



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

**OBTENCIÓN DE LÍNEAS FLUORESCENTES
ESTABLES *in vivo* DE UNA CEPA DE
Trypanosoma cruzi DEL VALLE DE
CARACAS HACIENDO USO DEL VECTOR
pTREX-n GFP5 (S65T)**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller Anuschka Da Silva Spínola como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología

Tutoras: Dra. Palmira Guevara
 Dra. Nereida Parra

CARACAS, VENEZUELA
MAYO 2016

**DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO
DE LA Br. ANUSCHKA DA SILVA SPÍNOLA**

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado de la Br. Anuschka Da Silva Spínola, C.I. N°: V-18.486.229, titulado: "**Obtención de líneas fluorescentes estables *in vivo* de una cepa de *Trypanosoma cruzi* del Valle de Caracas haciendo uso del vector pTREX-n GFP5 (S65T)**", para optar al título de Licenciada en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los Reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO** con una nota de **VEINTE (20) PUNTOS**.

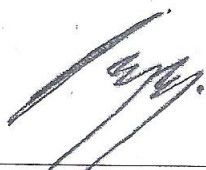
Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los dieciséis días del mes de mayo de 2016, dejando constar que la Profa. Palmira Guevara actuó como coordinadora del jurado examinador.



Prof. Gustavo Benaim
(Jurado Principal)



Profa. Leidi Herrera
(Jurado Principal)



Profa. Palmira Guevara
(Tutora – Coordinadora)



Dra. Nereida Parra
(Tutora)

“God,
grant me the SERENITY to accept the things I cannot change,
COURAGE to change the things I can,
and WISDOM to know the difference.”

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE TABLAS	ii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	iii
RESUMEN	iv
INTRODUCCIÓN	1
1. La enfermedad de Chagas.	1
2. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	2
3. Organización del genoma y expresión génica en <i>T. cruzi</i> .	3
4. Herramientas de genética reversa en Trypanosomatidae.	6
5. Vectores de expresión para <i>T. cruzi</i> .	8
5.1. Marcadores selectivos en vectores de expresión para <i>T. cruzi</i> .	10
5.2. Genes reporteros en vectores de expresión para <i>T. cruzi</i> .	10
ANTECEDENTES	12
OBJETIVOS	15
Objetivo general	15
Objetivos específicos	15
MATERIALES Y MÉTODOS	16
1. Cepa de <i>Trypanosoma cruzi</i> y cultivo de parásitos.	16
Caracterización de la cepa de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	16
1.1. Aislamiento de ADN de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	16
1.2. Tipificación del aislado de <i>Trypanosoma cruzi</i> mediante ensayos de PCR.	16
2. Determinación del IC50 al antibiótico G418 de la cepa de <i>T. cruzi</i> TGEN/VE/2012/ValleCCS1.	18
3. Transformación bacteriana.	19
3.1. Preparación de células competentes por CaCl ₂ .	19
3.2. Transformación de células competentes.	19
4. Aislamiento de ADN plasmídico.	20
4.1. Aislamiento de ADN plasmídico mediante “mini-prep”.	20
4.2. Aislamiento de ADN plasmídico con estuche comercial.	20
5. Digestión de ADN con enzimas de restricción.	21
6. Análisis de ADN mediante electroforesis con geles de agarosa.	21
7. Electroporación, seguimiento y selección de líneas transfectantes estables.	22
7.1. Clonamiento de líneas celulares estables de <i>T. cruzi</i> expresando GFP5 (S65T).	23
RESULTADOS	24
1. Evaluación del crecimiento e infectividad de la cepa de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	24
2. Aislamiento del ADN plasmídico del vector pTREX-n GFP5 (S65T).	25
3. Digestión de ADN del vector pTREX-n GFP5 (S65T) con enzimas de restricción.	27
4. Tipificación de la cepa <i>T. cruzi</i> TGEN/VE/2012/ValleCCS1 mediante PCR.	29
5. Determinación del IC50 en la cepa <i>T. cruzi</i> TGEN/VE/2012/ValleCCS1.	30
6. Construcción de líneas fluorescentes estables de <i>T. cruzi</i> TGEN/VE/2012/ValleCCS1 expresando la proteína de fluorescencia GFP5 (S65T).	31
7. Construcción de líneas fluorescentes estables de <i>T. cruzi</i> TGEN/VE/2012/ValleCCS1 expresando la proteína de fluorescencia <i>tdTomato</i> .	36

DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES	50
BIBLIOGRAFÍA	51
ANEXOS	61

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	3
2. Mecanismo de <i>trans-splicing</i> .	6
3. Vectores de expresión de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	9
4. Vector de expresión de <i>Trypanosoma cruzi</i> con el gen que codifica la <i>GFP</i> .	11
5. Cultivo de <i>Trypanosoma cruzi</i> aislado TGENVE/2012/ValleCCS1.	24
6. Aislamiento de ADN plasmídico del vector pTREX-n GFP5 (S65T).	25
7. Caracterización del vector pTREX-n GFP5 (S65T) mediante digestiones sencillas y dobles con enzimas de restricción.	26
8. Caracterización del aislado de <i>T. cruzi</i> TGENVE/2012/ValleCCS1 mediante el ensayo de PCR ADNk.	28
9. Caracterización del aislado de <i>T. cruzi</i> TGENVE/2012/ValleCCS1 mediante el ensayo de PCR ADNn.	28
10. Cinética de crecimiento de la cepa <i>T. cruzi</i> TGENVE/2012/ValleCCS1.	29
11. Cinética de crecimiento de <i>T. cruzi</i> TGENVE/2012/ValleCCS1 bajo concentraciones preliminares del antibiótico G418.	30
12. Cinética de crecimiento de <i>T. cruzi</i> TGENVE/2012/ValleCCS1 bajo diversas concentraciones del antibiótico G418.	31
13. Líneas celulares de <i>T. cruzi</i> 48 horas post-transfección con pTREX-n GFP5 (S65T).	32
14. Líneas celulares estables de <i>T. cruzi</i> 45 días post-transfección con pTREX-n GFP5 (S65T).	33
15. Líneas celulares estables de <i>T. cruzi</i> 6 meses post-transfección con pTREX-n GFP5 (S65T).	34
16. Diagrama del esquema de clonamiento de líneas celulares estables de <i>T. cruzi</i> transfectadas con pTREX-n GFP5 (S65T).	35
17. Líneas celulares estables clonadas de <i>T. cruzi</i> transfectadas con pTREX-n GFP5 (S65T).	36
18. Células VERO infectadas con líneas clonales de <i>T. cruzi</i> transfectadas con pTREX-n GFP5 (S65T).	37
19. Vector de expresión de <i>Trypanosoma cruzi</i> pTREX-Neo-tdTomato.	38
20. Líneas celulares de <i>T. cruzi</i> 48 horas post-transfección con pTREX-n tdTomato.	39
21. Caracterización de aislados de <i>T. cruzi</i> mediante el ensayo de PCR ADNn.	42

ÍNDICE DE TABLAS

1. Genoma de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	4
---	---

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	ARN de transferencia
EDTA	Sal sódica de etilen dietil tetra acetato
SDS	Dodecil fosfato de sodio
TAE	Tampón tris-acetato
LB	Medio Luria y Bernati
LIT	Triptosa infusión de hígado
MEM	Medio esencial mínimo
µg	Microgramos
mg	Miligramos
µL	Microlitros
mL	Mililitros
mM	Milimolar
M	Molar
pb	Pares de bases
Kb	Kilopares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
g	Gravedad
min	Minutos
seg	Segundos
Amp	Ampicilina
Str	Estreptomicina
Oligo	Oligonucleótido
µm	Micrometro
OMS	Organización Mundial de la Salud

RESUMEN

La enfermedad de Chagas es causada por el protozoo parásito *Trypanosoma cruzi*. Está catalogada por la OMS como desatendida y afecta a aproximadamente ocho millones de personas en veintidós países del continente americano, extendiéndose a países de otros continentes producto de la movilización de poblaciones de inmigrantes latinoamericanos en fase crónica o inaparente.

En la región norte-central costera y occidental de nuestro país se han reportado en los últimos años brotes agudos microepidémicos. El comportamiento parasitológico de estas cepas, las cuales han estado circulando en el ciclo selvático y en las infecciones agudas, es poco conocido y es motivo de estudio a través de su caracterización en cuanto a su interacción con el hospedador.

La dificultad de utilizar la genética clásica en un parásito con rara reproducción sexual ha motivado a la aplicación de las herramientas de la genética reversa para su estudio, como por ejemplo la generación de vectores de expresión estables con genes reporteros como la proteína de fluorescencia verde (*GFP*) para la construcción de parásitos autofluorescentes destinados al análisis las interacciones parásito-hospedador. En este trabajo reportamos la obtención de líneas fluorescentes estables *in vivo* de una cepa de *T. cruzi* recientemente aislada de *Pastrongylus geniculatus* en los Altos Mirandinos, haciendo uso del vector pTREX-n GFP5 (S65T), mediante técnicas de electroporación y selección con el antibiótico G418, así como la evaluación de su capacidad de infección *in vivo* e células Vero, con la perspectiva de en un futuro utilizar estas líneas estables en la evaluación de la infección por vía oral en modelos murinos en las fases aguda y crónica, así como una herramienta en el desarrollo de nuevos tratamientos quimioterapéuticos.

INTRODUCCIÓN

La tripanosomiasis americana, conocida como enfermedad de Chagas en el humano, es producto de la infección causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*. Descrito por primera vez por Carlos Chagas en 1908, como un flagelado desconocido presente en el intestino de un insecto hematófago, el *Pastronylus mengistus* (Rey, 1991), este investigador lo encuentra un año más tarde en la sangre de una niña infectada. En su ciclo de vida *T. cruzi* es capaz de infectar a más de 100 especies de mamíferos, y utiliza como vectores a varias especies de hemípteros hematófagos (familia Reduviidae, subfamilia Triatominae) abarcando a más de 140 especies de triatomos reconocidos pertenecientes a 19 especies (Brener y col., 2000; Coura y col., 2014) mostrando una amplia distribución geográfica en el continente americano.

El parásito *T. cruzi* es un protozooario flagelado ubicado taxonómicamente en el Reino Euglenida, Orden Kinetoplastida, Familia Trypanosomatidae (Reddy y col., 2014). Dentro del género *Trypanosoma* se definen dos secciones: Salivaria y Estercoraria; cuya distinción se relaciona con el modo como ocurre la transmisión del parásito mediada por los insectos vectores, la cual puede ser inoculativa o contaminativa respectivamente (Hoare, 1972). *T. cruzi* ha sido ubicado en la sección Estercoraria ya que es uno de los géneros de tripanosomas capaces de desarrollarse en el tubo digestivo del vector con liberación de formas infectivas a través de las heces (Brener y col., 2000).

1. La enfermedad de Chagas.

La enfermedad de Chagas es un problema de salud pública en el continente americano donde afecta a aproximadamente ocho millones de personas en 22 países, además de la existencia de reportes en Europa y en el norte de Estados Unidos producto de la movilización de poblaciones de inmigrantes latinoamericanos con infecciones crónicas o inaparentes (Guerri-Guttenberg y col., 2008), la transmisión congénita, transfusiones o trasplante de órganos.

La transmisión de la enfermedad en el humano puede ocurrir dependiendo del área y/o complejo ecopatogénico a través de tres mecanismos: vectorial, transfusional o congénito. Aún cuando era conocida la transmisión por contaminación de alimentos en brotes pequeños en el Amazonas

brasileño, en diciembre de 2007 se registró el brote más numeroso de la enfermedad de Chagas aguda en una escuela del municipio Chacao de la ciudad de Caracas mediante la ingesta de un jugo artesanal contaminado con triatominos infectados (Alarcón de Noya y col., 2010).

El curso de la enfermedad, en la actualidad ha sido simplificada proponiendo la clasificación de enfermedad en dos fases: Chagas agudo (sintomática y asintomática) y Chagas crónico (con enfermedad demostrada o sin ella) (Mordini y col., 2010). La definición clínica del período indeterminado consiste en la infección crónica sin evidencia de enfermedad y ésta ha sido sustituida por la clasificación de “sin patología demostrada”. También se ha sugerido la posibilidad de una transmisión sexual sin resultados concluyentes en el modelo murino (Martin y col., 2015).

2. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.

Al igual que otros hemoflagelados, *T. cruzi* posee los componentes de una célula eucariota: núcleo, microtúbulos citoplasmáticos, retículo endoplasmático, aparato de Golgi y una mitocondria. Adicionalmente posee un kinetoplasto en la base del flagelo, el cual contiene el genoma mitocondrial y como particularidades la presencia de un glicosoma donde se concentran y compartimentalizan enzimas necesarias en el metabolismo glicolítico; y acidocalcisomas que concentran calcio (de Souza, 1999).

El ciclo de vida del parásito (Figura 1) inicia cuando el hemíptero hematófago (insecto vector), durante la picadura, consume la sangre de un mamífero infectado en la cual están presentes los tripomastigotes sanguíneos, que son las formas infectantes para el vector. Los tripomastigotes pasan al intestino del insecto donde se transforman en epimastigotes y se multiplican por fisión binaria longitudinal, para luego migrar hacia el intestino posterior donde se diferencian en tripomastigotes metacíclicos. Cuando el vector infectado pica a un hospedador sano, defeca a la vez sobre la piel del individuo y en las heces libera los tripomastigotes metacíclicos (forma infectante para el mamífero), los cuales pueden penetrar a través de una lesión inducida por la inflamación generada por el insecto al picar, por heridas preexistentes en la piel, o bien por contacto con el epitelio del ojo o con la cavidad oral. Inmediatamente, los tripomastigotes metacíclicos invaden las células en el sitio de

inoculación y una vez en el citoplasma se transforman en amastigotes, los cuales se multiplican por fisión binaria y posteriormente lisan la célula y al liberarse se diferencian a tripomastigotes sanguíneos. Este proceso de diferenciación dura aproximadamente 5 días. Posteriormente, los tripomastigotes sanguíneos pueden ser capaces de parasitar células vecinas al sitio de inoculación o bien pasar al torrente sanguíneo e invadir células de otros tejidos.

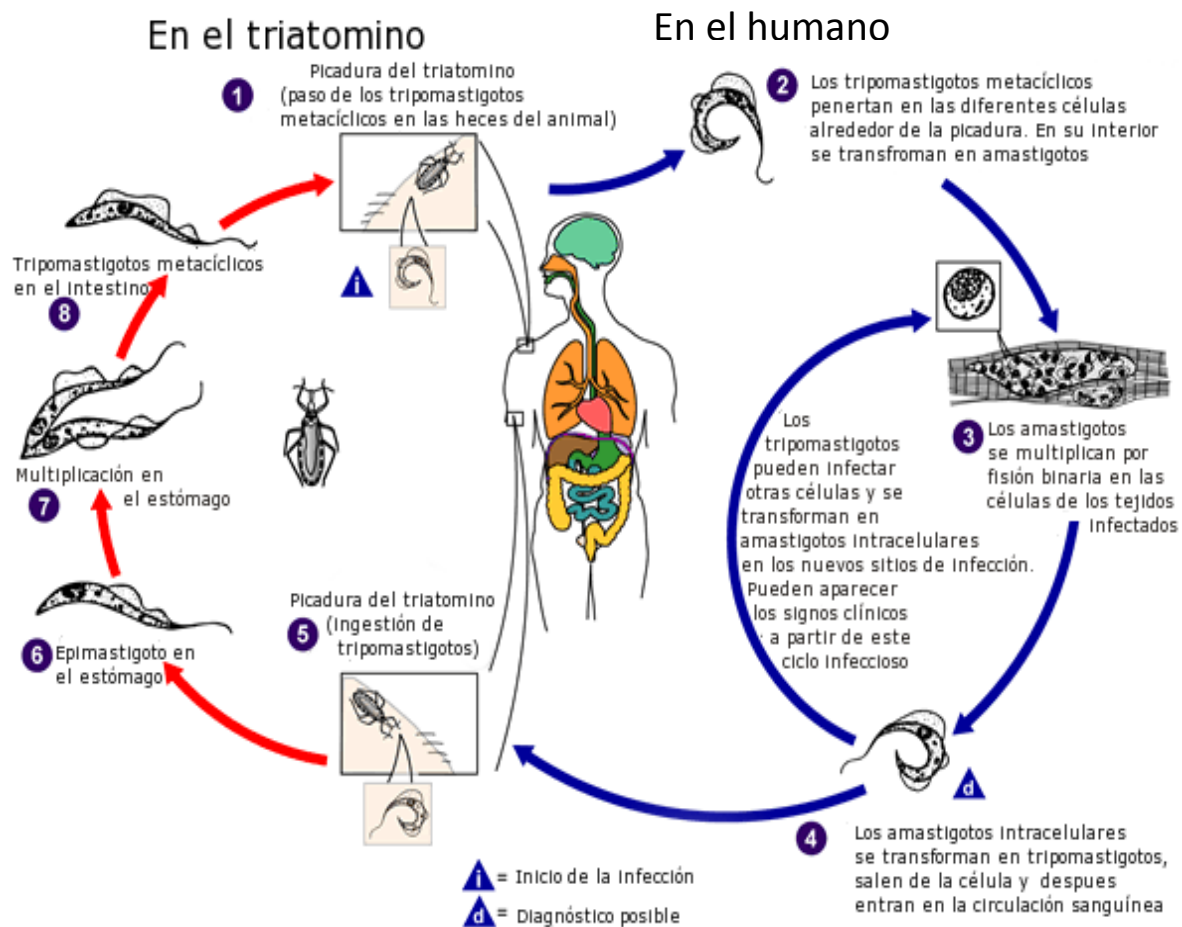


Figura 1

Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi* (Tomado con modificaciones del sitio <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html> de Centers Disease Control and Prevention, 2010).

3. Organización del genoma y expresión génica en *T. cruzi*.

El genoma de *T. cruzi* está distribuido en el núcleo y la mitocondria, de forma similar como ocurre en organismos eucariotas. Una característica particular en este género, la representa la red de moléculas circulares de ADN (ADNk) ubicadas en la mitocondria denominadas kinetoplasto. EL ADNk consiste en docenas de moléculas circulares que oscilan entre 20 a 40 Kb denominadas maxicírculos

que corresponde con el ADN mitocondrial, y centenas de minicírculos, moléculas circulares de 1462 pb que codifican para los ARN guía, requeridos en el proceso de edición (Lukeš y col., 2002). En su conjunto el ADNk constituye entre 16 a 30% del ADN total (Brener y col., 2000).

La secuenciación del genoma diploide de *T. cruzi* ha mostrado que el genoma diploide contiene 22.570 genes que codifican para proteínas, de los cuales 12.570 representan alelos (El-Sayed y col., 2005).

Tabla 1:
Genoma de *Trypanosoma cruzi* (El-Sayed y col., 2005).

Parámetro	Número
Tamaño (pb)	60.372.297
Contenido G+C (%)	51
Porcentaje codificante	58,9
Número de genes	22.570
ARNt	115
ARNr	219

En tripanosomátidos, al igual que en eucariotas superiores, se encuentran los tres tipos de ARN polimerasas (ARN polimerasa I, ARN polimerasa II y ARN polimerasa III), donde la ARN polimerasa I se encarga de la síntesis de los ARNr 18S y ARNr 28S, mientras que la ARN polimerasa II transcribe genes codificantes de proteínas y genes codificante de pequeños ARN nucleares de diversa naturaleza y la ARN polimerasa III síntesis los ARNt, ARNr 5S y otros ARN pequeños nucleares y citoplasmáticos (Brener y col., 2000). Las secuencias promotoras de la ARN polimerasa I (Chung y col., 1993), así como el promotor del gen del mini exón o secuencia líder (SL), transcrita por la ARN polimerasa II ya han sido caracterizadas en estos organismos (Gillinger y col., 2001). Se ha definido que las secuencias del promotor del gen ribosomal ocupa una región de aproximadamente 580 nucleótidos localizada próxima a la región 5' del gen del ARNr 18S. Además, se conoce que el promotor del gen de la SL de *T. cruzi* está localizado en la región 5' del gen de la SL, existe un elemento de 13 nucleótidos denominado PSE (*Proximal Sequence Element*) situado a 39 nucleótidos

del inicio de la región codificante del gen, el cual es crucial para la actividad del promotor, además se conoce que la organización del promotor del gen de la SL es altamente conservada (Nunes y col., 1997). Aparte de estos dos promotores para los genes ribosomales y los genes del miniexón no ha sido posible localizar regiones promotoras para el resto de los genes.

