación con el anticuerpo (antidogoxigenina) por 4 horas, mientras que el tiempo de exposición en el ChemiDoc fue de 30 min. En ninguna de las experiencias se logró obtener alguna señal.

En la actualidad se están realizando experiencias para determinar la eficiencia de las transferencias, y las condiciones de hibridación, utilizando muestras con el plásmido STR107 y la sonda de la transposasa IS10 como controles positivos.



**Figura 32. Detección de marcaje con digoxigenina.** Utilizando las sondas marcadas con digoxigenina, se realizó una detección del marcaje, utilizando el estuche comercial Boehringer Mannheim Biochemica. 1. Control positivo de marcaje, del kit comercial. 2. Telomeros marcados de *T. cruzi*. 3. Telómeros marcados de *T. rangeli*. 4. Telomerasa de *T. rangeli* marcada. 5. Transposasa IS10 marcada.

## VI. Discusión

En muchos casos, la región de ADN codificante para funciones celulares en eucariotas, representan un pequeño porcentaje total del genoma, esta región es la más conservada en el genoma de los organismos debido a procesos evolutivos que han actuado para conservar estas funciones celulares indispensables. El resto del genoma, tiene una composición variable, extremadamente dinámica y que en su mayoría está repleto de elementos móviles transponibles. El desarrollo de los proyectos genoma de los parásitos patógenos *L. major*, *T. brucei* y *T. cruzi* (TriTryp) demostró que sus genomas presentaban múltiples elementos móviles transponibles, en su mayoría de la clase II (Tabla 3). A medida que avanzan los estudios de los transposones en los tripanosomátidos, se puede conocer cuales son las contribuciones de estos transposones al genoma del hospedador, y su posible implicación funcional, con especial interés en el papel que juegan en la patogenicidad y virulencia. En este sentido, se pueden mencionar estudios recientes de transferencia horizontal de ADN entre *T. cruzi*, y su hospedador humano (Hecht y col, 2010) donde se reportó la presencia de ADN del minicírculo de *T. cruzi*, en el genoma de su hospedador humano, específicamente en los retrotransposones LINE-1 distribuidos en varios cromosomas. Esta secuencia del minicírculo del ADN del kinetoplasto de *T. cruzi*, se observó en pacientes diagnosticados con la enfermedad de Chagas. El estudio también incluyó la evaluación a la progenie de los pacientes diagnosticados con enfermedad de Chagas, donde se pudo evidenciar que el ADN del minicírculo, fue transferido verticalmente a sus descendientes.



Aunque el genoma de *T. rangeli* no ha sido secuenciado, recientemente se reportó que en aproximadamente un 51% del genoma, identificando varios elementos móviles transponibles (Grisard y col, 2010), por lo que se puede inferir que *T. rangeli* no es una excepción en cuanto al patrón de genes celulares y transposones observados en el proyecto TriTryp.

Hay un caso que llama particularmente la atención en *T. rangeli*, la secuenciación del recombinante STR107, el cual presenta una gran similitud con el transposasa del elemento móvil IS10 incluyendo los repetidos invertidos flanqueando a la transposasa (Rodríguez, 2005), un transposón de origen bacteriano, lo cual indicaría que existió una transferencia horizontal de genes.

Debido a su particular habilidad para moverse de un genoma a otro, los transposones se perfilan como buenos candidatos para explicar como ocurre la transferencia horizontal de genes, además, el análisis de los transposones permitiría comprender qué efecto tiene sobre el genoma del organismo en el cual se inserta. Por esta razón el objetivo principal de este trabajo consistió en caracterizar molecularmente el elemento móvil IS10, analizando su ubicación por técnicas moleculares mediante PCR específicos para detectar una región del gen de la transposasa IS10, en el genoma diferentes tripanosomátidos, y posteriormente realizar hibridaciones con sondas de la transposasa IS10 sobre perfiles de electrocariotipo de los diferentes tripanosomátidos para ubicar cromosómicamente el elemento móvil IS10.

### **Análisis de la secuencia de la transposasa IS10, en los bancos de datos.**

El trabajo se inició con una actualización de los reportes de la presencia del transposon IS10 en el genoma de los organismos registrados en las bases de datos, utilizando la secuencia del recombinante STR107 obtenida por Rodríguez (2005). Esta secuencia fue comparada con la base de datos GenBank, que se encuentra disponible en [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Se hizo una primera búsqueda (BLAST) en la base de datos al inicio de este estudio (2010), actualizado recientemente en el 2012 (tabla 5). Comparando los resultados de la búsqueda del 2010, con los del 2012, se evidenció como hubo un aumento en el número de organismos para el cual se reporta esta secuencia, especialmente en organismos fuera del dominio bacteria, donde la transposasa ha sido ampliamente reportada. Observamos como se ha reportado en ratón común (*Mus musculus*) 2011, en humano (*Homo sapiens*) 2011, pollo (*Gallus*) 2010, Hongo (*Aspergillus niger*) 2011, *Caenorhabditis briggsae* (*nematodo*) 2012, entre otros. La secuencia del transposón se ha encontrado en localidades diferentes del genoma, asociada a genes que tienen funciones celulares definidas. Por ejemplo en *D. melanogaster* la secuencia se encuentra asociada a una proteína que esta involucrada en la defensa de este organismo, para el Ratón Común (*Mus Musculus*) se encontró asociada a un gen que codifica para una hidrolasa (Tabla 5). En la búsqueda, llama particularmente la atención el reporte de similitud para *T. brucei*, en dos localizaciones, en el cromosoma 3 y el cromosoma 6. Sin embargo, los autores posteriormente se retractaron, alegando que la inserción del IS10 era un artefacto del sistema de clonamiento, y por ende no se encontraba originalmente en el genoma de *T. brucei*.

