



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

**Identificación y clonación del gen que codifica la
Proteína Paraflagelar 2 y una secuencia parcial de la
Clatrina de *Trypanosoma vivax***

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre
Universidad Central de Venezuela
por la bachiller Ana Victoria Ibarra Meneses
como requisito parcial para optar al
título de Licenciado en Biología

Tutores: Lic. Bernardo González
Lic. Roxana Gajardo

CARACAS, VENEZUELA

MARZO-2012



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

**Identificación y clonación del gen que codifica la
Proteína Paraflagelar 2 y una secuencia parcial de la
Clatrina de *Trypanosoma vivax***

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre
Universidad Central de Venezuela
por la bachiller Ana Victoria Ibarra Meneses
como requisito parcial para optar al
título de Licenciado en Biología

Tutores: Lic. Bernardo González
Lic. Roxana Gajardo

CARACAS, VENEZUELA

MARZO-2012

A mí Mamí por ser mi amiga, mi maestra, mi TODO.

Gracias por ser, estar y simplemente por EXISTIR.

*"Las ciencias tienen las raíces amargas, pero muy dulces los frutos."
Aristóteles*

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación se ha dado gracias a la ayuda y colaboración de un grupo maravilloso de personas.

Inicialmente, quiero agradecerle al Lic. Bernardo González, mi tutor, por aceptarme en el laboratorio y brindarme su ayuda, sus conocimientos e inmensa colaboración.

A la Lic. Roxana Gajardo o como yo la llamo, mi profe Roxy, por ayudarme en este arduo trabajo y hacer ese gran esfuerzo que está haciendo, muchas gracias profe.

Agradecida infinitamente con mi grupo de laboratorio: Profe Armando, Profe Marta, Lucy, Alpi, Marianita, David, Yare, Caro, Mimi. Le doy las gracias a cada uno de ellos por su inmensa colaboración, compañía, consejos y conocimientos.

Por otro lado, estoy orgullosa de haber estudiado en la UCV, en la Facultad de Ciencias, en donde tuve la oportunidad de conocer personas increíbles. Agradezco a cada uno de mis profesores, que ayudaron en la formación de mi carrera. Agradezco a esas personitas que conocí como compañeras de clase y que ahora son mis mejores amigas con las que he compartido horas de estudio, informes, viajes, entre tantas cosas. Leli, Mariiitaa, Lu, Vic, Nany GRACIAS, las quiero un mundo.

A la Dra. Marisabel Gonzatti y su equipo de laboratorio por brindarme su ayuda y colaboración.

A la Dr. Guillermina Alonso le estoy eternamente agradecida. Gracias por su enseñanza a lo largo de la carrera, por sus consejos, su ayuda y gracias por haber sido mi jurado y haberme ayudado tanto.

A Camila Roffé por estar siempre pendiente de mí desde que era una pichoncita de biólogo hasta estos momentos tan importantes. Gracias. Ahora ya si puedo decirte colega.

Por último pero no menos importante, agradezco a mi familia, especialmente a la mejor mamá del mundo, a mi papi y a mi hermano por apoyarme siempre, por brindarme su apoyo y su inmenso amor.

A mi Josh, por su infinito apoyo, ayuda, confianza, amor y comprensión.

Gracias por confiar en mí.

“Soy de los que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento”.

Marie Curie.

RESUMEN

La tripanosomosis bovina es una enfermedad fatal en bovinos, ovinos, caprinos y bufalinos, siendo *Trypanosoma vivax* su agente causal en Venezuela. Como todos los tripanosomatideos, presenta un flagelo situado en la parte anterior del parásito, que le otorga la movilidad. En el interior del flagelo, se encuentra el filamento paraflagelar (PFR). Entre las distintas proteínas que conforman el PFR se encuentran la proteína paraflagelar 2 (PFR2). La PFR2 es una proteína estructural que cumple un rol importante en la motilidad del parásito. *T. vivax* también presenta una invaginación profunda de la membrana plasmática en la base del flagelo, conocida como bolsillo flagelar. Esta estructura está asociada a los procesos endocíticos y de secreción de moléculas. Diversas proteínas están implicadas en estos procesos, entre ellas se encuentra la clatrina (CLH), una proteína estructural que recubre las vesículas en el proceso de transporte trans-membrana y está asociada en la incorporación de nutrientes al interior del parásito. El objetivo de este trabajo fue identificar y clonar el gen que codifica la PFR2 y la secuencia parcial de la CLH de un aislado venezolano (TvLIEM176) de *T. vivax*. Para ello, se realizaron estudios bioinformáticos que permitieron predecir la secuencia putativa de cada gen. De la secuencia obtenida se diseñaron cebadores para amplificar por PCR el gen que codifica la PFR2 (PFRFF/R) y la secuencia parcial de la CLH (CLHF/R), obteniéndose un único fragmento de 1800pb y de 535pb, respectivamente. El producto de PCR correspondiente al gen que codifica la PFR2 fue tratado con *EcoRV*, obteniéndose dos fragmentos, de 1152pb y de 648pb. El producto de PCR correspondiente a la secuencia parcial de la CLH se trató con la enzima *KpnI*, generando bandas de 432pb y de 103pb, ambas acordes con el tamaño esperado según el mapa de restricción obtenido por bioinformática. Se realizó la clonación de cada inserto en el vector p-GEMT easy. Las colonias fueron analizadas por PCR colony, tratadas con enzimas de restricción y secuenciadas automáticamente. La secuencia del clon se comparó con la secuencia putativa obtenida por bioinformática del gen que codifica la PFR2 y la secuencia parcial de la CLH, mostrando 95% y 99% de identidad respectivamente, siendo éstos los primeros reportes del gen que codifica la PFR2 y la secuencia parcial de la CLH de un aislado en Venezuela de *T. vivax*. Además, se presume que estas dos proteínas podrían servir como posible inmunógeno para el control de la tripanosomosis bovina en Venezuela.

INDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Tripanosomosis	1
1.2 <i>Trypanosoma vivax</i>	2
1.1.1 Clasificación de <i>T. vivax</i>	3
1.1.2 Ciclo de vida de <i>T. vivax</i>	4
1.1.3 Distribución de <i>T. vivax</i>	5
1.1.4 Características morfológicas de <i>T. vivax</i>	7
1.1.4.1 Filamento paraflagelar (PFR).....	10
Proteína paraflagelar 2 (PFR2).....	13
1.1.4.2 Bolsillo flagelar.....	14
1.1.4.2.1 Mecanismos de transporte.....	16
Vía endocítica.....	16
Vía secretora.....	17
1.1.4.2.2 Proteínas del bolsillo flagelar.....	18
Clatrina (CLH)	19
2. ANTECEDENTES	23
2.1 Proteínas paraflagelares (PFR1-PFR2).....	23
2.2 Clatrina (CLH)	25

3. OBJETIVOS.....	29
Objetivo general	29
Objetivos específicos.....	29
4. METODOLOGÍA.....	30
4.1 Obtención de ADN de <i>T. vivax</i> , TvLIEM176, a partir de la infección de un ovejito sano.	31
4.1.1 Grupo experimental.	31
4.1.2 Características del aislado.	31
4.1.3 Infección experimental.....	32
4.1.4 Evaluación parasitológica.....	32
4.1.5 Purificación de un aislado venezolano de <i>T. vivax</i>	33
4.1.6 Extracción de ADN genómico a partir de <i>T. vivax</i> purificado.	34
4.2 Diseño de cebadores para la amplificación del gen que codifica la TvPFR2 y la Tv _n CLH.....	36
4.2.1 Obtención de la secuencia de los genes que codifican la TvPFR2 y la Tv _n CLH.....	36
4.2.2 Diseño de cebadores del gen que codifican la TvPFR2 y la Tv _n CLH.	37
4.3 Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	37
4.3.1 Purificación del producto de PCR.	38
4.3.2 Secuenciación del producto de PCR.....	40

4.3.2.1	Análisis de las secuencias.	40
4.3.3	Confirmación de la secuencia por corte con enzimas de restricción del producto de PCR.	41
4.4	Obtención de los clones pGEMT/TvPFR2 y pGEMT/Tv _n CLH.	43
4.4.1	Preparación de las células electrocompetentes de <i>E. coli</i> TOP10.	43
4.4.2	Reacción de ligación para la formación de los vectores pGEMT/TvPFR2 y pGEMT/Tv _n CLH.	44
4.4.3	Transformación.	45
4.4.4	Ensayo de la reacción en cadena de la polimerasa de la colonia recombinante (PCR colony).	46
4.4.5	Extracción de plásmido (Miniprep).	48
4.4.6	Cortes con enzimas de restricción de los plásmidos recombinantes. ..	50
4.5	Análisis de la secuencia de nucleótidos de los clones obtenidos.	50
4.5.1	Análisis de la secuencia de nucleótidos de los clones TvPFR2 y Tv _n CLH.	51
4.5.2	Alineamiento de las secuencias.	51
4.5.3	Árbol filogenético basado en el análisis de la secuencia de cada proteína de diferentes organismos.	52
4.5.4	Análisis antigénico de la proteína PFR2 y la secuencia peptídica parcial de la CLH.	52

5. RESULTADOS	53
5.1 Proteína paraflagelar 2 de <i>T. vivax</i> (TvPFR2).....	53
5.1.1 Obtención de ADN de <i>T. vivax</i> de un ovino sano.....	53
5.1.2 Diseño de los cebadores a partir de la secuencia putativa del gen que codifica la PFR2.	53
5.1.2.1 Diseño de los cebadores TvPFRF y TvPFRR.....	55
5.1.3 Ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación del TvPFR2.	55
5.1.3.1 Purificación del producto de PCR del TvPFR2.....	57
5.1.3.2 Corte con enzimas de restricción.....	58
5.1.3.3 Secuenciación de TvPFR2.....	59
5.1.4 Clonación del TvPFR2 en el vector de clonación pGEM-T easy.....	60
5.1.4.1 Obtención de colonias recombinantes.....	60
5.1.4.2 Determinación de la presencia del TvPFR2 por PCR de la colonia.....	61
5.1.4.3 Extracción de plásmidos (Miniprep).....	62
5.1.4.4 Cortes con enzimas de restricción.....	63
5.1.5 Comparación y análisis de la secuencia del TvPFR2.	64
5.1.5.1 Árbol filogenético de la proteína PFR2.....	68
5.1.5.2 Características Físico-Químicas de la proteína PFR2.....	69

5.2	Secuencia parcial de la clatrina de <i>T. vivax</i> (Tv _n CLH).....	71
5.2.1	Obtención de ADN de <i>T. vivax</i> de un ovino sano.....	71
5.2.2	Diseño de los cebadores a partir de la secuencia putativa de la secuencia parcial de la clatrina.....	71
5.2.2.1	Diseño de los cebadores TvCLHF y TvCLHR.....	72
5.2.3	Ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la Tv _n CLH.....	73
5.2.3.1	Purificación del producto de la Tv _n CLH.....	75
5.2.3.2	Corte con enzimas de restricción.....	75
5.2.3.3	Secuenciación de la Tv _n CLH.....	77
5.2.4	Clonación de la Tv _n CLH en el vector de clonación pGEM-T easy.....	77
5.2.4.1	Obtención de colonias recombinantes.....	78
5.2.4.2	Determinación de la presencia de la Tv _n CLH por PCR colony....	79
5.2.4.3	Extracción de plásmidos (Miniprep).....	80
5.2.4.4	Cortes con enzimas de restricción.....	80
5.2.5	Comparación y análisis de la secuencia de la Tv _n CLH.	82
5.2.5.1	Árbol filogenético de la secuencia parcial peptídica de la CLH.	84
5.2.5.2	Características Físico-Químicas de la proteína PFR2 y la secuencia peptídica parcial de la CLH.	85
7.	CONCLUSIONES.....	100

8. PERSPECTIVAS.....	102
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103
10. ANEXOS.....	115

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes de la mezcla usada para realizar el corte con la enzima de restricción <i>EcoRV</i> del producto de PCR del gen que codifica la PFR2.....	42
Tabla 2. Componentes de la mezcla usada para realizar el corte con la enzima de restricción <i>KpnI</i> del producto de PCR de la secuencia parcial de la CLH.....	42
Tabla 3. Reactivos usado en la ligación entre el vector pGEMT y el producto purificado de PCR del TvPFR2 y de la Tv _n CLH.....	45
Tabla 4. Secuencia nucleotídica de los cebadores SP6 y T7 que amplifican el inserto de interés.	47
Tabla 5. Componentes de la mezcla de reacción para la amplificación de los genes con los cebadores SP6 y T7.	47
Tabla 6. Condiciones del ciclado del PCR de las colonias.	48
Tabla 7. Secuencia de los cebadores que amplifican el gen que codifica la PFR2.	55
Tabla 8. Componentes de la mezcla de reacción para la amplificación del TvPFR2.	56
Tabla 9. Condiciones de ciclado para la amplificación del gen que codifica la PFR2.....	56

Tabla 10. Secuencia de los cebadores internos que amplifican regiones del gen putativo de la proteína PFR2.	65
Tabla 11. Estudio comparativo, con base en el BLAST, entre el TvPFR2 con distintos organismos a nivel de la cobertura y de la identidad máxima en nucleótidos.....	67
Tabla 12. Estudio comparativo a nivel de la secuencia aminoacídica del TvPFR2 mediante alineamiento con otros tripanosomatideos.	68
Tabla 13. Secuencia de los cebadores que amplifican la secuencia parcial de la CLH.....	73
Tabla 14. Componentes de la mezcla de reacción para la amplificación de la Tv _n CLH.	73
Tabla 15. Condiciones de incubación para la amplificación de la Tv _n CLH.	74
Tabla 16. Estudio comparativo de los nucleótidos de la Tv _n CLH, de la colonia 4, con distintos tripanosomatideos a nivel de cobertura e identidad máxima.	83

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Longitud de un <i>T. vivax</i>	3
Figura 2. Ciclo biológico de <i>T. vivax</i>	4
Figura 3. Distribución geográfica de <i>T. vivax</i> ..	6
Figura 4. Esquema de un <i>Trypanosoma sp.</i>	8
Figura 5. Corte transversal del flagelo de <i>Trypanosoma sp.</i>	11
Figura 6. Esquema del bolsillo flagelar de <i>Trypanosoma</i>	15
Figura 7. Estructura de la clatrina.....	20
Figura 8. Endocitosis mediada por clatrina.....	21
Figura 9. Secuencia aminoacídica de la CLH.	22
Figura 10. Secuencia nucleotídica putativa del gen que codifica la PFR2 de TvY486 de 1800 pb, obtenida según las bases de datos. Mostrando el anclaje (hibridación) de los iniciadores TvPFRF/R.	54
Figura 11. Registro digital de la corrida electroforética de los productos de amplificación por PCR del TvPFR2 en un gradiente de temperatura de hibridación, con los cebadores TvPFRF y TvPFRR.....	57
Figura 12. Registro digital de la corrida electroforética del producto de PCR purificado del TvPFR2.....	58
Figura 13. Mapa de restricción de la secuencia putativa del gen que codifica la PFR2 utilizando el programa NEBCUTTER..	58

Figura 14. Registro digital de la corrida electroforética de los productos del corte con la enzima EcoRV del TvPFR2.....	59
Figura 15. Placas LB con la transformación en <i>E. coli</i> . TOP10/PFR2/pGEMT..	61
Figura 16. . Registro digital de la corrida electroforética de los productos de PCR de las colonias obtenidas de la transformación del TvPFR2.....	62
Figura 17. Registro digital de la corrida electroforética de los productos de ADN plasmídico purificado correspondientes al TvPFR2.....	63
Figura 18. Registro digital de la corrida electroforética de los productos de la digestión del ADN plasmídico de la colonias 1 y 2, que poseen el TvPFR2, con las enzimas <i>EcoRI</i> y <i>EcoRV</i>	64
Figura 19. Registro digital de la corrida electroforética de los productos de PCR con los cebadores SP6 y T7, TvPFRF y TvPFRR; TvPFRF1 y TvPFRR1; TvPFRF2 y TvPFRR2.....	65
Figura 20. Alineación entre la secuencia del TvPFR2, de la colonia 1, y la secuencia del TvY486PFR2, utilizando el programa Multialin.	66
Figura 21. Árbol filogenético de la secuencia aminoacídica de la PFR2 de distintos tripanosomatideos.	69
Figura 22. Predicción de antigenicidad, hidrofobicidad, hidrofobicidad y accesibilidad al solvente de la proteína PFR2 de TvLIEM176, utilizando el programa Antheprot.....	70

Figura 23. Secuencia nucleotídica putativa de la secuencia parcial de la CLH de TvY487 de 535 pb, obtenida según las bases de datos. Mostrando el anclaje de los cebadores TvCLHF/R.....	72
Figura 24. Registro digital de la corrida electroforética de los productos de amplificación por PCR de la Tv _n CLH en un gradiente de temperatura de hibridación, con los cebadores TvCLHF y TvCLHR.	74
Figura 25. Registro digital de la corrida electroforética de los productos de PCR purificado de la Tv _n CLH.....	75
Figura 26. Mapa de restricción de la Tv _n CLH utilizando el programa NEBCUTTER.....	76
Figura 27. Registro digital de la corrida electroforética de los productos del corte con la enzima de restricción <i>Kpn</i> I de la Tv _n CLH.	76
Figura 28. Alineamiento de la secuencia de la Tv _n CLH, obtenida por secuenciación automática, con la secuencia parcial putativa de la CLH de TvY486, utilizando el programa Multialin	77
Figura 29. Transformación en <i>E.coli</i> TOP10/Tv _n CLH/pGEMT	78
Figura 30. Registro digital de la corrida electroforética de los productos PCR de las colonias obtenidas de la transformación de la Tv _n CLH.	79
Figura 31. . Registro digital de la corrida electroforética de los productos de ADN plasmídico purificado correspondientes a la Tv _n CLH.....	80

Figura 32. Registro digital de la corrida electroforética de los productos de la digestión del ADN plasmídico de las colonias que poseen la TvCLH, con las enzimas <i>EcoRI</i> y <i>KpnI</i>	81
Figura 33. Alineación a nivel de nucleótidos de la Tv _n CLH, de la colonia 4, con la secuencia parcial de la CLH de TvY486, utilizando el programa Multialin. ...	82
Figura 34. Árbol filogenético de la secuencia peptídica de la CLH de TvLIEM176.....	84
Figura 35. Predicción de antigenicidad, hibrofobicidad, hidrofobicidad y accesibilidad al solvente del gen que codifica la CLH de TvY486 utilizando el programa Antheprot.....	85
Figura 36. Secuencia nucleotídica del sitio de inserción del los cebadores T7/SP6, correspondiente al vector pGEMT.....	91
Figura 37. Mapa del vector pGEMT easy. En el lateral se observan las enzimas de restricción que cortan el vector.....	92

ABREVIACIONES

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADN_{o,i}: ADN ovino infectado

AG: Aparato de Golgi

Amp: Ampicilina

Blast: Basic local alignment search tool

BSA: Albúmina sérica bovina

CLH: Clatrina

CRAM: Proteína de membrana rica en cisteína

° C: Grados centígrados

DEAE: Dietilaminietil

dNTPs: Desoxinucleótidos-trifosfato (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)

D.O: Densidad óptica

EDTA: Ácido etilendiamino tetraacético

FAZ: Zona de adhesión al flagelo

HDL: Lipoproteína de alta densidad

HPHBr: Receptor de haptoglobina-hemoglobina

Ig: Inmunoglobulina

IPTG: isopropil- β -D-tiogalactósido

ISG: Glicoproteínas invariantes de superficie

Kb: Kilobases

Medio LB: Medio Luria-Bertani

MgCl₂: Cloruro de magnesio

min: minutos

mL: Mililitro

μL: microlitros

mM: Milimolar

NaCl: Cloruro de sodio

NCBI: National Center for Biotechnology Information

O.N: Overnight (toda la noche)

ORF: Marco abierto de lectura

PBS: Buffer fosfato sódico

PBSG: Buffer fosfato sódico glucosado

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PFR: Filamento paraflagelar

PFR1: Proteína paraflagelar 1

PFR2: Proteína paraflagelar 2

RE: Retículo endoplasmático

SDS: dodecilsulfato sódico

T.A: Temperatura ambiente

TAE: Tris-acetato-EDTA

T.E: Buffer Tris-EDTA

Taq: ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*

T. brucei: *Trypanosoma brucei*

T. cruzi: *Trypanosoma cruzi*

T. evansi: *Trypanosoma evansi*

TFR: Receptor de transferrina

Tryp/mL: Trypanosoma/mililitro

T. vivax: *Trypanosoma vivax*

TvPFR2: Gen que codifica la PFR2 de *T. vivax*

Tv_nCLH: Secuencia parcial de la región N-terminal de la CLH de *T. vivax*

U.E.G.F: Unidad de estudios genéticos y forenses

V: Voltios

VSG: Glicoproteínas variantes de superficie

xg: Fuerza centrífuga

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Tripanosomosis

La tripanosomosis animal es una enfermedad debilitante y comúnmente fatal en los animales domésticos, especialmente en bovinos y pequeños rumiantes de diferentes edades, sexos y razas, producida por diferentes especies de tripanosomas (Dávila y Silva, 2000; Tafur y col., 2002). Entre los síntomas principales se presentan fiebre, anemia severa, trastornos reproductivos, pérdida de la condición corporal, y de la capacidad reproductiva tanto en machos como en hembras, lo que trae como consecuencia pérdidas significativas en la producción de carne y leche y muertes ocasionales (De Stefano y col., 1999; Desquesnes, 2004).