La ausencia de secuencias promotoras consenso en tripanosomas sugiere que el control de la expresión genética ocurre a nivel post-transcripcional. La organización de genes de proteínas se encuentra constituida en unidades transcripcionales policistrónicas. Los ARNm monocistrónicos se generan mediante el procesamiento del ARN precursor policistrónico mediante un proceso llamado “*trans-splicing*”, una reacción de transesterificación del ARN líder SL conteniendo el “*capping*” en el extremo 5’ (Figura 2). Esta reacción es catalizada por un complejo multienzimático constituido por enzimas específicas y ribonucleoproteínas, donde el ARN de la secuencia líder es escindido con una porción de 39 nucleótidos resultante del corte y éstas son transportadas a la región 5’ del pre-ARNm, la cual ha sido cortada en un sitio específico AG y sustituido por la SL. La evidencia experimental sugiere que la SL confiere estabilidad al ARNm impidiendo su degradación y contribuyendo a la interacción del ARNm con los ribosomas (Ullu y col., 1996). Como ocurre en eucariotas, los ARNm de los tripanosomátidos presentan en su extremo 3’ una cola compuesta por más de 30 residuos de adenina (cola poli A) sin existencia de una secuencia consenso para la adición de dicho residuo. Adicionalmente, la mayoría de los ARNm de *T. cruzi* poseen una extensa región 3’ no traducida, la cual se sitúa entre el codón de terminación de la traducción y el inicio de la cola poli A, recibiendo el nombre de 3’ UTR (3’ *Untranslated Region*), la presencia de esta región con secuencias específicas permite regular la expresión genética de manera estadio-específica.

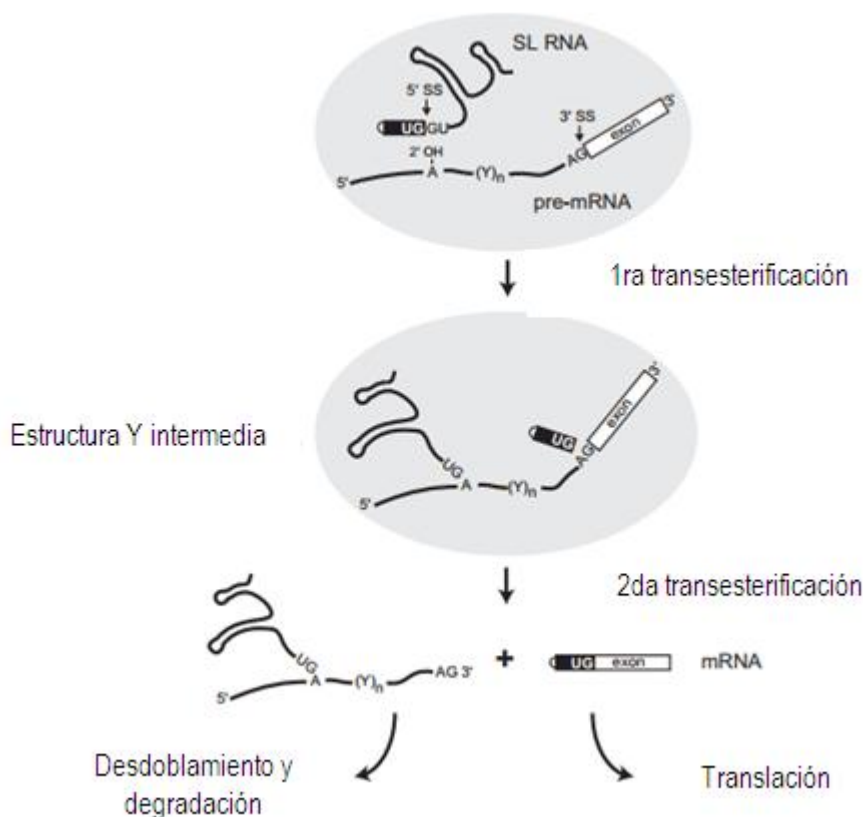


Figura 2

Mecanismo de *trans-splicing*.

A partir de ARN-SL y pre ARNm, incluida la secuencia conservada de adenosina, la cadena de polipirimidinas (Y)_n y el exón (parte de la copia policistrónica). Se observan las secuencias consenso en las zonas de corte 5' y 3' (5' SS y 3' SS'). La primera transesterificación consiste en un ataque nucleofílico del 2' OH en la región de adenosina en el punto 5'. La estructura Y intermedia consiste en el complejo intrón SL/exón codificante con la unión 2-5' fosfodiéster que se une al mini-exón de la secuencia líder (SL). En la segunda transesterificación, el 3' OH libre del mini-exón SL en la región 5' ataca el sitio de corte 3' del exón codificante. Como resultado, los primeros 39 nucleótidos (mini-exón) del ARN SL y del exón codificante se unen formando el ARN y los intrones son liberados como una estructura en Y, el cual es desdoblado y degradado (tomado con modificaciones de Preusser y col., 2012).

4. Herramientas de genética reversa en Trypanosomatidae.

En *T. cruzi* no se conocen formas sexuales, aunque existen ejemplos de cepas híbridas que comparten marcadores genéticos brindando evidencia circunstancial de recombinación sexual (Akopyants y col., 2009), lo que impide utilizar los métodos genéticos clásicos en el estudio de esta especie. Sin embargo, se ha iniciado el desarrollo de herramientas que permiten la aproximación de la genética reversa (Kelly, 1995), la cual se caracteriza por una batería de metodologías que utiliza tecnologías de ADN recombinante en la aplicación de mutagénesis controlada (Dimmock y col., 2007). En la actualidad se cuenta con diversos procedimientos de genética reversa para el estudio en

Trypanosomatidae, como por ejemplo: i) vectores de expresión, ii) métodos de electroporación eficientes para la obtención de líneas transfectantes estables, iii) métodos de reemplazo de genes y generación de mutantes, iv) mutagénesis dirigida por transposones, v) el rescate funcional de genes y vi) el “*knock out*” funcional de genes (Campelo, 2005).

Los intentos de manipular genéticamente a los tripanosomátidos comenzaron a mediados de los años ochenta, cuando se hizo evidente que la información proveniente de la nueva tecnología de ADN recombinante sería meramente descriptiva sin la disponibilidad de procedimientos para transformar a estos parásitos. La aproximación mediante genética reversa, con la utilización de vectores de expresión y métodos de transformación, fue realizada mientras se desconocía la regulación de la expresión genética en estos organismos. Solo se conocía que existía una transcripción policistrónica y que el proceso de “*trans-splicing*” era requisito en la obtención de ARNm maduro. Por tanto, los primeros experimentos de transformación fueron totalmente empíricos, bajo la ausencia de información en secuencias del promotor o sobre el lugar preciso donde era iniciada la transcripción y cuales secuencias eran requeridas durante el procesamiento del ARN.

Los primeros reportes de transformaciones estables en Trypanosomatidae utilizando vectores episomales brindaron resistencia al antibiótico G418 (Geneticin®) en *Leishmania* producto de la expresión del gen de la neomicina fosfotransferasa (*NEO*) y se estableció la electroporación como método de introducción de ADN exógeno (Taylor y col., 2011). Las técnicas aplicadas en los experimentos preliminares realizados en *Leishmania* se utilizaron en *T. cruzi* comprobándose que la electroporación era aplicable de igual forma en esta especie.

Una desventaja aún sin resolver en la aplicación de la genética reversa en estos organismos, particularmente al momento de utilizar vectores de expresión, es el desconocimiento de la secuencia de origen de replicación del vector en forma episomal, y se utiliza la presión selectiva mediada por la presencia de antibióticos y la sensibilidad del parásito frente a los mismos para forzar el mantenimiento de los vectores y la expresión de los transgenes de interés.

5. Vectores de expresión para *T. cruzi*.

Un vector de expresión constituye una herramienta genética conformada por una serie de elementos que permiten la adecuada síntesis de productos proteicos a partir de genes específicos en un contexto celular. En el caso de los tripanosomátidos estos elementos son: un origen de replicación, un promotor ribosomal fuerte, señales de “*trans-splicing*” y poliadenilación para el correcto procesamiento del ARNm y marcadores que permitan la selección del vector y su permanencia. Esencialmente éstos son elementos que permiten el mantenimiento del vector en el núcleo, replicándose para garantizar su permanencia, episomal o integrada, en la descendencia durante cada división celular y poder constituir líneas estables.

Uno de los primeros vectores desarrollados fue el vector pTEX (Kelly y col., 1992) que resultó funcional para *T. cruzi* y *Leishmania*; construido con secuencias derivadas de regiones intergénicas del gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) donde se presumía estaban ubicadas las señales post-transcripcionales, necesarias para el procesamiento, inclusive presumiblemente conteniendo un promotor críptico, garantizando la expresión del gen insertado (Figura 3). pTEX fue descrito como un vector de expresión de tipo “*shuttle*” debido a que posee orígenes de replicación reconocidos por procariotas y se replica episomalmente en dos especies de tripanosomátidos, *Leishmania* y *T. cruzi*. Adicionalmente presenta un sitio múltiple de clonamiento (SMC), esencial en el clonamiento de los genes a ser expresados.

A partir de pTEX se construyó pRIBOTEX (Martínez-Calvillo y col., 1997), insertando un fragmento de 800pb de ADN ribosomal conteniendo un promotor ribosomal río arriba del sitio múltiple de clonamiento (Martínez-Calvillo y Hernández, 1994). El plásmido resultante permitió reducir en dos semanas el tiempo requerido para la selección de parásitos resistentes a antibióticos y aumentó el nivel de expresión del gen marcador hasta 16.000 veces.

Posteriormente se diseñó el vector pTRES-n (Vázquez y Levin, 1999) como una versión mejorada de pRIBOTEX, donde se añadió una región de 220 pb del gen HX1 rica en pirimidinas que contiene la señal de “*trans-splicing*” del gen que codifica la proteína TcP2 β , incrementando la eficiencia post-

transcripcional de “*trans-splicing*”. En conjunto, el promotor ribosomal eleva 50 veces los niveles de transcripción y las señales específicas de “*trans-splicing*” incrementan 2.000 veces los niveles de ARNm maduro de los genes reporteros, resultando en un vector de expresión 100.000 veces más eficiente (Sayegh, 2005).

En el caso del vector pRIBOTEX destaca la integración de éste al locus de ADN ribosomal registrando así la transición de localización episomal a nuclear (Taylor y col., 2011).

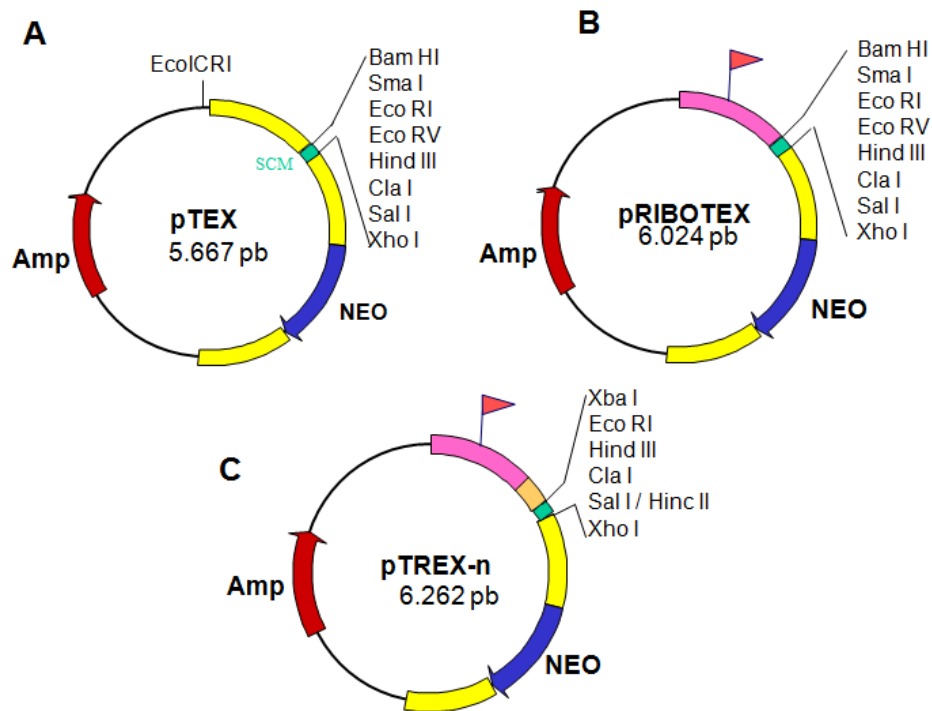


Figura 3

Vectores de expresión de *Trypanosoma cruzi* (Tomado de Feo, 2003).

- Plásmido pTEX.** Posee los elementos: 1) Sitio múltiple de clonamiento (SMC, barra de color verde). 2) Regiones “río arriba”, intergénicas y “río abajo” del locus de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, barras de color amarillo). 3) Genes reporteros de resistencia a antibióticos: Ampicilina (AMP, flecha de color rojo) y Neomicina (neo, flecha de color azul) (Kelly y col., 1992).
- Plásmido pRIBOTEX.** Construido a partir de pTEX contiene los elementos: 1) Promotor ribosomal de *Trypanosoma cruzi* (barra de color rosado con banderín rojo). 2) Sitio múltiple de clonamiento (SMC, barra de color verde). 3) Regiones intergénicas y “río abajo” del locus de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, barras de color amarillo). 3) Genes reporteros de resistencia a antibióticos: Ampicilina (AMP, flecha de color rojo) y Neomicina (NEO, flecha de color azul) (Martínez-Calvillo y col., 1997).
- Plásmido pTREX-n.** Construido a partir de pRIBOTEX. Se introdujo una región de 220 pb denominada HX1 (barra de color durazno) del gen que codifica la proteína TcP2β (Vázquez y Levin, 1999).

5.1. Marcadores selectivos en vectores de expresión para *T. cruzi*.

El ADN plasmídico puede ser introducido a bacterias a través del proceso artificial llamado transformación. En este proceso, las bacterias son tratadas con mezclas de cationes divalentes para hacerlas temporalmente permeables a las pequeñas moléculas de ADN. Hasta en las mejores condiciones, los plásmidos son difíciles de establecer en poblaciones bacterianas, por lo tanto para poder identificar a estos transformantes se introdujeron marcadores selectivos en los plásmidos. Estos marcadores confieren un nuevo fenotipo, el cual permite que las bacterias que han sido transformadas de manera exitosa puedan ser seleccionadas (Sambrook y col., 1989). Los marcadores que son usados comúnmente son los genes que confieren resistencia a antibióticos como la ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol y kanamicina. Cada uno de estos antibióticos opera por diversos mecanismos (Davies y Smith, 1978) como interferir en los procesos de entrada del antibiótico a la célula, modificar el sitio blanco de acción y pudiendo inactivar al antibiótico mediante la producción de una enzima.

Existen varios marcadores selectivos utilizados en vectores eucariotas para monitorear la expresión en un amplio rango de organismos, incluido *T. cruzi*, como los genes de la cloranfenicol acetil transferasa (*CAP*) y la neomicin fosfotransferasa (*NEO*).

5.2. Genes reporteros en vectores de expresión para *T. cruzi*.

En el desarrollo de herramientas para estudios genéticos fue considerado el uso de la emisión de luz, bioluminiscencia y biofluorescencia, como un marcador reportero, siendo ambos procesos químicamente diferenciables, la luminiscencia ocurre como una reacción enzimática que excita al sustrato liberando energía en forma de luz, mientras que la fluorescencia es producto de la transferencia de energía (Chalfie y Kain, 1998).

Estudios realizados en la proteína fluorescente verde (GFP, por sus siglas en inglés *Green Fluorescent Protein*), responsable de la emisión bioluminiscente de la medusa *Aequorea victoria*, originaron su uso como herramienta genética al aislar e insertar el gen que expresa esta proteína en vectores de expresión episomales. Desde su aislamiento el gen *GFP* ha sido manipulado por medio

de mutaciones que mejoraron la estabilidad de la proteína a temperaturas de 37°C y superiores, fue optimizado su rango de expresión en organismos con un alto contenido de pirimidinas en su genoma cambiando el usaje de codones a preferencias de G/C en la segunda y tercera posición de los codones, y fue mejorada la emisión de fluorescencia cambiando el rango y pico de longitud de onda de excitación y emisión (Sayegh, 2005). Un ejemplo es la versión GFP5 (S65T) (Siemering y col., 1996) clonada en el vector pTREX-n (Figura 4).

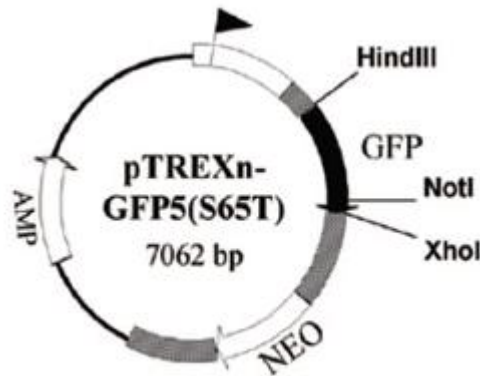


Figura 4

Vector de expresión de *Trypanosoma cruzi* con el gen que codifica la GFP (Tomado de Guevara y col., 2005). Vector pGFP5 (S65T). La digestión con las enzimas de restricción *HindIII* y *XhoI* escinde el fragmento GFP5 (S65T), mutante de la *Aequorea* GFP donde se ha cambiado una serina por una treonina en la posición 65, derivando en un incremento en el brillo.

ANTECEDENTES

La aplicación conjunta de vectores de expresión y marcadores de fluorescencia para visualizar *in vivo* los procesos de infección de organismos patógenos fue inicialmente desarrollada en bacterias con la finalidad de estudiar la relación parásito-hospedador y la patogenicidad de estos organismos.

En tripanosomátidos, la aplicación exitosa de la fluorescencia *in vivo* comenzó a ser utilizada para analizar el desarrollo de los parásitos en los insectos vectores, reevaluar los ciclos de vida y explorar la capacidad vectorial de especímenes naturales. El trabajo requirió desarrollar vectores de expresión con promotores fuertes (ribosomales) utilizando versiones adaptadas de la proteína *GFP* (Pinto, 1999; Guevara y col., 2001; Guevara y col., 2005).

Pinto (1999) y Guevara y col. (2001) desarrollaron el vector pXGFP5 (S65T)-R-promoter. Partiendo del vector pX (LeBowitz y col., 1990) clonaron el gen *GFP* bajo el control del promotor ribosomal de *Leishmania amazonensis* para construir líneas fluorescentes estables de *Leishmania donovani*. Las líneas fluorescentes estables fueron utilizadas para evaluar el desarrollo en tres especies de *Lutzomya* del nuevo mundo (*Lu. longipalpis*, *Lu. ovallesi* y *Lu. youngi*) capturadas en la naturaleza y provenientes de colonias, demostrando el potencial de esta aproximación para determinar capacidad vectorial.

Posteriormente Guevara y col. (2005) establecieron que, independientemente de la especie, grupo o cepa de parásitos de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli*, a los que se les fueron transfectados los vectores pTREX-n y pBS:CalB1/CUB01 con los genes reporteros GFP5 (S65T) y DsRed, se podían obtener líneas estables expresando altos niveles de ambas proteínas fluorescentes. Las líneas fluorescentes de ambas especies fueron utilizadas en infecciones individuales y mixtas para evaluar el desarrollo de ambos parásitos en el vector *Rhodnius prolixus*. La línea de *T. cruzi* GFP, pTREX-n GFP5 (S65T) mantuvo la fluorescencia durante el ciclo de infección en células de cultivo de riñón de monos (LLC-MK2), demostrando la factibilidad de esta aproximación para el estudio de la relación parásito-hospedador en tripanosomas.

Canavaci y col. (2010) precisan que el uso de proteínas fluorescentes insertadas en vectores de expresión constituye una importante herramienta de evaluación *in vitro* e *in vivo* de posibles compuestos anti-*Trypanosoma cruzi*. Utilizan los vectores pTREX-n y pLew90 β y las proteínas fluorescentes “tomato” en copias repetidas en tanda (*tdTomato*) y el gen de “the firefly luciferase” (*Luc*). El uso de parásitos transgénicos fluorescentes constituye una herramienta más precisa y objetiva que el conteo directo a través del microscopio, permite el análisis de la replicación del parásito durante el experimento, no requiere de métodos de fijación o permeabilización celular y las mediciones se realizan por un fluorímetro.

El estudio del comportamiento parasitológico de *T. cruzi* y la patología que puede causar ha llevado al desarrollo y uso de herramientas inmunológicas, histológicas y bioquímicas que contribuyen a la comprensión del proceso de infección y desarrollo de la enfermedad en el humano. Rodríguez-Angulo y col. (2013) evaluaron la posible alteración de TFN- α como consecuencia de la inflamación, dolor y malestar durante la fase aguda de la infección con una cepa virulenta de *T. cruzi* recientemente aislada que emula las características del brote de Chagas agudo producto de la ingesta de alimentos contaminados en el municipio Chacao del Valle de Caracas en 2007. Los autores evaluaron la actividad de proteínas de secreción liberadas por el parásito en miocitos, relacionadas directamente con miocardiopatías como arritmias y fallas cardíacas en el ratón infectado.

Alarcón de Noya y col. (2015) resaltan la ocurrencia en Venezuela de brotes infecciosos de la enfermedad de Chagas a través de la ingesta de alimentos y bebidas contaminadas principalmente con las heces del vector. Este mecanismo de transmisión dificulta el diagnóstico inmediato debido a la ausencia de picadura del triatomino, presenta manifestaciones más severas en la fase aguda de la enfermedad y afecta simultáneamente a grupos relativamente grandes de personas, con fallas terapéuticas importantes al tratamiento disponible con Benznidazol (Alarcón de Noya y col., 2011). Además destacan la migración del vector *Pastrongylus geniculatus* considerado fundamentalmente como silvestre, al ciclo peridoméstico, como principal triatomino infectado del Valle de Caracas, donde entre el 50% a 80% de los ejemplares capturados se le ha encontrado la presencia de *T. cruzi*.