### **Organización genómica de la transposasa IS10.**

La búsqueda del transposon IS10 en el genoma de los diferentes tripanosomátidos, se realizó principalmente por medio de PCR específico para amplificar una secuencia de 450 pb en una región intermedia de la transposasa. De las cepas analizadas para *T. rangeli*, se observó una amplificación de la banda de 450 pb para *Tr. Triatomino* y *Tr. San Agustín*, ninguna de las cepas estudiadas para *T. cruzi* o *Leishmania* presentó una amplificación para el PCR de la transposasa. Los resultados obtenidos en esta prueba de PCR de transposasa, aunado a los reportes de Rodríguez (2005), parecen revelar la presencia del elemento móvil IS10 en las cepas de *T. rangeli* Triatomino, y reportando por primera vez el elemento móvil para la cepa *T. rangeli* San Agustín. Pero no se observó resultado positivo para ninguna cepa de *T. cruzi* ni *Leishmania*, inclusive para las cepas *T. cruzi* JMP y *L. amazonensis* LBT0016, para las cuales fue reportada la presencia del elemento móvil IS10 en trabajos anteriores.

Existen varios aspectos que se deben tener en cuenta al interpretar en estos resultados, las condiciones experimentales, las cepas de trabajo, las características de los elementos móviles transponibles son algunos de esos aspectos. Al analizar los resultados de PCR de la transposasa, se observó como ninguno de los ADN provenientes de la extracción de tacos de agarosa resultó positivo al PCR de la transposasa, a diferencia del ADNg preservado en TE, donde si hubo una amplificación de la banda de 450 pb de la transposasa para los aislados de *T. rangeli* Triatomino y *T. rangeli* San Agustín. Estos resultados plantearon la interrogante que si podría existir algún factor que estaba influyendo negativamente en la

reacción de PCR. Inicialmente se evaluó el método de extracción de ADN cromosomal de los tacos, aplicando métodos alternativos, utilizando el estuche de extracción de ADN de agarosa (Life Technology) pero se obtuvieron resultados negativos para la amplificación de la banda de 450 pb de la transposasa IS10. Posteriormente se planteó la posibilidad de que el EDTA en el cual estaban embebido los tacos de ADN cromosomal, fuese el factor que afectaba la reacción de PCR, por lo cual se realizó un experimento enfocado en evaluar si el producto de la extracción de ADN cromosomal de tacos estaba inhibiendo el PCR de la transposasa utilizando como diana el control positivo (STR107). El resultado de este experimento evidenció cómo existe una inhibición parcial de la reacción de PCR de la transposasa utilizando el control positivo, a medida que aumentamos la cantidad de ADN cromosomal extraído de los tacos de agarosa (Figura 15). Tomando en cuenta estos resultados, se realizó un proceso de diálisis de los tacos de ADN cromosomal, tratando de remover el EDTA en el cual se encontraban sumergidos, sin embargo, luego del proceso de diálisis, no se logró amplificar la banda de 450 pb.

Si bien el EDTA parece inhibir la reacción de PCR de la transposasa IS10, no parece tener el mismo efecto para los PCR especie específica. Como se pudo observar en las figuras 8, 9 y 10, las muestras aisladas de tacos de agarosa presentaron amplificación para los PCR especie específica de *T. rangeli*, *T. cruzi* y *Leishmania*, por lo que no se debe atribuir el hecho de que las cepas *T. cruzi* JMP, *Leishmania* LBT0016 y *T. rangeli* Triatomino (Aisladas de Tacos de Agarosa) resultaran negativas a la presencia de la transposasa IS10 debido a una posible inhibición por parte del EDTA.

Los elementos móviles transponibles son segmentos de ADN muy dinámicos, su presencia, ubicación o distribución puede variar entre diferentes organismos. Debido a esta movilidad de los transposones, se podría explicar el por que de la discrepancia entre los resultados de Rodríguez (2005) y los resultados presentados en este trabajo para las cepas *T. cruzi* JMP y *Leishmania* LBT0016. Ciertamente las cepas utilizadas son las mismas, pero son aislados diferentes, existe la posibilidad de que el transposón estaba presente en los aislados utilizados por Rodríguez (2005), pero no en los aislados que se utilizaron en este presente trabajo.

La identificación mediante PCR de la transposasa en el genoma de *Tr* triatomino y *Tr* San Agustín reportados en este estudio, aunado a los reportados por Rodríguez (2005), suponen la transferencia horizontal del gen de la transposasa, inicialmente descrita en bacterias, hacia el genoma de los tripanosomátidos. La hipótesis de la transferencia de material genético entre las bacterias y los parásitos, se ve fortalecida por el análisis del genoma de los tripanosomátidos reportados en el proyecto TriTryp, donde se encontró que existen al menos 50 genes asociados al metabolismo de los parásitos, que parecen tener un origen bacteriano. En la tabla 8, se muestran algunos ejemplos de secuencias de origen procariota que se encuentran presentes en los Tripanosomátidos *T. cruzi*, *T. brucei* y *Leishmania*.

Código identificación base de datos TriTryp.	Nombre	Producto	Presencia en tripanosomátidos		
			<i>T. brucei</i>	<i>T. cruzi</i>	<i>T. rangeli</i>
LM0013.	LmjF29.1570	Carboxipeptidasa.	x	x	x
LM0029	LmjF17.1050	Hidrolasa	x	x	x
LM0065	LmjF36.5240	Glicosil hidrolasa	x	x	x
LM0077	LmjF33.2300	UDP-glucosa 4'-epimerasa	x	x	x
TB0142	Tb08.26N11.790	Petidina reductasa	x	x	x
TC0035	Tc00.1047053408799.19	Isopentenil-difosfato delta-isomerasa	x	x	x
TC0037	Tc00.1047053506513.110	Peptidasa	x	x	x
TC0214	Tc00.1047053509717.80	gliceraldehido-3fosfatodeshidrogenasa	x	x	x

Tabla 8. **Casos de secuencias reportadas en el proyecto TriTryp que son de origen bacteriano (Berriman et al, 2005).** En la tabla se muestran secuencias de ADN reportadas en el proyecto de los TriTryp, que son de origen bacteriano, y se encuentran presentes en las 3 especies de tripanosomátidos.