T. vivax es considerado el principal agente causal de la tripanosomosis bovina a nivel mundial (Rivera, 1996). Dicha enfermedad presenta tres fases durante la infección: La fase prepatente, la fase aguda y la fase crónica. La fase prepatente oscila desde la inoculación del parásito hasta que aparecen los parásitos en sangre. Posteriormente, se encuentra la fase aguda, caracterizada por altas parasitemias, encontrándose alrededor de 10^6 parásitos/mL, junto con un aumento de la temperatura y una disminución del hematocrito (Rivera, 1996). Finalmente, si el animal supera estas altas parasitemias, se encuentra la fase crónica, que puede durar meses e incluso años. Esta etapa se caracteriza por niveles bajos de hematocrito y hemoglobina, observándose hemorragias por la superficie de las mucosas, cavidad corporal, músculos, corazón, ganglios linfáticos y baja parasitemia, persistiendo la anemia en ausencia de parásitos en sangre (Gardiner, 1989; Anosa, 1988; Suárez y col., 2003).

1.2 *Trypanosoma vivax*

La presencia de *T. vivax* en América, fue reportada por primera vez por Leger y Vienne en 1919, en la Guayana Francesa, desde entonces se ha extendido en el continente llegando a Brasil y a tierras bajas de Bolivia. Se cree que este parásito llegó al continente americano desde África mediante bovinos infectados (Curasson, 1943) y después se difundió a distintas regiones del continente a causa de los traslados de los animales. En Venezuela, fue identificado por primera vez por Tejera (1920) y desde ese momento, se han realizado estudios acerca de su morfología, fisiología, relación parásito-hospedador, así como los aspectos clínicos de la enfermedad.

T. vivax es un hemoparásito, flagelado, unicelular eucariota que afecta principalmente a bovinos, ovinos, caprinos, camélidos y bufalinos; siendo los bovinos los principales hospedadores y los búfalos los menos susceptibles (Dávila y Silva, 2000). Entre los rasgos morfológicos más destacados, se encuentran: una membrana ondulante bien desarrollada y adosada a un flagelo libre, el cinetoplasto redondeado y pequeño, cercano al extremo posterior del parásito el cual finaliza en forma cónica y un núcleo redondeado, ubicado en posición central (Hoare, 1972).

Según Legar y Vienne (1919), en las cepas suramericanas existen variaciones de tamaño de 16 a 26,5 μm de longitud y un ancho de 1-3 μm . Estudios realizados por Gómez (2011) de las dimensiones del parásito indican que el tamaño de *T. vivax* en Venezuela, oscila entre 18 y 24 μm de largo (en promedio $21,00 \pm 2,00 \mu\text{m}$) (Figura 1).

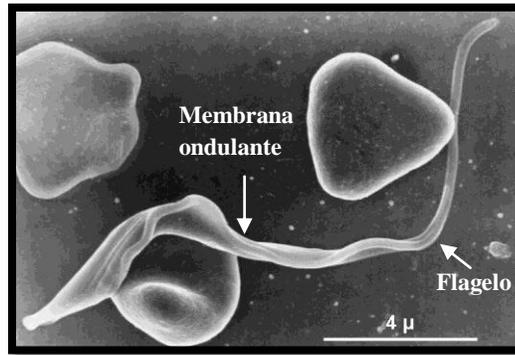


Figura 1. Longitud de un *T. vivax*. (Cortesía del Dr. Ely Gómez).

1.1.1 Clasificación de *T. vivax*.

Taxonómicamente de acuerdo a Levine y colaboradores (1980) y Soulsby (1987), *T. vivax* se clasifica de la siguiente forma:

- Reino** Animalia
 - Subreino** Protozoa
 - Phylum** Sarcomastigophora
 - Subphylum** Mastigophora
 - Clase** Zoomastigophora
 - Orden** Kinetoplastida
 - Suborden** Trypanosomatina
 - Familia** Trypanosomatidae
 - Género** *Trypanosoma*
 - Subgénero:** *Duttonella*
 - Especie** *vivax*.
- 

En 1972, Hoare divide el género *Trypanosoma* en dos importantes secciones. La Sección Stercoraria, que son flagelados metacíclicos que se desarrollan en el tubo digestivo del vector y son transmitidos por las heces. Se caracterizan por presentar un gran cinetoplasto, su extremo posterior es en punta aguda y se multiplican de manera discontinua en los vertebrados, como amastigotes o epimastigotes. Por otro lado, la

sección Salivaria, son flagelados metacíclicos que se transmiten a través de glándulas salivales del vector. Estos organismos se caracterizan por la terminación en punta redondeada (Alves y col., 2008) y se multiplican de una manera continua como tripomastigotes (Brenner, 1979). Según la clasificación de Hoare (1972), *T. vivax* se ubica en la Sección Salivaria.

1.1.2 Ciclo de vida de *T. vivax*.

En África, *T. vivax* es transmitido cíclicamente por la mosca tsetse y mecánicamente por otras moscas hematófagas (Figura 2A). Mientras que en el continente Americano la transmisión es de tipo mecánica (Figura 2B), cuyos vectores son las moscas de los establos y tábanos (Hoare, 1972).

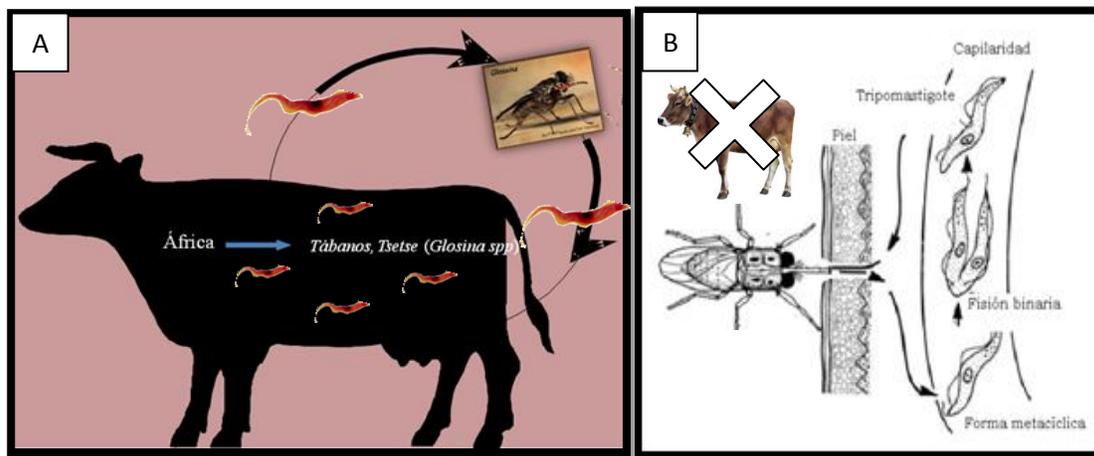


Figura 2. Ciclo biológico de *T. vivax*. A) Transmisión cíclica (Modificado de Desquesnes, 2004) B) Transmisión mecánica (Modificado de Gardiner y col., 1989)

La transmisión cíclica requiere de la participación de dos hospedadores: 1) Invertebrados (dípteros hematófagos), como *Glossina* sp y 2) Vertebrados

(mamíferos). Dentro del díptero hematófago, el parásito es capaz de multiplicarse y permanecer en la fase infectiva durante toda la vida del insecto; desarrollándose en la proboscis del díptero donde la forma tripomastigote se transforma en epimastigote. El paso más importante es la formación de los tripomastigotes metacíclicos que son los únicos que infectan a los hospedadores vertebrados (Figura 2A) (Osorio y col., 2008).

En América, debido a la ausencia de la mosca tsetsé, la transmisión de *T. vivax* se hace de forma mecánica, principalmente por dípteros como Tabanidae y *Stomoxys* sp, sin la multiplicación ni crecimiento del parásito en el hospedador invertebrado. Por lo que la transmisión es directa, y el parásito es capaz de dividirse dentro del hospedador mamífero por fisión binaria (Figura 2B). La transmisión también puede darse mediante el uso de agujas e instrumentos contaminados (vía iatrogénica) (Hoare, 1972).

1.1.3 Distribución de *T. vivax*

T. vivax está ampliamente distribuido a nivel mundial, siendo las zonas tropicales de África y América de Sur las de mayor impacto. Así mismo se han encontrado reportes en el Este de la India (Hoare, 1972). En Latinoamérica, la tripanosomosis está distribuida desde Centro América hasta Suramérica, siendo los países más afectados: Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guyana francesa, Panamá, Paraguay, Perú y Venezuela (Figura 3). Existen reportes de una región de Brasil, conocida como el Pantanal, que colinda con Bolivia, donde en

1988 hubo un gran brote, que causó la expansión de *T. vivax* en ambos países. (Seild y col., 1999; Gonzales y col., 2007).

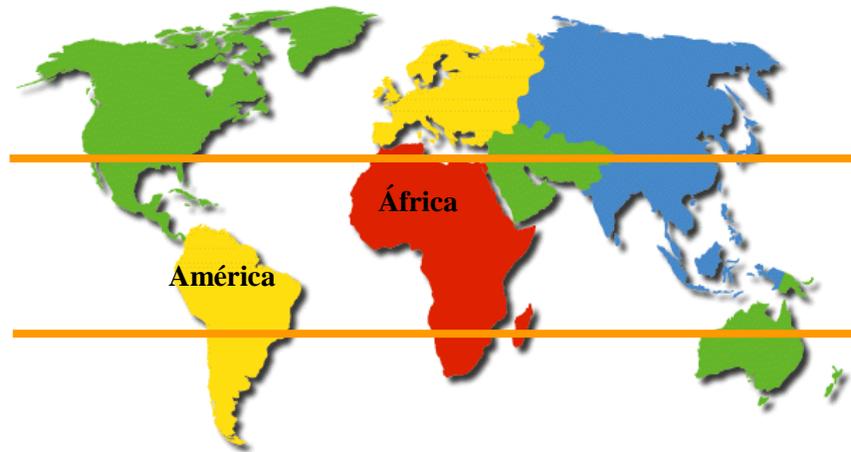


Figura 3. Distribución geográfica de *T. vivax*. Las líneas amarillas sesgan la distribución de *T. vivax* a nivel mundial (Cortesía Dr. Armando Reyna).

En Venezuela, este patógeno está ampliamente distribuido por todo el país, presentando una mayor prevalencia en zonas ganaderas bovinas (llanos venezolanos) (Toro y col., 1980; Wells, 1987; Tamasaukas y col., 2006). Reportes de Toro (1990) confirman que en la región de los llanos se encuentra la mayor prevalencia de tripanosomosis bovina en Venezuela (39%). Otros investigadores, como Reyna (2007), demuestran la presencia de *T. vivax* en el estado Miranda, Sur del estado Guárico, Anzoátegui y Monagas. Por otro lado, Simoes y colaboradores (2009) realizaron estudios en las diferentes zonas ganaderas de Venezuela, reportando el parásito en los llanos, en el sur de lago de Maracaibo y en las regiones centro occidental andina.

Debido a que la tripanosomosis bovina ocasiona en los hospedadores debilitamiento, enflaquecimiento, pérdida en la condición corporal, trastornos reproductivos, entre otros, que traen como consecuencia una disminución de los productos derivados de los mismos, como la leche, la carne y el queso. Todo esto, afecta a la producción pecuaria, ya que al haber escases de los productos hay un aumento de los precios. Desquesnes (2004), señaló el impacto económico de la tripanosomosis en el ganado en Venezuela, indicando una tasa de mortalidad cercana al 40%. Por lo que, es importante el estudio de este hemoparásito, ya que hay pocos reportes. En este trabajo lo que se quiere es identificar proteínas que sirvan como diana terapéutica para el control de la tripanosomosis en Venezuela.

1.1.4 Características morfológicas de *T. vivax*

La estructura de *T. vivax* está constituida por diferentes organelos que son fundamentales para el desarrollo y supervivencia del parásito. A nivel de su organización interna, *T. vivax* presenta una sola mitocondria en forma reticular que se extiende a todo lo largo del cuerpo del flagelado. En el interior de la mitocondria, situado en las adyacencias del cuerpo basal del flagelo, se encuentra aglomerado el ADN mitocondrial, formando una estructura conocida como cinetoplasto (Figura 4) (Bastin y col., 2000; Field y Carrington, 2009).

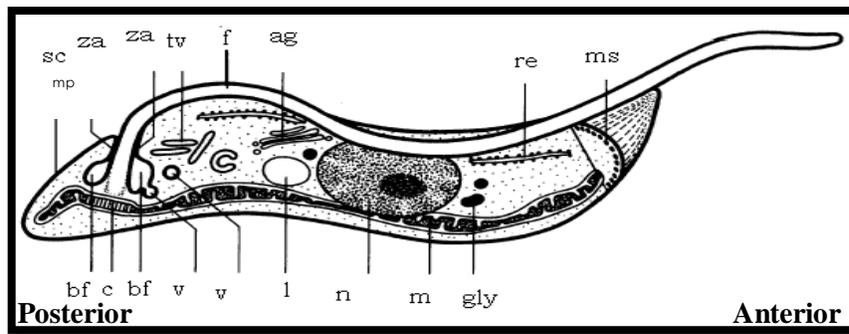


Figura 4. Esquema de un *Trypanosoma sp.* El diagrama es un bosquejo que muestra la localización de organelos y estructuras principales. **mp**, membrana plasmática; **za**, zona de adhesión; **tv**, estructura tubulovesicular; **f**, flagelo; **ap**, aparato de golgi; **re**, retículo endoplasmático; **ms**, microtubulos subpeliculares; **bf**, bolsillo flagelar; **c**, cinetoplasto; **v**, vesículas; **l**, lisosoma; **n**, núcleo. **m**, mitocondria; **gly**, glicosoma. (Modificado de Landfear e Ignatushchenko, 2001).

El citoplasma es rico en gránulos y vesículas, en él se encuentran lisosomas y material lipídico (lipo-proteico o glico-proteico) (Bastin y col., 2000). Adicionalmente, en el citoplasma se observa organelos acídicos que acumulan grandes cantidades de calcio y polifosfato conocidos como ácidocalcisomas (Kornberg, 1995), siendo estos el principal reservorio de cationes y fósforo, además participan en el metabolismo del polifosfato, de la homeostasis del calcio, del mantenimiento del pH intracelular y de la regulación osmótica (Do Campo, 2005). También se observan glicosomas, que son organelos que poseen una forma ovalada o redondeada, cubiertos de una sola membrana. En los glicosomas se localizan enzimas glicolíticas, que son de vital importancia para la supervivencia del parásito y actúan como contenedores de actividades metabólicas (Michels y col., 2000).

El núcleo se encuentra rodeado por un envoltorio compuesto por dos membranas yuxtapuestas que presentan poros. De la membrana citoplasmática

emergen túbulos continuos con el retículo endoplasmático que se ramifican en el citoplasma. El nucléolo es central, prominente y muy denso (Vickerman, 1974). Existe un retículo endoplásmico (RE) que está disperso en el citoplasma (Duszenko y col., 1988). El aparato de Golgi (AG) está situado en el centro de la vía secretora, cuya función es la de agregar carbohidratos complejos a lípidos de membrana y proteínas sintetizadas nuevamente en el RE que serán secretadas al medio extracelular o integradas a membranas (Landfear e Ignatushchenko, 2001)

La superficie celular de los tripanosomatidos posee dos componentes asociados: la membrana plasmática, y una extensa capa de microtúbulos subpeliculares asociados a ella (Landfear e Ignatushchenko, 2001). Los microtúbulos subpeliculares son estructuras asociadas a la membrana plasmática, cuya función es evitar la absorción de nutrientes por pinocitocis a lo largo de la superficie celular (Gadelha y col., 2009); excepto en el bolsillo flagelar, la cual es la estructura donde se realizan los procesos de endocitosis y secreción que se llevan a cabo en tripanosomátideos (Landfear e Ignatushchenko, 2001).

El sistema locomotor presenta un solo flagelo, el cual se inserta en el bolsillo flagelar. El flagelo está situado en la parte anterior, otorgándole movilidad al parásito. Presenta unos pliegues de los túbulos que lo conforman y tiene una membrana ondulante que une el flagelo al cuerpo del parásito (De Souza, 2002). Además de una estructura de nueve pares de microtúbulos con disposición de anillo y un par de microtúbulos centrales libres, envueltos por una vaina flagelar conocida como axonema y junto a esta se encuentra una estructura filamentosa altamente

organizada que lo acompaña en toda su longitud denominada filamento paraflagelar (Bastin y col., 2000; Vaughan y Gull, 2003).

En el filamento paraflagelar y en el bolsillo flagelar se encuentran la proteína paraflagelar 2 y la clatrina, respectivamente, los cuales se desarrollan a continuación. Estas dos proteínas son importantes en la supervivencia del parásito, la primera está relacionada con el movimiento del mismo y la segunda con la formación de vesículas que permiten la entrada y salida de nutrientes (Morgan y col., 2001; Abdille y col., 2008).

1.1.4.1 Filamento paraflagelar (PFR)

El filamento paraflagelar (PFR) es una estructura filamentosa que se extiende desde el punto donde está anclado el flagelo al bolsillo flagelar y corre a lo largo de éste y del axonema de los kinetoplastideos flagelados (Bastin y col., 2000; Miranda y col., 2010). Esta estructura es detectada junto con el axonema una vez que el flagelo sale del bolsillo flagelar y se extiende hasta el extremo anterior. Está estrechamente relacionada con los dobletes 4 y 7 del axonema a través de filamentos específicos (Figura 5). La posición del flagelo en relación al cuerpo celular está definida por el PFR (McKean y col., 2003).

El PFR es una estructura compleja, trilaminar formada por tres dominios, definidos por la posición en el axonema: un dominio proximal corto, un dominio intermedio y uno distal más desarrollado (Figura 5). Los dominios proximal y distal presentan estructura similares, con varios sacos apilados entre sí paralelamente. Por

otro lado, el dominio intermedio está compuesto por filamentos delgados que unen los otros dos dominios. El PFR está físicamente conectado al axonema a través de fibras con forma de letras "V", que se fijan al dominio proximal (Figura 5) (De Souza y Souto-Padrón, 1980; Maga y col., 1999; Landfear e Ignatushchenko, 2001).

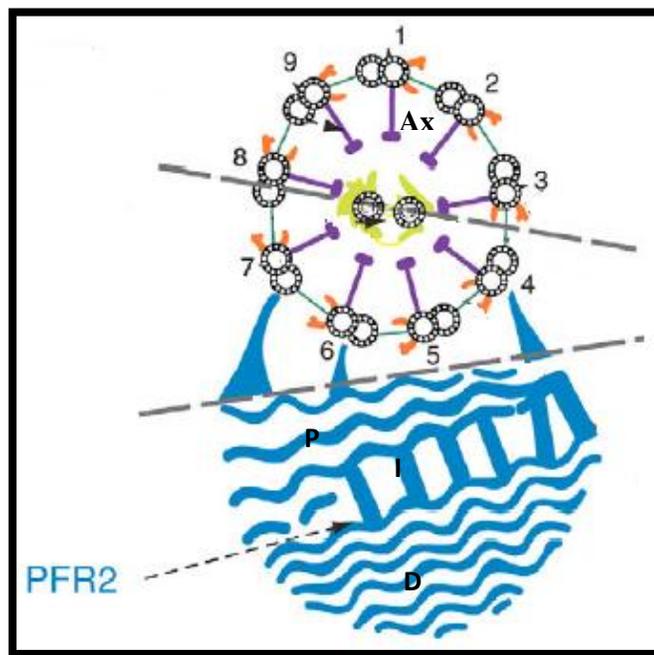


Figura 5. Corte transversal del flagelo de *Trypanosoma* sp. El filamento paraflagelar (PFR) está dividido en tres dominios: D: distal; I: intermedio; P: proximal. Presenta un axonema (Ax) (Modificado de Branche y col., 2006).

Inicialmente se creía que el PFR le daba un atributo físico al flagelo (Fuge, 1969). Estudios posteriores demostraron que el PFR presenta funciones metabólicas, reguladoras, de señalización y de motilidad. Por un lado, cumple una función metabólica, ya que está estrechamente relacionado con el bolsillo flagelar, el cual se encarga de controlar el metabolismo del parásito. Cumple una función reguladora, ya que controla la regulación de los genes por mecanismos post-

transcripcionales y transcripción del ARN. Finalmente, cumple una función de señalización del calcio, ya que existe una interacción específica entre la calmodulina y los componentes del PFR que permiten el desplazamiento del parásito (Bastin y col., 1996; Portman y Gull, 2010).