Los estudios dirigidos a la caracterización del parásito en el proceso de la infección aguda, particularmente producto de la contaminación de alimentos, y la fase crónica precisan incorporar herramientas con alta sensibilidad para detectar la presencia del parásito y hacer seguimiento a nivel celular en estudios *in vivo* e *in vitro*. Por tanto, se requiere el desarrollo de líneas de *T. cruzi* fluorescentes estables de cepas de reciente aislamiento, asociadas a casos de Chagas agudo producto de transmisión oral, caracterizadas a nivel de linaje y provenientes de vectores de la zona de origen de los brotes microepidémicos o aisladas directamente de los casos de infección en humanos por contaminación de alimentos.

Considerando este contexto, surge el interés del trabajo conjunto entre el Laboratorio de Fisiología de Parásitos del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) y el Laboratorio de Genética Molecular del Instituto de Biología Experimental (IBE), proponiendo una colaboración sinérgica en el desarrollo y aplicación de herramientas de la genética reversa. Se propone específicamente el vector pTREX-n GFP5 (S65T), dirigida a la expresión de la proteína biofluorescente verde en *T. cruzi* para la obtención de líneas fluorescentes estables que permitirán realizar estudios con la finalidad de comprender el comportamiento, patología, invasión de tejidos y tropismo del parásito *in vivo*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Obtención de líneas fluorescentes estables *in vivo* de una cepa de *Trypanosoma cruzi* de los Altos Mirandinos haciendo uso del vector pTREX-n GFP5 (S65T).

Objetivos específicos

- Aislamiento y caracterización del vector pTREX-n GFP5 (S65T).
- Tipificación de la cepa de *Trypanosoma cruzi* de los Altos Mirandinos mediante PCR.
- Determinación del IC50 de la droga G418 en la cepa de *T. cruzi* TGEN/VE/2012/ValleCCS1.
- Transfección por electroporación de pTREX-n GFP5 (S65T) al aislado *T. cruzi* TGEN/VE/2012/ValleCCS1.
- Obtención de poblaciones fluorescentes estables de *T. cruzi* TGEN/VE/2012/ValleCCS1.
- Evaluación del ciclo infeccioso *in vitro* de líneas clonadas estables de *T. cruzi* TGEN/VE/2012/ValleCCS1 pTREX-n GFP5 (S65T) en células VERO.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepa de *Trypanosoma cruzi* y cultivo de parásitos.

En este trabajo se utilizó la cepa de *T. cruzi* TGEN/VE/2012/ValleCCS1 aislada a partir del vector *P. geniculatus* capturado en el Municipio los Salias, Estado Miranda, y mantenida en cultivo en el Laboratorio de Fisiología de Parásitos del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Altos de Pipe, Venezuela. Los parásitos fueron cultivados y mantenidos en medio LIT (triptosa 1,5%; infusión de hígado 0,2%, extracto de levadura 0,5%; glucosa 0,4%; NaCl 0,9%; KCl 0,04%; Na₂HPO₄ 0,75%; hemina 0,04% con 100 µg/mL de penicilina, 50µg/mL de gentamicina a pH 7.4) suplementado con suero fetal bovino inactivado con calor al 10% y almacenados a 28°C bajo agitación continua.

Caracterización molecular de la cepa de *Trypanosoma cruzi*.

1.1. Aislamiento de ADN de *Trypanosoma cruzi*.

Para el aislamiento de ADN genómico (ADNg) de *T. cruzi* se utilizó el estuche Genomic DNA Extraction Kit, marca comercial AccuPrep® de BIONEER tecnología que emplea columnas de sílica que enlazan específicamente el ADN en presencia de sales caotrópicas. Los cultivos de epimastigotes en fase exponencial, recuperados por centrifugación a 4000g por 3 min, fueron procesados en las columnas siguiendo las instrucciones de la casa comercial. El ADN se separó de la sílica por un cambio de pH debido a la adición del tampón de elución (10mM Tris-Cl pH 8.5). Este protocolo permitió obtener entre aproximadamente 3 a 6 µg de ADN genómico en 200µL de tampón de elución (≈30ng/µL). Las muestras de ADN total fueron almacenadas a 4°C hasta su uso.

1.2. Tipificación del aislado de *Trypanosoma cruzi* mediante ensayos de PCR.

La caracterización genética del aislado establecido como *T. cruzi* se llevó a cabo mediante dos ensayos de PCR:

Inicialmente se aplicó el PCR ADNk (PCR ADN de kinetoplasto) siguiendo el protocolo descrito por Gomes y col. (1998). El ensayo utilizó los cebadores 121 y 122 (sintetizados por

BIONEER) de secuencias 5'-AAATAATGTACGGGKGAGATGCATGA-3' y 5'-GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAAATATA-3', respectivamente. Estos cebadores se unirían específicamente a regiones conservadas del mini círculo del ADNk, amplificando preferencialmente un segmento de 330 pb correspondiente a una de las cuatro regiones variables del mini círculo (Gomes y col., 1998). Se utilizaron 2µL de ADNg en cada reacción y el programa de PCR se llevó a cabo en un Termociclador (MJ Research, modelo PTC-200). Se elaboró la mezcla de reactivos bajo las siguientes concentraciones finales: tampón 1X (Tris-HCl 25mM a pH 9.0, NaCl 25mM), oligo 121 1µM, oligo 122 1µM, MgCl₂ 3mM, dNTPs 200µM, *Taq* polimerasa 0,05U/µL, agua destilada y muestra para un volumen final de 25µL. El programa de incubación y ciclos se presentó de la siguiente manera: 1 ciclo de 4min a 94°C, 1 ciclo de 2min a 68°C, 1 ciclo de 2min a 72°C, 5 ciclos de 1min a 94°C seguido de 1min a 66°C y 1min a 72°C, 35 ciclos de 1min a 94°C seguido de 1min a 64°C y 1min a 72°C y por último 1 ciclo de 5min a 72°C finalmente, la muestra se mantuvo a 4°C hasta su uso.

El segundo, PCR ADNn (PCR ADN nuclear) basada en la secuencia satélite 195 siguiendo protocolo descrito por Moser y col., 1989. En este sentido, se emplearon los cebadores TcZ1 y TcZ2 (Invitrogen) de secuencias 5'-CGAGCTCTTGCCACACGGGTGCT-3' y 5'-CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3', respectivamente. Estos cebadores se unen específicamente a la secuencia repetitiva de 195 pb de ADN nuclear que es el más abundante en el organismo (Moser y col., 1989). Se utilizó 1µL de ADNg en cada reacción y el programa de PCR se llevó a cabo en un Termociclador (Eppendorf Mastercycler ep Gradient 5341). Se realizó la mezcla de reactivos bajo las siguientes concentraciones finales: tampón 1X (Tris-HCl 25mM a pH 9.0, NaCl 25mM), oligo TcZ1 0,2µM, oligo TcZ2 0,2µM, MgCl₂ 1,5mM, dNTPs 800µM, *Taq* polimerasa 0,5U/ensayo, agua destilada y muestra para un volumen final de 15µL. El programa de incubación y ciclos se presentó de la siguiente manera: 1 ciclo de 5min a 95°C, 40 ciclos de 3min a 95°C seguido de 1min a 65°C y 1 min a 72°C y por último 1 ciclo de 5min a 72°C, finalmente la muestra se mantuvo a 4°C hasta su uso.

Para la visualización del producto de PCR ADNk, el amplicón de 330 pb, fue separado mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa al 2% en tampón TAE 0,5X (Tris-acetato 20mM; EDTA 0,5mM) a 50V durante 1h. El gel fue transferido a una cubeta con 500mL de agua destilada, a la cual se le añadió bromuro de etidio (BrEt 0,5µg/mL) y se dejó reposar durante 2min.

En el caso del producto de PCR ADNn, el amplicón de 188pb, fue separado mediante electroforesis de geles horizontales de agarosa al 1,5% con SYBR® Safe a 0,5X en tampón TAE 1X (Tris-acetato 40mM; EDTA 1mM) a 100V durante 30min. Las bandas de ADN fueron visualizadas en un transiluminador con luz ultravioleta (312nm) y se realizó el registro fotográfico mediante el equipo Gel Dock. El registro de las imágenes se realizó con un sistema de digitalización de imágenes utilizando el programa de computación QuantityOne® (BioRad).

2. Determinación del IC50 al antibiótico G418 de la cepa *T. cruzi* TGEN/VE/2012/ValleCCS1.

Para determinar el IC50, la cepa *T. cruzi* TGEN/VE/2012/ValleCCS1 fue cultivada a concentraciones crecientes del antibiótico G418 en un rango de 0 a 800µg/mL. El seguimiento del crecimiento celular se determinó mediante el conteo directo al microscopio, en la cámara de Neubauer diariamente por un período de 15 días. La viabilidad celular se determinó a través del método de azul de tripano, siguiendo el protocolo de Hunt (1987) mezclando 50µL de la suspensión celular estéril (entre 2-10x10⁶ parásitos/mL) con 50µL de solución de azul de tripano 0,2%_{P/V} en PBS, se colocó la suspensión en un hemocitómetro y se dejó decantar por 1min. Posteriormente se observó al microscopio de luz a un aumento de 40X dentro de los 3min siguientes a la coloración, contando células muertas (azules) y células vivas (no teñidas).

El porcentaje de inhibición del crecimiento se calculó de acuerdo a la fórmula presente en Yao y col. en 2007 en un rango de 0 a 100%, los cuales fueron plasmados en un gráfico de línea como variable independiente, y la concentración del antibiótico (0µg/mL, 250µg/mL, 500µg/mL y 800µg/mL) como variable dependiente, procediendo a obtener la ecuación de la recta a partir de la aplicación de una regresión lineal en Excel (Anexo 1).

3. Transformación bacteriana.

3.1. Preparación de células competentes por CaCl₂.

El protocolo seguido para la preparación de células competentes por CaCl₂ fue tomado de Sambrook y col. (1989) con algunas modificaciones. Partiendo de una colonia aislada de la cepa HB101 de *Escherichia coli* (Gibco-BRL): F⁻ mcrB mrr hsdS20(r_B⁻ m_B⁻) recA13 leuB6 ara-14 proA2 lacY1 galK2 xyl-5 mtl-1 rpsL20(Sm^R) glnV44 λ⁻, se inocularon 2mL de caldo LB con estreptomicina (40μg/mL). Luego del crecimiento con agitación durante una noche a 37°C en la estufa, se agregaron 8mL de caldo LB con estreptomicina (40μg/mL) fresco y se sometió a una hora adicional de incubación, bajo condiciones de agitación y a 37°C. Seguidamente, las células fueron recuperadas por centrifugación a 4000g, a 4°C por 10min. El sedimento celular fue lavado con solución salina (NaCl 0,85%) estéril, y luego se recuperaron nuevamente por centrifugación, manteniendo las mismas condiciones del paso anterior. Este sedimento fue resuspendido en una solución de CaCl₂ 50mM estéril a 4°C, e incubado en hielo durante 1h. Posteriormente las células fueron recuperadas por centrifugación a 4000g por 10min y resuspendidas en 1mL de CaCl₂ 50mM estéril a 4°C. Esta suspensión celular se utilizó inmediatamente para llevar a cabo la transformación.

3.2. Transformación de células competentes.

El protocolo de transformación bacteriana fue tomado de Sambrook y col. (1989) con algunas modificaciones. Se tomaron 200μL de la suspensión en CaCl₂ de células competentes, las cuales fueron mezcladas con aproximadamente 10ng de ADN plasmídico, en un volumen que no excediera los 10μL. Esta mezcla fue incubada en hielo por 1h. Transcurrido este tiempo se aplicó un choque térmico a 45°C por 90s. Inmediatamente las células fueron resuspendidas en 1mL de LB e incubadas a 37°C por 30min con agitación. Las células fueron concentradas mediante centrifugación a 4000g por 5min y se descartaron 500μL del medio LB sobrenadante. 50μL de las células resuspendidas fueron sembradas por rastrilleo en placas de agar LB con estreptomicina (40μg/mL) y ampicilina (100μg/mL) las cuales se incubaron durante una noche a 37°C.

4. Aislamiento de ADN plasmídico.

El ADN plasmídico fue obtenido mediante dos protocolos en pequeña escala, el protocolo de “miniprep” con reactivos preparados en el laboratorio y utilizando un estuche comercial con columnas.

4.1. Aislamiento de ADN plasmídico mediante “mini-prep”.

Este protocolo fue tomado con modificaciones de los métodos de Birnboim y Doly (1979) e Ish-Horowicz y Burke (1981) (referido en Sambrook y col., 1989). Inicialmente, se seleccionó una colonia aislada del recombinante de interés, la cual fue inoculada en 4mL de caldo LB más ampicilina (100µg/mL) y estreptomicina (100µg/mL), durante una noche a una temperatura de 37°C con agitación constante. Las células fueron recuperadas por centrifugación durante 10min a 4000g. El sedimento celular fue lavado con solución salina (NaCl 0,85%) estéril y posteriormente sometida a centrifugación bajo las condiciones anteriormente descritas. Las células fueron resuspendidas en 100µL de solución de lisis I (glucosa 50mM; Tris-HCl pH 8.0; EDTA 10mM) y luego fueron sometidas a incubación durante 5min a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 200µL de la solución de lisis II (SDS 1%; NaOH 0,2N) y se mezcló por inversión. Esta mezcla fue incubada en hielo por 5min. Finalmente se añadieron 150µL de solución de lisis III (acetato de sodio 3M pH 5.2). Luego se incubó en hielo por 8min y centrifugó a 13000g por 15min, con la finalidad de recuperar el sobrenadante, al cual se le realizó una extracción con cloroformo:fenol (1:1), seguida de una centrifugación de 3min a 13000g. Posteriormente se agregó un volumen de isopropanol igual al volumen de sobrenadante extraído, la mezcla fue incubada en hielo durante 10min y posteriormente centrifugada a 13000g por 15min, fue descartado el sobrenadante y lavado el sedimento de ácidos nucleicos con etanol 70% y centrifugado a 13000g por 5min. El ADN fue resuspendido en 20µL de tampón TE (Tris-HCl 10mM pH 8.0; EDTA 1mM).

4.2. Aislamiento de ADN plasmídico con estuche comercial.

Para el aislamiento de ADN plasmídico se utilizó el estuche Plasmid Extraction Kit, marca comercial Accuprep® de BIONEER. La técnica está basada en el método de lisis alcalina de Birnboim

y col., 1979. Se partió de una colonia aislada del recombinante de interés, la cual fue inoculada en 5mL de caldo LB más ampicilina (100µg/mL) y estreptomicina (100µg/mL), durante una noche bajo agitación y una temperatura de 37°C. Las células fueron recuperadas por centrifugación durante 2min a 15000g. Siguiendo las instrucciones del manual de la casa comercial, las células fueron expuestas a una serie de tampones para la resuspensión, lisis, neutralización, lavado y elución, bajo el empleo de columnas de sílica que enlazan específicamente el ADN en presencia de sales caotrópicas. Se obtuvo un máximo de 20µg de ADN plasmídico altamente purificado. Las muestras de ADN plasmídico fueron almacenadas a 4°C hasta su uso.

5. Digestión de ADN con enzimas de restricción.

El ADN plasmídico fue digerido con enzimas de restricción como parte de la caracterización y análisis del vector de expresión pTREX-n GFP5 (S65T). Estas restricciones se llevaron a cabo bajo las condiciones recomendadas por la casa comercial en cuanto a: concentración de la enzima por microgramo de ADN a digerir, concentración final del tampón, temperatura y tiempo de incubación. Las digestiones fueron llevadas a cabo en un volumen final de 15µL. Se realizaron digestiones sencillas y dobles con la finalidad de obtener regiones génicas características del vector haciendo uso de las endonucleasas *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII* y *XhoI* de la casa comercial PROMEGA.

6. Análisis de ADN mediante electroforesis en geles de agarosa.

La electroforesis en geles de agarosa fue utilizada para evaluar la integridad y concentración del ADN aislado, así como, la pureza de la muestra a través de la visualización del tamaño y conformación del ADN plasmídico, ADNn y los fragmentos de ADN producto de la digestión con enzimas de restricción. La concentración de agarosa utilizada varió de acuerdo al tamaño del ADN a analizar. Inicialmente las muestras fueron cargadas en los bolsillos de los geles, luego de ser mezcladas con tampón de carga 6X (azul de bromofenol 0,25%; cianol xileno 0,25%; sacarosa 40%), utilizando una relación muestra: tampón de 5:1. Las corridas electroforéticas fueron realizadas en tampón TAE 1X (Tris-acetato 40mM; EDTA 1mM pH 8.0) utilizando un voltaje de 50V. El ADN fue

visualizado bajo luz ultravioleta con la ayuda de un transiluminador acoplado con un sistema Gel-Doc 1000® (BioRad) a una longitud de onda de 320nm. El registro de imágenes se llevó a cabo con un sistema de digitalización utilizando el programa de computación QuantityOne® (BioRad).

7. Electroporación, seguimiento y selección de líneas transfectantes estables.

Las experiencias de transfección de parásitos se realizaron siguiendo el protocolo de Hariran y col. (1993), con algunas modificaciones. Las formas epimastigotes de la cepa de *T. cruzi* fueron cultivadas en medio LIT hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento (10^8 células/mL). Previo a la electroporación los parásitos fueron recolectados por centrifugación a 3000g por 15min y lavados en solución salina estéril (NaCl 0,85%) dos veces. El sedimento celular fue resuspendido en medio LIT sin hemina y sin suero fetal bovino, a una concentración final de $8,9 \times 10^9$ células/mL. Un volumen de 400µL de esta suspensión celular fue colocado en cubetas de electroporación BTX® de 2mm pre-incubadas en hielo por 10min. Las células fueron mezcladas con 200µg de ADN plasmídico de pTREX-n GFP5 (S65T) y pTREX-n tdTomato en un volumen no mayor a 40µL. La mezcla fue incubada en hielo por 10min para luego proceder a la electroporación utilizando el Gene Pulser II BioRad®; bajo las siguientes condiciones: un pulso simple de 300V, 1000µF y 100Ω de resistencia. Posterior a la electroporación las células fueron incubadas 10min en hielo y luego transferidas a viales de 5mL de medio LIT sin antibiótico e incubadas a 28°C por 48h. Pasado este tiempo, se le añadió al medio el antibiótico G418 a la concentración final de 800µg/mL, manteniendo el cultivo en agitación y a 28°C por 10 días. Cumplido este lapso, los parásitos fueron transferidos a un medio de cultivo sin droga posterior a una centrifugación a 2500g por 10min y descarte del medio anterior. Los mismos fueron mantenidos de manera cíclica durante períodos de 10 días en medio con y sin antibiótico hasta obtener poblaciones estables que expresaron el marcador reportero *GFP* y *tdTomato* sin la presencia de la presión selectiva. El seguimiento del gen reportero *GFP5*(S65T) se realizó por la observación de los cultivos en microscopio de fluorescencia OPTIPHOT-2 (Nikon) con un filtro de excitación de 475nm-500nm, un filtro de supresión de 520nm y una lámpara de fluorescencia XBO (Nikon) y el gen reportero *tdTomato* con un filtro de excitación de 554nm y un filtro de supresión de 581nm. El registro

fotográfico se realizó acoplando al microscopio una cámara digital (Leica, modelo DC 300F), el programa para capturar las imágenes Leica500 y el análisis se realizó con la ayuda del programa Image Pro Express (Leica).

7.1. Clonamiento de líneas celulares estables de *T. cruzi* expresando GFP5 (S65T).

Para obtener una población homogénea de *T. cruzi* que expresara la proteína GFP5 (S65T) se realizó la selección clonal partiendo de cultivos estables transfectados con el vector pTREX-n GFP5 (S65T). Se tomaron alícuotas de 100.000 parásitos/mL, los cuales fueron obtenidos a partir de cultivos en fase logarítmica (10^7 parásitos/mL), ubicándolos en placas de cultivo de 24 pozos a partir de los cuales se aplicaron diluciones seriadas hasta alcanzar una concentración de 1 parásito (dilución de 10^5) en un volumen final de 1mL de medio suplementado con G418. Se llevó a cabo la evaluación del crecimiento celular mediante observación directa al microscopio durante un período de dos meses hasta obtener crecimiento poblacional. Fueron seleccionados tres poblacionales clonales al azar siendo mantenidas en medio LIT con 10% suero fetal bovino y se les añadió G418 (800 μ g/mL) cada quince días aproximadamente.

RESULTADOS

1. Evaluación del crecimiento e infectividad de la cepa de *Trypanosoma cruzi*.

La cepa de *T. cruzi* TGEN/VE/2012/ValleCCS1 fue aislada y mantenida por el equipo del Laboratorio de Fisiología de Parásitos del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), extraída del vector *P. geniculatus* proveniente de la zona rural de Potrerito del Estado Miranda, siendo conservada *in vitro* mediante repiques en células VERO más medio de crecimiento MEM y suero fetal bovino al 10%, bajo un coeficiente de infectividad de 10 tripomastigotes metacíclicos por célula (Figura 5). En la Figura 5, panel A se detalla la formación de nidos intracelulares contentivos de formas amastigotas. En el panel B de la Figura 5 se muestran las formas tripomastigotas y epimastigotas.