El origen del elemento móvil bacteriano IS10 en el genoma de los tripanosomatidos, pudo haber ocurrido de diferentes maneras, pero antes de profundizar en los posibles escenarios del origen de la transposasa, se debe tener presente la contaminación con ADN bacteriano, recordando que en el proyecto TriTryp se determino que la presencia de la transposasa en *T. brucei* era producto de un artefacto, una contaminación bacteriana.

Las cepas utilizadas en este trabajo fueron aisladas de medios de cultivo (Agar Sangre) de parásitos, alguno de estos medios pueden llegar a presentar contaminación bacteriana. Si se hace un aislamiento de ADN de parásitos a partir de un medio de cultivo contaminado, no sería confiable para pruebas de PCR futuras, debido a la interferencia del ADN bacteriano, especialmente para la prueba de PCR de la transposasa, porque se conoce que muchas bacterias tienen la secuencia de la transposasa en su genoma. Para descartar que el medio de cultivo agar sangre de donde se extrajo el ADN tuviese contaminantes bacterianos, se realizó un PCR ARN 16-S, los resultados demostraron que no existe presencia de contaminantes bacterianos, corroborando la confiabilidad de los medios de cultivos en los cuales se mantenían las cepas del Laboratorio de Genética Molecular del IBE.

Una vez que se determinó que no se trata de una contaminación o un error experimental ocasionado por la presencia de ADN bacteriano en los medios de cultivos, se planteo la posibilidad de que el origen del elemento móvil bacteriano en el genoma de los tripanosomátidos, pudo ser consecuencia de la interacción del parásito con la microbiota

del hospedador invertebrado. Tomando en cuenta la flexibilidad del genoma del parásito y las condiciones a las que es sometido el parásito en el vector, pudieron haber sido los desencadenantes para que ocurriera un proceso de transferencia lateral de genes.

En la bibliografía se encuentran estudios que permiten conocer la microbiota del vector invertebrado. Se puede mencionar los estudios realizados de la flota microbiana en los triatominos vectores de la enfermedad de Chagas, *Rhodnius*, *Triatoma*, *Panstrongylus* y *Dipetalogaster*, donde se encontró que la flora bacteriana estaba constituida principalmente por Enterobacteriaceae, específicamente *Candidatus Rohrkolberia*, *Arsenophonus* y *Serratia*. Moraes y col (2003), realizaron un estudio sobre la microbiota presente en vectores invertebrados de la enfermedad de Chagas: *Rhodnius prolixus*, *Rhodnius neglectus*, *Dipetalanogaster maximus* y *Panstrongylus megistus*, enfocado principalmente en los hongos, donde se reportó que los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* eran los más comunes. En el estudio anteriormente mencionado, se llegó a la conclusión que posiblemente *Aspergillus niger* y *Penicillium corylophilum* formaban parte de la flora natural del tracto digestivo de los triatominos. Es interesante acotar que justamente *Aspergillus niger*, fue uno de los organismos que obtuvo un resultado positivo al la presencia de la transposasa por medio del análisis *in silico* de GenBank, por lo que se podría postular como un candidato para la transferencia lateral de genes, al igual que las Enterobacterias, que en su mayoría presentan el elemento móvil en el genoma.



En este trabajo el estudio del contenido intestinal del vector triatomo estuvo principalmente enfocado en analizar de la presencia de la transposasa IS10 por medio del PCR. Los resultados de este análisis mostraron que no se pudo detectar la presencia de la transposasa en el contenido intestinal de los triatomos (*Panstrongylus*). La motivación de este análisis de los contenidos intestinales, radicaba principalmente en brindar una mayor información que permitiera una mejor comprensión de cómo pudo haber ocurrido esta transferencia horizontal de genes, acotando que se estudiaron triatomos tomados directamente de su habitat, lo que permitía acercarse a como era realmente su microbiota en condiciones naturales. Como siguiente paso en el análisis de la presencia de la transposasa en el contenido intestinal de los Chipos, se propuso realizar en un futuro, un PCR 16-S ribosomal a las muestras de contenido intestinal, para cerciorarse de la presencia de ADN bacteriano así como la efectividad del método de aislamiento de ADN a partir del contenido intestinal, y de esta manera poder determinar la presencia de la transposasa IS10 en el contenido intestinal del chipo.

El paso final en este análisis de la organización genómica de la transposasa, mediante hibridaciones de electrocariotipos de diferentes tripanosomátidos con sondas marcadas con digoxigenina, lo cual no solo permitiría corroborar su presencia en el genoma de diferentes tripanosomátidos, si no que también permitiría conocer su ubicación cromosómica, distribución y si existe variabilidad en su ubicación entre las diferentes cepas.