Cuando el PFR no está correctamente estructurado, no se puede completar la citocinesis (Broadhead y col., 2006), dando lugar a células con núcleos múltiples, cinetoplastos y flagelos y, por lo tanto, no se induce la movilidad (Portman y Gull, 2010).

Se han asociado gran cantidad de proteínas al PFR a través de estudios bioquímicos, bioinformáticos e inmunológicos, aunque las funciones de éstas aún se desconocen (Woodward y col., 1994). Schlaeppi y colaboradores (1989) y Portman y Gull, 2010 demostraron que existen dos proteínas principales que forman el PFR: la proteína paraflagelar 1 (PFR1) y la proteína paraflagelar 2 (PFR2). La zona proximal del PFR está formada principalmente de filamentos compuestos de PFR1. Por lo tanto, los dominios intermedio y distal del PFR deben contener la mayor parte de la proteína PFR2 (Maga y col., 1999). La PFR1 tiene una masa molecular que varía entre 70– 80 KDa, mientras que la PFR2 varía entre 65- 72 KDa.

Proteína paraflagelar 2 (PFR2)

La PFR2 es altamente organizada y está directamente relacionada con la motilidad del parásito (Clark y col., 2005; Abdille y col., 2007). Las mutaciones nulas del gen PFR2 han evidenciado que la estructura del PFR es necesaria para la motilidad y viabilidad del parásito (Morell y col., 2005). Estas mutaciones ocasionan la producción de parásitos con baja velocidad de movimiento y graves perturbaciones en la onda del mismo (Deflorin y col., 1994; Ladon, 1996; Santrich y col., 1997; Maga y col., 1999).

En *Leishmania* sp y *Trypanosoma brucei* la masa molecular de la PFR2 corresponde a 69 KDa (Portman y Gull, 2010). El mecanismo de regulación es post-transcripcional, ocurriendo a través de corte y empalme, poliadenilación, estabilidad del ARNm, traducción y estabilidad de las proteínas (Vanhamme y Pays, 1995; Moore y col., 1996).

En vista de que no hay reportes del gen que codifica la PFR2 de *T. vivax* y que los tratamientos actuales para la tripanosomosis bovina son insuficientes y los fármacos utilizados son altamente tóxicos, el estudio de esta proteína es necesario para la búsqueda de posibles inmunógenos que sirvan para el control de la tripanosomosis (Bastin y col., 1998).

1.1.4.2 Bolsillo flagelar

A medida que transcurre el ciclo de vida del tripanosoma, el flagelo sufre una serie de cambios que dan lugar a la aparición del bolsillo flagelar, en donde ocurren los procesos pinocíticos, endocíticos y exocíticos (Absalon y col., 2008).

El bolsillo flagelar es una invaginación profunda de la membrana plasmática en la base del flagelo, que varía en tamaño de acuerdo al estadio del ciclo de vida del parásito. Esta estructura es dinámica y está asociada a los procesos de intercambio de nutrientes, proteínas, partículas, entre el interior y el exterior del parásito (Landfear e Ignatushchenko, 2001; Field y Carrington, 2009).

El bolsillo flagelar está ubicado en el extremo posterior del tripanosoma y rodeado por el desmosoma y una zona de adhesión (Figura 6A) (Landfear e Ignatushchenko, 2001). Está compuesto por microtúbulos especializados que se encuentran a lo largo de su superficie. Estos microtúbulos, se integran en la matriz y se convierten en microtúbulos subpeliculares asociados a la zona de fijación del flagelo (FAZ). Por lo tanto, estos microtúbulos definen el eje del flagelo y sus estructuras asociadas (Bastin y col., 2000).

Existe un lugar donde se ancla el flagelo al bolsillo flagelar, conocido como collar del bolsillo flagelar (Figura 6B), un cuarteto de microtúbulos integrados a los microtubulos subpeliculares que definen el eje de entrada del flagelo. Al mismo tiempo, se encuentra el collarete del bolsillo flagelar, el cual consiste en un conjunto de fibras que son localizadas fuera de la membrana del flagelo, en el lumen del bolsillo flagelar. El collarete sirve para fijar la membrana y el axonema.

Además, en el bolsillo flagelar ocurre la degradación de anticuerpos específicos contra las glicoproteínas variantes de superficie (VSG) y así mismo, ocurren los procesos de reciclaje de las mismas, contribuyendo en la defensa en contra de la respuesta del sistema inmune (Absalon y col., 2008; Field y Carrington, 2009).

1.4.1.2.1 Mecanismos de transporte

Los diferentes mecanismos de transporte permiten al parásito adquirir nutrientes y expulsar de su interior desechos del metabolismo. Por lo que, a continuación se describirán diferentes vías de transporte que ocurren en el bolsillo flagelar de los tripanosomas.

Vía endocítica

La endocitosis es un proceso en el cual las moléculas grandes y el material particulado son internalizados. Una porción de la membrana plasmática rodea al material que va a ser tomado, formándose una vacuola o vesícula, dependiendo del tamaño de la partícula (Lodish, 2005). Existen tres tipos de endocitosis: la fagocitosis, la pinocitosis y la endocitosis mediada por un receptor. En la fagocitosis, una partícula de gran tamaño se une a la superficie, conduciendo a la expansión de la membrana e incorporándola al interior del parásito a través de la formación de una vacuola. En la pinocitosis, gotas líquidas son invaginadas por la membrana plasmática e internalizadas, formando vesículas. Y finalmente, en la endocitosis mediada por receptor, los receptores proteícos se unen a un ligando particulado, ocasionando la invaginación de la membrana dando lugar a la

formación de una vesícula. En el proceso de endocitosis, las vesículas endocíticas son desprendidas de la membrana del bolsillo flagelar, en donde las moléculas a ser endocitadas y/o las proteínas cargadas son enviadas al compartimiento endosoma/lisosoma o son reciclados a la superficie (Coppens y col., 1987). En los tripanosomatideos, todos los eventos endocíticos, ya sea mediado por un receptor, fagocitosis o pinocitosis, se inician en la membrana del bolsillo flagelar (Landfear e Ignatushchenko, 2001).

Vía secretora

La secreción es un proceso de segregación y liberación al exterior de sustancias químicas en una célula. La sustancia secretada puede tener una cierta función, más que ser un desecho, como es el caso de la sustancia expulsada por exocitosis. Un claro ejemplo del proceso de secreción de los tripanosomatideos es el mecanismo que ocurre en el complejo de las proteínas variantes de superficie (VSG) -Inmunoglobulinas (Ig). El complejo VSG-Ig entra al bolsillo flagelar asociado al plasma de la membrana. Los anticuerpos específicos de las VSG presentes en el interior del parásito, se encargan de la degradación y reciclaje de las mismas, contribuyendo así, con la defensa en contra de la respuesta inmune adaptativa del hospedador. A causa de esto, las VSG se reciclan eficazmente a la superficie y las Ig son degradadas (Field y Carrington, 2009). Este proceso de reciclaje o liberación de partículas implica la fusión de vesículas, que contienen la

sustancia a secretar, con la membrana citoplasmática de la célula, liberándose así el contenido de la vesícula al exterior de la célula (Landfear e Ignatushchenko, 2001).

En el proceso de secreción de los tripanosomas, participan diversos organelos del parásito, los cuales están asociados al bolsillo flagelar. En concreto, las membranas del RE se encuentran unidas al bolsillo flagelar, al igual que el AG (Lacomble y col., 2009).

En la vía secretora, las proteínas de membrana son exportadas desde el RE hacia el bolsillo flagelar. Desde el bolsillo, la superficie de proteínas de la cubierta y algunas glicoproteínas invariables de superficie (ISG) están en continuo movimiento en su superficie y cubren el cuerpo del parásito, mientras que los receptores para la absorción de macromoléculas están exclusivamente retenidos en el bolsillo flagelar (Borst y Fairlamb, 1998; Morgan y col., 2002).

Estudios realizados por Field y Carrington (2009), aseguran la presencia de VSG, en el RE, AG y en el transporte de vesículas. Sugiriendo que el paso de las VSG, ocurre a través del bolsillo flagelar y de la superficie de la célula.

1.1.4.2.2 Proteínas del bolsillo flagelar

En el proceso de transporte de nutrientes en el bolsillo flagelar están implicadas diversas proteínas, tales como el receptor Haptoglobina-Hemoglobina (HPHBR), la clatrina (CLH), una proteína de membrana rica en cisteína (CRAM), el receptor de transferrina (TFR), receptor de Lipoproteínas de alta densidad (HDLr), vesículas de transporte interno como rab11, rab5, entre otras (Landfear e

Ignatushchenko, 2001). Entre estas proteínas, la clatrina, una proteína estructural del bolsillo, que está estrechamente relacionada con el proceso de endocitosis de los tripanosomas.

Clatrina (CLH)

La Clatrina (CLH) es una proteína estructural oligomérica que recubre las vesículas en el proceso de transporte trans-membrana, y está asociada en la incorporación de nutrientes al interior del parásito. Tiene una masa molecular de 191.231 kDa y 5100 pb. Su estructura consiste en tres dominios, constituidos por tres cadenas pesadas y tres cadenas ligeras; ensamblándose en una unidad conocida como trisquelion (Figura 7A). La cadena pesada está compuesta por un dominio globular N-terminal, un segmento del dominio distal, un segmento proximal, y un C-terminal, los cuales permiten la interacción con proteínas endocíticas en el bolsillo flagelar de los tripanosomas. Del mismo modo, las cadenas ligeras, se encuentran unidas al dominio proximal de las cadenas pesadas, regulando así el ensamblaje de los trisqueliones (Wakeham y col., 2003; Mousavi y col., 2004).

En el ensamblaje de esta proteína cada lado es poligonal, compuesto por dos segmentos de dominio proximal y distal anti-paralelos, formado por cuatro trisqueliones superpuestos (Figura 7B). Los trisqueliones unidos a la membrana, conforman una caja poliédrica que ocasiona la invaginación de la misma, que será regulada por las cadenas de CLH (Correa y col., 2007).

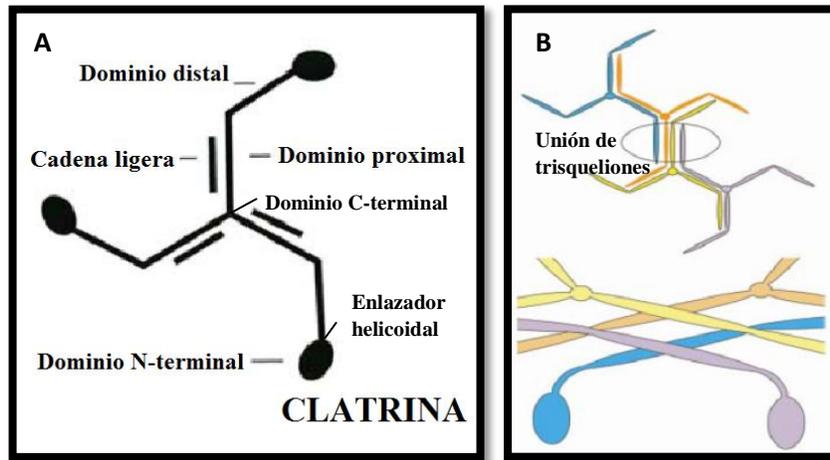


Figura 7. Estructura de la clatrina. **A.** Representación de un trisquelión, se observa las cadenas pesadas y las cadenas ligeras de la proteína. **B.** Interacción de los trisqueliones. (Modificado de Mousavi y col., 2004).

Morgan y colaboradores (2001) demostraron que la CLH se localiza en el bolsillo flagelar y está asociada a la red trans-Golgi. La localización subcelular de CLH sugiere que se han conservado las funciones, mediando la endocitosis y el transporte desde la red trans-Golgi al endosoma y lisosoma en tripanosomas (Hung y col., 2004).

El tráfico vesicular mediado por CLH, es un mecanismo muy importante dentro del bolsillo flagelar, en el cual las proteínas y los lípidos son transportados desde la membrana del bolsillo hacia los organelos del tripanosoma (endocitosis) (Kirchhausen, 2000; Owen y Luzio, 2000) y hacia las vacuolas y lisosomas (Hirst y Robinson, 1998). Durante la formación de vesículas, la CLH interactúa de forma coordinada con otras proteínas de la vesícula en formación, tales como proteínas adaptadoras (AP), y selectivamente recluta moléculas de carga específicas en

vesículas e interviene otras moléculas como AP180, auxilina, epsin15 y epsin, que tienen funciones regulatorias (Figura 8) (Kirchhausen, 1999; Mousavi y col., 2004).

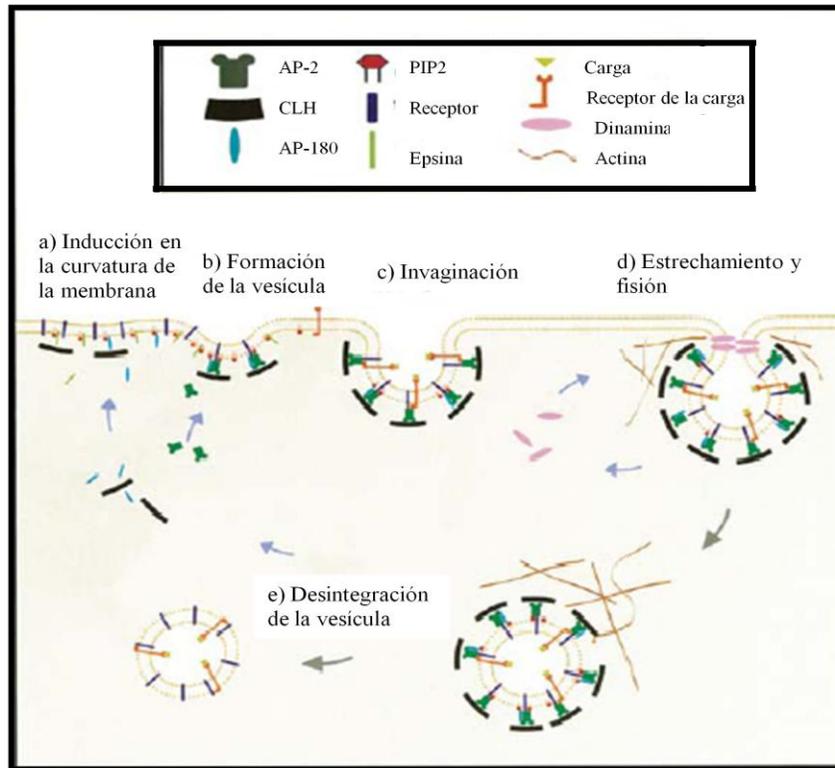


Figura 8. Endocitosis mediada por clatrina. (Modificado de Mousavi y col., 2004).

Otro papel que cumple la CLH, es la regulación de las funciones celulares y la conducción de los altos niveles de actividad endocítica en el estadio en sangre del parásito (Morgan y col., 2001; Allen y col., 2003). Los niveles de expresión de la cadena pesada de la CLH se correlacionan con la actividad endocítica y de reciclaje, esencial para la supervivencia del parásito en el estadio en sangre (Morgan y col., 2001; Hung y col., 2004).

La proteína CLH tiene una masa molecular de 191.231 kDa y el gen tiene una longitud de 5100 pb. Al ser una proteína de gran tamaño se seleccionó una secuencia parcial del gen de 535 pb, correspondiente al dominio N-terminal de la proteína (Figura 9). Esta secuencia parcial se seleccionó debido a que es una región importante en la formación de la vesícula y unión de los trisqueliones (Hung y col., 2004; Pierre y col., 2011; Willox y Royle, 2011). Y además se presume que es una región antigénica.

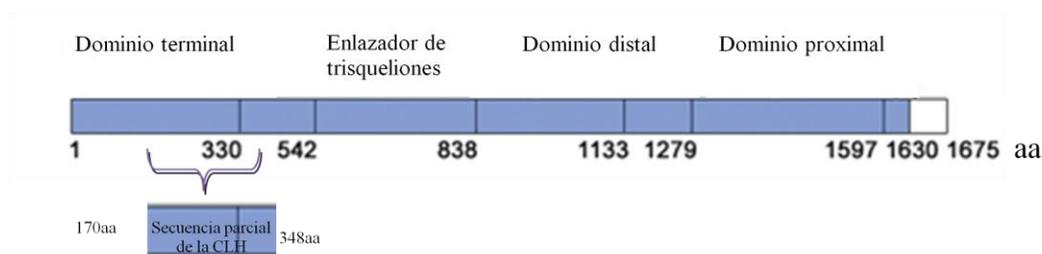


Figura 9. Secuencia aminoacídica de la CLH. El segmento amplificado representa la secuencia parcial de la CLH que se va a identificar en este trabajo. (Modificado de Xing y col., 2010).

2. ANTECEDENTES

2.1 Proteínas paraflagelares (PFR1-PFR2).

El PFR fue identificado en tripanosomas por primera vez por Keith Vickerman en 1962, el cual observó que éste está compuesto por filamentos finamente organizados.

Schlaeppli y colaboradores, en 1989, demostraron que el PFR de *T. brucei* estaba compuesto de dos proteínas principales, la PFR1 y la PFR2, cuyos pesos moleculares correspondían a 69 kDa y 73 kDa, respectivamente. Estudios bioquímicos realizados por estos investigadores demostraron a su vez, que las proteínas del PFR no formaban parte de las proteínas del citoesqueleto, concluyendo que estas dos proteínas representan dos configuraciones diferentes de un polipéptido individual codificado por un locus del PFR.

Santrich y colaboradores, en 1997, demostraron el papel que cumple el PFR en *L. mexicana*. Estos investigadores mutaron el gen que codifica la PFR2 de *L. mexicana* y demostraron que el mutante revelaba la presencia de una subestructura, que contenía la proteína PFR1, indicando que ésta puede polimerizar en ausencia de PFR2. La presencia de esta mutación ocasionaba cambios flagelares y disminución de la velocidad de movimiento al compararlos con los parásitos silvestres.

Maga y colaboradores, en 1999, demostraron la presencia de las dos proteínas (PFR1 y PFR2) que conforman el filamento paraflagelar en *L. mexicana*.

Estos investigadores, hicieron una mutación nula a la PFR2, teniendo como resultado que el parásito perdía la motilidad. También compararon mutantes nulos de la PFR2 con mutantes nulos de la PFR1, obteniendo que ambas proteínas son esenciales en la formación y movilidad del parásito. Por lo que concluyeron que, para la formación del filamento paraflagelar, ambas proteínas son esenciales.

Clark y colaboradores, en el 2005, clonaron y expresaron dos genes que se encuentran presentes en el PFR de *Trypanosoma cruzi*. Estas proteínas fueron purificadas y demostraron ser inmunogénicas, dándoles protección contra la infección.

Abdille y colaboradores (2008a), estudiaron la similaridad que existe entre la PFR1 y la PFR2 en *T. evansi*, mediante técnicas de biología molecular, Western Blot y ensayos de inmunoprecipitación. La secuencia aminoacídica correspondiente a la PFR1 expresada demostró una identidad del 68,4% con la proteína PFR2 de *T. evansi*. Por otro lado, mostraron que los anticuerpos preparados contra PFR1 y PFR2 en ratones reconocen a estas proteínas sin reactividad cruzada.

Abdille y colaboradores (2008b), establecieron la existencia del gen que codifica la PFR2 en *T. evansi*, el cual clonaron y expresaron en bacterias. Demostraron al mismo tiempo por cromatografía de afinidad y Western blot, que la proteína paraflagelar PFR2 es conservada en diversos parásitos, por lo que puede servir como blanco para el desarrollo de vacunas en diferentes especies de *Trypanosoma*.

Según Miranda y colaboradores, en el 2010, el PFR es una estructura específica y única en la familia de los Kinetoplastidae. Estos investigadores obtuvieron por microscopia de fuerza atómica y de transmisión la estructura del PFR de *T. cruzi*, demostrando que es una estructura estática y que la organización de los filamentos difiere entre las diversas regiones del flagelo. Al mismo tiempo demostraron que un silenciamiento de la síntesis de las principales proteínas (PFR1 y PFR2) afecta en la motilidad del flagelo.

Un trabajo reciente de Portman y Gull (2010), estableció el papel del flagelo y de sus componentes en la motilidad celular. Estos autores estudiaron las características morfológicas de la estructura de los filamentos paraflagelares (PFR) de los kinetoplastideos, concluyendo que el PFR es una plataforma metabólica, homeostática, regulatoria y sensorial que puede ser conservada en la evolución y que la PFR1 y la PFR2 son proteínas esenciales en la formación del PFR.