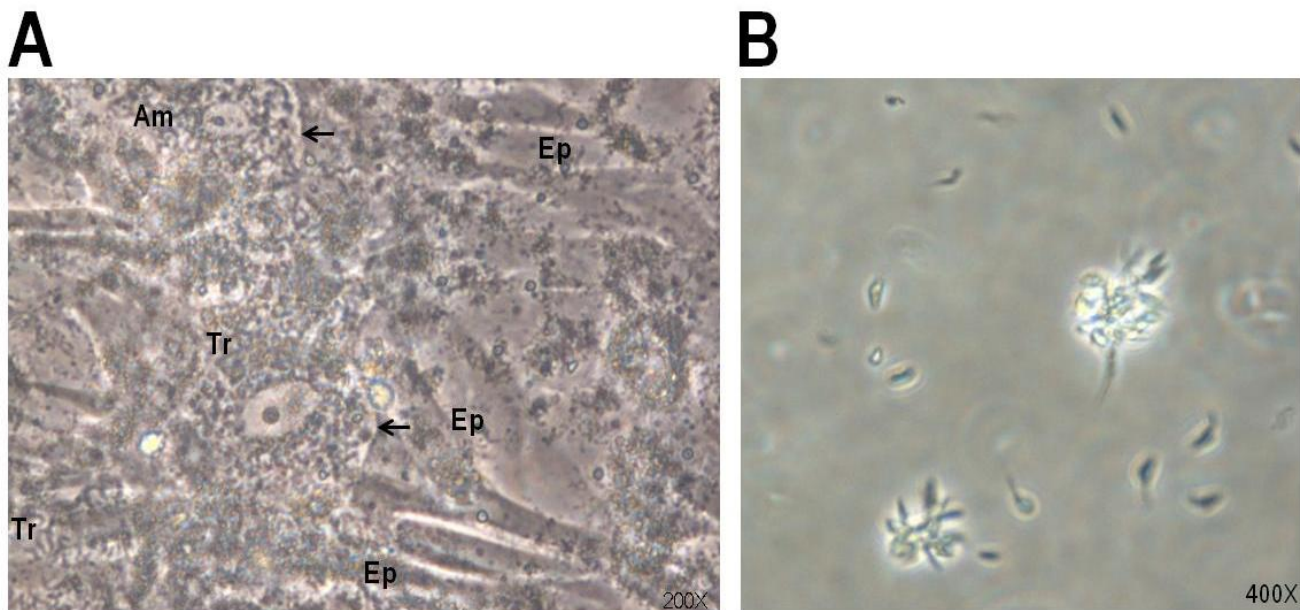


Figura 5
Cultivo de *Trypanosoma cruzi* aislado TGENVE/2012/ValleCCS1
A. Células Vero infectadas con el aislado *T. cruzi* TGENVE/2012/ValleCCS1 mantenidas en medio MEM con suero fetal bovino al 10%. B. Epimastigotes *T. cruzi* TGENVE/2012/ValleCCS1 en medio LIT con suero fetal bovino al 10%. Aumento 200X y 400X. (←) células VERO infectadas; (Tr) tripomastigotes; (Am) amastigotes; (Ep) epimastigotes.

Posteriormente los tripomastigotes metacíclicos fueron trasvasados a medio LIT con suero fetal bovino al 10% donde se mantuvieron a 28°C con agitación continua con la finalidad de promover formas epimastigotas (Figura 5, panel B). Bajo estas condiciones se almacenaron los cultivos durante un período de un año consecutivo con refrescamientos cada siete a diez días.

2. Aislamiento de ADN plasmídico del vector pTREX-n GFP5 (S65T).

Una vez aplicada la metodología de lisis alcalina en escala de mini preparaciones se procedió a evaluar la calidad del aislamiento mediante electroforesis en geles de agarosa 0,8%, TAE 0,5X. En la Figura 10 se muestran los resultados del aislamiento del vector pTREXnGFP5 (S65T) (Guevara y col., 2005). En la electroforesis en las dos concentraciones de las muestras del aislamiento de pTREXnGFP5 (S65T) fue posible identificar la forma circular covalentemente cerrada (ccc) del plásmido cuyo tamaño es de 7062 pb (Figura 6, carriles 1 y 2). En el Carril 1 se detallan dos bandas más, características de las formas: lineal y superenrollada, que puede presentar un plásmido. Cualitativamente la muestra no presenta ARN ni degradación del ADN, con un alto porcentaje de la forma ccc, apta para las experiencias de transfección.

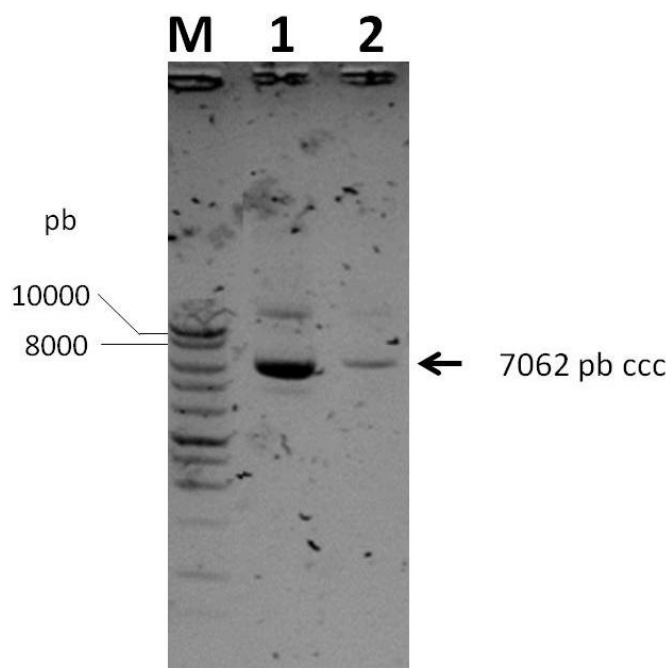


Figura 6

Aislamiento de ADN plasmídico del vector pTREX-n GFP5 (S65T).

Corrida electroforética del ADN del vector pTREX-n GFP5 (S65T) aislado a partir de *E. coli* HB101. Gel de agarosa al 0,8%, TAE 0,5X. Carriles: M, marcador 1Kb Escalera de ADN marca PROMEGA; 1 y 2, dos concentraciones de pTREX-n GFP5 (S65T). La flecha indica el punto de migración de la forma circular covalentemente cerrada del vector de 7062pb.

3. Digestión de ADN del vector pTREX-n GFP5 (S65T) con enzimas de restricción.

Como parte de la caracterización del vector pTREX-n GFP5 (S65T) se realizó el análisis del patrón de bandas obtenidas mediante digestión con enzimas de restricción específicas acorde con el

mapa de restricción reportado (Guevara y col., 2005) (Figura 7). En el panel B de la Figura 7 se observa el patrón de bandas generados en las digestiones sencillas y dobles con las enzimas *Bam*HI, *Xho*I, *Eco*RI y *Hind*III del vector pTREX-n GFP5 (S65T). La digestión con *Bam*HI liberó el fragmento de 220 pb correspondiente a la región HX1 contentiva del sitio de *trans-splicing* (carril 1), mientras que la digestión doble *Bam*HI/*Xho*I, además de liberar el fragmento de HX1 de 220 pb, libera un fragmento de aproximadamente 780 pb correspondiente al gen *GFP5* (S65T) (Dias, M., 2001) (carril 2). La digestión doble *Xho*I/*Eco*RI, corroboró la presencia del gen *GFP5* (S65T) al liberar un fragmento de cerca 780 pb, coincidiendo con los sitios de corte señalados en el mapa (Figura 7, panel A). La digestión *Hind*III con un único sitio de corte en el sitio múltiple de clonamiento debió linealizar del plásmido y obtener una banda de 7062 pb, sin embargo no hubo digestión, posiblemente por inactivación de la enzima *Hind*III. En su conjunto, los resultados permitieron confirmar que el plásmido aislado es pTREX-n GFP5 (S65T).

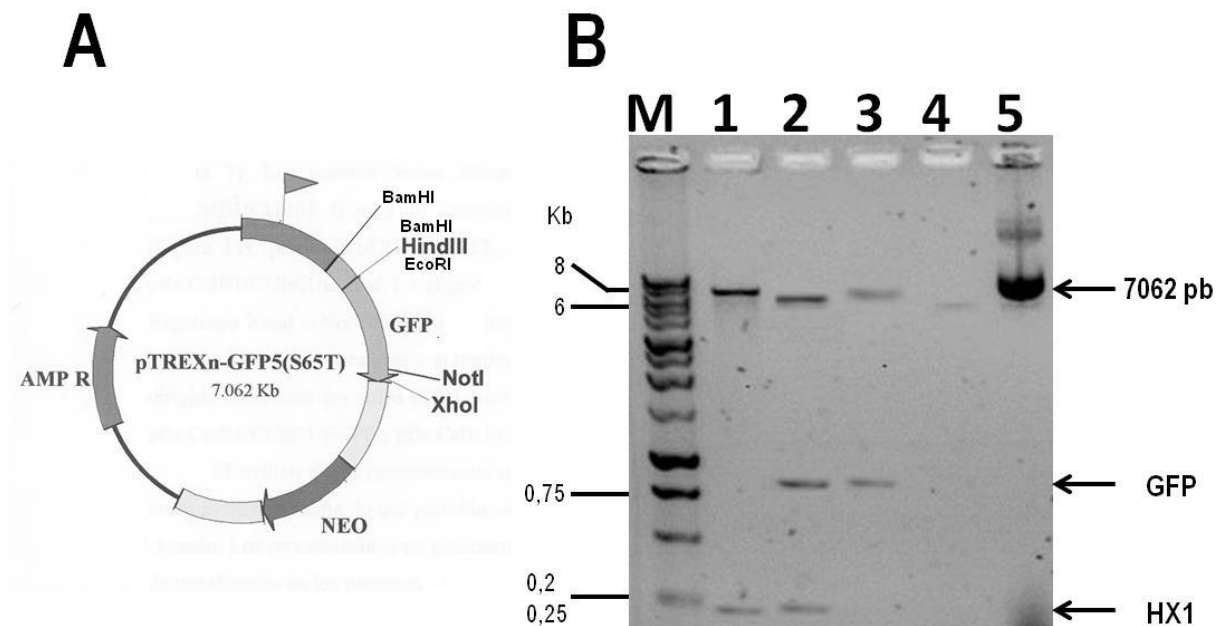


Figura 7

Caracterización del vector pTREX-n GFP5 (S65T) mediante digestiones sencillas y dobles con enzimas de restricción.

Gel de agarosa al 1% en TAE 0.5X. Carriles: M, Escalera de ADN 1kb (PROMEGA); 1, pTREX-n GFP5 (S65T) *Bam*HI; 2, pTREX-n GFP5 (S65T) *Bam*HI y *Xho*I; 3, pTREX-n GFP5 (S65T) *Eco*RI y *Xho*I; 4, pTREX-n GFP5 (S65T) *Hind*III; 5, pTREX-n GFP5 (S65T) sin digerir. Las flechas indican la posición del pTREX-n GFP5 (S65T) circular covalentemente cerrado; el fragmento del gen *GFP* y el fragmento de la región HX1.

4. Tipificación de la cepa *T. cruzi* TGEN/VE/2012/ValleCCS1 mediante PCR.

Previo a la realización de las experiencias de transfección se realizaron ensayos moleculares de amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) dirigidos a secuencias repetitivas del genoma nuclear y del ADN del kinetoplasto (ADNK) características de la especie, para así corroborar que efectivamente la cepa TGEN/VE/2012/ValleCCS1 era *T. cruzi*.

En primer lugar, se realizó el ensayo PCR ADNk utilizando los cebadores 121 y 122 (Sturm y col., 1989), los cuales se unen a regiones conservadas del mini círculo de ADNk amplificando un segmento de 330 pb correspondiente a una de las cuatro regiones variables del mini círculo (Gomes y col., 1998). La Figura 8 muestra los resultados de la amplificación. Tanto la cepa *T. cruzi* TGEN/VE/2010/196, incluida como control positivo, como la cepa TGEN /VE/2012/ValleCCS1 (Figura 8, carriles 2 y 1 en ese orden) amplificaron la banda específica de 330 pb y un patrón de bandas idéntico, mientras que la cepa *T. evansi* MEQU/VE/2003/TeAp-N/D1 (Figura 8, carril 3) amplificó una única banda ligeramente superior a 330 pb. El control negativo de agua mostró ausencia de contaminación (Figura 8, carril 4).

En segundo lugar, se realizó el ensayo PCR ADNn microsatélite utilizando los cebadores TcZ1 y TcZ2 (Moser y col., 1989), los cuales amplifican un fragmento de 188 pb de la región repetitiva de 195 pb de ADN nuclear específica de la especie *T. cruzi* que representa un 9% del genoma. En la Figura 9 se observa el amplicón producido en la muestra de TGEN /VE/2012/ValleCCS1 (Carril 1), el cual se presentó con multiplicidad de bandas producto a la organización en tándem de repetido base de la secuencia de 195 pb en el núcleo. Los controles negativos, *T. evansi* y agua (Figura 9, carriles 2 y 3 respectivamente) no hubo generación de amplicón, solamente la formación de dímeros de oligonucleótidos como bandas de bajo peso molecular claras en la parte inferior del gel.

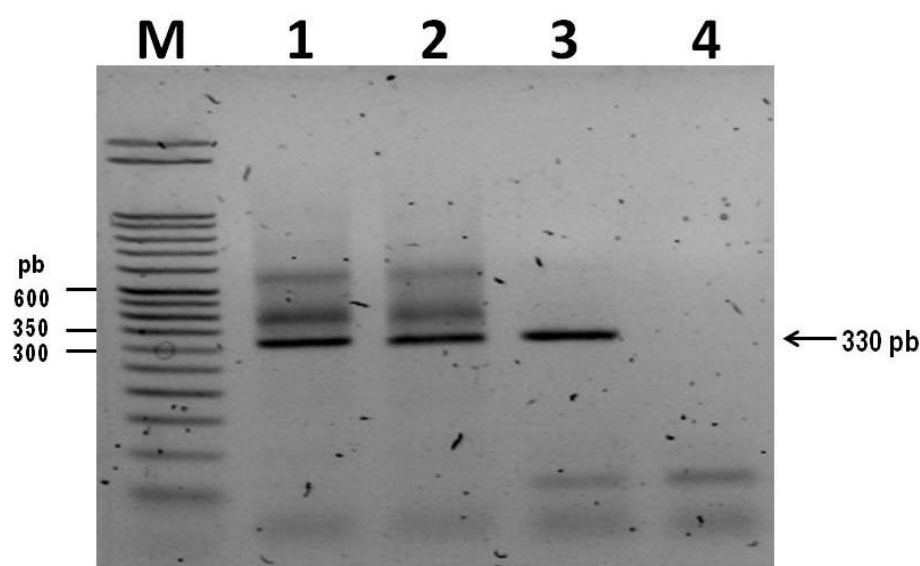


Figura 8

Caracterización del aislado de *T. cruzi* TGEN/VE/2012/ValleCCS1 mediante el ensayo de PCR ADNk.

Productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los oligos 121/122 corridos en gel de agarosa al 2% 0,5X TAE. Carriles: M, marcador de peso molecular SIGMA 50 pb; 1, *T. cruzi* TGEN/VE/2012/ValleCCS1; 2, *T. cruzi* TGEN/VE/2010/196; 3, *T. evansi* MEQU/VE/2003/TeAp-ND1; 4, agua cuarto blanco.

La flecha indica el fragmento de 330pb específico para *T. cruzi*.

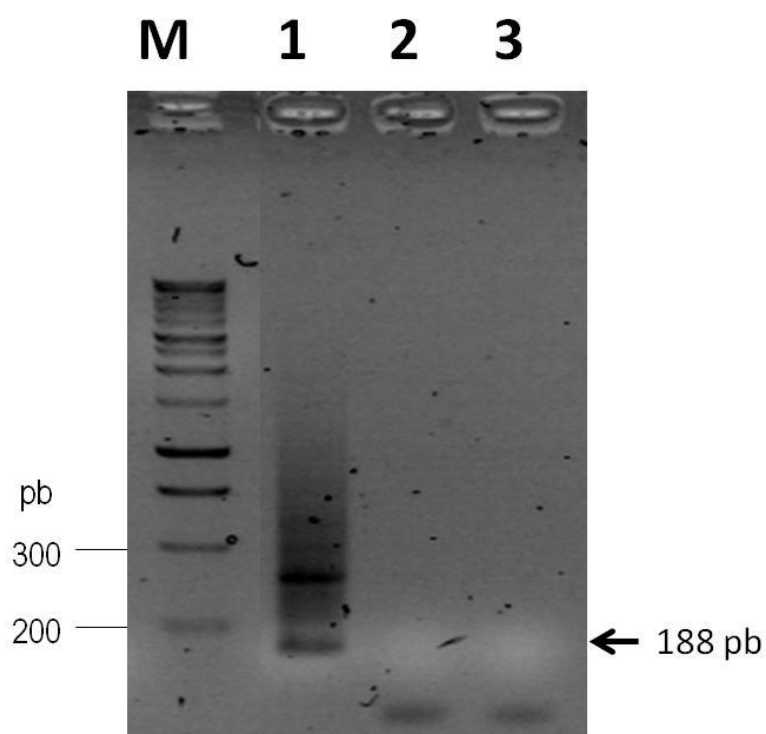


Figura 9

Caracterización del aislado de *T. cruzi* TGEN/VE/2012/ValleCCS1 mediante el ensayo de PCR ADNn.

Productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los cebadores TcZ1/TcZ2 corridos en gel de agarosa al 2% 0,5X TAE. Carriles: M, marcador de peso molecular SIGMA 50 pb; 1, *T. cruzi* TGEN/VE/2012/ValleCCS1; 2, *T. evansi* MEQU/VE/2003/TeAp-ND1; 3, agua.

La flecha indica el fragmento de 188pb específico para *T. cruzi*.

5. Determinación del IC50 de la droga G418 en la cepa *T. cruzi* TGEN/VE/2012/ValleCCS1

En una primera aproximación se estableció la cinética de crecimiento de la cepa así como una consulta bibliográfica en relación a las concentraciones del antibiótico G418 utilizadas en *T. cruzi* durante ensayos similares de transfección con vectores portando el gen *NEO* (Barclay y col., 2011; Bouvier y col., 2013; Canavaci y col., 2010; Chamekh y col., 2005; Gaunt y col., 2003; Guevara y col., 2005; Kelly y col., 1992). Primeramente se elaboró un ensayo con concentraciones crecientes de 5 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 250 µg/mL y 500 µg/mL pero al no haber una disminución en el crecimiento de la población (Figura 11) se acordó evaluar nuevos rangos de concentración, 250 µg/mL, 500 µg/mL y 800 µg/mL. Partiendo de 250.000 parásitos/mL, inóculo de tripomastigotes metacíclicos provenientes del cultivo con células VERO, se inició el seguimiento del crecimiento del cultivo en medio LIT más 10% suero fetal. En la Figura 10 se muestra la cinética de crecimiento de la cepa TGEN/VE/2012/ValleCCS1. Observamos una fase de latencia de cuatro días, posteriormente el inicio de la fase exponencial al quinto día y la fases de muerte a partir del octavo día, llegando a una concentración máxima de $3,46 \times 10^7$ parásitos/mL el día 7.

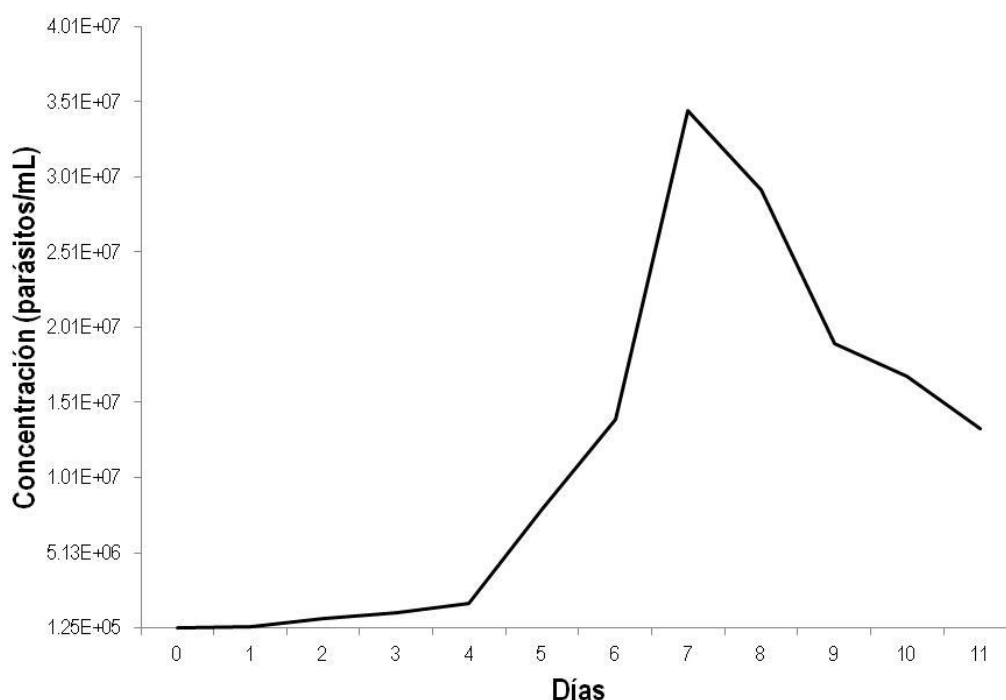


Figura 10

Cinética de crecimiento de la cepa *T. cruzi* TGEN/VE/2012/ValleCCS1.