Los electrocariotipos de los diferentes tripanosomátidos se obtuvieron utilizando el nuevo sistema GueFast para la electroforesis de campo pulsado. El análisis de los patrones de banda, al igual que el peso de cada banda, brinda información muy útil sobre los genomas de los diferentes tripanosomatideos y la variabilidad que existe entre ellos. Una de las principales diferencias que se pudo encontrar, fue en el rango de tamaño de los cromosomas, obteniendo para las diferentes cepas de *Leishmania* bandas cromosomales de menor tamaño (250 – 1500 kb) que las encontradas para *T. rangeli* (400 – 1500 kb) y *T. cruzi* (500 – 1400 kb) Ver tabla 7. Los resultados obtenidos de esta experiencia, están en concordancia con los reportes encontrados en la bibliografía. Podemos mencionar que Santes y col, (1997) describió la presencia de 20 cromosomas que van desde 450 a 3500 Kp en *T. cruzi* CL brener, otro reporte para *T. cruzi*, específicamente la cepa Dm28c, indico la presencia de 18 cromosomas desde 550 a 1550 Kb (Aymerich y Goldenberg, 1989). Para *Leishmania* se reportaron alrededor de 20-28 cromosomas, en un rango de PM de 250 a 2600 kb (Bastien y col, 1997), y para *T. rangeli*, se han reportado de 16 a 24 cromosomas en un rango de 350 a 3130 kb (Henrikson y col, 1996) (Tolado y col, 2001), 14 cromosomas en un rango de 350 a 2000 kb (Tanaka y col, 1994). Si bien los resultados mostrados en este estudio corroboran el rango de tamaños de los cromosomas de los diferentes tripanosomátidos, especialmente para las bandas de menor tamaño, parece existir una diferencia en el número de los cromosomas reportados en la bibliografía, con los encontrados en este trabajo (Tabla 7). Debe tenerse en consideración el tipo de cámara electroforética que se está utilizando, y las limitaciones que esta podría presentar, debido a que una cámara de mayor tamaño, con un mayor tiempo y área de corrida, permitirá

una mejor resolución de bandas en comparación a una cámara de menor tamaño. En el caso de la cámara TAFE utilizada en este trabajo, permitió resolver alrededor de 12-16 cromosomas en los tripanosomátidos, tomando en cuenta el tamaño de la cámara, y el tiempo de corrida, se consideró que la resolución de bandas es suficiente para el objetivo planteado en este trabajo, que es la ubicación cromosómica de la transposasa IS10.

Además de observar la variabilidad entre los tripanosomátidos, también se analizó la variabilidad que existe entre las diferentes cepas de *T. cruzi*, *T. rangeli* y *Leishmania*. Un caso interesante para mencionar es la cepa "*Tc Recuperado de Chipo*", previamente en los análisis de tipificación, esta cepa había resultado positivo tanto para *T. rangeli* (p542) como para *T. cruzi* (Clon 6). En análisis de los tamaños cromosomales de "*Tc recuperado de chipo*", son muy similares a los tamaños cromosomales reportados para *Tr* Triat, esto se puede evidenciar en la figura 24, los carriles 5 y 6 pertenecen a la cepa denominada "*recuperado de chipo*", y en el carril 8, se encuentra *Tr* Triat, se observó que tanto la distribución, como el tamaño de las bandas cromosomales, son muy parecidas para ambas cepas. En esta misma figura, se observó como la cepa *Tr* Dog (carril 9), de igual manera presenta una gran similitud con la cepa de *Tr* Triat. Esta misma similitud entre los cromosomas de estas cepas, se pudo evidenciar en la figura 22, carriles 5 y 6. En vista de estos resultados, se puede resaltar la importancia de la implementación de este nuevo sistema de electroforesis de campo pulsado TAFE en el laboratorio de Genética Molecular del IBE, el cual permite darle robustez a los estudios de tipificación y caracterización molecular de las diferentes cepas de tripanosomátidos.

Si bien el marcaje con digoxigenina de todas las sondas fue exitoso, las hibridaciones de los electrocariotipos transferidos a membranas de nylon no pudieron aportar información acerca de la organización cromosómica de la transposasa. Estos resultados no se pueden interpretar como la ausencia de la transposasa en el genoma, debido a la limitante experimental que no permitió llevar a cabo exitosamente las experiencias de hibridación, debido a que ninguno de los controles de hibridación que se utilizaron arrojaron resultados positivos. Si se analiza paso a paso los procedimientos experimentales de la hibridación, se puede ir dilucidando donde podría radicar la problemática experimental que impidió realizar esta metodología de manera exitosa. Por un parte se conoce que el marcaje de las diferentes sondas con digoxigenina fue exitoso, como se observa en los análisis de PCR, y posteriormente se corroboró mediante una prueba de estimación de la cantidad de sonda, en la cual se servía directamente sobre la membrana de nylon el ADN marcado con digoxigenina, y se realizó el proceso de revelado mencionado en la metodología. Por lo cual se puede inferir que la problemática experimental no estuvo en el proceso de marcaje ni tampoco en el revelado. Se dirige la atención entonces hacia la transferencia de ADN del gel de agarosa, hacia la membrana de Nylon. Principalmente el protocolo que se utilizó planteaba la utilización de NaOH como la solución de transferencia de ADN por capilaridad. En vista de los resultados negativos de las hibridaciones con las primeras membranas que se probaron, se planteo la posibilidad de que el NaOH podría estar afectando la digoxigenina, desprendiéndola de la sonda, impidiendo la detección en el revelado. Aunque el instructivo de la digoxigenina utilizada no mencionaba que era sensible al medio alcalino (alkaline labile), se consultó

directamente a Roche Apply Science acerca de este producto, y su susceptibilidad al utilizar NaOH. La respuesta de esta casa comercial fue que ellos no pensaban que el medio alcalino afectara al kit de digoxigenina que se utilizó en el experimento. A pesar de la respuesta de Roche, se comenzó a utilizar otra solución de transferencia, un buffer SSC, para evitar una posible interferencia del NaOH con la digoxigenina. Sin embargo, con la utilización de este tampón se experimentó un inconveniente, la transferencia incompleta de ADN del gel de agarosa a la membrana. Se optimizarón los métodos de tratamiento del gel previos a la transferencia, al igual que el aumento del tiempo de transferencia a 48 horas, obteniéndose un mejor resultado, pero aun con la utilización de la solución SSC como medio de transferencia, no se pudo lograr obtener un resultado positivo para las hibridaciones, con ningún control de hibridación.