2.2 Clatrina (CLH)

Morgan y colaboradores, en el 2001, indican la presencia de la CLH, actuando como transportadora de un cierto número de moléculas en el bolsillo flagelar. Estos investigadores clonaron y caracterizaron la cadena pesada de la CLH e hicieron comparaciones de los diferentes estadios de *T. brucei*. Por otro lado, estos autores demostraron por microscopía electrónica que la CLH está distribuida en la región posterior del parásito (bolsillo flagelar) y observaron que la adquisición de nutrientes por endocitosis es requerida en el estadio procíclico.

Wakeham y colaboradores, en el 2003, describen la estructura de la CLH, "el trisquelión" en los tripanosomatideos. Estos investigadores se enfocaron en el autoensamblaje de la CLH, el cual implica interacciones débiles coordinadas que favorecen la regulación celular. Así mismo, estudiaron la dimerización de las clatrininas recombinantes de los dominios proximales y distales, demostrando que las interacciones entre las diferentes recombinantes dependen de los procesos de polimerización de la CLH en la formación de las vesículas.

En el mismo año, Allen y colaboradores (2003), estudiaron la endocitosis mediada por la CLH de *T. brucei*. Estos autores correlacionaron la actividad endocítica con los niveles de expresión de la cadena pesada de la CLH. Los resultados sugirieron que la endocitosis rápida juega un papel muy importante en la evasión de la respuesta inmune. En este estudio se evaluó el papel de la CLH mediante el ARN de interferencia (ARNi) y observaron que al suprimir la expresión de la CLH ocurre una muerte rápida en el estadio en sangre de los tripanosomas. Por otro lado, en el estadio procíclico, observaron una acumulación de vesículas y alteraciones en el tráfico de una proteína lisosomal, indicando variaciones en la función de la CLH en este estadio del ciclo de vida de *T. brucei*.

Mousavi y colaboradores, en el 2004, analizaron la endocitosis dependiente de CLH en los tripanosomatideos. Estos investigadores demostraron que una proteína adaptadora (AP-2) está implicada en casi todas las etapas de la formación de las vesículas con recubrimiento de CLH. Estos estudios explican que, la

fosforilación de las proteínas adaptadoras, así como del receptor, son muy importantes para la captación de los receptores de señalización.

En el 2004, Hung y colaboradores, determinaron que el bolsillo flagelar representa el 0,43% de la membrana; y las moléculas receptoras como la CLH, son retenidas en este espacio. Estos autores, estudiaron la función de la cadena pesada de la CLH en el tráfico de receptores en el bolsillo flagelar de *T.brucei*, mediante el enfoque de doble cadena de ARN. Los resultados obtenidos de la inducción por ARNi a las 24h, indicaron que en el estadio procíclico disminuyó la absorción de macromoléculas por medio de la endocitosis mediada por el receptor. A las 48h, no se observó exportación de una proteína de membrana rica en cisteína (CRAM). Finalmente, a las 72h, se observaron cambios morfológicos en la membrana del tripanosoma, en donde no se encontró diferencia estructural entre el bolsillo flagelar y el flagelo. Los autores concluyeron que el tráfico de proteínas dependiente de la CLH en el bolsillo flagelar, puede ser esencial para la biogénesis y el mantenimiento del bolsillo en los tripanosomas.

En el 2004, Overath y Englester, estudiaron el funcionamiento del bolsillo flagelar y los procesos que ocurren en *T. brucei*. Estos investigadores realizaron estudios con el ARN de interferencia y técnicas de microscopía electrónica, demostraron que existe un tráfico de proteínas mediado por CLH, mediante el cual ocurren procesos de reciclaje e incorporación de nutrientes.

Estudios recientes de Kumar y colaboradores (2011), resaltaron la importancia del reciclaje de moléculas de actividad endocítica en la infección de ratones con *T. brucei brucei*. Estos investigadores diseñaron diversas estrategias para poder analizar la vía endocítica en el bolsillo flagelar. Los resultados obtenidos indican que la vía endocítica está implicada en la evasión inmune por la prestación de un mecanismo para remover las inmunoglobulinas de superficie reconocidas por las VSG, concluyendo que la CLH representan un excelente blanco para las drogas.

Stijlemans y colaboradores, en el 2011, estudiaron los mecanismos de evasión de la respuesta inmune de *T. brucei*. Estos investigadores diseñaron nanoanticuerpos VSG-específicos (Nb), de bajo peso molecular, derivados de la cadena pesada de anticuerpos de los camélidos que impiden la endocitosis. El bloqueo de la endocitosis mediada por la CLH ocasionó perturbaciones metabólicas, relacionadas con la reducción de los niveles ATP intracelular y pérdida del potencial de membrana, culminando en la muerte celular del parásito.

3. OBJETIVOS

Objetivo general:

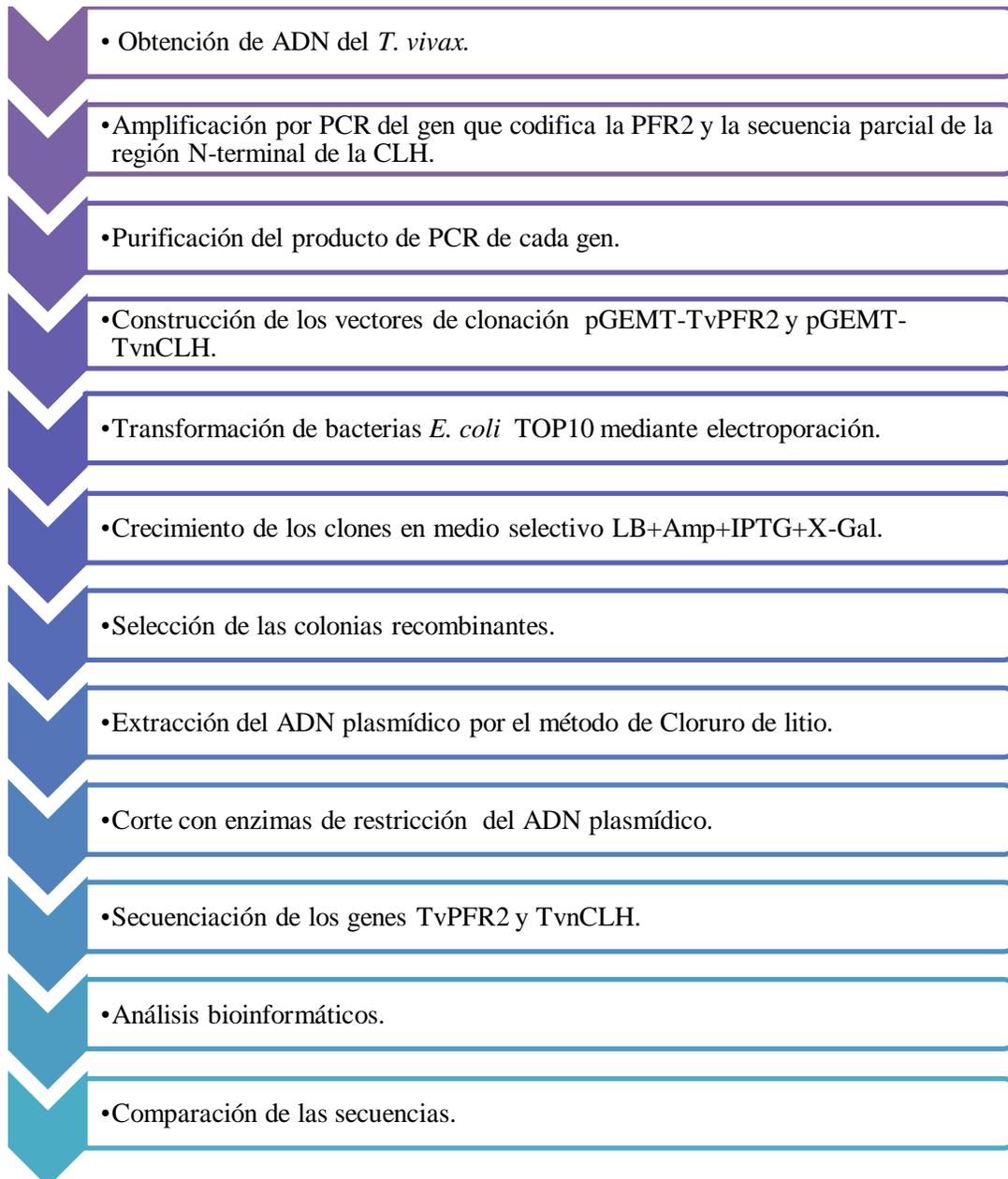
✓ Identificar y clonar el gen que codifica la proteína paraflagelar 2 y una secuencia parcial de la región N-terminal de la clatrina de *Trypanosoma vivax*.

Objetivos específicos:

1. Obtener ADN de *Trypanosoma vivax*, TvLIEM176, a partir de la infección de un ovino sano.
2. Diseñar cebadores específicos para la amplificación del gen que codifica la PRF2 y la secuencia parcial de la región N-terminal de la CLH.
3. Amplificar los genes que codifican la PRF2 y la secuencia parcial de la región N-terminal de la CLH.
4. Clonar los genes que codifican la PFR2 y una secuencia parcial de la región N-terminal de la CLH en un sistema bacteriano.
5. Comparar las secuencias de los genes que codifican la PFR2 y la secuencia parcial de la región N-terminal de la CLH de *T. vivax* con las secuencias putativas obtenidas por bioinformática.

4. METODOLOGÍA

Esquema de la metodología general empleada para la identificación y clonación de las proteínas.



4.1 Obtención de ADN de *T. vivax*, TvLIEM176, a partir de la infección de un ovejito sano.

4.1.1 Grupo experimental.

A un ovejito sano de 6 meses, de raza West African, de 16 Kg se le tomó una muestra de sangre con el fin de evaluarlo parasitológicamente y descartar la presencia de hemoparásitos.

El ovino permaneció en el bioterio del Instituto de Estudios Científicos y Tecnológicos (IDECYT), en donde contó con las condiciones adecuadas para su mantenimiento y posterior tratamiento. Se le suministró agua *ad libitum* y se alimentó con pasto seco.

Por otro lado, en relación al tratamiento post-infección, se le suministró una dosis de 0,5mg/Kg de Cloruro de Isoniazid y 5mL de Hematofos (suplemento vitamínico), con el fin de garantizar su supervivencia (Sandoval y col., 1995; Espinoza y col., 1996).

4.1.2 Características del aislado.

El aislado de *T. vivax* utilizado para la infección del ovejito, es procedente del estado Trujillo, su denominación es TvLIEM176. Este aislado se encuentra criopreservado en tanques de nitrógeno líquido en el Laboratorio de Biología Molecular del IDECYT.

4.1.3 Infección experimental.

El ovejito fue inmunosuprimido con cinco inyecciones intravenosas de 2 mg/Kg de dexametasona, suministrada interdiariamente. A la cuarta dosis de haber iniciado la inmunosupresión, se inoculó 1 mL de un aislado venezolano de *T. vivax* (TvLIEM176) administrado por vía intravenosa (González y col., 2005; Gómez, 2011).

El seguimiento de la infección se hizo a través de la obtención de muestras de sangre interdiariamente, a partir de la vena yugular, con el uso de tubos tipo Vacutainer[®] en presencia de EDTA, durante la primera semana de post-infección, hasta alcanzar el pico de parasitemia (aproximadamente 20 parásitos por campo $\approx 1 \times 10^7$ parásitos/mL). Se tomaron las respectivas alícuotas, las cuales se utilizaron para la evaluación parasitológica por el método de Brener y para la purificación de *T. vivax*.

4.1.4 Evaluación parasitológica.

La parasitemia fue evaluada según el método de Brener. Este método consiste en la toma de 5 μ L de sangre colocada en una lámina portaobjeto, cubriéndose con una lámina cubreobjetos de 22 x 22 mm, extendiéndose la sangre de manera uniforme en toda el área de la lámina cubreobjetos. Posteriormente, se contaron los parásitos presentes en 100 campos, en un microscopio óptico Leica[®] a un aumento de 40X, en donde la parasitemia se expresó en tripanosomas/mL de sangre según la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Tripanosomas}}{\text{mL}} = Tc \times Fm \times Fc$$

Donde:

Tc: Tripanosomas contados en 100 campos.

Fm: Factor del microscopio. Para este caso particular Fm: 5824. El factor del microscopio está relacionado con el área de visión y el número de campos observados al microscopio a un aumento determinado de los oculares y el objetivo.

Fc: Factor de corrección (1000/5 μ L: 200).

4.1.5 Purificación de un aislado venezolano de *T. vivax*.

Una vez alcanzado el pico de parasitemia (10^7 Try/mL), se procedió a la purificación de los parásitos de acuerdo al protocolo descrito por González y colaboradores (2005). Inicialmente se realizó un gradiente de Percoll para separar los glóbulos rojos y luego se pasó por una cromatografía en columna de DEAE celulosa, con el fin de separar el resto del material sanguíneo por su carga.

Se tomaron 90 mL de sangre del ovino infectado correspondiente al primer pico de parasitemia, añadiéndose la misma en tubos de EDTA- Na_2 al 0,15%; se mezcló v/v delicadamente con una solución de Percoll Sigma[®] (8,55% de sacarosa, 2,0% de glucosa, se ajustó el pH a 7,5 con HEPES sólido) (Grab y Bwayo, 1982). La mezcla se centrifugó a 17500 xg por 25 min a 15° C, obteniéndose tres capas claramente diferenciadas. Se recolectó la capa superior del gradiente formado, rica en parásitos, con la ayuda de pipetas Pasteur. La capa superior se diluyó en una solución tampón glucosado (PBSG) (fosfato sódico 40mM, pH 7,5, NaCl 150mM,

glucosa 1%). A continuación, se centrifugó a 6000 *xg* por 15 min a 15° C. El sobrenadante se descartó y el sedimento se resuspendió con solución PBSG. Este procedimiento se realizó por duplicado, de modo de lavar el sedimento con PBSG, y así eliminar los residuos de Percoll. El sedimento se resuspendió con 2mL de PBSG y se colocó en una columna cromatográfica de intercambio iónico de DEAE celulosa, equilibrada previamente con PBSG. Constantemente, el eluato se revisó en un microscopio para confirmar la elución y la pureza de los tripanosomas. Posteriormente, se recolectaron los tubos que contenían parásitos en un pool, y se centrifugaron a 6000 *xg* por 15 min a 15° C. Luego de la centrifugación, se descartó el sobrenadante, se resuspendió el sedimento en 1 mL de PBS y se transfirió a un tubo Eppendorf. El concentrado de parásitos se centrifugó a 14000 *xg* por 15 min, se descartó el sobrenadante y se guardó el sedimento a -20° C. (Brenner, 1979; González y col., 2005).

4.1.6 Extracción de ADN genómico a partir de *T. vivax* purificado.

Una vez obtenidos los parásitos purificados, se procedió a la obtención del ADN genómico de *T. vivax*. El protocolo utilizado fue el descrito por el estuche comercial Promega (Wizard[®] Genomic ADN Purification kit A1120).

Inicialmente, se tomaron 300 μ L del ADN purificado del parásito y se agregaron 900 μ L de la solución de lisis celular en un tubo de centrífuga de 1,5 mL. A continuación, se mezcló por inversión para ocasionar la ruptura de los glóbulos rojos y glóbulos blancos que quedasen de la purificación del parásito. La mezcla se incubó por 10 min a temperatura ambiente, realizando inversión al tubo

periódicamente. Posteriormente, se centrifugó por 20 seg a 16000 *xg*. Del producto obtenido, se descartó el sobrenadante, en el cual se encontraron organelos y restos de membrana celular. El sedimento fue removido en un agitador para resuspender el contenido del mismo en la solución de lisis celular. A continuación, se añadieron 300 μL de la solución de lisis nuclear para la obtención del ADN, en donde se mezcló por inversión hasta formar una solución viscosa. Dicha mezcla se incubó por 30 min a TA, con el fin de garantizar la ruptura de los núcleos presentes. Luego, se agregaron 1,5 μL de RNAsas, y se mezcló suavemente por inversión. La mezcla obtenida, se incubó 15 min a 37° C y posteriormente 5 min a TA, para eliminar la mayor cantidad de ARN. Posteriormente, se añadieron 100 μL de la solución de precipitación de proteínas a la mezcla y se agitó en el vórtex por 20 seg o hasta que se observaron pequeños agregados de proteínas. Una vez obtenido el agregado, se centrifugó por 3 min a 16000 *xg*. Transcurrido este tiempo, se observó un sedimento color marrón, el cual fue descartado y hubo una recuperación del sobrenadante, que contenía el material genético. Se trasvasó a otro tubo de centrifuga de 1,5 mL, el cual contenía 300 μL de isopropanol. Se mezcló por inversión hasta que se observaron los hilos de ADN. Luego se centrifugó por 5 min a 16000 *xg*, descartándose el sobrenadante y se obtuvo un sedimento de color blanco en el fondo del tubo de centrifuga. Adicionalmente, se añadieron 300 μL de etanol al 70% para lavar el sedimento, se centrifugó durante 1 min a 16000 *xg* y se descartó el sobrenadante. El sedimento se secó al vacío, en un equipo conocido como concentrador centriVap ADN LABCONCO, a 65° C durante 10 min, con el

fin de evaporar el etanol de la muestra. Finalmente, se agregaron 100 μ L de agua bidestilada para rehidratar el sedimento, y se colocó a 4° C por 12 horas.

Para comprobar la integridad del ADN genómico de *T. vivax*, se realizó una corrida electroforética en un gel de agarosa al 0.8%, en una solución de buffer TAE 1X (20 mL TAE 50X, 980 mL H₂O), el cual contenía 1 μ L de SYBR[®] Safe ADN gel stain (Invitrogen) por cada 10 mL de TAE. La corrida electroforética se realizó a 100 V durante 30 min. Una vez transcurrido el tiempo de corrida, se observó cada gel en un equipo de fotodocumentación (Uviti).

4.2 Diseño de cebadores para la amplificación del gen que codifica la TvPFR2 y la Tv_nCLH.

Previo al diseño de cebadores se realizó una búsqueda bioinformática que permitió seleccionar la secuencia putativa del gen que codifica la PFR2 de *T. vivax* (TvPFR2), así como la secuencia parcial de la región N-terminal de la CLH de *T. vivax* (Tv_nCLH). Estas secuencias sirvieron de base para el diseño de los cebadores que amplificaron el TvPFR2 y la Tv_nCLH en toda su extensión.

4.2.1 Obtención de la secuencia de los genes que codifican la TvPFR2 y la Tv_nCLH.

Las secuencias de los genes que codifican la PFR2 y la secuencia parcial de la CLH de *T. vivax* se obtuvieron mediante el uso de herramientas bioinformáticas. Se utilizaron bases de datos como GeneDB (<http://www.genedb.org>), Trityp (<http://tritypdb.org/tritypdb/>), o GenBank que permitieron obtener las secuencias

putativas de cada gen de *T. vivax* TvY486, las cuales sirvieron de base para la obtención de la secuencia adecuada. El Instituto Wellcome Trust Sanger ha llevado a cabo el genoma parcial de *T. vivax* cepa Y486, produciendo una secuencia preliminar del genoma de alta calidad.

4.2.2 Diseño de cebadores del gen que codifican la TvPFR2 y la Tv_nCLH.

Con el fin de identificar y amplificar los genes que codifican para la secuencia parcial de la CLH y la PFR2 de TvLIEM176, se diseñaron cebadores para su amplificación. Para ello, se utilizó el programa OLIGO-EXPLORER (<http://www.genelink.com/tools/gl-oe.asp>), el cual es una herramienta bioinformática que permite diseñar los cebadores, considerando propiedades tales como, la temperatura de fusión (T_m , por sus siglas en inglés), el porcentaje guanina-citosina (%GC), posibilidad de formación de horquillas o dímeros de cebadores. A su vez, los cebadores permiten la amplificación en dirección al crecimiento de la cadena $5' \rightarrow 3'$. Los cebadores diseñados para la amplificación de la PFR2 se denominaron TvPFRF/R y para la secuencia parcial de la CLH se denominaron Tv_nCLHF/R.

4.3 Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para la estandarización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen que codifica la PFR2 y la secuencia parcial de la CLH, se debieron establecer las características del ciclado, es decir, el tiempo y temperatura de hibridación. La

fase correspondiente a la hibridación se sometió a gradientes de temperatura, con el fin de optimizar la reacción.

En relación a la mezcla de reacción, se estandarizó con las cantidades adecuadas de Buffer, MgCl₂, dNTPs, cebadores, Taq, ADN y agua, para la amplificación de cada gen.

Una vez estandarizada la técnica, se evaluó cada producto de PCR en geles de agarosa a concentraciones apropiadas de acuerdo a los tamaños de los productos de PCR obtenidos, en una solución de buffer TAE 1X, el cual contenía 1 µL de SYBR[®] Safe TM ADN gel stain (Invitrogen) por cada 10 mL de TAE. La corrida electroforética se realizó a 100 V durante 30 min. Una vez transcurrido el tiempo de corrida, se observó cada gel en un equipo de fotodocumentación (Uviti).