Seguimiento del crecimiento de la cepa *T. cruzi* TGEN/VE/2012/ValleCCS1 en medio LIT. El número de parásitos viables por mL fue determinado mediante el método de conteo directo por cámara de Neubauer con tinción por azul de tripano (50%). La concentración de parásitos se expresa en exponenciales y el tiempo en días.

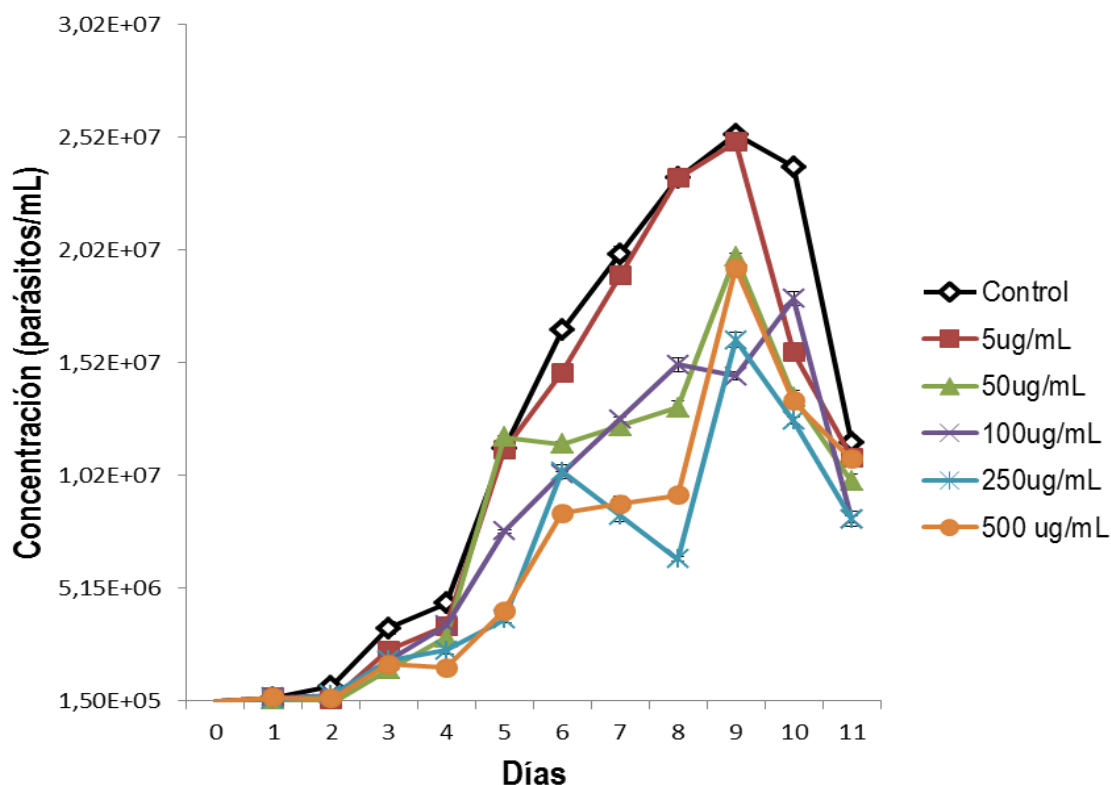


Figura 11

Cinética de crecimiento de *T. cruzi* TGEN/VE/2012/ValleCCS1 bajo concentraciones preliminares del antibiótico G418.

Seguimiento del crecimiento de la cepa *T. cruzi* MHOM/VE/2012/ValleCCS1 en medio LIT bajo tres concentraciones del antibiótico G418: 5 µg/mL (línea roja), 50 µg/mL (línea verde), 100 µg/mL (línea morada), 250 µg/mL (línea azul) y 500 µg/mL (línea naranja). El número de parásitos viables por mL fue determinado mediante el método de conteo directo por cámara de Neubauer teñidos con tinción por azul de tripano (50%). La concentración de parásitos se expresa en exponenciales y el tiempo en días.

Una vez que se caracterizó la cepa y se comprobó que correspondía a *T. cruzi*, se procedió a la evaluación del crecimiento con el antibiótico G418 bajo las concentraciones de 0 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL y 800 µg/mL. La Figura 12 mostró los resultados empleados en el cálculo del IC50. Se observó una diferencia entre el control y los tratamientos con el antibiótico, pudiendo notarse la inhibición en el crecimiento a partir del cuarto día, con un incremento en la muerte de los parásitos en todas las concentraciones probadas del antibiótico. El IC50 se calculó en base a los resultados obtenidos al tercer día, determinando su valor en 390 µg/mL siguiendo el procedimiento establecido en los materiales y métodos. El patrón de crecimiento del cultivo control se mantuvo con una fase de latencia de cuatro días, segunda de la fase exponencial a partir del quinto día y un máximo de $1,81 \times 10^7$ parásitos/mL al octavo día, siendo similares al comportamiento observado en la Figura 10

pese a que esta población presentó una caída abrupta a diferencia de la Figura 12 donde se infiere la existencia de una fase de latencia.

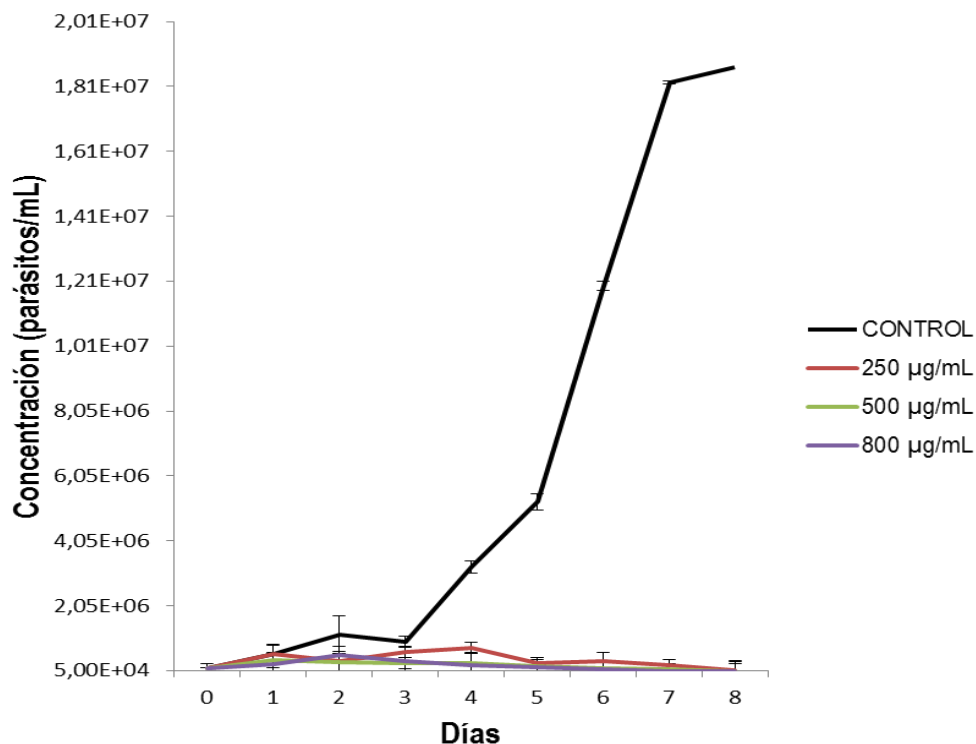


Figura 12
Cinética de crecimiento de la cepa *T. cruzi* TGEN/VE/2012/ValleCCS1 bajo el antibiótico G418.

Seguimiento del crecimiento de la cepa *T. cruzi* TGEN/VE/2012/ValleCCS1 en medio LIT bajo tres concentraciones del antibiótico G418: 250 µg/mL (línea roja), 500 µg/mL (línea verde) y 800 µg/mL (línea azul). El número de parásitos viables por mL fue determinado mediante el método de conteo directo por cámara de Neubauer con tinción por azul de tripano (50%). La concentración de parásitos se expresa en exponenciales y el tiempo en días.

6. Construcción de líneas celulares de *T. cruzi* TGEN/VE/2012/ValleCCS1 expresando la proteína de fluorescencia GFP5 (S65T).

La construcción de líneas celulares de *T. cruzi* con la cepa TGEN/VE/2012/ValleCCS1 expresando la proteína de fluorescencia verde se realizó mediante la transfección del vector pTREX-n GFP5 (S65T) (Figura 4). Las condiciones de electroporación fueron establecidas en trabajos previos (Campelo, 2005) y la concentración del antibiótico G418 fue determinada en 800 µg/mL de acuerdo a los resultados de la sección 5 de este trabajo (Figura 12).

Los epimastigotes de la cepa *T. cruzi* TGEN/VE/2012/ValleCCS1 fueron transfectados por cuadruplicado con un aproximado de 200 µg del plásmido pTREX-n GFP5 (S65T). En las 48 horas posteriores a la transfección, las células transfectadas sobrevivientes mostraron la expresión de la fluorescencia verde (Figura 13, panel B) y los cultivos fueron expuestos al antibiótico G418 a una concentración de 800 µg/mL alternado con 10 días de cultivo sin el antibiótico. De forma rutinaria (en períodos de 7 a 10 días) fueron evaluadas la viabilidad celular y la fluorescencia.

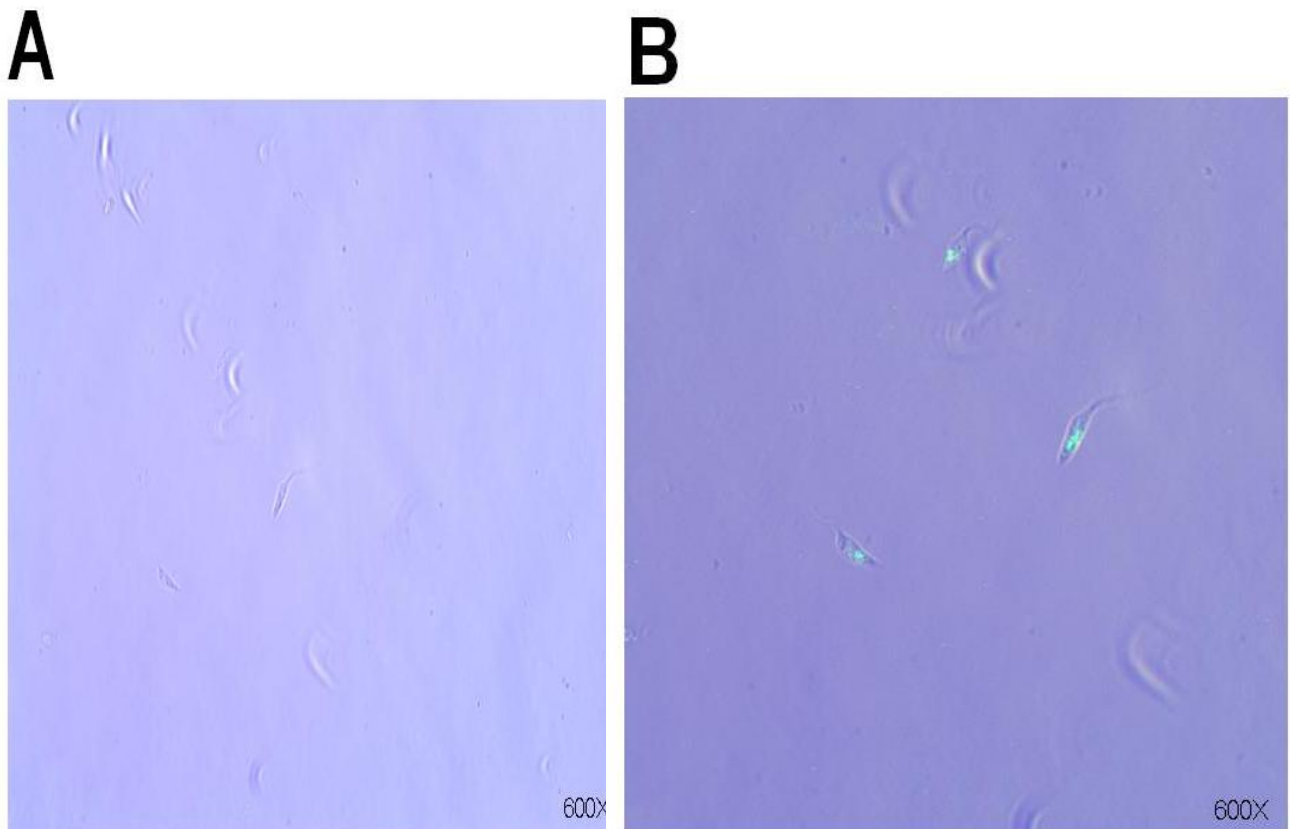


Figura 13

Líneas celulares de *T. cruzi* 48 horas post-transfección con pTREX-n GFP5 (S65T).

A y B. Epimastigotes expresando el gen *GFP5* (S65T). A. Microscopía de luz. B. Microscopía de fluorescencia. Aumento 600X.

Se observó una caída poblacional abrupta durante los primeros 10 días posteriores a la transfección, debido a la presencia del antibiótico G418 en el medio de cultivo. Los epimastigotes sobrevivientes presentaron motilidad y morfología consistentes con el comportamiento presentado por la cepa silvestre, además de la resistencia a la droga G418 como la expresión de la proteína *GFP5* (S65T) en la totalidad de los parásitos sobrevivientes. Durante la tercera semana ya se podían observar células en división pese a la abundancia de detrito en el medio cultivo debido al remanente de parásitos muertos. A los 45 días se logró obtener una población estable fluoresciendo en 100% (Figura 14).

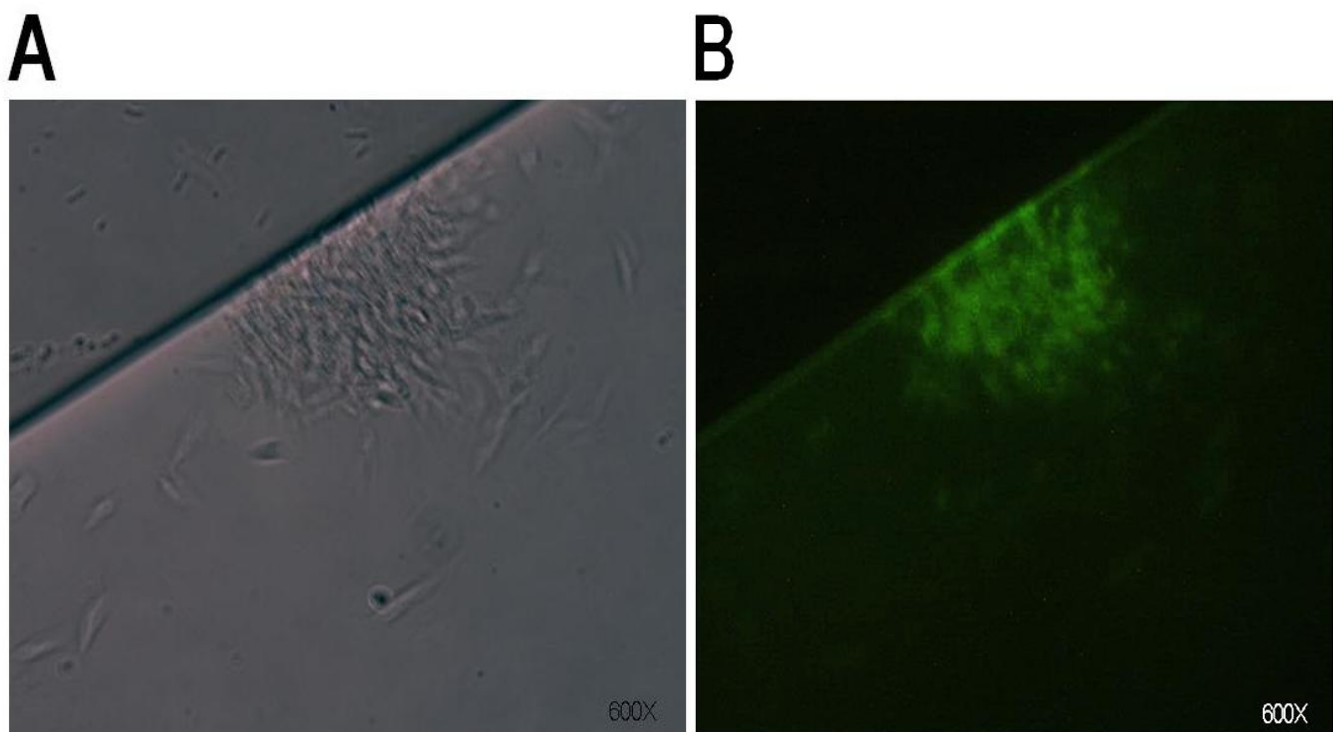


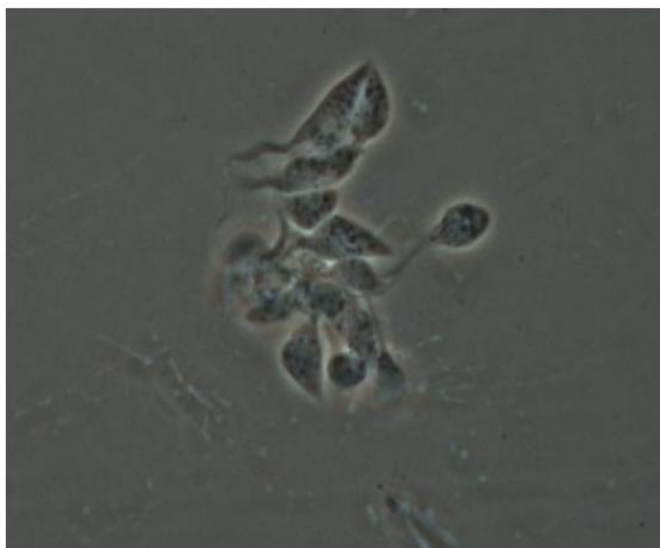
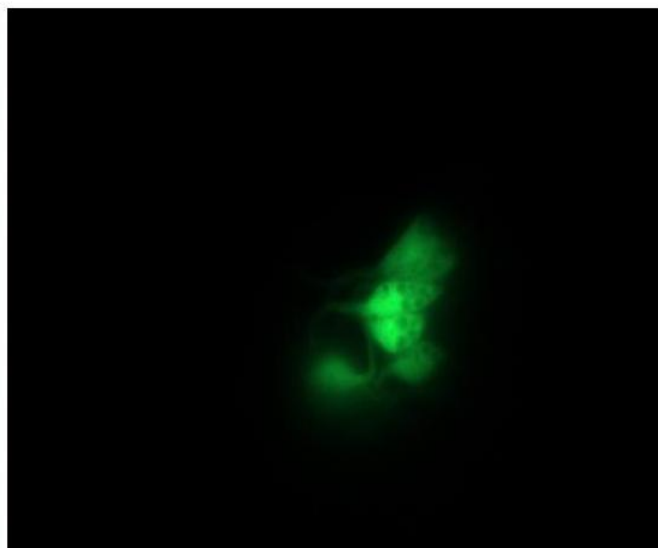
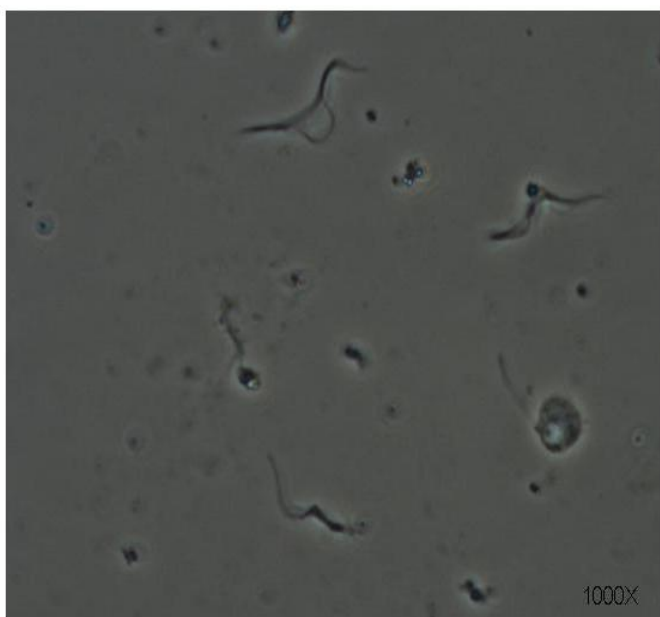
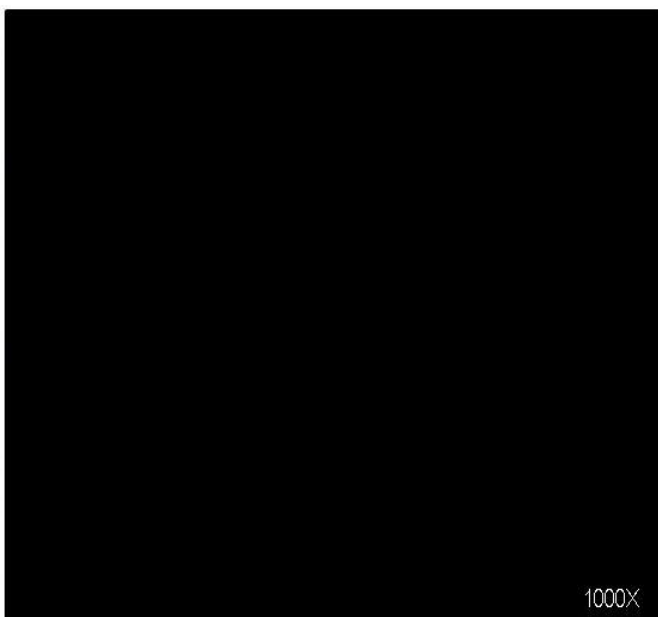
Figura 14

Lineas celulares estables de *T. cruzi* 45 días post-transfección con pTREX-n GFP5 (S65T).