En vista de estos resultados, se puede inferir que la problemática experimental podría radicar en una transferencia ineficiente del material genético desde el gel a la membrana o en por unas condiciones de hibridación inadecuadas. Por lo cual, el siguiente paso en este trabajo será la optimización de la transferencia de ADN del gel a la membrana utilizando SSC como solución de transferencia, realizando pruebas solo para los controles positivos utilizando la técnica de transferencia de ADN al vacío, lo que incrementaría la eficacia de la transferencia de material genético a la membrana, al igual que reducirá el tiempo de duración del experimento, y de esta manera cerciorarnos de una transferencia completa del ADN del gel hacia la membrana. Una vez solventados los inconvenientes de la hibridación con la sonda de la transposasa, se procedería a realizar estudios sobre la

presencia de la proteína, realizando ensayos para determinar si se está expresando la proteína, ensayos de Western Blot, que permitan tener una mayor comprensión de la posible funcionalidad de transposasa en los tripanosomátidos.

## VII. CONCLUSIONES

- 7.1** Al realizar un análisis comparativo en las base de datos (GenBank) con la secuencia del recombinante STR107, podemos observar como desde el año 2010 hasta el 2012 ha existido un incremento en el numero de organismos reportados (procariotas y eucariotas) que presentan una similitud mayor al 97% con la secuencia del elemento móvil IS10.
- 7.2** Logramos corroborar por medio del ensayo PCR transposasa, la presencia de secuencias del elemento móvil IS10 en el genoma de *T. rangeli* Triatomino, *T. rangeli* San Agustín.
- 7.3** Logramos descartar la presencia de contaminantes bacterianos en medios de cultivos de parasitos, como posible fuente del reporte de la transposasa en el genoma de los tripanosomátidos, mediante PCR ARN 16S ribosomal.
- 7.4** La presencia de la transposasa IS10 en el contenido intestinal de triatominos no pudo ser determinada. Es necesario determinar la presencia de ADN bacteriano mediante el PCR ADN 16S ribosomal en los aislados de ADN de contenido intestinal, para luego repetir los ensayos de PCR de la transposasa.
- 7.5** La implementación del nuevo sistema de electroforesis de campo pulsado Guefast, nos permitió obtener información sobre los genomas de los tripanosomátidos y la variabilidad de los mismos, mediante el análisis de perfiles de electrocariotipos. Obteniéndolo rangos de tamaños de peso molecular desde 400 a 1500 kb para las cepas de *T. rangeli*, entre 500 – 1400 kb Para las cepas de *T. cruzi*, y para las cepas de *Lesihmania* los tamaños cromosomales se encontraron desde 250 – 1500 kb. Además es una herramienta muy valiosa para fortalecer los estudios de caracterización molecular de los diferentes organismos.

**7.6** La ubicación cromosómica del elemento móvil IS10 por medio de hibridaciones moleculares con sondas de ADN marcadas con digoxigenina no pudo ser determinada, es necesario evaluar los métodos de transferencia de ADN del gel hacia la membrana de nylon para cerciorarnos que ocurra una transferencia completa y que el ADN se haya fijado a la membrana, para poder determinar la ubicación cromosómica del elemento móvil IS10 utilizando sondas marcas con digoxigenina.



## VIII. BIBLIOGRAFIA.

1. Aché, A., Matos, A.J (2001) **Interrupting Chagas disease transmission in Venezuela.** Rev. Inst: med. Trop. Sao Paulo 43:37-43.
2. Aksoy, S. (1991). **Site-specific retrotransposons of the trypanosomatid protozoa.** *Parasitol. Today* 7:281–285.
3. Aksoy, S., Williams, S., Chang, S., Richards, F. (1990). **SLACS retrotransposon from *Trypanosoma brucei gambiense* is similar to mammalian LINEs.** Nucleic Acids Research. 18 (4): 785-792.
4. Añez, N., Crisante, G., Rojas, A. (2004) **Update on Chagas disease in Venezuela – A review.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 99(8): 781-787.
5. Araya, J., Cano, M., Gomes, J., Novak, E., Requena, J., Alonso, C., Levin, M., Guevara, P., Ramiez, J., Da Silveira, F. (1997) **Characterization of an interspersed repetitive DFNA element in the genome of *Trypanosoma cruzi*.** Parasitology 115:563-570.
6. Aymerich, S., Goldenberg, S. (1989) **The karyotype of *Trypanosoma cruzi* Dm 28c: comparison with other *T. cruzi* strains and trypanosomatids.** Exp Parasitol;69(2):107-15.
7. Azambuja, P., Garcia, E. S. (2005) ***Trypanosoma rangeli* interactions within the vector *Rhodnius prolixus* - A mini review.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 100(5): 567-572.
8. Basseri, HR., Tew, IF., Ratcliffe, NA. **Identification and distribution of carbohydrate moieties on the salivary glands of *Rhodnius prolixus* and their possible involvement in attachment/invasion by *Trypanosoma rangeli*.** *Experimental Parasitology.* 2002 Apr;100(4):226-34.
9. Basso, B., Moretti, E., Fretes, R. (2008). **Vaccination with epimastigotes of different strains of *Trypanosoma rangeli* protects mice against *Trypanosoma cruzi* infection.** *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* Vol. 103(4): 370-374.