4.3.1 Purificación del producto de PCR.

Una vez obtenido el amplificado de cada gen, se procedió a la purificación de los productos de PCR. El protocolo realizado fue el descrito en el estuche comercial Wizard[®] SV Gel and PCR de Promega, cuyo fundamento corresponde a la centrifugación del producto de PCR en minicolumnas de afinidad al ADN.

Inicialmente, se amplificó cada gen de acuerdo a las condiciones estandarizadas, la banda obtenida de la corrida electroforética se cortó en el gel de agarosa y se colocó en un Eppendorf previamente pesado. Posteriormente, se pesó el tubo con la banda, la cual dio la relación para agregar la solución de unión a la membrana (10 µL de solución de unión a la membrana x 10 mg de gel de agarosa).

Luego, la mezcla se sometió a vórtex y se incubó a 50- 65° C durante 10 min o hasta que la banda estuvo disuelta.

La solución formada se transfirió a una minicolumna S.V colocada en un tubo de colección (para cada producto PCR). Se centrifugó la minicolumna ensamblada a 16000 *xg* por 1 min. Se removió la minicolumna S.V, se descartó el líquido del tubo de colección y se colocó nuevamente la minicolumna SV en el tubo de colección. Luego se lavó la minicolumna S.V añadiendo 700 μ L de “Membrana Wash Solution” previamente diluída en etanol 95%. Se centrifugó la minicolumna S.V ensamblada por 1 min a 16000 *xg*. Se vació el tubo colector y se colocó nuevamente la minicolumna dentro de él. Se repitió el lavado con 500 μ L de “Membrane Wash Solution” y se centrifugó la minicolumna ensamblada por 5 min a 16000 *xg*. A continuación se removió la minicolumna ensamblada de la centrífuga teniendo cuidado de que el contenido del tubo colector no tocara la membrana. Se vació el tubo colector y se colocó nuevamente la minicolumna, ambos se colocaron en un concentrador (LABCONCO) 5 min a 65° C, para permitir la evaporación de residuos de etanol. Finalmente, se transfirió la minicolumna S.V a un tubo de 1,5 mL estéril y se agregaron 50 μ L de agua libre de nucleasas directamente al centro de la columna sin tocar la membrana con la punta de la pipeta. Se incubó a temperatura ambiente por 1 min. Se centrifugó por 1 min a 16000 *xg*; se descartó la minicolumna S.V y se mantuvo el Eppendorf con el ADN diluído a -20° C.

4.3.2 Secuenciación del producto de PCR.

Con el fin de determinar el gen que codifica la PFR2 y la secuencia parcial de la CLH de *T. vivax*, se realizó la secuenciación automática.

Una vez obtenido el producto purificado de PCR, se colocaron alícuotas de 15 μL del mismo (\approx [20 ng]) y 5 μL de los cebadores (\approx [5 pmoles/ μL]) (sentido y antisentido) y se llevaron a la Unidad de Estudios Genéticos y Forenses (UEGF) ubicada en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), con el objetivo de secuenciar el fragmento deseado mediante la secuenciación automática del ADN.

4.3.2.1 Análisis de las secuencias.

Una vez obtenida la secuencia de cada gen, se realizó un análisis *in silico* para determinar la identidad y/o diferencias con las secuencias putativas obtenidas por bioinformática. Inicialmente, las secuencias obtenidas se colocaron en la base de datos del servidor National of Biotechnology Information, mediante el uso del programa BLAST, para encontrar el alineamiento con otros organismos. Al mismo tiempo, se empleó el software DNACLUB que permitió el análisis del ADN, encontrar los marcos abiertos de lectura (ORF) y traducir la secuencia de la proteína. A su vez, se utilizó el programa BIOEDIT para obtener una secuencia consenso de cada gen, una vez obtenido la secuencia del TvPFR2 y la Tv_nCLH por secuenciación automática. Por otro lado, se utilizó el programa Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) que permitió conocer la homología entre

las secuencias putativas reportadas para diferentes tripanosomatídeos y las obtenidas por secuenciación.

4.3.3 Confirmación de la secuencia por corte con enzimas de restricción del producto de PCR.

Paralelo al envío del producto purificado de la PCR a la UEGF, se obtuvieron los mapas de restricción del gen que codifica la PFR2 y la secuencia parcial de la CLH, mediante el uso del programa NEBcutter (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>). El objetivo de realizar estos mapas fue poder predecir los sitios de corte del producto de PCR de cada gen y escoger la enzima para hacer el corte que arrojara un número manejable de fragmentos de restricción.

Así, luego de obtener los mapas de restricción, se procedió a la digestión con las enzimas de restricción. Para ello, una alícuota del producto de PCR purificado de cada amplificación, fue añadido a la mezcla con Buffer específico de la enzima, la enzima de restricción, el ADN y el agua desionizada. Luego, se colocó cada reacción en el concentrador centriVap ADN LABCONCO a 37° C durante el tiempo correspondiente al que tardó cada enzima en cortar. Posteriormente, la digestión se observó en geles de agarosa a concentraciones apropiadas de acuerdo a los tamaños de los productos y por medio de un equipo de fotodocumentación (Uviti), esperándose los fragmentos que confirmaron la presencia de cada gen amplificado. En la tabla 1 se observan los componentes de la mezcla de reacción para la digestión del producto de PCR purificado del gen que codifica la PFR2 con la enzima *EcoRV*, el cual tuvo 2 horas de incubación.

Tabla 1. Componentes de la mezcla usada para realizar el corte con la enzima de restricción *EcoRV* del producto de PCR del gen que codifica la PFR2.

COMPONENTES	CONCENTRACIÓN	VOLUMEN (μL)
Buffer D	10X	2
BSA	10mg/mL	0,2
Enzima (<i>EcoRV</i>)	10U/μL	1
ADN	~40ng/μL	4
Agua desionizada	-	12,8
Volumen total		20

En la tabla 2, se observan los componentes de la mezcla de reacción para la digestión del producto de PCR de la secuencia parcial de la CLH con la enzima *KpnI*. La mezcla de reacción fue incubada por 2 horas.

Tabla 2. Componentes de la mezcla usada para realizar el corte con la enzima de restricción *KpnI* del producto de PCR de la secuencia parcial de la CLH.

COMPONENTES	CONCENTRACIÓN	VOLUMEN (μL)
Buffer J	10X	2
BSA	10mg/mL	0,2
Enzima (<i>KpnI</i>)	12U/μL	1
ADN	~40ng/μL	4
Agua desionizada	-	12,8
Volumen total		20

Para confirmar la presencia del gen TvPFR2 y de la Tv_nCLH se realizaron tres metodologías que permitieron verificar la identificación de los genes: 1) Amplificación por PCR y observación del producto en geles de agarosa; 2) Secuenciación del producto purificado de la PCR en la UEGF y 3) Cortes con enzimas de restricción del producto purificado de la PCR.

4.4 Obtención de los clones pGEMT/TvPFR2 y pGEMT/Tv_nCLH.

El objetivo de esta clonación fue la producción de un gran número de copias con alta fidelidad del gen que codifica la PFR2 y la secuencia parcial de la CLH. Para ello, el gen o la secuencia parcial se insertó en el vector de clonación pGEM-T, formando una molécula de ADN recombinante y esta última, se incorporó a la célula anfitriona *E. coli* TOP10 donde tuvo lugar la amplificación por replicación del vector recombinante.

4.4.1 Preparación de las células electrocompetentes de *E. coli* TOP10.

Para preparar las células electrocompetentes, se partió de un cultivo incubado toda la noche (ON) de 3 mL de LB + 200 μ L de *E. coli* TOP10, las cuales estaban criopreservadas en el tanque de nitrógeno del Laboratorio de Biología Molecular del IDECYT. El cultivo se dejó en agitación a 37° C, durante toda la noche. Al día siguiente, se pasaron los 3 mL del cultivo a una fiola con 200 mL de LB (Bacto-tryptona, extracto de levadura, NaCl, pH 7), en condiciones de esterilidad. Este cultivo se incubó a 37° C y en agitación, hasta alcanzar una $D_{600\text{ nm}} = 0.6$. Es importante destacar, que como blanco en la medición de la densidad óptica, se usó medio LB. A continuación, se distribuyeron los 200 mL de cultivo en 4 tubos de 50 mL. Se centrifugaron a 4000 xg a 4° C durante 15 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 45 mL de H₂O estéril y fría (los tubos se sometieron a vórtex). Nuevamente, se centrifugaron con las condiciones antes mencionadas, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron con 20 mL de H₂O,

se trasvasó lo obtenido en un único tubo. Se centrifugó a 4000 xg a 4° C por 15 min, se descartó el sobrenadante, se tomó un tubo de 15 mL y se resuspendió en 4 mL de glicerol al 10%. Se centrifugó nuevamente a 4000 xg a 4° C por 15 min, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 300 μ L de glicerol al 10%. Finalmente, las células se pudieron usar directamente para transformación o se dispensaron en alícuotas de 40 μ L en -80° C. Se tomó como control de transformación una placa LB, que permitió el crecimiento de la *E. coli* TOP10 y una placa LB/Amp. Las células *E. coli* TOP10 son sensibles a la ampicilina, por lo que no debió encontrarse crecimiento alguno.

4.4.2 Reacción de ligación para la formación de los vectores pGEMT/TvPFR2 y pGEMT/Tv_nCLH.

La ligación se realizó entre el inserto y el vector pGEM-T easy para formar los vectores pGEMT/PFR2 y pGEMT/_nCLH. El protocolo utilizado fue el descrito por la casa comercial Kit de pGEM-T easy (Promega).

Se realizó la mezcla de reacción de ligación como se observa en la tabla 3 (manteniendo previamente los tubos Eppendorf en hielo).

Tabla 3. Reactivos usado en la ligación entre el vector pGEMT y el producto purificado de PCR del TvPFR2 y de la Tv_nCLH.

Reactivos	CONCENTRACIÓN	Volumen (μL)
Buffer 2X rapid ligation	10X	2
Buffer T4 ADN ligasa		
Vector pGEM-T easy	50 ng/μL	0,5
Producto de PCR	~40ng/μL	2
T4 ADN ligasa	3U/μL	1
H ₂ O estéril	-	5,5
Volumen final		10

La mezcla de ligación se incubó toda la noche a 4° C sin agitación.

4.4.3 Transformación.

La transformación consiste en la inserción del vector recombinante dentro de la célula competente *E. coli* TOP10 (Luque y Herráez, 2008). El protocolo que se empleó fue el siguiente:

Previo a la transformación se prepararon placas de LB y de LB/ampicilina/IPTG/X-gal. Dos placas por reacción de ligación.

Una vez obtenidas las células electrocompetentes, se procedió a realizar la electroporación, en la cual, se colocaron las cubetas para electroporar en hielo, al igual que las células, para no perder la cadena de frío. Posteriormente, se tomaron 3 μL del producto de ligación (plásmido + inserto). Se tomaron tantos tubos de células electrocompetentes, según la cantidad de muestras de ADN para electroporar. Se prepararon Eppendorfs con 1 mL de LB, para colocar en la cubeta luego de electroporar. Se mezcló el producto de ligación con los 40 μL de células

electrocompetentes en la cubeta de electroporación. Una vez que se realizó la mezcla, se encendió el equipo de electroporación (Eppendorf), y se dio un pulso de 1500 V. Una vez que se escuchó la alarma del equipo de electroporación, se le agregó rápidamente 1 mL de LB en la cubeta. El producto obtenido de la transformación se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 mL y este se dejó incubar 1 hora a 37° C. Finalmente, se sembraron 100 µL del volumen total de electroporado, con rastrillo en placa de LB/Amp/X-gal/IPTG. Las colonias recombinantes y no recombinantes fueron seleccionadas por color. En ausencia del inserto, la bacteria en un medio con el inductor IPTG y el sustrato X-gal, produce β-galactosidasa, que convierte el sustrato X-gal a una sustancia azul, apareciendo colonias de color azul. En el caso de que se encuentre un inserto interrumpiendo el gen *LacZ*, la bacteria no produce β-galactosidasa, y las colonias se observan de color blanco, las cuales corresponden a las colonias recombinantes.

4.4.4 Ensayo de la reacción en cadena de la polimerasa de la colonia recombinante (PCR colony).

Se realizó la reacción en cadena de la polimerasa de las colonias recombinantes con los cebadores SP6 y T7 (Tabla 4), con el fin de obtener las secuencias completas del inserto de interés, ya que estos amplifican los promotores ubicados cerca del sitio múltiple de clonación del vector pGEMT easy (Figura 35).

Tabla 4. Secuencia nucleotídica de los cebadores SP6 y T7 que amplifican el inserto de interés.

Cebadores	Secuencia
T7(Sentido)	5`-TATTTAGGTGACACTATA-3´
SP6 (antisentido)	5`- TAATACGACTCACTATAGGG -3´

Inicialmente, se seleccionó una colonia recombinante (color blanco), se tomó con la ayuda de un asa de platino y se colocó en la mezcla de reacción preparada como se indica en la tabla 5, para la PCR colony con los cebadores T7/SP6.

Tabla 5. Componentes de la mezcla de reacción para la amplificación de los genes con los cebadores SP6 y T7.

Componentes	Concentración stock	Concentración final	Volumen (µL)
Buffer 5X	5 X	1 X	5
MgCl₂	25 mM	1mM	3
dNTP´s	25 mM	0,2mM c/u	0,5
Cebador SP6	10 µM	1 µM	1,0
Cebador T7	10 µM	1 µM	1,0
Taq polimerasa	5U/1µL	0,5U	0,125
ADN	-	-	1,0
H₂O	-	-	13,375
Volumen total			25µL

Para la amplificación con los cebadores T7/SP6, se siguieron las condiciones establecidas por el kit de Promega (Tabla 6).

Tabla 6. Condiciones del ciclado del PCR de las colonias.

Fase	Temperatura (° C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	94	2min	1
	94	30seg	35
Hibridación	55	1min	35
Extensión	72	1 min	35
	72	10min	1
	4	α	

Por otro lado, se llevó a cabo este mismo procedimiento pero con los cebadores específicos diseñados en este trabajo (TvPFRF/R y TvCLHF/R), siguiendo las condiciones descritas en la tabla 8 y tabla 14.

Una vez culminada la PCR de la colonia se realizó una corrida electroforética del producto obtenido en geles de agarosa al 1%, en una solución de buffer TAE 1X, el cual contenía 1 μ L de SYBR[®] Safe TM ADN stain gel (Invitrogen) por cada 10 mL de TAE. La corrida electroforética se realizó a 100 V durante 30 min. Una vez transcurrido el tiempo de corrida, se observó cada gel en un equipo de fotodocumentación (Uviti).

4.4.5 Extracción de plásmido (Miniprep).

Se realizó la extracción de plásmido o Miniprep, con el fin de purificar la secuencia específica, ya que estos pueden ser aislados fácilmente del genoma de la bacteria. La extracción de plásmidos se realizó mediante el método de cloruro de litio. Para ello, se creció un cultivo de bacterias *E. coli* TOP10 en medio LB, ON a 37° C. Al día siguiente se evaluó la D.O_{600nm}, procurando que se encontrara entre 1-

1,5. Al mismo tiempo, se precalentaron 50 μL de H_2O (d) a 65°C por cada muestra a hidratar. Y se colocó la solución C en hielo. A continuación, se colocaron 1,5 mL de cultivo en un tubo Eppendorf y se centrifugó por 1 min a $22440\text{ }xg$. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento con 200 μL de solución A (50 mM Glucosa; 10 mM EDTA; 25 mM Tris) hasta que la mezcla fue homogénea y se dejó 5 min a TA. Luego, se añadieron 400 μL de la solución B (lisis) (0,2 M NaOH; 1% SDS) al tubo con la mezcla. Se mezcló por inversión varias veces y se incubó en hielo por 5 min. Posteriormente, se añadieron 300 μL de la solución C (neutralización) (29,4 gr/100 mL Acetato de potasio; 11,5 mL/100mL ácido acético glacial; se mantiene la solución a 4°C). Se mezcló por inversión observándose un precipitado blanco. Esta mezcla, se centrifugó por 10 min a $22440\text{ }xg$. Paralelamente, se preparó un tubo con 500 μL de isopropanol por cada muestra realizada. Se transfirió el sobrenadante al tubo Eppendorf que contenía los 500 μL de isopropanol y se mezcló por inversión varias veces. Esto permitió el precipitado de todos los ácidos nucleicos remanentes incluyendo ADN y ARN. Se incubó la mezcla 5 min a TA y se centrifugó por 10 min a $22440\text{ }xg$, descartándose el sobrenadante. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento con 200 μL de TE (TrisCl a pH 8 y 1 mM EDTA). Se añadieron 200 μL de cloruro de litio a 5M. Se incubó la mezcla 5min a -20°C . Se centrifugó por 10 min a $22440\text{ }xg$ y se pasó el sobrenadante a un Eppendorf con 240 μL de isopropanol. La mezcla se incubó 5 min a TA y se centrifugó por 10 min a $22440\text{ }xg$. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 1 mL de etanol al 70%. Luego, se centrifugó 5 min a $22440\text{ }xg$, se descartó el sobrenadante y se dejó secar

el sedimento 5 min a 65° C en un concentrador (LABCONO). Una vez seca la muestra, se colocaron 50 µL de agua estéril. Se resuspendió suavemente con la pipeta y se dejó a TA por 10 min. Finalmente, cada producto de la extracción de plásmido se evaluó en geles de agarosa al 1%, observándose los mismos en un equipo de fotodocumentación (Uviti).

4.4.6 Cortes con enzimas de restricción de los plásmidos recombinantes.

Paralelamente al análisis de la secuencia, se confirmó la presencia del inserto mediante el corte con enzimas de restricción, expuesto en la sección 4.3.4, pero en este caso se empleó el producto obtenido de la extracción de plásmido (Miniprep) correspondiente al gen que codifica la PFR2 y la secuencia parcial de la CLH.

4.5 Análisis de la secuencia de nucleótidos de los clones obtenidos.

Con el fin de hacer la comparación entre la secuencia putativa y la secuencia obtenida por secuenciación automática del gen que codifica la PFR2 y la secuencia parcial de la CLH, se hicieron los alineamientos múltiples que pudieran revelar características conservadas de la familia. Para identificar esa relación evolutiva se evaluó la cantidad de similitud compartida, para poder construir posteriormente un árbol filogenético.

4.5.1 Análisis de la secuencia de nucleótidos de los clones TvPFR2 y Tv_nCLH.

Se realizó la reacción en cadena de la polimerasa de la colonia recombinante amplificada con los cebadores T7/SP6, con el fin de obtener la secuencia completa de la PFR2 y la secuencia parcial de la CLH. Para el análisis de la secuencia definitiva, se tomaron 20µL (≈40ng/µL) del producto obtenido de la PCR colony junto con los cebadores T7/SP6 sentido y antisentido con una concentración final de 5pmolar, los cuales fueron enviados a la UEGF para amplificar los fragmentos de interés.

En el caso de la TvPFR2, al ser de gran tamaño, se diseñaron cebadores internos que permitieron obtener la secuencia completa del gen. Para el diseño de estos cebadores se utilizó el protocolo descrito en la sección 4.2.2. Para la PCR se estandarizó tanto la mezcla de reacción como el gradiente de temperatura.

4.5.2 Alineamiento de las secuencias.

Una vez que se obtuvieron las secuencias definitivas de cada gen, se realizó un análisis *in silico* para determinar homología con la secuencia putativa obtenida por bioinformática mediante el programa BLAST (www.ch.embnet.org). Para comparar las secuencias de nucleótidos obtenidos, se realizó un estudio de análisis múltiple, mediante el programa MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

4.5.3 Árbol filogenético basado en el análisis de la secuencia de cada proteína de diferentes organismos.

Un árbol filogenético es un diagrama que indica las relaciones entre las diversas especies o genes presentes, así como la distancia evolutiva que existe entre ellos. Para la realización de dicho árbol se siguió el siguiente protocolo:

Inicialmente, se agruparon las secuencias aminoacídicas de cada proteína de los diferentes organismos en el programa ClustalX, este programa generó un alineamiento global de un conjunto de secuencias. La reconstrucción filogenética fue realizada en el programa MEGA 4 y las secuencias fueron analizadas por el método de Neighbor-joinig para el caso de la PFR2 y el método de Kimura en el caso de la secuencia parcial de la CLH. Los árboles fueron calculados a partir del número de diferencias entre aminoácidos con 500 replicaciones de bootstrap.

4.5.4 Análisis antigénico de la proteína PFR2 y la secuencia peptídica parcial de la CLH.

El análisis antigénico se realizó con el fin predecir los posibles péptidos antigénicos y que a futuro sirviesen como blanco terapéutico.