A y B. Epimastigotes de *T. cruzi* 45 días post transfección con pTREX-n GFP5 (S65T expresando los genes *NEO* y *GFP5* (S65T).

A. Microscopía de luz. B. Microscopía de fluorescencia. Aumento 600X.

Se evaluó el comportamiento de forma regular durante 6 meses post-transfección, obteniendo fluorescencia en 75% de la población (Figura 15, panel B). Los tripomastigotes metacíclicos no expresaban *GFP5* (S65T) pero sí resistencia al antibiótico G418 (Figura 15, panel D).

A**B****C****D****Figura 15**

Líneas celulares estables de *T. cruzi* 6 meses post-transfección con pTREX-n GFP5 (S65T).

A y B. Epimastigotes expresando los genes *NEO* y *GFP5* (S65T). C y D. Tripomastigotes metacíclicos expresando el gen *NEO*. A y C. Microscopía de luz. B y D. Microscopía de fluorescencia. Aumento 1000X.

Con el objetivo de garantizar la uniformidad en la expresión de la fluorescencia en la población de las líneas transfectadas con pTREX-n GFP5 (S65T), se llevó a cabo la metodología descrita en la sección 7.1 como dilución seriada para la obtención del clonamiento poblacional (Figura 16).

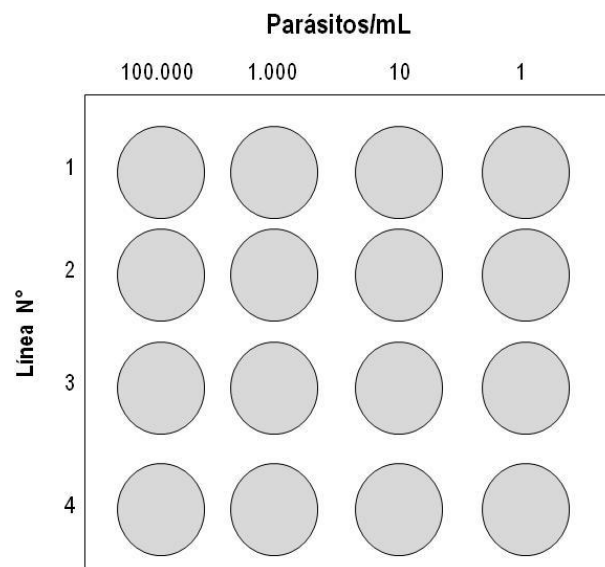


Figura 16
Diagrama del esquema de clonamiento de líneas celulares estables de *T. cruzi* transfectadas con pTREX-n GFP5 (S65T).

En las poblaciones clonadas, se observa una expresión de la proteína GFP5 (S65T) uniformemente distribuida por toda la célula (núcleo, citoplasma y flagelo), en contraste con las observadas durante las primeras semanas del cultivo en la población total donde la fluorescencia se detectaba fundamentalmente centrada en el núcleo (Figura 17, panel B).

Una vez obtenidas las líneas celulares estables y poblaciones clonales de *T. cruzi* expresando la resistencia al antibiótico G418 y la proteína GFP5 (S65T), se procedió a infectar células VERO con la finalidad de observar la expresión de la proteína de fluorescencia durante el ciclo intracelular y en los varios estadios celulares (tripomastigote, epimastigote y amastigote), para determinar el comportamiento de las líneas transfectadas durante la infección *in vitro*, como modelo de trabajo para futuras experiencias *in vivo* (Figura 18).

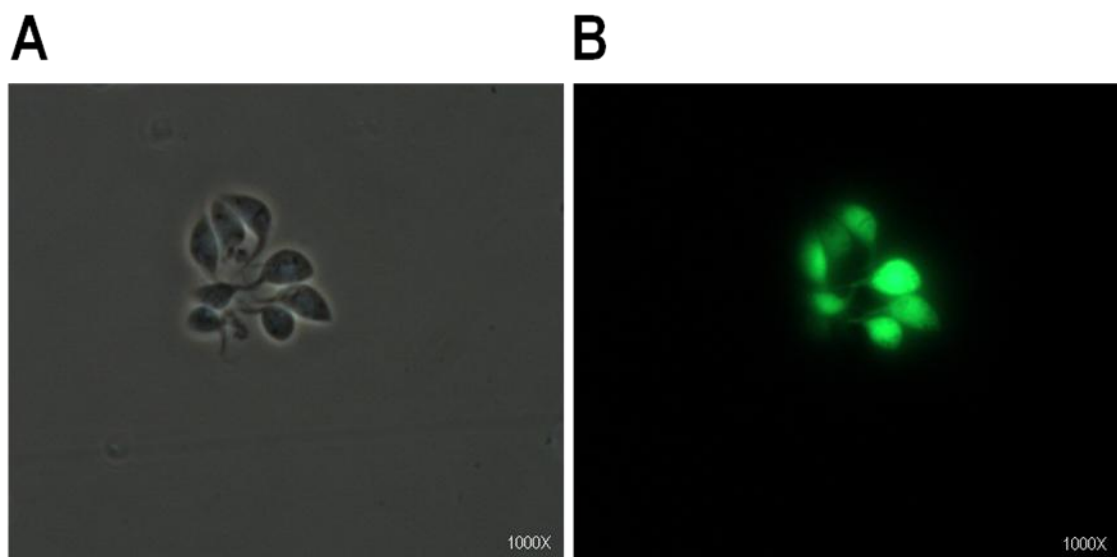


Figura 17

Líneas celulares clonadas de *T. cruzi* transfectadas con pTREX-n GFP5 (S65T).

A y B. Epimastigotes expresando los genes *NEO* y *GFP5* (S65T). A. Microscopía de luz. B. Microscopía de fluorescencia. Aumento 1000X.

7. Construcción de líneas celulares de *T. cruzi* TGEN/VE/2012/ValleCCS1 expresando la proteína de fluorescencia *tdTomato*.

En el marco del interés del Laboratorio de Fisiología de Parásitos del IVIC en el desarrollo de herramientas que permitan la mayor comprensión de la infección por *Trypanosoma cruzi* debido a la gran heterogeneidad y plasticidad en su estructura genética, así como la alta prevalencia en la región suramericana, y contando con experticia del Laboratorio de Genética Molecular del Instituto de Biología Experimental en la aplicación de herramientas de genética reversa, se ampliaron esfuerzos en la obtención de líneas fluorescente estables de *T. cruzi*, incluyendo un vector derivado de pTREX-n, diseñado más recientemente con un gen reportero que expresara una proteína de fluorescencia roja, pTREX-n tdTomato (Canavaci y col., 2010) (Figura 19).

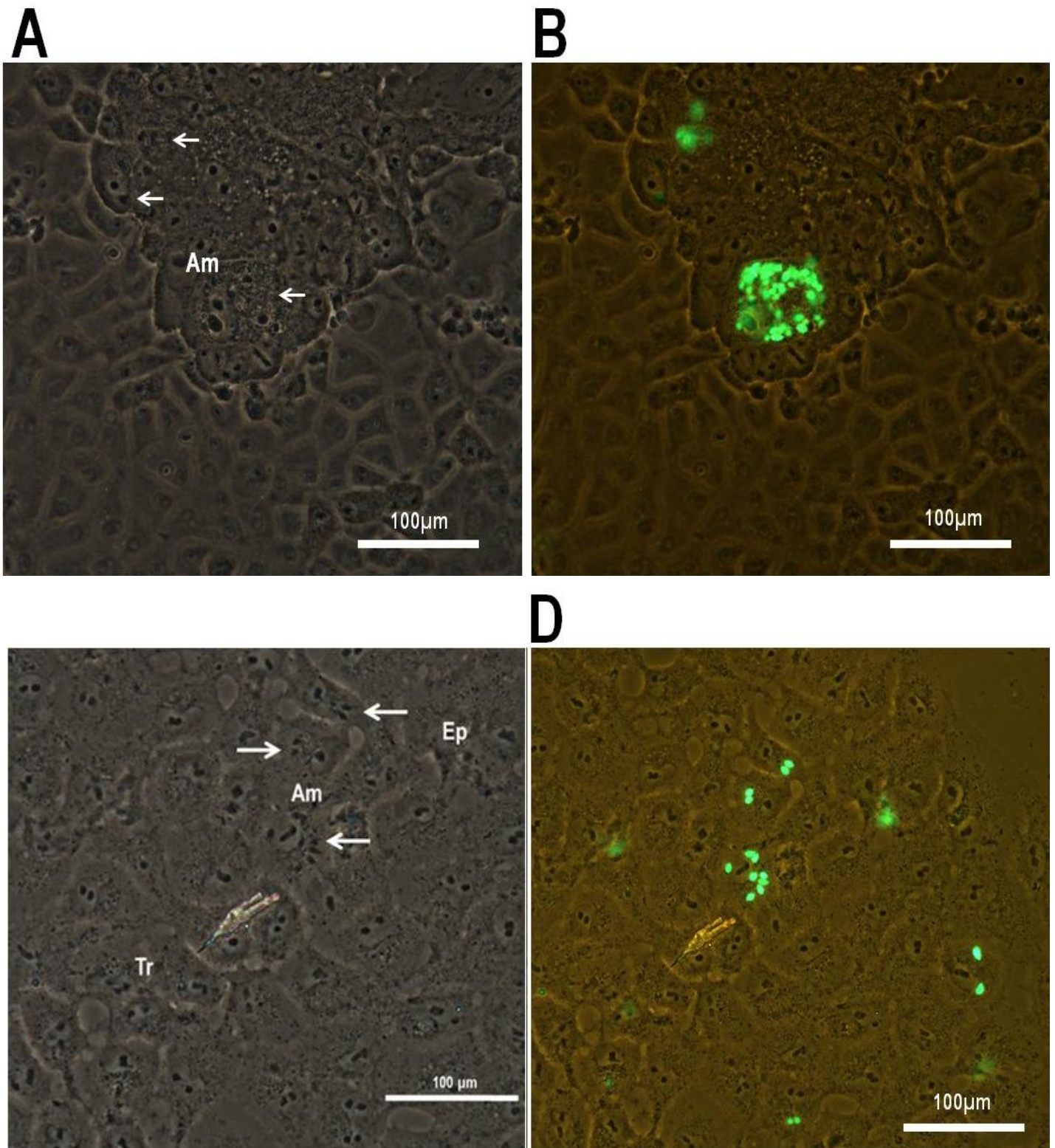


Figura 18

Células VERO infectadas con líneas clonales de *T. cruzi* transfectadas con pTREX-n GFP5 (S65T).

A, B, C y D. Células Vero infectadas con el aislado *T. cruzi* TGEN/VE/2012/ValleCCS1 expresando los genes *NEO* y *GFP5* (S65T) mantenidas en medio MEM con suero fetal bovino al 10%. A y C. Microscopía de luz. B y D. Microscopía de fluorescencia. Aumento 400X. (←) células VERO infectadas; (Am) amastigotes.

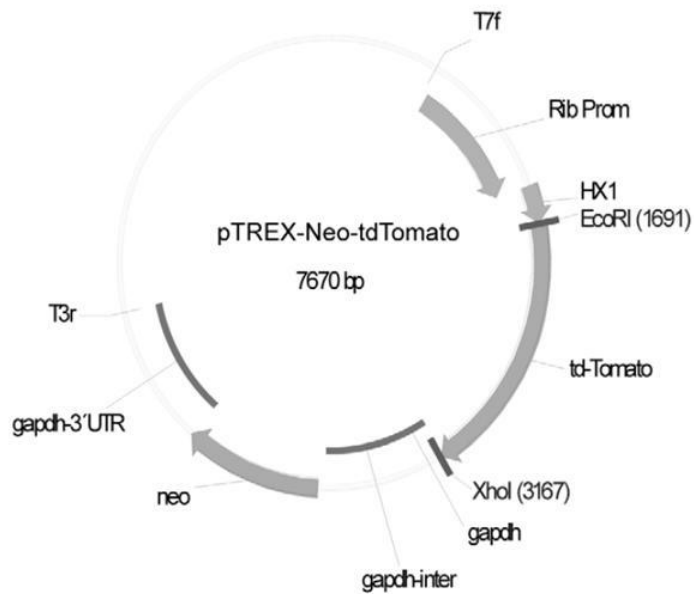


Figura 19

Vector de expresión de *Trypanosoma cruzi* pTREX-Neo-tdTomato (Tomado de Canavaci y col., 2010).

Mapa de Vector pTREX-Neo-tdTomato derivado de pTREX-n (Vázquez y Levin, 1999) indicando los genes *NEO* y *tdTomato* derivado a partir del gen *DsRed* de *Discosoma* sp. (Shaner y col., 2004). Se indican los sitios de corte con las enzimas *EcoRI* y *XhoI* que escinden el fragmento *tdTomato*.

Con el objetivo de obtener líneas fluorescentes estables rojas se tomaron epimastigotes en fase exponencial tardía de la cepa *T. cruzi* TGEN/VE/2012/ValleCCS1 y se transfectaron por duplicado con un aproximado de 200 µg del plásmido pTREX-n tdTomato obtenido bajo los protocolos descritos para pTREX-n GFP5 (S65T). Del mismo modo, a las 48 horas posteriores se evaluó la fluorescencia (Figura 20, panel B) y los cultivos fueron expuestos al antibiótico G418 a una concentración de 800 µg/mL en períodos de alternados de 10 días de cultivo en presencia y ausencia del antibiótico.

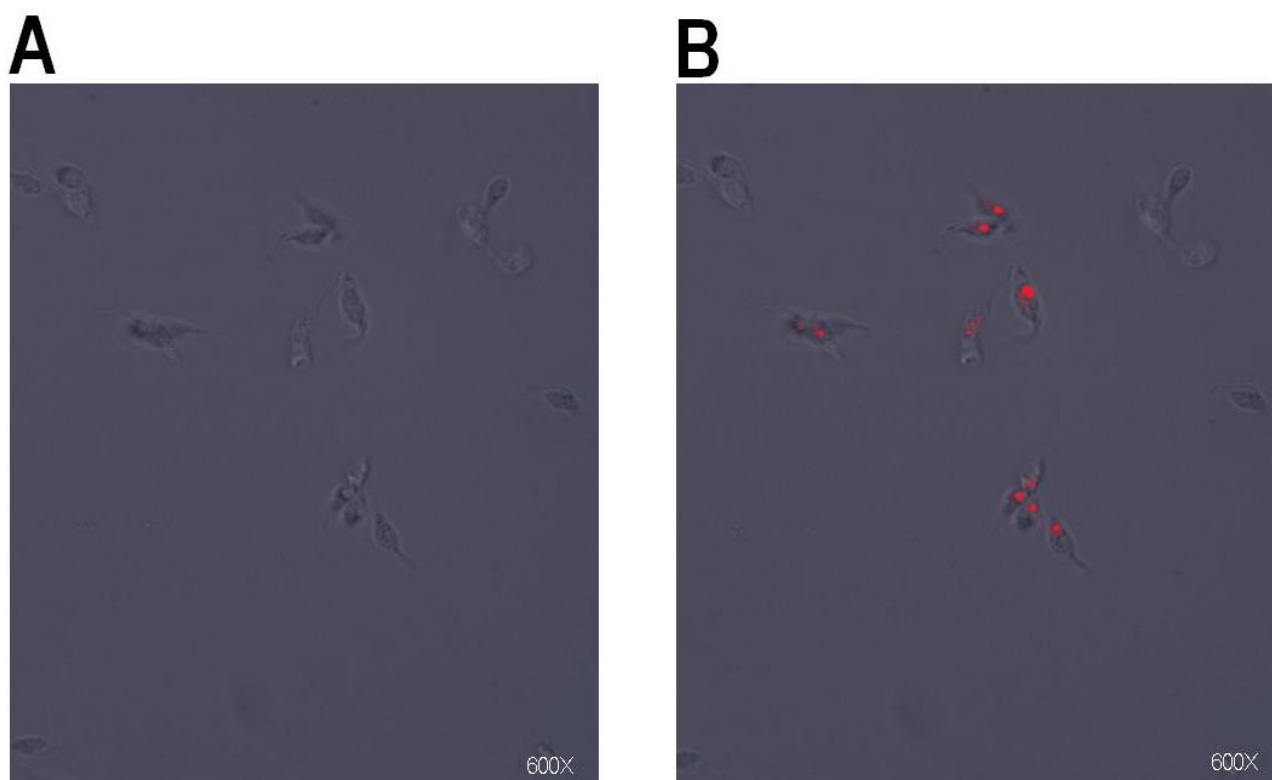


Figura 20

Lineas celulares de *T. cruzi* 48 horas post-transfección con pTREX-n tdTomato.

Ay B. Epimastigotes expresando los genes *NEO* y *tdTomato*. A. Microscopía de luz. B. Microscopía de fluorescencia. Aumento 600X.

Del mismo modo que ocurrió con las líneas fluorescentes verdes, se observó una caída poblacional abrupta durante los primeros 10 días posteriores a la transfección, durante la incubación en presencia del antibiótico G418 en el medio de cultivo. Aquellos epimastigotes sobrevivientes presentaban motilidad y morfología consistentes con el comportamiento presentado por la cepa silvestre y tanto la resistencia a la droga G418 como la expresión de la proteína *tdTomato*.

Después de los 25 días post-transfección no hubo un incremento en la tasa de replicación de los parásitos transfectados con pTREX-n tdTomato en ninguno de los duplicados del cultivo. Sin éxito en los intentos de su recuperación, cambios de temperatura de incubación de 29°C a 37°C, exposición a un contenido de 5% de CO₂, cambios más frecuentes de medio LIT (en períodos de 5 días), por tanto los cultivos fueron descartados.

DISCUSIÓN

La infección en humanos por el parásito *Trypanosoma cruzi* data de hace más de nueve mil años de acuerdo a los estudios realizados en momias preservadas de forma natural procedentes de la región andina donde observaron una infectividad de 40,6% en los individuos estudiados, encontrándose con severas patologías en el sistema digestivo además de cardiopatías características de la enfermedad hoy en día (Aufderheide y col., 2004; Coura y col., 2014). En la actualidad la enfermedad de Chagas es catalogada como desatendida o abandonada, representando un problema de salud pública que se mantiene en vigencia en todo el continente americano y que se ha expandido a otros continentes acompañando la migración legal e ilegal de individuos infectados con *T. cruzi* y presentando la enfermedad en sus diferentes fases, desde Latinoamérica a países no endémicos (Coura y col., 2014).

El parásito circula en la naturaleza en tres ciclos que se solapan e intercambian, el ciclo silvestre, el ciclo peridoméstico y el ciclo doméstico, definidos por la interacción de las poblaciones humanas infectadas con el vector y los reservorios naturales, determinando la transmisión vectorial a través de la contaminación con heces infectadas durante la picadura del insecto. Recientemente en el bosque urbanizado de la ciudad de Caracas y la zona norte costera del país se han reportados episodios de transmisión por contaminación de alimentos, donde cepas normalmente circulando en el ciclo silvestre entre vectores y reservorios mamíferos, ahora se encuentran causando casos agudos con sintomatología y comportamiento clínico acentuados, que no responden al tratamiento disponible y mantienen la presencia del parásito aún en la fase crónica (Alarcón de Noya y col., 2015).

Tomando como factores la domiciliación de vectores y los registros recientes de transmisión asociadas a la ingesta de bebidas y comidas contaminadas, es pertinente el estudio de nuevos aislados del agente etiológico, *Trypanosoma cruzi* de vectores, especialmente aquellos provenientes de zonas urbanas reportadas de reciente transmisión. Desde el punto de vista de la transmisión vectorial en Venezuela la especie predominante es *Rhodnius prolixus* a lo largo del territorio (Coura y col., 2014). *Pastrongylus geniculatus* destaca como vector infectado predominante en la región

capital, siendo éste el principal triatomino asociado a la transmisión oral pese a presentar un reflejo de defecación retardado (Alarcón de Noya y col., 2015).