10. Bastien, P., Blaineau, C., Pages, M. (1992) **Molecular Karyotype analysis in Leishmania**. *Subcell Biochem* ;18:131-87.
11. Bhattacharya, S., Bakre, A., Bhattacharya A. (2002). **Mobile genetic elements in protozoan parasites**. *Journal of Genetics*. 81(2):73-86.
12. Blaxter, M. (2007). **Symbiont genes in host genomes: fragments with a future?**.*Cell Host Microbe*. 11;2(4):211-3.
13. Böhne, A., Brunet, F., Galiana-Arnoux, D., Schultheis, C., Volff JN. (2008).**Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates**. *Chromosome Research*;16(1):203-15.
14. Bringaud, F., Bartholomeu, D., Blandin, G., Delcher, A., Baltz, T., El-Sayed, N., Ghedin E. (2006). **The *Trypanosoma cruzi* L1Tc and NARTc non-LTR retrotransposons show relative site-specificity for insertion**. *Molecular Biology and Evolution*. 23:411–420.
15. Bringaud, F., Berriman, M., Hertz-Fowler, C. (2009). **Trypanosomatid Genomes Contain Several Subfamilies of ingi-Related Retroposons**. *Eukaryot Cell*; 8(10): 1532–1542.
16. Bringaud, F., García-Pérez, J., Heras, S., Ghedin, E., El-Sayed, N., Andersson, B., Baltz, T., Lopez, M. (2002). **Identification of non-autonomous non-LTR retrotransposons in the genome of *Trypanosoma cruzi***. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 124(1-2):73-8
17. Brown, T.A (2002). **Genomes**. Second Edition. Wiley-Liss. USA. Pp 137.
18. Chiurillo, M., Cano, I., Da silveira, F., Ramierez, J., (2002). **Organization of telomeric and sub-telomeric regions of chromosomes from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi***. *Molecular and Biochemical Parasitolog*. 100: 173-183.
19. Church, G.M., Gilbert, W. (1983) **Genomic sequencing**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81:1991-1995.

20. Clark, A., Eisen, M., Smith D., Begman C., Oliver, B., Markow, T., Kaufman, T., Kellis, M., Gelbart, W., Iyer, V., et al. (2007). **Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny.** *Nature* 450:203-218. }
21. D'Alessandro-Bacigalupo, A. & Saravia, N. (1992). ***Trypanosoma rangeli*.** *Parasitic Protozoa*, Second Edition, Academy Press. Vol 2:1-54.
22. D'Alessandro, A (1976). **Biology of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920.** En WHR Lumsden & DA Evans (eds), *Biology of Kinetoplastida*, Vol. 1, Academic Press, Londres, Nueva York y San Francisco, p. 327-493.
23. D'Alessandro, A., Saravia, N. (1999). ***Trypanosoma rangeli*.** En HM Gilles, *Protozoal Diseases*, Oxford University Press. 398-412.
24. Donald, G, Grisafi, P., Kleckner, N., Botstein, D. (1979) **The ends of Tn10 are not IS3.** *Journal of Bacteriology*, Sept 1979. Vol 139, 0021-9193.
25. Dorn, P., Daigle, M., Combe, C., Tate, A., Stevens, L., Phillippi-Falkenstein, K. (2012). **Low prevalence of chagas parasite infections in a nonhuman primate colony in lousiana.** *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2012;51(4):443-7.
26. El-Sayed, N., Myler, P. Blandin, G., Berriman, M., Crabtree, J., Aggarwal, G y colaboradores (2005). **Comparative Genomics of Trypanosomatid Parasitic Protozoa.** *Science.* 309:404-409.
27. Feder, D., Gomes, S., Garcia, E., Azabuja, P. (1999) **Metalloproteases in *Trypanosoma rangeli*-infected *Rhodnius prolixus*.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* Vol.94 n.6 771-777.
28. Garcia, E., Castro, P., Figueredo, B., Azambuja, P., (2012) **Parasite-mediated interactions within the insect vector: *Trypanosoma rangeli* strategies.** *Parasites & Vectors* 5:105
29. Graham, S. (1995) **Mechanisms of stage-regulated gene expression in kinetoplastida.** *Parasitol, Today.* 11:217-224.
30. Grisard, C., Stoco, H., Wagner, G., Sincero, C., Rotova, G., Rodrigues, B., Snoeijs, i., Koerich, B., Sperandio, M., Bayer-Santos, E., Fragoso, P., Goldenberg, O., Vallejo, G., Tyler, K., Davila, A., Steindel, M., Transcriptomic. **Analyses of the avirulent**

- protozoan parasite *Trypanosoma rangeli***. *Molecular & Biochemical Parasitology* 174 (2010) 18–25
31. Grisard, EC., Steindel, M., Guamieri, AA., Eger-Mangrich, I., Campbell, DA., Romahna, AJ. (1999). **Characterization of *Trypanosoma rangeli* strains isolated in Central and South America: an overview**. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 203-209.
  32. Groggl, M., Kuhn, R. (1984). **Identification of antigens of culture of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* recognized by sera from patients with chronic Chagas disease**. *Journal of Parasitology*. 70: 822-824.
  33. Grisard, C., Stoco, H., Wagner, G., Sincero, T., Gianinna, R., Rodrigues, J., Snoeijer, C., Koerich, L., Sperandio, M., Bayer-Santos, E., Fragoso, S., Goldenberg, S., Triana, O., Vallejo, G., Tyler, K., Davila, A., Steinder, M. (2010) **Transcriptomic analyses of the avirulent protozoan parasite *Trypanosoma rangeli***. *Molecular & Biochemical Parasitology*. 174: 18-25.
  34. Guevara, P. **Identificación y diagnóstico molecular de microorganismos. Manual de laboratorio** (2004).
  35. Guhl, F., Hudson, L., Marinkelle, CJ., Jaramillo, CA., Bridge, D. (1987). **Clinical *Trypanosoma rangeli* infection as a complication of Chagas' disease**. *Parasitology* 94: 475-484.
  36. Guhl, F., Vallejo, A. (2003). ***Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920 – An updated Review**. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 98(4): 435-442.
  37. Haren, L., Ton-Hoang, B., Chandler, M. (1999) **Integrating DNA: transposases and retroviral integrases**. *Annual Review of Microbiology*. 53: 245-281.
  38. Hecht, M., Nitz, N., Araujo, P., Sousa, O., Cassia, A., Gomes, A., Leonardecz, E., Texeira, L. (2010) **Inheritance of DNA Transferred from American Trypanosomes to Human Hosts**. *PLoS ONE* 5(2): e9181. doi:10.1371/journal.pone.0009181
  39. Hecker, H., Schwarzenbach, M. & Rudin, W. (1990). **Development and interactions of *Trypanosoma rangeli* in and with the reduviid bug *Rhodnius prolixus***. *Parasitology Research* 1990; 76(4): 311-8.