El análisis por bioinformática del gen que codifica la PFR2 y la secuencia parcial de la CLH se realizó con el programa ANTHEPROT (http://antheprot-pbil.ibcp.fr/anthe_download.php?recipient=ANTHEPROT). Este programa es un software de análisis de secuencias de proteínas que permite el manejo de la secuencia de la proteína y los datos de una manera muy interactiva.

5. RESULTADOS

5.1 Proteína paraflagelar 2 de *T. vivax* (TvPFR2).

5.1.1 Obtención de ADN de *T. vivax* de un ovino sano.

Una vez alcanzado el pico de parasitemia, se analizó la sangre obtenida por técnica parasitológicas (Brener) y PCR, según los protocolos descritos en la sección de metodología. El pico de parasitemia se alcanzó el día 11, observando alrededor de 20try/campo, teniendo una parasitemia de 1×10^7 try/mL. Dicha sangre fue utilizada para la identificación y clonación de TvPFR2.

5.1.2 Diseño de los cebadores a partir de la secuencia putativa del gen que codifica la PFR2.

Mediante la búsqueda en las bases de datos de la secuencia del gen que codifica la PFR2, se identificó una secuencia putativa del gen de *T. vivax* Y486 asociado al movimiento del parásito. La secuencia encontrada fue de 1800 pb (Figura 10), codificante de un péptido de 600 aminoácidos y una masa molecular de 69 kDa. En la figura 10 se observa el anclaje de los cebadores en el extremo anterior y posterior de la secuencia de la PFR2. El cebador sentido, TvPFRF, se ancló en la hebra 3´- 5´ que permitió la amplificación de la hebra complementaria, mientras que el cebador antisentido, TvPFRR, se ancló por complementariedad de bases en la hebra 5´- 3´ para la amplificación de la hebra molde.

```

1      10     20     30     40     50     60     70     80     90     100    110    120    130
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
TvY486PFR2 ATGAGCCGCGAGGAGTCCGAGACAGTGGACCCCGCGGACGACAGCGACCCGCGGTCGCCAGGCTGACGGACATCACGCTGGAGGCCCGCCGACAGCAGAGATCCACACCTGAGGCTGAAACCTGCT
TvPFRF    ATGAGCCGCGAGGAGTCCG
TvPFRR
Consensus at.gagcgcgaaggaagtcg.....

131    140    150    160    170    180    190    200    210    220    230    240    250    260
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
TvY486PFR2 GCCGTGTCGAATGAGGATAGCTGACAGGACTGATGCTCTCCAGCTGGAGCGAGACGCGCGGACAGAGCTGCACAGCGGCCACGAGAGGCCACAGACTGCTTGCAGCAGTGGAGGCTGGAGCAGATG
TvPFRF
TvPFRR
Consensus .....

261    270    280    290    300    310    320    330    340    350    360    370    380    390
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
TvY486PFR2 GAGCCTGACGGAGGATACGACATCAGGAGCTGATGCGCGTGTGCGGCTGGAGCTCTCCGTCGCGGCTGTACAGCCGGAGATAGCCGAGTTCATGGAGATCGTGGCGCTGAGAGAGACCTG
TvPFRF
TvPFRR
Consensus .....

391    400    410    420    430    440    450    460    470    480    490    500    510    520
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
TvY486PFR2 ACGAGCTGAGGACGCCACACACAGAGCGCGCAGGTGCTGTACCAGGACGATGACACGCCATTGCGAGCTGGAGAGATCGAGGATGAGCTGCAGCTTCGACACTGGATGCTCCGAATGG
TvPFRF
TvPFRR
Consensus .....

521    530    540    550    560    570    580    590    600    610    620    630    640    650
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
TvY486PFR2 CACAGGTCCTCCGTCGATGTCGAGGAGCTGGAGGACTGCATGAGCTGACTGTCTGCAGACCGCGCTGCTTGGCATGAGGAGCAGATCAGCTGCAGCTGGAGCAATTAAGAGGGCAGGAGATAT
TvPFRF
TvPFRR
Consensus .....

651    660    670    680    690    700    710    720    730    740    750    760    770    780
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
TvY486PFR2 CCGACAGCTTGCATTCGCGACGGTGGATGGCGATCGCTGAGGAGGACTGACTACATCAGGGGCGAGCTGCTGGAGCAGCTGTTGAGCTGCTGGCCGACAGTTCGACATTCATGGCAGCAGGAGGAC
TvPFRF
TvPFRR
Consensus .....

781    790    800    810    820    830    840    850    860    870    880    890    900    910
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
TvY486PFR2 GAGACAGCAGCTTCCAGCAGATCCAGGAGTGCAGGAGTGTCTCCAGGAGGCGCCGCGCTCAGAGCAGCAGGCTCGCTGAGCAGCAGCTGCAGGACAGCTGAGGAGCTGCAGCAGCAG
TvPFRF
TvPFRR
Consensus .....

911    920    930    940    950    960    970    980    990    1000   1010   1020   1030   1040
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
TvY486PFR2 TCCAGAGGCCGACCTGGAGGACGACAGGAGCCATGAGGCGCTTTCGCTCACAGAGGAGGAGCTCCGAGCGGTTTCATCCAGCAGAGCTGACAGCAGGAGCAGGAGCTGGCGGCTCCAGGAGCTGG
TvPFRF
TvPFRR
Consensus .....

1041   1050   1060   1070   1080   1090   1100   1110   1120   1130   1140   1150   1160   1170
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
TvY486PFR2 GCGGCTGTCAGCGCTTGGACGAGGCGCTTCCAGGAGGTCAGCGCGCATCAGGAGGATGATCGCAGGAGGAGGCGCAGGTTGGATACCGAGCTTCCATGATGCTGGGACGACAGAGAG
TvPFRF
TvPFRR
Consensus .....

1171   1180   1190   1200   1210   1220   1230   1240   1250   1260   1270   1280   1290   1300
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
TvY486PFR2 CTGCTGAGCTGTCGCTGTACACTGTGACCTTGCCTGCGGTCATGGGCTGCTGGAGGATGATGGCAGGAGGCTGACGCTATCAGTCCGCGCACGACAGCAGATGCGAGGAGCTTGCAGGCG
TvPFRF
TvPFRR
Consensus .....

1301   1310   1320   1330   1340   1350   1360   1370   1380   1390   1400   1410   1420   1430
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
TvY486PFR2 TGAGCTCGAGGTGCACGAGGACTCGAGGCGCTCCGCGCTGTACAAAGCTTGGGCGAGCTGGTGTACAGAGGAGGAGGCGCTCGAGGAGATTGACCGACACATCCGACGACGATATTCA
TvPFRF
TvPFRR
Consensus .....

1431   1440   1450   1460   1470   1480   1490   1500   1510   1520   1530   1540   1550   1560
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
TvY486PFR2 ACTGAGATTGCGCATTTGAGACATTCGACCCGACCGAGCGAGCAGCAGCTTGCACCGGAGGAGGAGCTGTACAGCTGCTGCGCAGGTTGGAGGAGGAGCTGGAGATGCTGAGGAGCAGATGGCGAGGCG
TvPFRF
TvPFRR
Consensus .....

1561   1570   1580   1590   1600   1610   1620   1630   1640   1650   1660   1670   1680   1690
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
TvY486PFR2 CTGGAGATGTTGGCCGACGAGGAGCGCGCTGACACAGGCGCGATCGAGTTCGTGACCCCTCCGAGGAGTGGAGGATGGCAATAGACCCCGCAGCAGATGGTGGAGTACCGTCCGACCTGG
TvPFRF
TvPFRR
Consensus .....

1691   1700   1710   1720   1730   1740   1750   1760   1770   1780   1790   1800
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
TvY486PFR2 CTAGCAGGAGGAGTGAAGATTGCGGCCGAGCGCAGGAGCTCAGCGCTCCAGATGCTACAGGCCACACAGCAGCCGCGGCCGACGCGTGCAGCAGATCACGCGATG
TvPFRF
TvPFRR
Consensus .....
CAGCAGATCACGCGATG
cagcagatcagcagtag

```

Figura 10. Secuencia nucleotídica putativa del gen que codifica la PFR2 de TvY486 de 1800 pb, obtenida según las bases de datos. Mostrando el anclaje (hibridación) de los iniciadores TvPFRF/R.

5.1.2.1 Diseño de los cebadores TvPFRF y TvPFRR.

Para la amplificación del gen que codifican la PFR2 de TvLIEM176 fue necesaria el diseño de cebadores específicos.

Con base en el marco abierto de lectura (ORF), se diseñaron los cebadores sentido y antisentido, como se observa en la tabla 7. El cebador sentido, denominado TvPFRF, de 19 pb y el cebador antisentido, denominado TvPFRR, de 18 pb, presentaron una temperatura de melting de 63,8° C y 60,8% en contenido de GC.

Tabla 7. Secuencia de los cebadores que amplifican el gen que codifica la PFR2.

Secuencia	Cebadores	Secuencia	Tm (° C)	Th(° C)
TvPFR2	TvPFRF (Sentido)	5'- ATGAGCGCGAAGGAAGTCG- 3'	60,5	63,8
	TvPFRR (Antisentido)	5'- GTCGTCTAGTGCGTCATC - 3'	60,4	

5.1.3 Ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación del TvPFR2.

La estandarización de la PCR permitió determinar las cantidades y concentraciones adecuadas de los componentes de la reacción para la amplificación del TvPFR2 (Tabla 8). Al mismo tiempo, se estableció el programa de ciclado y la temperatura de hibridación para el TvPFR2.

Tabla 8. Componentes de la mezcla de reacción para la amplificación del TvPFR2.

Componentes	Concentración stock	Concentración final	Volumen (µL)
Buffer	5X	1 X	2,5
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	0,75
dNTP's	10 mM	0,08 mM	0,2
Cebador TvPFRF	10 µM	0,3 µM	0,75
Cebador TvPFRR	10 µM	0,3 µM	0,75
Taq polimerasa	2,5U/1µL	0,5U	0,3
ADN	-	-	2
H ₂ O	-	-	17,75
Volumen total			25µL

Se sometió la mezcla de reacción a un gradiente de temperatura para estandarizar la PCR y obtener la temperatura óptima de hibridación, evitando la inespecificidad, de acuerdo a las condiciones descritas en la tabla 9. En donde se realizaron 3 fases: Una fase de desnaturalización a 94° C, una fase de hibridación, en la cual se realizó un gradiente de temperatura y una fase de extensión a 72° C.

Tabla 9. Condiciones de ciclado para la amplificación del gen que codifica la PFR2.

Fase	Temperatura (° C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	94	5min	1
	94	1min	33
Hibridación	55- 64	1min	33
Extensión	72	2 min	33
	72	10min	1
	4	α	

En la figura 11 se muestra un registro fotográfico de un gel correspondiente a los productos de PCR obtenidos por un gradiente de hibridación de la temperatura, desde 55° C a 64° C, observándose en todos los carriles una banda de 1800 pb, que pudiera corresponder al gen que codifica la PFR2. Como se puede observar, a medida que se aumentó la temperatura disminuyó el número de bandas.

A partir de estos resultados se seleccionó 64° C como la temperatura de hibridación óptima para la amplificación de TvPFR2 (carril 9).

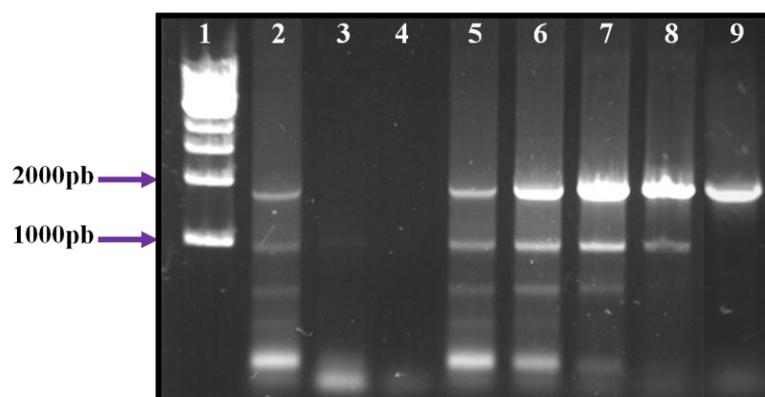


Figura 11. Registro digital de la corrida electroforética de los productos de amplificación por PCR del TvPFR2 en un gradiente de temperatura de hibridación, con los cebadores TvPFRF y TvPFRR. Carril 1: Marcador de peso molecular 1Kb. Carril 2: ADN_{o,i} con TvLIEM176 (55° C). Carril 3: ADN ovejo sano (control). Carril 4: H₂O (control). Carril 5: ADN_{o,i} con TvLIEM176 (57° C). Carril 6: ADN_{o,i} con TvLIEM176 (59° C). Carril 7: ADN_{o,i} con TvLIEM176 (61° C). Carril 8: ADN_{o,i} con TvLIEM176 (63° C). Carril 9: ADN_{o,i} con TvLIEM176 (64° C). Electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %.

5.1.3.1 Purificación del producto de PCR del TvPFR2.

En la figura 12 se muestra el registro digital del producto de PCR purificado por minicolumnas. Se observa una banda de 1800 pb que pudiera corresponder al TvPFR2.

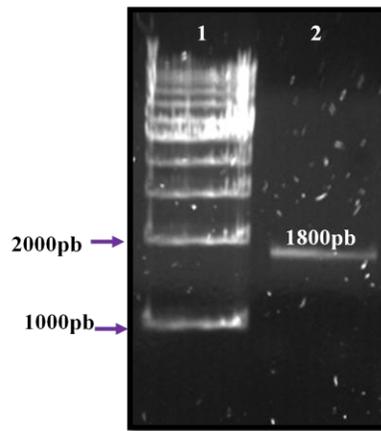


Figura 12. Registro digital de la corrida electroforética del producto de PCR purificado del TvPFR2. Carril 1: Marcador de peso molecular 1Kb. Carril 2: TvPFR2 purificado. Electroforesis en geles de agarosa al 1%.

5.1.3.2 Corte con enzimas de restricción.

A partir de la secuencia putativa obtenida de la PFR2 se realizó un mapa de restricción, con el fin de seleccionar la enzima de restricción que cortase la secuencia escogida en fragmentos conocidos y que únicamente cortase el inserto de interés. (Figura 13).

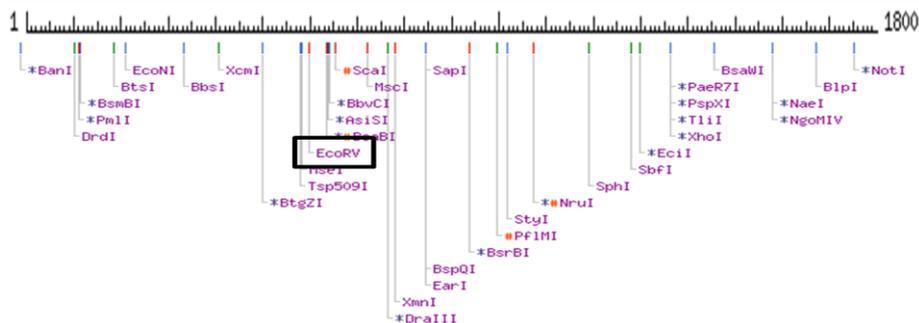


Figura 13. Mapa de restricción de la secuencia putativa del gen que codifica la PFR2 utilizando el programa NEBCUTTER. Se señala con un recuadro en negro la enzima de restricción utilizada para la digestión.

Con base en la información obtenida del mapa, se sometió el producto de PCR purificado a una digestión en presencia de la enzima *EcoRV*. En la figura 14 se puede observar el producto del corte con la enzima de restricción, correspondiente a dos fragmentos, uno de 1152 pb y otro de 648 pb, cuyos tamaños están acordes a los esperados según el mapa de restricción obtenido por bioinformática.

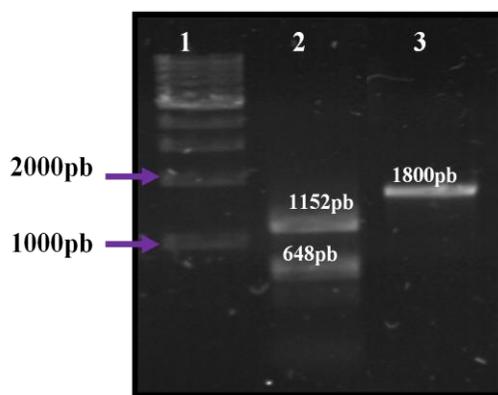


Figura 14. Registro digital de la corrida electroforética de los productos del corte con la enzima *EcoRV* del TvPFR2. Carril 1: Marcador de peso molecular 1 Kb. Carril 2: Producto de PCR del TvPFR2 digerido con la enzima *EcoRV*. Carril 3: Producto de PCR de PFR2 sin digerir. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %.

5.1.3.3 Secuenciación de TvPFR2.

El producto de PCR correspondiente a la PFR2 fue enviado al centro de secuenciación automática, pero no hubo resultado en los datos enviados por el laboratorio de la UEGF. Sin embargo, como se verá más adelante, si se obtuvieron resultados de la secuencia a partir del clon del TvPFR2 (Ver figura 20).

5.1.4 Clonación del TvPFR2 en el vector de clonación pGEM-T easy.

Una vez obtenido el producto de amplificación del TvPFR2, se procedió a la construcción de la molécula recombinante, pGEMT/TvPFR2. La construcción, por un proceso de electroporación, se incorporó a la célula de *E. coli* TOP10. Posteriormente, se hizo un cultivo y se seleccionaron las colonias que hubiesen incorporado el vector con el inserto de interés.

5.1.4.1 Obtención de colonias recombinantes.

En la Figura 15 se observan tres placas. La placa de la izquierda corresponde a un control LB/Amp, en la cual no se observó crecimiento de la *E. coli* TOP10, correspondiente al control negativo. La placa del centro, corresponde a una placa control de LB en la cual se observó un césped bacteriano (control positivo), y en la placa de la derecha se observaron las colonias bacterianas obtenidas de la transformación bacteriana. En la transformación se obtuvieron catorce colonias blancas y cincuenta colonias azules. Este resultado indica una baja eficiencia en la transformación.

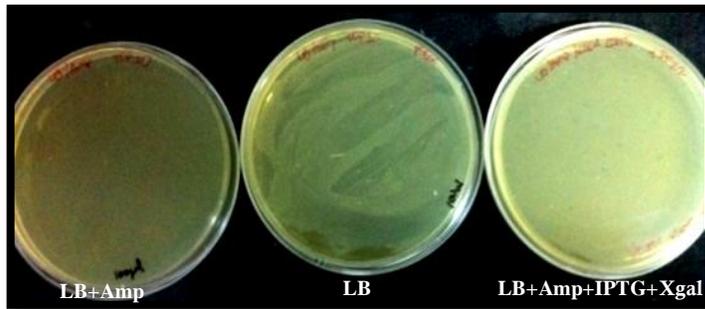


Figura 15. Placas LB con la transformación en *E. coli*. TOP10/PFR2/pGEMT. Se observan las colonias recombinantes (color blanco), y las colonias no recombinantes (color azul).

5.1.4.2 Determinación de la presencia del TvPFR2 por PCR de la colonia.

Las colonias crecidas provenientes del proceso de transformación bacteriana se sometieron a extracción de ADN para posterior análisis por PCR.

En la figura 16, se muestra el producto por PCR del ADN de dos colonias obtenidas de la transformación, tanto con los cebadores específicos (TvPFRF/TvPFRR) como con los cebadores T7/SP6. Al mismo tiempo, puede observarse en el carril 4 (control positivo), una banda de 1800 pb, que es del mismo tamaño que la banda obtenida con los cebadores específicos de las colonias transformadas (carril 2 y 5), corroborando de este modo los resultados que se esperaban de la transformación. Por otro lado, en el carril 3 y 6 se observa una banda aproximadamente 1983 pb correspondiente a la amplificación de la TvPFR2 con los cebadores T7/SP6.

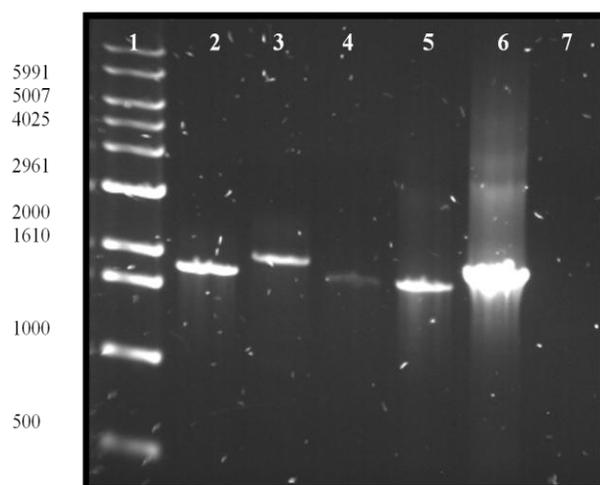


Figura 16. . Registro digital de la corrida electroforética de los productos de PCR de las colonias obtenidas de la transformación del TvPFR2. Carril 1: Marcador de peso molecular 1 Kb; carril 2: ADN de la colonia 1 amplificada con los cebadores específicos; carril 3: ADN de la colonia 1 amplificada con los cebadores T7/SP6; carril 4: Producto de PCR purificado de PFR2 con los cebadores específicos; carril 5: ADN de la colonia 2 amplificada con los cebadores específicos; carril 6: ADN de la colonia 2 amplificada con los cebadores T7/SP6; carril 7: H₂O. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %.