Con el objetivo de profundizar la caracterización del comportamiento de estos parásitos en la infección humana y el desarrollo en los vectores se llevó al desarrollo de herramientas de la genética reversa, específicamente la construcción de vectores de expresión para tripanosomátidos a principios de los años 90, basados en las particularidades genéticas de *T. cruzi*, específicamente considerando la transcripción policistónica, “*trans-splicing*”, la expresión de genes regulados post-transcripcionalmente, la ausencia de intrones y de promotores de ARN polimerasa tipo II (exceptuando el promotor *SL-ARN*) y la transcripción de genes que codifican proteínas mediadas por ARN polimerasa tipo I (Martínez-Calvillo y col., 2010).

En este contexto, unificando los intereses de evaluar cepas de *T. cruzi* de reciente aislamiento en la región capital a partir de *P. geniculatus* y asociadas a transmisión por ingesta de alimentos (Rodríguez-Angulo y col., 2013; Alarcón de Noya y col., 2015) y el uso de herramientas de la genética reversa, se desarrolló este trabajo con el objetivo de obtener líneas fluorescentes estables *in vivo* de una cepa de *T. cruzi* del Valle de Caracas haciendo uso del vector pTREX-n GFP5 (S65T).

La cepa utilizada, denominada *T. cruzi* TGEN/VE/2012/ValleCCS1 fue caracterizada por el Dr. Alfredo Mijares y su equipo de trabajo en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) como TcI y extraída de *P. geniculatus*. La descripción del comportamiento de esta cepa en infecciones en ratones NMRI a través de la evaluación de parámetros parasitológicos y moleculares permitió concluir que variables como virulencia y parasitemia en estas infecciones en murinos son tan altas y agresivas como en la sintomatología y valores presentados en las infecciones obtenidas en pacientes afectados por brotes orales durante la fase aguda (Rodríguez-Angulo y col., 2013).

La tipificación molecular permitió corroborar que la cepa utilizada efectivamente era *T. cruzi*. Dos ensayos de amplificación especie específicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), haciendo uso de dos pares de oligonucleótidos dirigidos a sendos blancos de secuencias distintivas ubicados en dos compartimientos del genoma, un par para ADN de kinetoplasto y otro para

región altamente repetitiva del ADN nuclear. En el primero, se utilizaron los oligonucleótidos 121 y 122 diseñados por Sturm y colaboradores en 1989, originariamente con el nombre de S35 y S36, los cuales anclan en las regiones conservadas del ADN del minicírculo del kinetoplasto, (Degraeve y col., 1988) obteniendo un amplicón de 330 pb (Figura 6). Aun cuando estos cebadores fueron descritos originalmente como *T. cruzi*-específicos, son capaces de amplificar en otras especies de tripanosomátidos (de Sousa, 2014).

En el segundo ensayo de amplificación, se utilizaron los oligonucleótidos TcZ1 y TcZ2 diseñados por Moser y colaboradores en 1989, los cuales amplifican un segmento de 188 pb de la secuencia repetitiva de 195 pb de ADN nuclear, siendo la secuencia repetitiva más abundante en esta especie abarcando 9% del ADN genómico. Estos iniciadores excluyeron la región final AATTTCG con la finalidad de reducir una posible hibridación con secuencias ricas en A-T de otros parásitos, insectos y mamíferos. TcZ1 y TcZ2 son altamente específicos para *T. cruzi*, no amplifican especies de *Leishmania* ni a tripanosomátidos africanos (Figura 21), y generan un fragmento base y una población de mayor tamaño, múltiples del fragmento base, producto de la organización en tándem de la repetición base, la cual se visualiza como un barrido (Figura 7).

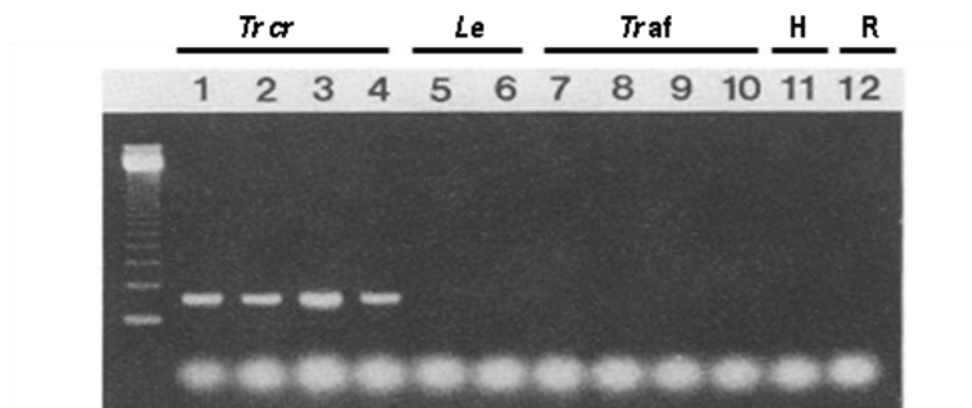


Figura 21

Caracterización de aislados de *T. cruzi* mediante el ensayo de PCR ADNn. (Moser y col., 1989)

Productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los oligos TcZ1/TcZ2 corridos en gel de agarosa.

Carriles: M, marcador de peso molecular SIGMA50pb; 1, *T. cruzi* Y; 2, *T. cruzi* Corpus Christi; 3, *T. cruzi* Tulahuén; 4, *T. cruzi* Sylvio X-10/4; 5, *Leishmania mexicana mexicana*; 6, *Leishmania major*; 7, *T. congolense*; 8, *T. brucei brucei*; 9, *T. brucei gambiense*; 10, *T. brucei rhodesiense*; 11, humano; 12, ratón. La flecha indica el fragmento de 188pb específico para *T. cruzi*.

La escogencia del plásmido pTREX-n GFP5 (S65T) se debe a que garantiza una alta expresión del gen reportero de interés, la estabilidad del vector una vez dentro de la célula y al corto tiempo de síntesis del ARNm maduro. Construido por Manuel Dias en el año 2001, partiendo del pTREX-n diseñado por Vázquez y Levin en 1999, un vector de tipo “shuttle” con un promotor ribosomal fuerte, regiones intergénicas derivadas de GAPDH garantizando el procesamiento del ARN del gen de resistencia a la neomicina y señales fuertes de “trans-splicing” (HX1) frente al sitio múltiple de clonamiento donde insertaron como gen reportero, a la versión GFP5 (S65T) optimizada en estabilidad de plegamiento e intensidad de la fluorescencia a partir del gen de la proteína de fluorescencia verde originalmente aislada de *Aequorea victoria*.

La diversidad intraespecífica en la especie *T. cruzi* no ha sido obstáculo en el uso exitoso de pTREN-n para la expresión de proteínas en sus diferentes linajes e inclusive en otros tripanosomátidos. pTREX-n es un vector de expresión con elementos provenientes de diferentes linajes de *T. cruzi* y contiene una secuencia fuerte de “trans-splicing” tomada de un fragmento del gen HX1 a partir de cepas DTU VI, secuencias del gen de la enzima GAPDH tomado de la cepa Sylvio X10 (Tcl) (Kelly y col., 1992) y un promotor ribosomal fuerte para la ARN Pol I obtenido a partir de genotecas de CL Brener y Tulahuen II (ambas TcVI) (Martínez-Calvillo y col. 1997).

De acuerdo a lo reportado por Guevara y col. en 2005 haciendo una evaluación comparativa de los niveles de fluorescencia obtenidos, utilizando pTREX-n GFP5 (S65T) en cepas del parásito pertenecientes a diferentes linajes, sugieren que la variación en la expresión del gen de fluorescencia verde pudiese asociarse a la heterogeneidad inter-especie del parásito, una característica a tomar en cuenta al utilizar cepas recientemente aisladas y diversidad de linajes.

Una ventaja adicional de pTREX-n es que es un vector capaz de integrarse al locus ribosomal independientemente si es introducido en forma lineal o circular (Lorenzi y col., 2003).

Este trabajo presenta un acento en lo metodológico, donde la aplicación de una serie de técnicas de la genética molecular y la genética reversa son requeridas en la obtención de líneas fluorescentes estables de *T. cruzi*. Como punto de partida fue necesario corroborar la identidad del

vector pTREX-n GFP5 (S65T), a través del patrón de fragmentos generados mediante las digestiones sencillas y dobles con enzimas de restricción identificadas en el mapa del vector, como una alternativa a la secuenciación del plásmido. Se realizó la aplicación de técnicas y metodologías clásicas de la genética molecular como la transformación del vector pTREX-n GFP5 (S65T) en *Escherichia coli* HB101, la cual es una bacteria genéticamente modificada que funge como célula hospedadora. Una vez transformado, el vector fue aislado mediante dos metodologías dirigidas a obtener altas concentraciones de ADN plasmídico. En una primera aproximación se hizo constar que el vector había sido aislado de forma exitosa bajo la observación de dos características en la evaluación cualitativa mediante electroforesis en geles de agarosa utilizando una muestra referencial (Figura 6): el peso molecular consistente con el esperado (7062 pb) y precisando las tres formas estructurales en las que se puede presentar un plásmido (lineal, circular covalentemente cerrado y superenrollado). Adicionalmente se llevaron a cabo varias digestiones (simples y dobles) con enzimas de restricción con la finalidad identificar la presencia de secuencias específicas de corte ubicando fragmentos conteniendo el gen *GFP*, ubicado en el segmento de 800 pb (Figura 7, carriles 2 y 3) y el inserto de 220 pb de HX1 (Figura 7, carriles 1 y 2) considerado como la secuencia fuerte de control post-transcripcional característica del esqueleto de pTREX.

Durante la caracterización de la cepa TGEN/VE/2012/ValleCCS1 se evaluó la cinética de crecimiento en medio LIT más 10 % suero fetal, tomándola como referencia control para determinar la sensibilidad de los parásitos al ser expuestos al antibiótico G418. El vector pTREX-n GFP5 (S65T) posee como marcador selectivo al gen *NEO*, el cual le confiere a *T. cruzi* resistencia a este antibiótico al ser transfectado de manera exitosa, mediante la expresión de la enzima aminoglucósido 3-fosfotransferasa II la cual añade un fosfato a la droga impidiendo bloquee la síntesis de polipéptidos en el organismo. G418 es uno de los antibióticos más utilizados en la genética molecular de eucariotas, aun cuando el gen *NEO* es un gen de origen procariota.

Para la determinación del IC50 a G418 se realizó una consulta bibliográfica de las concentraciones de este antibiótico utilizadas en experiencias de transfección en distintas cepas de *T.*

cruxi con el compendio de vectores de expresión para esta especie (pTEX, pRIBOTEX y pTRES). En una primera instancia se acordó evaluar el comportamiento de la cepa bajo concentraciones crecientes de 0 a 500 µg/mL, teniendo resultados poco satisfactorios (Figura 11), manteniéndose el crecimiento del cultivo. Considerando estos resultados se decidió reevaluar el diseño experimental y exponer los parásitos a un rango superior de concentraciones (250 µg/mL, 500 µg/mL y 800 µg/mL), procediendo al cálculo del coeficiente de inhibición (IC50) al tercer día de exposición al antibiótico obteniendo un valor de 390µg/mL. Se asignó como valor deseado para ejercer la presión selectiva una concentración del antibiótico más del doble de IC50, escogiendo la concentración superior evaluada (800µg/mL) para ejercer la presión selectiva, garantizando el mantenimiento de la expresión del gen de resistencia *NEO* y concomitantemente, la del gen reportero *GFP*, ya observado en las primeras 48 horas como una expresión transitoria (Figuras 13 B).

Con el propósito de introducir material genético foráneo al interior celular de cualquier tripanosomátido se ha perfeccionado la electroporación como método de preferencia de transfección iniciado a principios de los años 90. En esta metodología se requiere altas densidades poblacionales debido a la elevada mortalidad de los parásitos durante el choque eléctrico y la necesidad de garantizar un gran número de células promoviendo la recepción y expresión estable de los genes *NEO* y *GFP* una vez mantenido el cultivo bajo presión selectiva. Por ello es necesario partir de un cultivo a densidad de 10⁸ parásitos/mL y luego concentrarlos para alcanzar en promedio 10⁹-10¹⁰ parásitos/mL. Una alta concentración de ADN de 200 µg se recomienda para la transfección, sin embargo se ha reportado que menores concentraciones rinden similares resultados (Lu y Buck, 1991) con valores de hasta 5µg. Normalmente se encuentra en la literatura que el proceso de electroporación en *T. cruzi* requiere del uso de varias soluciones y tampones con una compleja y costosa composición de sales. En este trabajo, siguiendo las recomendaciones del investigador John Swindle (comunicación personal), se prescindió del uso de estos tampones y se utilizó directamente medio LIT sin hemina, brindando resultados igualmente satisfactorios. Debido a la situación de estrés a la cual son expuestos los parásitos durante la aplicación de esta técnica, existe una disminución

brusca en la población dispuesta en la cubeta de electroporación, lo que hace necesario mantener a las células transfectadas en medio LIT suplementado durante las próximas 48 horas para la recuperación de las células y garantizar su sobrevivencia en las condiciones de selección. Pasado este tiempo, se procedió a observar bajo microscopio de fluorescencia una alícuota de esta población, donde además de haber detectado alrededor de cinco parásitos por campo en aumento de 600X, las células presentaban fluorescencia verde, principalmente en el núcleo, demostrando una expresión transitoria. Se ha reportado que los derivados de pTREX-n se integran al genoma nuclear en un período de 5 horas post-transfección y que aquellos plásmidos donde esto no ocurre son rápidamente degradados (Lorenzi y col., 2003). Es posible que luego de 48 horas de la transfección, el gen *GFP* se esté expresando desde una posición integrada en el genoma.

Las líneas estables expresando *NEO* y *GFP* se obtuvieron a los 45 días post-transfección y han sido continuamente evaluadas durante más de seis meses. Se utilizaron los siguientes criterios para definir las líneas transfectantes estables: Observar la fluorescencia en ausencia de la droga G418 en el medio de cultivo, por consiguiente la expresión del gen *GFP* era independiente de la presión selectiva como requisito; la expresión de la proteína de fluorescencia verde se visualizara de manera homogénea en todo el citoplasma y núcleo del parásito; y por último, observa una cinética de crecimiento igual a la línea salvaje, con un tiempo de generación de 18 a 19 horas en las líneas celulares transfectadas con una alta densidad poblacional, similar en la cepa control. Todas estas características coinciden con los resultados obtenidos en trabajos anteriores, haciendo uso de derivados de pTREX con genes reporteros de biofluorescencia en *T. cruzi* (Campelo, 2005).

Posteriormente se aislaron líneas celulares clonadas al realizar diluciones seriadas partiendo de una de las líneas fluorescentes estables hasta alcanzar 1 parásito/mL por pozo, dirigidas a garantizar que la población generada por fisión binaria portara el mismo genotipo. Este procedimiento permite que, ante la capacidad de detectar, en la población originalmente transfectada, una variación fenotípica en el grado de expresión de un gen *GFP*, el genoma de la línea clonada sea el mismo para

todos los individuos en la población, apuntando así a compensar la posibilidad eventos estocásticos derivados de la inserción de los genes heterólogos transfectados (Curto y col., 2014).

Con la finalidad de evaluar el las características de infectividad de las líneas celulares genéticamente modificadas originales y clonadas, se procedió a realizar una infección de células VERO con un inóculo de la población fluorescente estable y con varios de los cultivos de las líneas derivadas de la población clonada. Con esto se indujo a los parásitos a pasar por un ciclo infectivo similar al que ocurre en células del hospedador, donde se pudieron distinguir formas tripomastigotas, epimastigotas y amastigotas expresando *GFP*, pudiendo observar la fluorescencia durante los diversos estadios morfológicos del ciclo de vida del parásito, planificando complementar la evaluación en un futuro en el modelo murino.

En la fase crónica los daños patológicos asociados a la infección pueden presentarse en el sistema cardíaco (específicamente corazón) y digestivo (esófago y/o colon) y con menos frecuencia también puede involucrar el sistema nervioso central y periférico (Díaz, 2014). Haciendo uso de esta herramienta de visualización es posible evaluar *in vitro* la invasión de *T. cruzi* en diversos tipos celulares (epiteliales, linfoblastos, neuroblastos) pudiendo estudiar el comportamiento pantrópico de éste, sin necesidad de realizar ensayos histológicos en el modelo murino.

El disponer de líneas fluorescentes estables de una cepa recientemente aislada de *T. cruzi* permitirá desarrollar experiencias para analizar la interacción parásito-hospedador en mayor profundidad. Estas líneas facilitan la visualización, estando en condiciones de evaluar múltiples variables asociadas a la infección como el tropismo en los tejidos, contribuyendo al debate sobre la acumulación parasitaria en el corazón y/o en el tracto digestivo, a la sintomatología presentada (desde un punto de vista fisiológico e histológico), inclusive a la evaluación de tratamientos con nuevas drogas, aplicadas en modelos *in vitro* haciendo uso de células VERO o *in vivo* en el modelo murino.

El uso de organismos biofluorescentes en el modelo murino ha permitido evaluar la distribución de *T. cruzi* en el mamífero por más de un año, pudiendo comprender aspectos de la infección crónica como no había sido posible evaluar previo al desarrollo de esta herramienta, destacando que los parásitos durante la fase crónica no se ubican predominantemente en el corazón sino en tejidos gastrointestinales (especialmente colon y/o estómago), pese a que mantienen la patología cardíaca usual asociada a Chagas (Lewis y col., 2015). Esta sintomatología fue similar a los registrados en las momias de la región andina infectadas hace 9000 años, Esta herramienta permite un espectro de diseños experimentales entre los cuales están: contar la población parasítica haciendo uso de ensayos a microplacas conjuntamente con sistemas de imagen adecuados, obteniendo valores consistentes y de gran reproducibilidad; evaluar la toxicidad de drogas anti-*T. cruzi* *in vivo* en mejores condiciones ya que permite detallar sus efectos en tejidos a profundidad; admite la realización de estudios a cultivos de parásitos bajo períodos largos de tiempo y en células variadas en ensayos *in vitro*; y hace posible detectar números pequeños de parásitos que bajo ensayos corrientes de visualización no serían capaces de ser observados (Goyard y col., 2014), contribuyendo al avance en el desarrollo de compuestos quimioterapéuticos y sus efectos en el hospedador como posible tratamiento.

Además de representar el punto de partida para la generación de líneas fluorescentes en otros colores ampliando los potenciales usos, con las líneas fluorescentes estables obtenidas en este trabajo, estamos en posición abordar estudios que conlleven al desarrollo de compuestos quimioterapéuticos como posible tratamiento de la enfermedad de Chagas analizando sus efectos en el hospedador.

Como perspectivas a futuro se están desarrollando nuevas estrategias y técnicas en el genética reversa aplicadas a tripanosomátidos con la posibilidad de establecer knock-out funcionales aplicando deleciones puntuales directamente en el genoma de *T. cruzi* mediante la construcción de vectores con el sistema CRISPR-Cas9 con la expresión de *GFP* y tomando como base segmentos de pTREX, con la finalidad de aumentar el conocimiento sobre los genes esenciales de este patógeno

(Peng y col., 2014). También Curto y col. 2014 se encuentran desarrollando cromosomas artificiales de tripanosomas (pTACs) como vectores lineales con genes reporteros de fluorescencia queriendo lograr la inserción de genes sin presión selectiva en el genoma de forma más rápida y de fácil corroboración, es decir en sitios puntuales y conocidos, buscando ampliar la comprensión de la intrincada genética del parásito.

CONCLUSIONES

- El vector pTREX-n GFP5 (S65T) fue aislado y caracterizado corroborando su identidad mediante la aplicación de técnicas de transformación bacteriana, aislamiento de ADN plasmídico y digestiones con endonucleasas de restricción.
- Fue corroborada, con la identificación molecular del aislado TGEN/VE/2012/ValleCCS1, como *Trypanosoma cruzi* mediante los ensayos de PCR ADNk y ADNn, haciendo uso de los pares de oligonucleótidos especie-específicos 121/122 y TcZ1/TcZ2, respectivamente.
- Se determinó el IC50 del aislado *T. cruzi* TGEN/VE/2012/ValleCCS1 al antibiótico G418 evaluado al tercer día en 390µg/mL. Para las experiencias de selección de líneas transfectantes se utilizó una concentración de 800µg/mL.
- Fue posible determinar la expresión transitoria de los genes de fluorescencia GFP5 (S65T) y *tdTomato*.
- Las líneas fluorescentes verdes estables de *T. cruzi* TGEN/VE/2012/ValleCCS1 se obtuvieron a los 45 días y fueron mantenidas y evaluadas durante 6 meses.
- Se logró evaluar el ciclo infectivo *in vitro* de *T. cruzi* TGEN/VE/2012/ValleCCS1 transfectada con pTREX-n GFP5 (S65T) en células VERO, pudiendo observar formas amastigotas, epimastigotas y tripomastigotas expresando la proteína de fluorescencia verde (GFP).
- Disponemos de líneas fluorescentes estables para evaluar el ciclo infectivo *in vivo* en el modelo murino y realizar experiencias dirigidas a analizar el proceso de infección y la relación parásito hospedador por cepas recientemente aisladas de vectores circulando en las zonas de transmisión por vía oral.