40. Henriksson, J., Solari, A., Rudker, M. Sousa, O.E., Pattersson, U. (1996) **Karyotype variability in *Trypanosoma rangeli***. *Parasitology*. 112: 385-391.
41. Heras, S., Thomas, M., Garcia, M., Felipe, P., Garcia, J.L., Ryan, M., Lopez, M. (2006) **L1Tc non-LTR retrotransposons from *Trypanosoma cruzi* contain a functional viral-like self-cleaving 2A sequence in frame with the active proteins they encode**. *Cellular and Molecular life sciences*. 63, 1449–1460.
42. Herbig-Sandreuter A. **Untersuchungen über den Cyclus von *T. rangeli* Tejera 1920 im Warmbluter und in *Rhodnius prolixus***. (1955) *Acta Trop* 12: 261-264
43. Hernandez, R. Martinez, S., Hernandez-Rivas, R., Gomez, E. (1993). ***Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA genes: a review**. *Biology Research*. 26(1-2):109-14.
44. Hotopp, J., Clark, M., Oliveira, D., Foster, J., Fischer, P., Torres, M., Giebel, J. (2007). **Widespread lateral gene transfer from intracellular bacteria to multicellular eukaryotes**. *Science*. Vol, 317. pp. 1753-1756.
45. Karsten, V., Davis, C., Kuhn, R. (1992). ***Trypanosoma cruzi* in wild raccoons and opossums in North Carolina**. *J Parasitol*. 1992 Jun;78(3):547-9.
46. Klasson, L., Kambris, Z., Cook, P., Walker, T., Sinkins, S. (2009) **Horizontal gene transfer between *Wolbachia* and the mosquito *Aedes aegypti***. *BMC Genomics*. 10:33
47. Lewin, B. (2004). **Genes VIII**, 8<sup>th</sup> Edition. Oxford University Press, New York. pp: 467.
48. Macedo, A., Vallejo, G., Chiari, E., Pena, S. (1993). **DNA fingerprinting reveals relationships between strains of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi***. En *SDJ Pena, R Chakraborty, JT Epplen, AJ Jeffreys (eds), DNA Fingerprinting*. p. 321-329.
49. Mahillon, J., Chandler, M. (1998). **Insertion sequences**. *Micribiology and Molecular Biology Reviews*. Vol. 62, No. 3, p. 725-774.
50. Martínez, J., Henriksson, J., Rydaker, M., Cazzulo, J., J, Pettersson, U. (1995). **Genes for cysteine proteinases from *Trypanosoma rangeli***. *FEMS Micribiology Letters*. 129(2-3):135-41.

51. Mejía, A., Paláu, M., Zúñiga, M. (2005) ***Trypanosoma rangeli*: Lo que se conoce y el impacto de su presencia.** En *MedUNAB.* 7:166-71.
52. Moraes, A., Junqueira, C., Celano, V., Costa, G., Rodrigues, J. (2003) **Fungal flora of the digestive tract of *rhodnius prolixus*, *rhodniusneglectus*, *diptelanogaster maximus* and *panstrongylus megistus*, vectors of *trypanosoma cruzi*, chagas,** 1909. *Brazilian Journal of Microbiology* (2004) 35:288-291
53. Mota, F., Marinho, L., Carvalho, M., Lima, M., Cicero, B., Garcia, E., Carels, N., Azambuja, P. (2012) **Cultivation-Independent Methods Reveal Differences among Bacterial Gut Microbiota in Triatomine Vectors of Chagas Disease.** *PLoS Negl Trop Dis* 6(5): e1631.
54. Nikoh N, Nakabachi A (2009). **Aphids acquired symbiotic genes via lateral gene transfer.** *BMC Biol.* 7:12.
55. O'Daly, J., Carrasco, H., Fernandez, V., Rodríguez, M. (1994). **Comparison of chagasic and non-chagasic myocardopathies by ELISA and immunoblotting with antigens of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*.** *Acta Tropica.* 56(4): 265-287.
56. Ohtsubo, H., Ohtsubo, E. (1977) **Repeated DNA sequences in plasmid, phages and bacterial chromosome.** P49-63, Cold Spring Harbor Laboratory.
57. Osorio, Y., Travi, B., Palma, G., Saravia N. (1995). **Infectivity of *Trypanosoma rangeli* in a promonocytic mammalian cell line.** *Journal of Parasitology.* 81: 687-693.
58. Pace JK II., Feschotte, C. (2007) **The evolutionary history of human DNA transposons: evidence for intense activity in the primate lineage.** *Genome Res* 17: 422-432
59. Porcel, B., Bontempi, E., Henriksson, J., Rydarker, M., Aslund, L., Segura, E., Pettersson, U., Ruiz, A. (1996). ***Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*: molecular characterization of genes encoding putative calcium-binding proteins, highly conserved in trypanosomatids.** *Experimental Parasitology.* 84(3): 387-399.