5.1.4.3 Extracción de plásmidos (Miniprep).

En la figura 17 se presenta la electroforesis de los plásmidos extraídos de 2 colonias obtenidas de la transformación por electroporación y su posterior selección con ampicilina. Se observa una variación en la migración del ADN, entre el carril 2 y 3, correspondientes a las colonias que poseen el inserto, en relación al carril 4 que es el plásmido control.

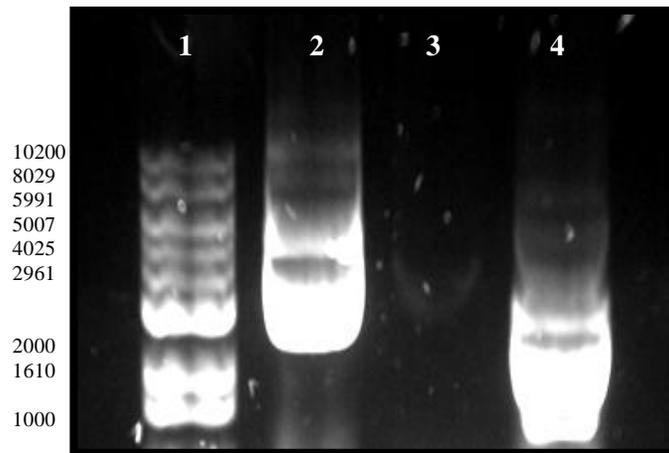


Figura 17. Registro digital de la corrida electroforética de los productos de ADN plasmídico purificado correspondientes al TvPFR2. Carril 1: Marcador de peso molecular 1Kb; carril 2: ADN plasmídico de la colonia 1; carril 3: ADN plasmídico de la colonia 2; Carril 4: ADN plasmídico de la colonia azul (Control negativo). Electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

5.1.4.4 Cortes con enzimas de restricción.

Una vez extraídos los plásmidos e identificada la presencia del inserto, se procedió al corte con enzimas de restricción del fragmento de interés, utilizándose para ello las enzimas *EcoRI* y *EcoRV*. En la figura 18 se muestra los productos de la digestión de los plásmidos, en la cual 2 de ellos tienen el fragmento de interés (carril 2 y 4), observándose una banda de 1800 pb que coincide con el tamaño esperado de la digestión con *EcoRI*. También se evidencia la presencia de una banda de 4815 pb en los carriles 3 y 5, correspondientes a la digestión con *EcoRV*, la cual lineariza el vector recombinante.

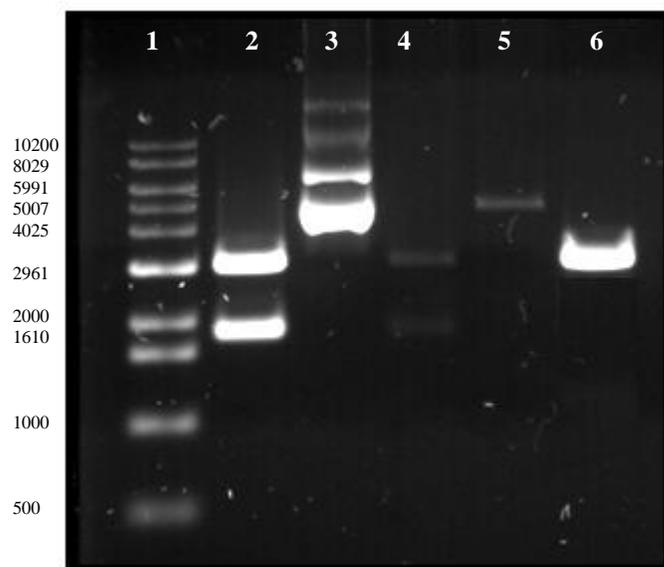


Figura 18. Registro digital de la corrida electroforética de los productos de la digestión del ADN plasmídico de la colonias 1 y 2, que poseen el TvPFR2, con las enzimas *EcoRI* y *EcoRV*. Carril 1: Marcador de peso molecular de 1 Kb; carril 2: colonia 1, digestión del ADN plasmídico con *EcoRI*; carril 3: colonia 1 digestión del ADN plasmídico con *EcoRV*; carril 4: colonia 2, digestión del ADN plasmídico con *EcoRI*; carril 5: colonia 2 digestión del ADN plasmídico con *EcoRV*; carril 6: control negativo (ADN plasmídico de una colonia azul).

5.1.5 Comparación y análisis de la secuencia del TvPFR2.

Como la secuencia del gen que codifica la PFR2 es de extenso tamaño, se necesitaron distintos pares de cebadores para la obtención de la secuencia completa. Para ello, se diseñaron dos pares de cebadores internos denominados TvPFRR1/TvPFRF1 y TvPFRF2/TvPFRR2, que amplificaron en menor tamaño la secuencia del gen (Tabla 10).

Tabla 10. Secuencia de los cebadores internos que amplifican regiones del gen putativo de la proteína PFR2.

Cebadores	Secuencia	Nucleótidos	Temperatura de hibridación
TvPFRF1 (Sentido)	5'-TGAAGCAGCACCACAACAAG- 3'	20	52° C
TvPFRR1 (Antisentido)	5'- GTTCCTCGATGTGTGTGGG - 3'	19	
TvPFRF2 (Sentido)	5'-CAGACGGAGGACGAGAAC- 3'	18	52° C
TvPFRR2 (Antisentido)	5'- GATTGACCGCAACATCCGC- 3'	19	

En la figura 19, se observa la amplificación del gen que codifica la PFR2 con los cebadores T7/SP6, los cebadores específicos diseñados inicialmente en este trabajo y los dos pares de cebadores internos.

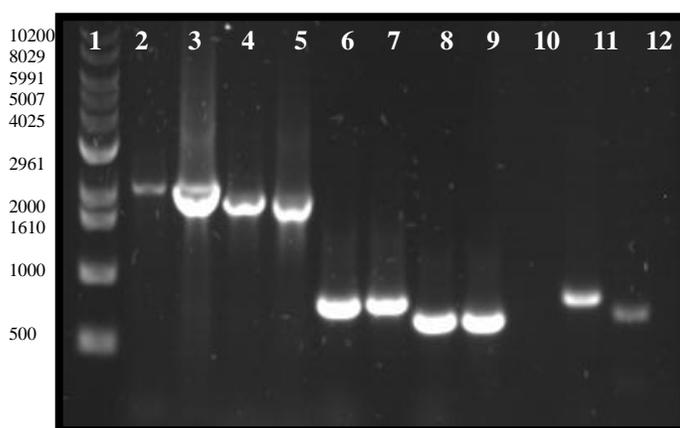


Figura 19. Registro digital de la corrida electroforética de los productos de PCR con los cebadores SP6 y T7, TvPFRF y TvPFRR; TvPFRF1 y TvPFRR1; TvPFRF2 y TvPFRR2. Carril 1: Marcador de peso molecular 1Kb; carril 2: colonia 1 amplificada con los cebadores T7/SP6; carril 3: colonia 2 amplificada con los cebadores T7/SP6; carril 4: colonia 1 amplificada con los cebadores PFRFF y PFRR; carril 5: colonia 2 amplificada con los cebadores PFRFF y PFRR; carril 6: colonia 1 amplificada con los cebadores PFRF1 y PFRR1; carril 7: colonia 2 amplificada con los cebadores PFRF1 y PFRR1; carril 8: colonia 1 amplificada con los cebadores PFRFF2 y PFRR2; carril 9: colonia 1 amplificada con los cebadores PFRF2 y PFRR2; carril 10: Producto de PCR purificado; carril 11: ADN de ovejo con los cebadores PFRF1 y PFRR1; carril 12: ADN de ovejo con los cebadores PFRF2 y PFR2. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %.

En la Figura 20 se observa el alineamiento entre la secuencia obtenida en el GenBank (HE573024.1) y la secuencia del TvPFR2, obtenida por secuenciación automática (UEGF- IVIC), con una identidad de 95% entre ellas.

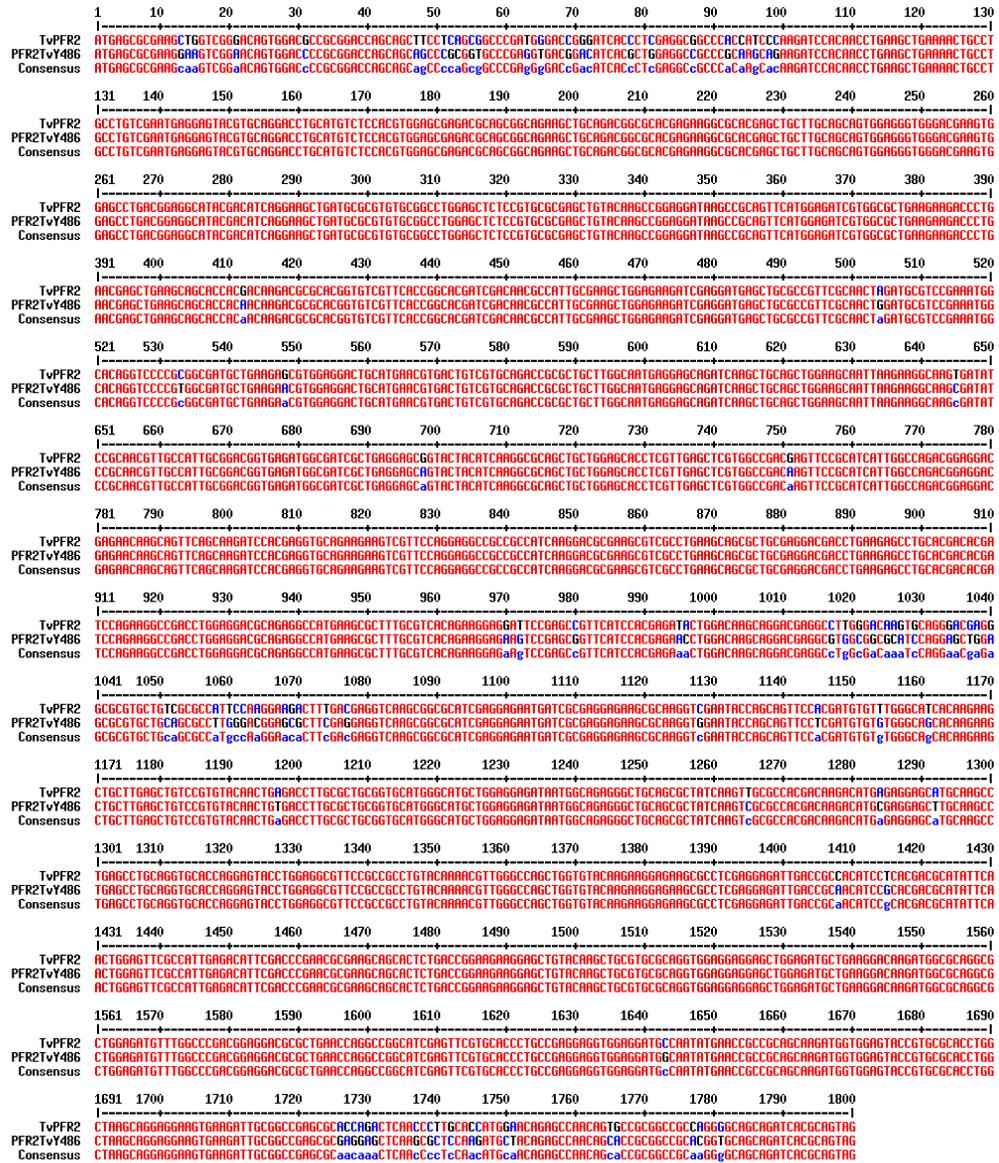


Figura 20. Alineación entre la secuencia del TvPFR2, de la colonia 1, y la secuencia del TvY486PFR2, utilizando el programa Multialin.

Al igual que el análisis de la secuencia del gen que codifica la PFR2 de TvY486, se realizó un análisis del TvPFR2, producto de un clon obtenido por secuenciación automática, mediante la comparación y el alineamiento de secuencias reportadas de genes obtenidos a partir de bases de datos. En la tabla 12, se puede observar el análisis de la secuencia correspondiente al TvPFR2, el cual presentó identidad con *T. cruzi*, *Leishmania* sp, entre otros.

Tabla 11. Estudio comparativo, con base en el BLAST, entre el TvPFR2 con distintos organismos a nivel de la cobertura y de la identidad máxima en nucleótidos.

DESCRIPCIÓN	COBERTURA	E VALUE	MAX IDENT
<i>Trypanosoma vivax</i> Y486	100%	0.0	96%
<i>Trypanosoma cruzi</i>	98%	0.0	84%
<i>Leishmania donovani</i>	96%	0.0	85%
<i>Leishmania infantum</i>	96%	0.0	82%
<i>Leishmania mexicana</i>	95%	0.0	81%
<i>Leishmania major</i>	91%	0.0	82%
<i>Trypanosoma congolense</i>	95%	0.0	82%
<i>Crithidia fasciculata</i>	96%	0.0	81%
<i>Leishmania braziliensis</i>	91%	0.0	82%
<i>Trypanosoma evansi</i>	98%	0.0	81%
<i>Trypanosoma brucei</i>	98%	0.0	81%

A su vez, se realizó un estudio comparativo de la secuencia nucleotídica y aminoacídica del TvPFR2 con otros tripanosomatídeos como se observa en la tabla 12.

Tabla 12. Estudio comparativo a nivel de la secuencia aminoacídica del TvPFR2 mediante alineamiento con otros tripanosomatídeos.

PROTEÍNA PARAFLAGELAR 2 DE	COBERTURA	E VALUE	MAX IDENTIDAD
<i>Trypanosoma vivax</i> Y486	100%	0.0	91%
<i>Trypanosoma brucei</i> TREU927 (69 kDa)	100%	0.0	84%
<i>Trypanosoma evansi</i> (69 kDa)	100%	0.0	84%
<i>Trypanosoma congolense</i> IL3000 (69 kDa)	100%	0.0	84%
<i>Trypanosoma cruzi</i> strain CL Brener (69 kDa)	98%	0.0	82%
<i>Crithidia fasciculata</i> (69 kDa)	96%	0.0	78%
<i>Leishmania braziliensis</i> (69 kDa)	96%	0.0	78%
<i>Leishmania major</i>	96%	0.0	78%
<i>Leishmania mexicana</i> MHOM/GT/2001/U1103	96%	0.0	77%

5.1.5.1 Árbol filogenético de la proteína PFR2.

Con los resultados obtenidos, se realizó un árbol filogenético a través de las secuencias aminoacídicas de la PFR2.

En la figura 21 se muestra el árbol filogenético con las relaciones evolutivas de las secuencias correspondiente al TvPFR2 con distintos organismos, ubicando a *T. vivax* en la misma rama de *T. cruzi*, *T. brucei* y *T. evansi*.

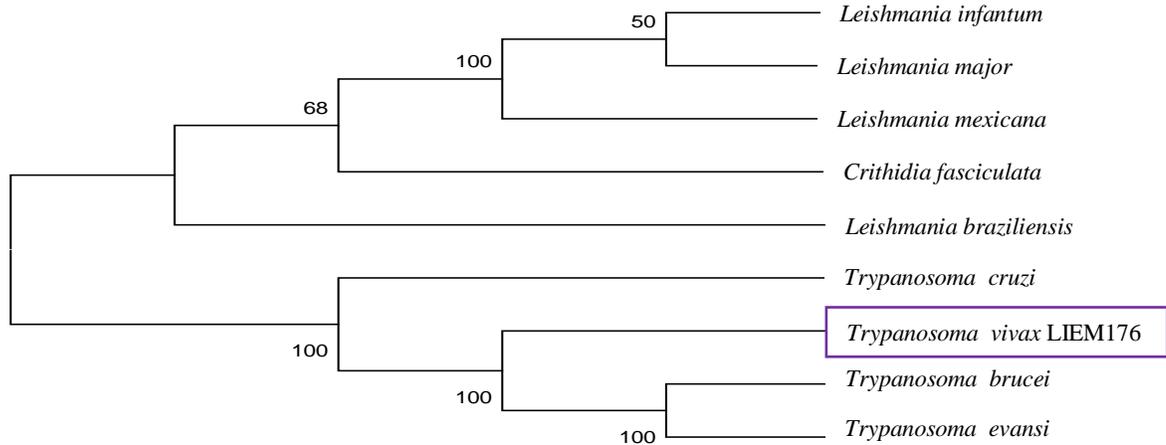


Figura 21. Árbol filogenético de la secuencia aminoacídica de la PFR2 de distintos tripanosomatideos. Método de Neighbor-Joining. Los números en las bases de las ramas significan el porcentaje de sustitución derivado de 500 replicas.

5.1.5.2 Características Físico-Químicas de la proteína PFR2.

Las características físico-químicas de las proteínas muestran la antigenicidad, hidrofobicidad, hidrofobicidad y accesibilidad al solvente. En la figura 22, la gráfica amarilla representa los segmentos antigénicos. La gráfica roja, indica el carácter hidrofóbico de la proteína, es decir que ésta es menos soluble en agua que en un solvente apolar. La gráfica azul, indica el carácter hidrófilo que es la propiedad que poseen las proteínas a ser más solubles en agua que en un disolvente apolar. Por su parte, la gráfica verde indica la accesibilidad al solvente, es decir, es la propiedad de una cadena lateral de estar expuesta al solvente.

En la figura 22 se encuentra el análisis de las características físico-químicas de la PFR2 de *T. vivax* de acuerdo a lo expresado en la introducción de esta sección.

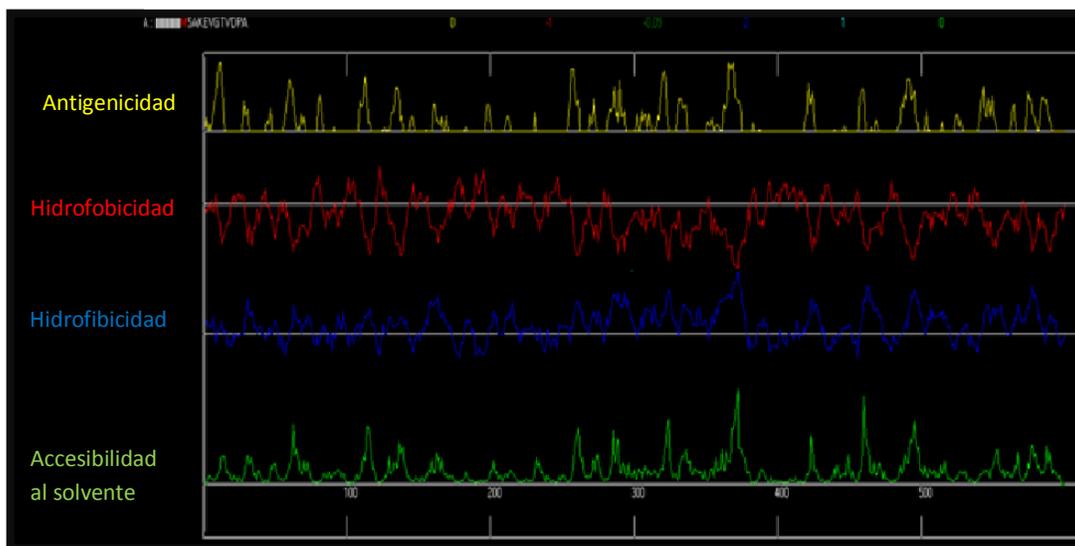


Figura 22. Predicción de antigenicidad, hidrofobicidad, hidrofibicidad y accesibilidad al solvente de la proteína PFR2 de TvLIEM176, utilizando el programa Antheprot.

5.2 Secuencia parcial de la clatrina de *T. vivax* (Tv_nCLH)

5.2.1 Obtención de ADN de *T. vivax* de un ovino sano.

Una vez alcanzado el pico de parasitemia, se analizó la sangre obtenida por técnica parasitológicas (Brener) y PCR, según los protocolos descritos en la sección de metodología. El pico de parasitemia se alcanzó el día 9, observando alrededor de 20try/campo, teniendo una parasitemia de 1×10^7 try/mL. Dicha sangre fue purificada por el método descrito por González y colaboradores (2006), quedando libre de glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas. Posteriormente, se realizó la extracción de ADN a los parásitos. El ADN de parásitos purificados fue utilizado para la identificación y clonación de Tv_nCLH.