BIBLIOGRAFÍA

1. Akopyants, N.S., Kimblin, N., Secundino, N., Patrick, R., Peters, N., Lawyer, P., Dobson, D.E., Beverley, S.M., Sacks, D.L., 2009. Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. *Science*. **324**: 265–268.
2. Alarcón de Noya, B. Díaz-Bello, Z., Colmenares, C., Ruiz-Guevara, R., Balzano, L., Campelo, R., Abate, T., Maniscalchi, M., Ramírez, J., Noya, O. 2011. Eficacia terapéutica en el primer brote de transmisión oral de la enfermedad de Chagas en Venezuela. *Biomed*. **31**: 64-65.
3. Alarcón de Noya, B., Díaz-Bello, Z., Colmenares, C., Ruiz-Guevara, R., Mauriello, L., Muñoz-Calderón, A., Noya, O. 2015. Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela: epidemiological, clinical and diagnostic approaches. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. **110**: 377-386.
4. Araújo, A., Jansen, A., Reinhard, K., Ferreira, L. 2009. Paleoparasitology of Chagas disease – A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. **104**: 9-16.
5. Aufderheide, A., Salo, W., Madden, M., Streitz, J., Buikstra, J., Guhl, F., Arriaza, B., Renier, C., Wittmers, L., Fornaciari, G., Allison, M. 2004. A 9000-year record of Chagas' disease. *PNAS*. **101**: 2034-2039.
6. Barclay, J., Morosi, L., Vanrell, C., Trejo, E., Romano, P., Carrillo, C. 2011. *Trypanosoma cruzi* coexpressing ornithine decarboxylase and Green Fluorescence Proteins as a tool to study the role of polyamines in Chagas disease pathology. *Enzyme Res*. **2011**: 1-10.
7. Birnboim, H., Dolly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure from screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*. **7**: 1513.

8. Botero, D., Restrepo, M. 1998. Parasitosis Humanas. Tercera Edición. Editorial: Corporación para investigaciones Biológicas. Medellín, Colombia.
9. Bouvier, L., Cámara, M., Canepa, G., Miranda, M., Pereira, C. 2013. Plasmid vectors and molecular buildings blocks for the development of genetic manipulation tools for *Trypanosoma cruzi*. *PLos One*. **8**: e80217.
10. Brener, Z., Andrade, Z. A., Barral-Netto, M. 2000. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Editora Guanabara Koogan, Segunda Edición, Rio de Janeiro, Brasil.
11. Campelo, R. 2005. Adaptación de un sistema de expresión condicional de genes de otros kinetoplastida a *Trypanosoma rangeli*. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
12. Canavaci, A. M. C., Bustamante, J. M., Padilla, A. M., Perez, C. M., Simpson, L. J., Xu, D., Boehlke, C. L., Tarleton, R. L. 2010. *In vitro* and *in vivo* high-throughput assays for the testing of anti-*Trypanosoma cruzi* compounds. *PLos Negl. Trop. Dis.* **4**: e740.
13. CDC. 2010. Centers for Disease Control and Prevention. URL disponible en: <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>. [Consulta: 30 de Abril de 2015].
14. Chalfie, M., Kain, S. 1998. GFP Green Fluorescent Protein: Properties, applications, and protocols. Wiley-Liss, Inc., Primera Edición, Nueva York, Estados Unidos de Norte América.
15. Chamekh, M., Vercruysse, V., Habib, M., Lorent, M., Goldman, M., Allaoui, A., Vray, B. 2005. Transfection of *Trypanosoma cruzi* with host CD40 ligand results in improved control of parasite infection. *Infect Immun.* **73**: 6552- 6561.
16. Chung, H., Lee, M., Van der Ploeg, L. 1992. RNA polymerase I-mediated protein-coding gene expression in *Trypanosoma brucei*. *Parasitol Today*. **8**: 414-418.

17. Contreras, V., 1994. Elementos de apoyo para trabajar en la enfermedad de Chagas (Propiedades biológicas de metacíclicos de *Trypanosoma cruzi*). Clementes editores C.A. Universidad Carabobo. Valencia, Venezuela.
18. Coura, J. R., Viñas, P. A., Junqueira, A. 2014. Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries- *Mem Inst Oswaldo Cruz*. **109**: 856-862.
19. Curto, M., Lorenzi, H., Moraes, R., Souza, R., Levin, M., da Silveira, J., Schijman, A. 2014. Cloning and expression of transgenes using linear vectors in *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol*. **3641**: 1-10.
20. Davies, J., Smith, D. I. 1978. Plasmid-determined resistance to antimicrobial agents. *Annu. Rev. Microbiol*. **32**: 469.
21. Degrave, W., Fragoso, S. P., Britto, C., van Heuverswyn, H., Kidane, G. Z., Cardoso, M. A. B., Mueller, R. U., Simpson, L., Morel, C. M. 1988. Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Bioch. Parasitol*. **27**: 63-70.
22. De Sousa, M. 2014. On opportunist infections by *Trypanosoma lewisi* in humans and its differential diagnosis from *T. cruzi* and *T. rangeli*. *Parasitol. Res*. **113**: 4471-4475.
23. De Souza, W. 1999. A Short Review on the Morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **94**: 17-36.
24. Dias, J. C. 2006. Chagas disease: successes and challenges. *Cad. Saude Publica*. **22**: 2020-2021.
25. Dias, M. 2001. Diseño de herramientas moleculares para el estudio de la interacción parásito-vector en infecciones mixtas de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli*. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

26. Díaz, L. 2014. Evaluación parasitológica de aislados venezolanos de *Trypanosoma cruzi* provenientes del ciclo doméstico de zonas urbanas del Distrito Capital, en el modelo murino de la enfermedad de Chagas. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
27. Dietrich, P., Soares, M. B., Alfonso, M. H., Floeter-Winter, L. M. 1993. The *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA-encoding gene: analysis of promoter and upstream intergenic spacer sequences. *Gene*. **125**: 103-107.
28. Dimmock, N., Easton, A., Leppard, K. 2007. Introduction to Modern Virology. Sexta Edición. Editorial: Blackwell Publishing Ltd. Oxford, Reino Unido.
29. El-Sayed, N., Myler, P., Bartholomeu, D., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A., Ghedin, E., Worthey, E., Delcher, A., Blandin, G., Westenberger, S., Caler, E., Cerqueira, G., et al. 2005. The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease. *Science*. **309**: 409-415.
30. Feo, O. 2003. Caracterización del espaciador intergénico ribosomal de *Trypanosoma rangeli*. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
31. Gaunt, M., Yeo, M., Frame, I., Stothard, J., Carrasco, H., Taylor, M., Mena, S., Veazey, P., Miles, G., Acosta, N., de Arias, A., Miles, M. 2003. Mechanism of genetic exchange in american trypanosomes. *Nature*. **421**: 936-939.
32. Gilinger, G., Bellofatto, V. 2001. Trypanosome spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms. *Nucleic Acid Research*. **29**: 1556-1564.
33. González, N., Galindo, I., Guevara, P., Novak, E., Scorza, J. V., Añez, N., Valera, M., Ramírez, J. L. 1994. Identification and detection of *Trypanosoma cruzi* by using a DNA

- amplification fingerprint obtained from the Ribosomal Intergenic Spacer. *J Clinical Microbiol.* **32**: 153-158.
34. Graham, S. 1995. Mechanisms of stage-regulated gene expression in Kinetoplastida. *ParasitolToday*.**11**: 217-224.
 35. Gomes, M., Macedo, A., Vago, A. 1998. *Trypanosoma cruzi*: Optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. *Exp Parasitol.* **88**: 28-33.
 36. Goyard, S., Lourenço, P., Deolindo, P., Autheman, D., D' Archivio, S., Minoprio, P. 2014. *In vivo* imaging of trypanosomes for a better assessment of host-parasite relationships and drug efficacy. *Parasitol. Inter.* **63**: 260-268.
 37. Guerri-Guttenberg, R.A., Grana, D.R., Ambrosio, G., Milei, J., 2008. Chagas cardiomyopathy: Europe is not spared. *Eur. Heart J.***29**: 2587–2591.
 38. Guevara, P., Dias, M., Rojas, A., Crisante, G., Abreu-Blanco, M. T., Umezawa, E., Vazquez, M., Levin, M., Añez, N., Ramírez, J. L. 2005. Expression of fluorescent genes in *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): its application to parasite-vector biology. *J. Med. Entomol.* **42**: 48-56.
 39. Hariharan, S., Ajioka, J., Swindle, J. 1993. Stable transformation of *Trypanosoma cruzi*: inactivation of the PUB12.5 polyubiquitin gene by targeted gene disruption. *Mol Biochem Parasitol.* **57**: 15-30.
 40. Hernandez, R., Diaz-de-Leon, F., Castañeda, M. 1988. Molecular cloning and partial characterization of ribosomal RNA genes from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.***27**: 275-280.
 41. Hernández, R., Martínez-Calvillo, S., Hernández-Rivas, R., Gómez, E. 1993. *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA genes: a review. *Biol. Res.***26**: 109-114.

42. Hoare, C. A. 1972. Herpetosoma from man and others mammals. In the Trypanosomes of mammals: a zoological monograph. Blackwell Sci, Primera Edición, Oxford, Inglaterra.
43. Hunt, S.V. 1987. Preparation of Lymphocytes and accessory cells. Lymphocyte a Practical Approach. G.C.B. Klausir Press. UK.
44. Kelly, J. M. 1995. Trypanosomatid shuttle vectors: new tools for the functional dissection of parasite genomes. *Parasitol Today*. **11**: 447-451.
45. Kelly, J. M., Ward, H., Miles, M., Kendall, G. 1992. A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. *Nucleic Acids Res*. **20**: 3963-3969.
46. Kendall, G., Wildespin, A. F., Ashall, F., Miles, M. A., Kelly, J. M. 1990. *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase does not conform to the "hot spot" topogenic signal model. *EMBO J*. **9**: 2751-2758.
47. Klug, W., Cummings, M. 2006. Conceptos de genética. Prentice Hall, Octava Edición, Nueva Jersey, Estados Unidos de Norte América.
48. Le Grice, S. F. J., Matzura, H. 1981. Binding of RNA polymerase and the catabolite gene activator protein within the cap promoter in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol*. **150**: 185.
49. Lee, M., Van der Ploeg, L. 1997. Transcription of the protein coding genes in trypanosomes by RNA polymerase I. *Annu. Rev. Microbiol*. **51**: 463-489.
50. Levine, N., Coorlis, J., Cox, F., Deroux, G., Grain, J. 1980. A newly revised classification of the Protozoa. *J Protozool*. **27**: 37-58.
51. LeBowitz, J., Coburn, C., McMahon-Pratt, D., Beverley, S. 1996. Development of a stable *Leishmania* expression vector and application to the study of parasite surface antigen genes. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **87**: 9736-9740.

52. Lewis, M., Fortes-Francisco, A., Taylor, M., Kelly, J. 2015. A new experimental model for assessing drug efficacy against *Trypanosoma cruzi* infection based on highly sensitive *in vivo* imaging. *J. Biomol. Screen.* **20**: 36-45.
53. Lorenzi, H., Vazquez, M., Levine, M. 2003. Integration of expression vectors into the ribosomal locus of *Trypanosoma cruzi*. *Gene.* **310**: 91-99.
54. Lu, H., Buck, G. 1991. Expression of an exogenous gene in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Mol Biochem Parasitol.* **44**: 109-114.
55. Lukeš J, Guilbride DL, Votypka J, Zikova A, Benne R, Englund PT. 2002. Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure. *Eukar Cell.* **1**:495–502.
56. Martin, D. L., Lowe, K. R., McNeill, T., Thiele, E. A., Roellig, D. M., Zajdowicz, J., Hunter, S. A., Brubaker, S.A. 2015. Potential sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in mice. *Acta. Trop.* **3614**: 1-4.
57. Martínez-Calvillo, S., Hernández, R. 1994. *Trypanosoma cruzi* ribosomal DNA: mapping of a putative distal promoter. *Gene.* **142**: 243-247.
58. Martínez-Calvillo, S., Sunkin, S., Shao-Feng, Y., Fox, M., Stuart, K., Myler, P. 1997. Genomic organization and functional characterization of the *Leishmania major* in ribosomal RNA gene locus. *Mol. Biochem. Parasitol.* **116**: 147-157.
59. Martínez-Calvillo, S., Vizuet de Rueda, I., Florencio-Martínez, L., Manning-Cela, R., Figueroa-Angulo E. 2010. Gene expression in trypanosomatid parasites. *J Biomed Biotechnol.* **2010**: 1-15.
60. Mc Daniel, J.P. y Drovak, J.A. 1991. Identification, isolation, and characterization of naturally-occurring *Trypanosoma cruzi* variants. *Mol. Biochem. Parasitol.* **57**: 213-222.

61. Mordini, D. O. 2010. ¿Por qué una “nueva clasificación de la enfermedad de Chagas?” *Rev Fed Arg Cardiol.* **39**: 238-239.
62. Moser, D., Kirchhoff, L., Donelson, J. 1989. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* **1989**: 1477-1482.
63. Nelson, R. G., Parsons, M., Selkirk, M., Newport, G., Barr, P. J. Agabian, N. 1984. Sequences homologous to variant antigen mRNA spliced leader in Trypanosomatidae families in *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic Acids Res.* **13**: 1271-1275.
64. Nozaki, T., Cross, G. A. 1995. Effects of 3' untranslated and intergenic regions on gene expression in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **75**: 55-76.
65. Noya, B.A, Díaz-Bello, Z., Colmenares, C., Ruiz-Guevara, R., Mauriello, L., Muñoz-Calderón, A., Noya, O. 2015. Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela: epidemiological, clinical and diagnostic approaches. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **110**: 377-386.
66. Nunes, L. R., Carvalho, M. R., Buck, G. A. 1997. *Trypanosoma cruzi* strains partition into groups base on the structure and fuction of the SL RNA and rRNA gene promoters. *Mol Biochem Parasitol.* **62**: 221-224.
67. Peng, D., Kurup, S., Yao, P., Minning, T., Tarleton, R. 2014. CRISPR-Cas9-mediated single-gene and gene family disruption in *Trypanosoma cruzi*. *mBio.* **6**: e02097-14.
68. Pinto, D. 1999. Identificación y análisis de secuencias potencialmente terminadoras de la transcripción de los genes ribosomales en *Leishmania amozenensis*. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
69. Preusser, C., Jaé, N., Bindereif, A. 2012. mRNA splicing in trypanosomes. *Int. J. of Med. Microbiol.* **302**: 221-224.

70. Reddy, T., Thomas, A., Stamatis, D., Bertsch, J., Isbandi, M., Jansson, J., Mallajosyula, J., Pagani, I., Lobos, E., Kyrpides, N. The Genomes OnLine Database (GOLD) v.5: a metadata management system based on a four level (meta)genome project classification. *Nucl. Acids Res.* **43**: 1099-1106.
71. Rey, Luiz. 1991. Parásitos e Doenças Parasitarias do Homen nas Americas e na Africa. Ed. Guanabara Koogan S.A., Segunda Edición, Rio de Janeiro, Brasil.
72. Rodríguez-Angulo, H., Thomas, L. E., Castillo, E., Cárdenas, E., Mogollón, F., Mijares, A. 2013. Role of TNF in sickness behavior and allodynia during the acute phase of Chagas' disease. *Exp Parasitol.* **134**: 422-429.
73. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Segunda Edición, Nueva York, Estados Unidos de Norte América.
74. Sayegh, M. 2005. Desarrollo de vectores de expresión en *Trypanosoma rangeli* basado en las secuencias del promotor ribosomal. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
75. Shaner, N., Campbell, R., Steinbach, P., Giepmans, B., Palmer, A., Tsien, R. 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol.* **21**: 1567-1572.
76. Siemering, K., Golbik, R., Sever, R., Hasseloff, J. 1996. Mutations that supress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Curr Biol.* **6**: 1653-1663.
77. Sykes, R. B., Mathew, M. 1976. The beta-lactamases of gran-negative bacteria and their role in resistance to beta-lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* **2**: 115.

78. Taylor, M., Huang, H., Kelly, J. 2011. Genetic techniques in *Trypanosoma cruzi*. *Adv Parasitol.* **75**: 231-250.
79. Ullu, E., Tschudi, C., Gunzl, A. 1996. *Trans*-splicing in trypanosomaid protozoa: Molecular Biology of Parasitic Protozoa, Editorial IRL Press, Primera Edición, Oxford, Reino Unido.
80. Vanhamme, L., Pays E. 1995. Control of gene expression in trypanosomes. *Microbiol. Rev.* **59**: 223-240.
81. Vázquez, M., Levin, M. 1999. Functional analysis of the intergenic regions of TcP2 β gene loci allowed the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector. *Gene.* **239**: 217-225.
82. Virreira, M., Torrico, F., Truyens, C., Alonso-Veja, C., Solano, M., Carlier, Y., Svoboda, M. 2013. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am. J. Trop. Hyg.* **68**: 574-582.
83. Yao, Z., Che, X., Lu, R., Zheng, M., Zhu, Z., Li, J., Jian, X., Shi, L., Liu, J., Gao, W. 2007. Inhibition by tyrosyleutide (YSL) on the invasion and adhesion of the mouse melanoma cell. *Mol Med.* **13**: 14-21.

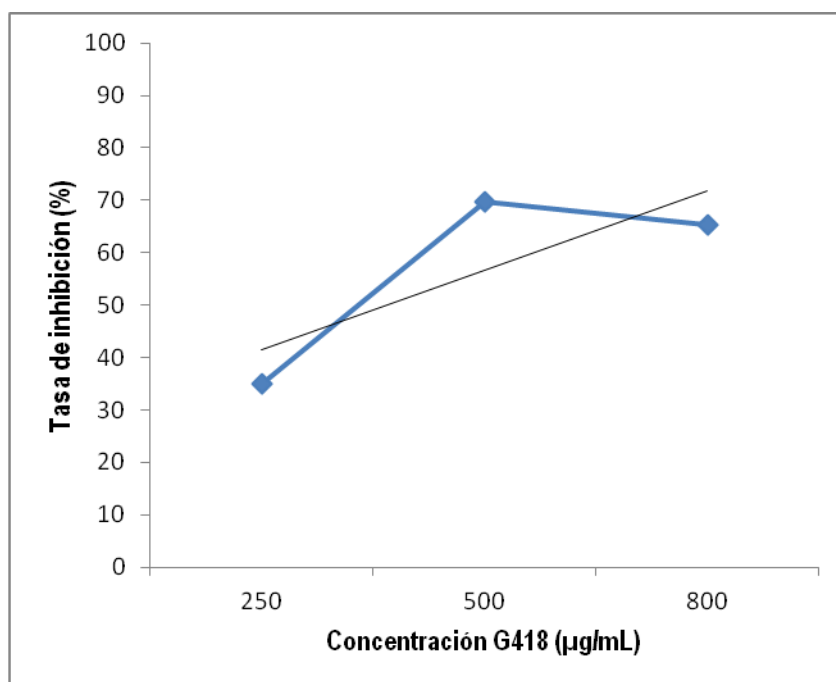
ANEXO 1

$$\% \text{ Inhibición} = \left(1 - \frac{\text{Concentración con droga}}{\text{Concentración control}} \right) \times 100$$

Fórmula para el cálculo del porcentaje de inhibición (Yao y col., 2007)

Valores del porcentaje de inhibición de la cepa *T. cruzi* TGEN/VE/2012/ValleCCS1 al ser expuesta a concentraciones crecientes del antibiótico G418 (0µg/mL, 250µg/mL, 500µg/mL y 800µg/mL) durante el transcurso de seis días.

Concentración de la droga G418 (µg/mL)	Porcentaje de inhibición						Días
	0	1	2	3	4	5	
0	0	0	0	0	0	0	
250	0	0,436681223	71,61290323	35	76,6743649	94,62416746	97,08044528
500	0	33,18777293	74,62365591	69,73684211	91,83987683	96,47954329	98,99180844
800	0	57,20524017	53,97849462	65,26315789	93,14857583	96,86013321	99,36988028



Determinación del IC50 de la droga G418 en la cepa *T. cruzi* TGEN/VE/2012/ValleCCS1.

Tasa de inhibición al tercer día (72 horas) de la cepa *T. cruzi* TGEN/VE/2012/ValleCCS1 al haber sido expuesta a concentraciones crecientes del antibiótico G418: 250µg/mL, 500µg/mL y 800µg/mL. Tasa de inhibición expresada en porcentaje y la concentración de la droga en µg/mL.

$$y = 0.0052712087x + 29.43208791$$

Ecuación de la recta a partir de la regresión lineal calculada a las 72 horas de exposición al antibiótico G418 de la cepa *T. cruzi* TGEN/VE/2012/ValleCCS1

$$IC50 = \frac{50 - 29.43208791}{0.0052712087} = 390$$

Media de la concentración máxima a las 72 horas de exposición al antibiótico G418 de la cepa *T. cruzi* TGEN/VE/2012/ValleCCS1