60. Pritham, E. (2009) **Transposable Elements and Factors influencing their Success in Eukaryotes**. Journal of Heredity, doi:10.1093
61. Ptashne, K., Cohen, N. (1975) **Ocurrence of incertion sequence (IS) regions on plasmid deoxyribonucleic acid as direct and inverted nucleotide sequence duplications**. J Bacteriol. 122:776-781.
62. Requena, J., López, M., Alonso, C. (1996). **Genomic repetitive DNA elements of *Trypanosoma cruzi***. *Parasitology Today*. Volume 12, Issue 7, P. 279-283.
63. Riquez, A. (2009). **Mortalidad por enfermedad de Chahas. A propósito de los brotes de Chagas agudo como enfermedad emergente de la transmisión alimentaria**. Gac. Méd. Caracas; 117: 319-321
64. Rodgers, M., Popper, S., Wirth, D. **Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of Leishmania**. (1990) Exp Parasitol, 267-75.
65. Rodriguez Mesa, Evelyn (2005). **Identificación y caracterización genética de una transposasa putativa en *Trypanosoma rangeli***. Trabajo especial de grado – Universidad Central de Venezuela. Consulta: 5 de Septiembre 2009.
66. Salzberg, S., White, O., Peterson, J., Eisen, J. (2001). **Microbial Genes in the Human Genome: Lateral Transfer or Gene Loss?**.*Science*. Vol.292. no.5523, pp. 1903 - 1906.
67. SamBook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. (1989). **Molecular Cloning: A laboratory manual**. Second Edition. Cold Spring, Harbour Laboratory Press.
68. SanMiguel, P., Tikhonov, A., Jin, YK., Motchoulskaia, N., Zakharov, D.(1996) **Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome**. *Science* 274: 765–768.
69. Santos, M., Cano, Ml., Schijman, A., Lorenzi, H., Vazquez, M., Levin, M., Ramirez, J., Bradao, A., Degrave, W., Silveira, J.,(1997). **The *Trypanosoma cruzi* genome project: nuclear karyotype and gene mapping of clone *CL Brener***. Mem Inst Oswaldo Cruz;92(6):821-8.

70. Sharp, P., Cohen, N., Davidson, N. (1973) **Electro microscope heteroduplex studies of sequence relations among plasmids of *E. coli* II. Structure of drug-resistance (R) factors and F factors.** J. Mol. Biol. 75:235-255.
71. Smith, M., Bringaud, F., Papadopoulou, B. (2009). **Organization and evolution of two SIDER retroposon subfamilies and their impact on the *Leishmania* genome.** BMC Genomics. 22;10:240.
72. Tanaka, T., Kaneda, Y., Lida, A., Tanaka, M. (1994) **Homologous cysteine proteinase genes located on two different chromosomes from *Trypanosoma rangeli*.** International Journal of Parasitology. 24 (4): 179-188.
73. Thomas, M., Fernández, A., Moro, A., Garcia, J., González, A. (1993). **Biología molecular de tripanosomátidos.** En *Parasitología molecular. Colección nuevas tendencias.* Lopez, M.C y Rivas L (eds). pp. 135-143.
74. Thomas, M.C., Fernández, A., Moro, A., García, J.A., González, A. (1993). **Biología molecular de tripanosomátidos.** Parasitología molecular. Colección nuevas tendencias pp.135-143
75. Tolado, C., Steindel, M., Sousa, M., Tavares, C.(2001). **Molecular Karyotype and Chromosomal Localization of Genes Encoding  $\beta$ -tubulin, Cysteine Proteinase, hsp 70 and Actin in *Trypanosoma rangeli*.** Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Vol. 96(1): 113-121.
76. Training in Tropical Diseases. Organización Mundial de la Salud. [http://apps.who.int/tdr/svc/diseases/chagas/Pagina\\_visitada\\_en\\_Septiembre\\_2009](http://apps.who.int/tdr/svc/diseases/chagas/Pagina_visitada_en_Septiembre_2009).
77. TriTrypDB, Kinetoplastid Genomics Resource. <http://tritrypdb.org/tritrypdb/showApplication.do> Pagina visitada en: Septiembre 2010 – Agosto 2012
78. Urdaneta-Morales, S., Tejero, F (1985) ***Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920: mouse model for high, sustained parasitemia.** Journal of Parasitology, 409-414.
79. Urrea, D., Carranza, J., Cuba, C., Gurgel-Golcalves, R., Guhl, F., Schofield, C., Triana, O., Vallejo, G. **Molecular characterisation of *Trypanosoma rangeli* strains isolated**



- from *Rhodnius ecuadoriensis* in Peru, *R. colombiensis* in Colombia and *R. pallescens* in Panama, supports a co-evolutionary association between parasites and vectors. En *Infection, Genetics and Evolution* 5. 123–129.
80. Vallejo, G. (1998). **Estudios comparativos entre las secuencias de kDNA de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli* y su aplicación en el diagnóstico molecular de la tripanosomiasis americana.** *Actual Biol.* 20:43-56.
81. Vallejo, G., Macedo, A., Chiari, E., Pena, S.(1994) **Kinetoplast DNA from *Trypanosoma rangeli* contains two distinct classes of minicircles with different size and molecular organization.** *Molecular and Biochemical Parasitology.* 67(2):245-53.
82. Vargas, N., Souto, R., Carranza, J., Vallejo, G., Zingales, B. (2000). **Amplification of a specific repetitive DNA sequence for *Trypanosoma rangeli* identification and its potential application in epidemiological investigations.** *Experimental Parasitology.* 96(3):147-59.
83. Vazquez, M., Bed-Dov, C., Lorenzi, H., Moore, T., Schijman, A., Levin, M. (2000). **The short interspersed repetitive element of *Trypanosoma cruzi*, SIRE, is part of VIPER, an unusual retroelement related to long terminal repeat retrotransposons.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 10.1073/pnas.050578397.
84. Watkins, R (1971). **Histology of *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*.** En *Journal of invertebrate pathology.* 17: 67-71.
85. Zuñiga, X., Palau, T., Penin, P., Garmillo, C., De Diego, J.A. (1997). **Characterization of a *Trypanosoma rangeli* strain of Colombian origin.** *Memorias do instituto Oswaldo Cruz* 92, 523-530