5.2.2 Diseño de los cebadores a partir de la secuencia putativa de la secuencia parcial de la clatrina.

Se realizó la búsqueda en las bases de datos como Trityp, GeneDB y GenBank de la secuencia putativa de la CLH de *T. vivax*, encontrándose que está asociada a un sistema de transporte de sustancias, partículas y/o moléculas. Se seleccionó una secuencia parcial putativa de la región N-terminal de la CLH, de 535 pb y codificante de un péptido de 178 aminoácidos. En la figura 23 se observa el anclaje de los cebadores en el extremo anterior y posterior de la secuencia parcial de la CLH. El cebador sentido TvCLHF se ancla en la hebra 3' - 5' que permitió la amplificación de la hebra complementaria, mientras que el cebador antisentido

TvCLHR se ancla por complementariedad de bases en la hebra 5'- 3' para la amplificación de la hebra molde.

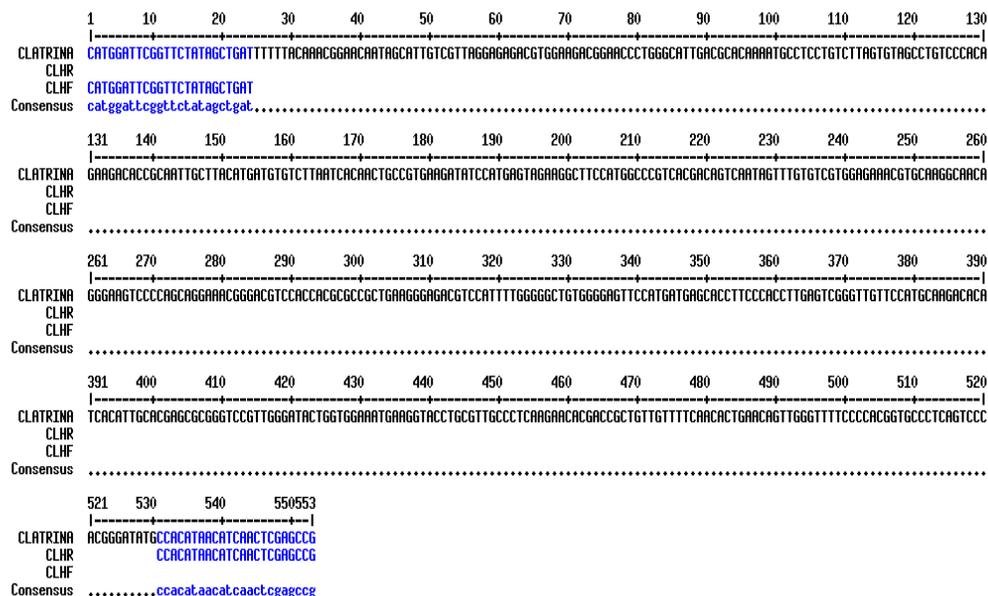


Figura 23. Secuencia nucleotídica putativa de la secuencia parcial de la CLH de TvY487 de 535 pb, obtenida según las bases de datos. Mostrando el anclaje de los cebadores TvCLHF/R.

5.2.2.1 Diseño de los cebadores TvCLHF y TvCLHR.

Para la amplificación de la secuencia parcial de la CLH de TvLIEM176 fue necesario el diseño de cebadores específicos.

Con base en el ORF, se diseñaron los cebadores sentido y antisentido, como se observa en la tabla 13. Los cebadores para amplificar la Tv_nCLH se denominaron TvCLHF (sentido), de 24 pb, y TvCLHR (antisentido), de 23 pb, presentando una temperatura de hibridación de 59° C y 52,1% en contenido de GC.

Tabla 13. Secuencia de los cebadores que amplifican la secuencia parcial de la CLH.

Secuencia	Cebadores	Secuencia	Tm (° C)	Th (° C)
Tv _n CLH	Tv _n CLHF (Sentido)	5'-CATGGATTCGGTCTATAGCTGAT-3'	59,6	59° C
	Tv _n CLHR (Antisentido)	3'-GGTGTATTGTAGTTGAGCTCGGC-5'	59,4	

5.2.3 Ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la Tv_nCLH.

La estandarización de la PCR permitió determinar las cantidades y concentraciones adecuadas de los componentes de la reacción para la amplificación de la Tv_nCLH (Tabla 14). Al mismo tiempo, se estableció el programa de ciclado y la temperatura de hibridación para la Tv_nCLH.

Tabla 14. Componentes de la mezcla de reacción para la amplificación de la Tv_nCLH.

Componentes	Concentración stock	Concentración final	Volumen (µL)
Buffer 5X	10 X	1 X	2,5
MgCl ₂	50 mM	3 mM	1,5
dNTP's	10 mM	0,3 mM	0,75
Cebador TvCLHF	10 µM	0,3 µM	0,75
Cebador TvCLHR	10 µM	0,3 µM	0,75
Taq polimerasa	2,5U/1µL	0,5U	0,2
ADN	-	-	1,5
H ₂ O	-	-	17,05
Volumen total			25µL

En la figura 24 se muestra un gel de electroforesis de la reacción de PCR sometida a un gradiente de temperatura de 53° C a 59° C, en donde se observa una banda de 535 pb correspondiente a la Tv_nCLH, proveniente de ADN de parásitos

purificados (ADNpp). Se tomó 59° C (carril 5) como la temperatura de hibridación óptima para la amplificación de la Tv_nCLH. En el carril 3 se observa un gran número de bandas correspondiente a una contaminación probablemente de algún componente de la mezcla de reacción.

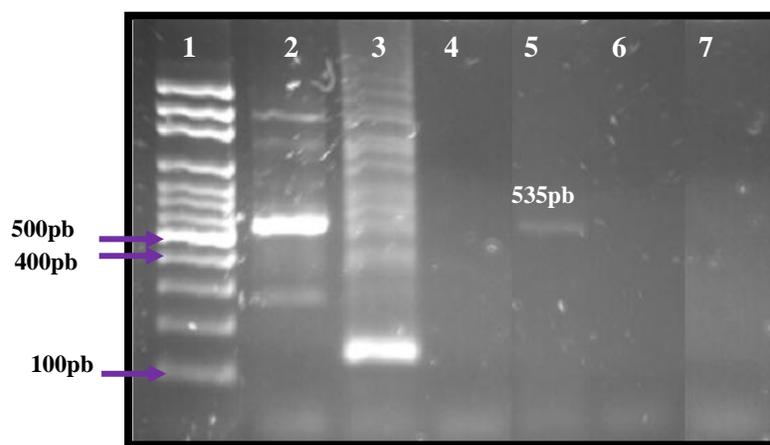


Figura 24. Registro digital de la corrida electroforética de los productos de amplificación por PCR de la Tv_nCLH en un gradiente de temperatura de hibridación, con los cebadores TvCLHF y TvCLHR. Carril 1: Marcador de peso molecular 100pb. Carril 2: ADNppTvLIEM176 (53° C). Carril 3: ADNpp TvLIEM176 (55° C). Carril 4: ADNpp TvLIEM176 (57° C). Carril 5: ADNpp TvLIEM176 (59° C). Carril 6: ADN con ovino sano. Carril 7: H₂O. Electroforesis en gel de agarosa al 2%.

En la tabla 15 se observan las condiciones utilizadas para la amplificación de la Tv_nCLH.

Tabla 15. Condiciones de incubación para la amplificación de la Tv_nCLH.

Fase	Temperatura (° C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	94	5min	1
	94	1 min	33
Hibridación	59	1 min	33
Extensión	72	1 min	33
	72	10min	1
	4	α	

5.2.3.1 Purificación del producto de la Tv_nCLH.

En la figura 25 se observa el registro digital del producto de PCR purificado por minicolumnas. Se observa la banda de 535 pb que pudiera corresponder a la Tv_nCLH.

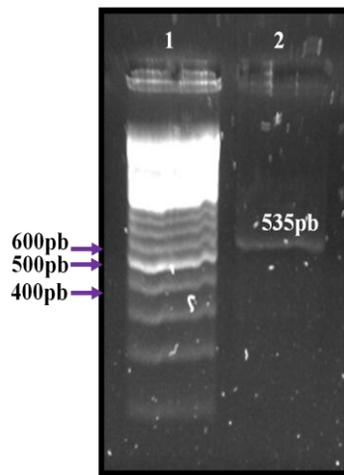


Figura 25. Registro digital de la corrida electroforética de los productos de PCR purificado de la Tv_nCLH. Carril 1: Marcador de peso molecular 100 pb. Carril 2: Tv_nCLH purificado. Electroforesis en geles de agarosa al 1%.

5.2.3.2 Corte con enzimas de restricción.

Mediante el análisis *in silico* con el programa NebCutter, se obtuvo el mapa de restricción de la secuencia parcial putativa de la CLH (Figura 26). De dicho mapa se escogió una enzima de restricción que cortase la secuencia parcial escogida.

5.2.3.3 Secuenciación de la Tv_nCLH.

Con el uso de la secuencia obtenida por bioinformática (Figura 23), se realizó el alineamiento de la secuencia obtenida por secuenciación automática Tv_nCLH con la secuencia parcial putativa de la región N-terminal, obtenida por GenBank, en donde se muestra una identidad del 88% entre ambas.

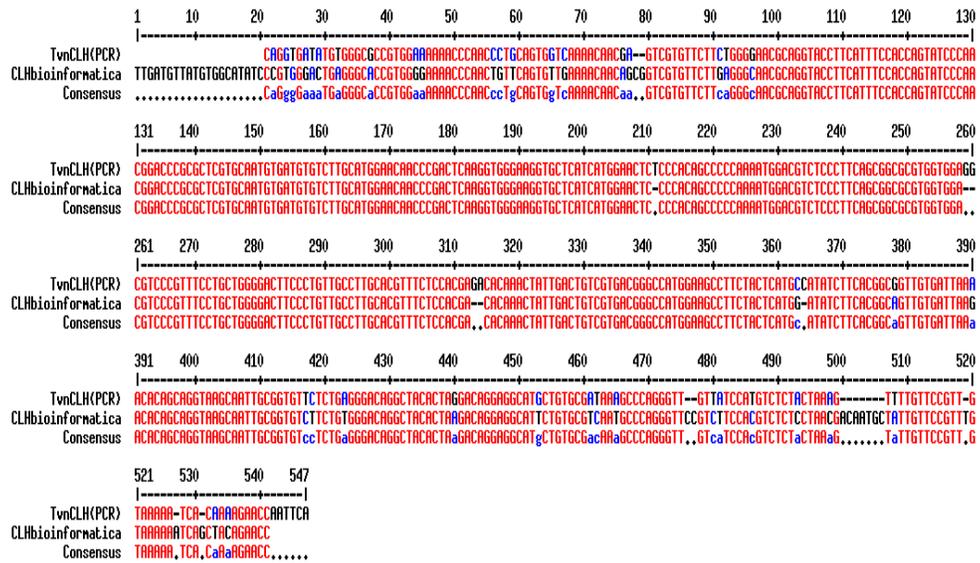


Figura 28. Alineamiento de la secuencia de la Tv_nCLH, obtenida por secuenciación automática, con la secuencia parcial putativa de la CLH de TvY486, utilizando el programa Multialin

5.2.4 Clonación de la Tv_nCLH en el vector de clonación pGEM-T easy.

Una vez obtenido el producto de amplificación de la Tv_nCLH y analizada cada secuencia, se procedió a la construcción de la molécula recombinante, pGEMT/Tv_nCLH. El vector recombinante, por un proceso de electroporación, se

incorporó a la célula de *E. coli* TOP10. Posteriormente, se hizo un cultivo y se seleccionaron las colonias recombinantes.

5.2.4.1 Obtención de colonias recombinantes.

En la Figura 29 se observan tres placas. En la placa de la izquierda se observa una placa control de LB donde se observa un césped bacteriano, correspondiente al control positivo. La placa del centro corresponde a un control LB+ Amp, en donde no se observó crecimiento de la *E. coli* TOP10 (control negativo), y en la placa de la derecha se observaron las colonias bacterianas obtenidas de la transformación bacteriana. En esta última placa se obtuvo como producto de la transformación nueve colonias blancas y sesenta y tres colonias azules. Este resultado indica una baja eficiencia en la transformación.

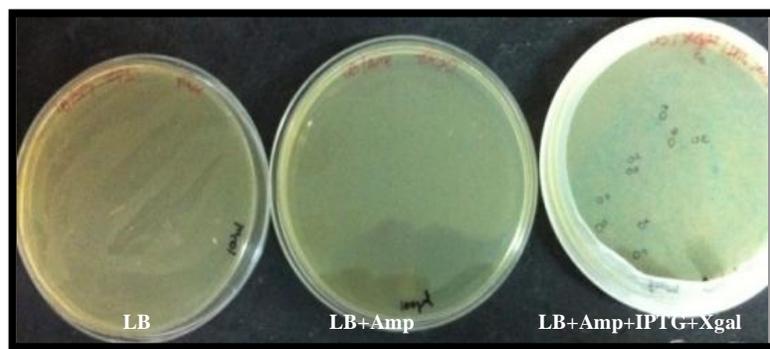


Figura 29. Transformación en *E.coli* TOP10/Tv_nCLH/pGEMT Se observan las colonias recombinantes (color blanco), y las colonias no recombinantes (color azul).

5.2.4.2 Determinación de la presencia de la Tv_nCLH por PCR colony.

Para determinar la presencia de la Tv_nCLH en las colonias recombinantes se hizo una PCR, observándose la presencia del inserto en 4 de las 9 colonias blancas. Se amplificó el ADN a partir de las cuatro colonias positivas con los cebadores específicos diseñados $TvCLHF/TvCLHR$ y con los cebadores SP6 y T7 (Figura 30). Se observó una banda de 535 pb, correspondiente a la Tv_nCLH con los cebadores $TvCLHF/TvCLHR$ en el carril 2, 4 y 6. Así mismo, se observó una banda de aproximadamente 718 pb, obtenida a partir del producto de PCR de las colonias blancas amplificadas con los cebadores SP6 y T7 (carril 3, 5 y 7).

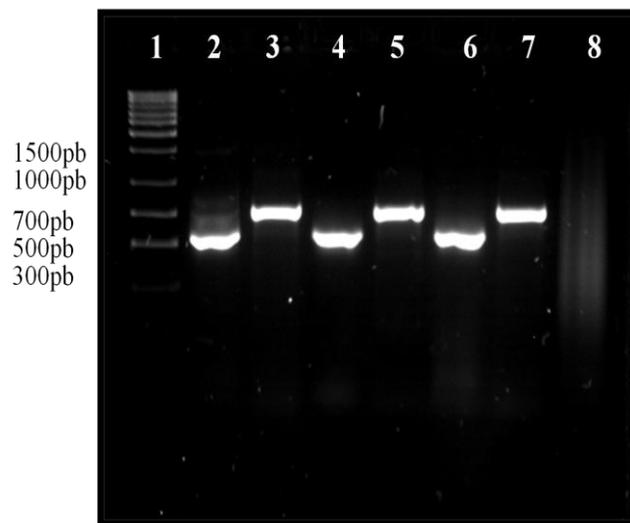


Figura 30. Registro digital de la corrida electroforética de los productos PCR de las colonias obtenidas de la transformación de la Tv_nCLH . Carril 1: Marcador de peso molecular 1Kb; carril 2: ADN de la colonia 4 amplificada con los cebadores $TvCLHF/TvCLHR$; carril 3: ADN de la colonia 4 amplificada con los cebadores T7/SP6; carril 4: ADN de la colonia 6 amplificada con los cebadores $TvCLHF/TvCLHR$; carril 5: ADN de la colonia 6 amplificada con los cebadores T7/SP6; carril 6: ADN de la colonia 8 amplificada con los cebadores $TvCLHF/TvCLHR$; carril 7: ADN de la colonia 8 amplificada con los cebadores T7/SP6; carril 8: H_2O . Electroforesis en gel de agarosa al 2 %.

5.2.4.3 Extracción de plásmidos (Miniprep).

En la figura 31 se evidencia la integridad de 4 plásmidos resultantes de la transformación de las bacterias que integraron el Tv_nCLH . Se observa variación en el patrón de bandas, que pueden corresponder a distintos plásmidos. El carril 2 corresponde al control de ADN plasmídico de una colonia sin inserto. Los carriles 3, 4 y 5 corresponden a colonias con el inserto del Tv_nCLH .

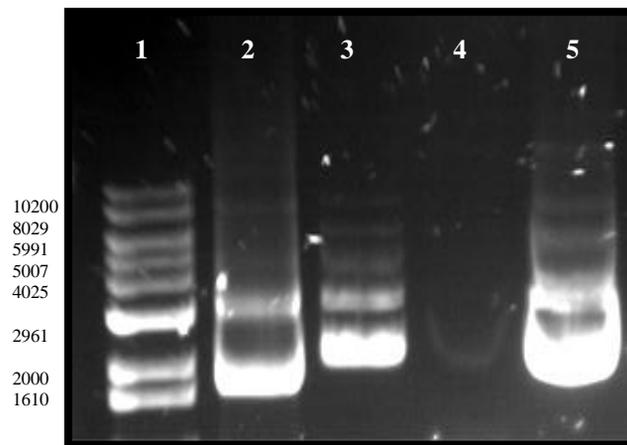


Figura 31. . Registro digital de la corrida electroforética de los productos de ADN plasmídico purificado correspondientes a la Tv_nCLH . Carril 1: Marcador de peso molecular 1 Kb; carril 2: ADN plasmídico de la colonia azul (control negativo); carril 3: ADN plasmídico de la colonia 6; carril 4: ADN plasmídico de la colonia 8; carril 5: ADN plasmídico de la colonia 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1%.

5.2.4.4 Cortes con enzimas de restricción

Se seleccionaron 3 colonias blancas que dieron positivo mediante PCR de las colonias. En la Figura 32 se observa la digestión de los distintos plásmidos con dos

enzimas diferentes, *EcoRI* y *KpnI*. En los carriles 2, 4 y 6 se muestra la digestión con la enzima *EcoRI* que liberó un fragmento con un tamaño aproximado de 548 pb correspondiente al inserto de Tv_nCLH y otro fragmento de 3015 pb correspondiente al vector pGEM-T Easy. De la digestión con *KpnI*, en el carril 3, 5 y 7, se obtuvo que la molécula recombinante se linearizó, dando como resultado una banda de 3550 pb, correspondiente a la suma del vector y el inserto, siendo este resultado positivo para los 3 clones analizados.

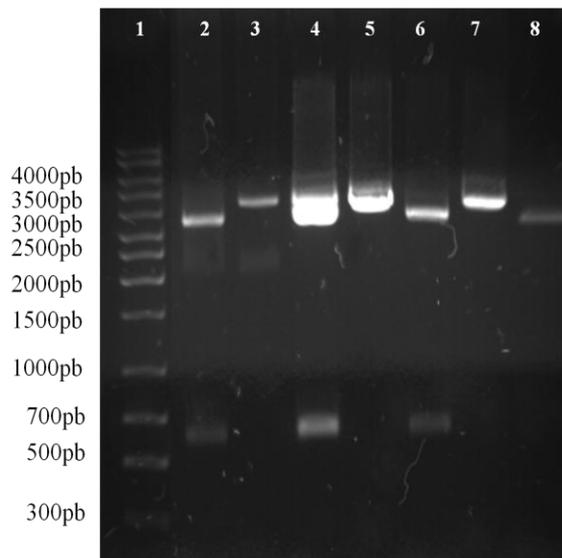


Figura 32. Registro digital de la corrida electroforética de los productos de la digestión del ADN plasmídico de las colonias que poseen la TvCLH, con las enzimas *EcoRI* y *KpnI*. Carril 1: Marcador de peso molecular 1Kb.; carril 2: Digestión del ADN de la colonia 4 con la enzima *EcoRI*; carril 3: Digestión del ADN de la colonia 4 con la enzima *KpnI*; carril 4: Digestión del ADN de la colonia 6 con la enzima *EcoRI*; carril 5: Digestión del ADN de la colonia 6 con la enzima *KpnI*; carril 6: Digestión del ADN de la colonia 12 con la enzima *EcoRI*; carril 7: Digestión del ADN de la colonia 12 con la enzima *KpnI*; carril 8: control negativo (ADN de una colonia azul digerido con *EcoRI*). Electroforesis en gel de agarosa al 2 %.

5.2.5 Comparación y análisis de la secuencia de la Tv_nCLH.

Una vez realizado el alineamiento de la secuencia parcial de la CLH de TvY486, obtenida por bioinformática, y la TV_nCLH obtenida por PCR (Figura 28), se realizó el alineamiento a nivel de nucleótidos de la secuencia parcial de la CLH de TvY486 con la Tv_nCLH (clon) de 535 pb (Figura 33), en donde a diferencia del alineamiento entre la secuencia obtenida por bioinformática y PCR, se obtuvo una identidad del 99% entre estas secuencias.

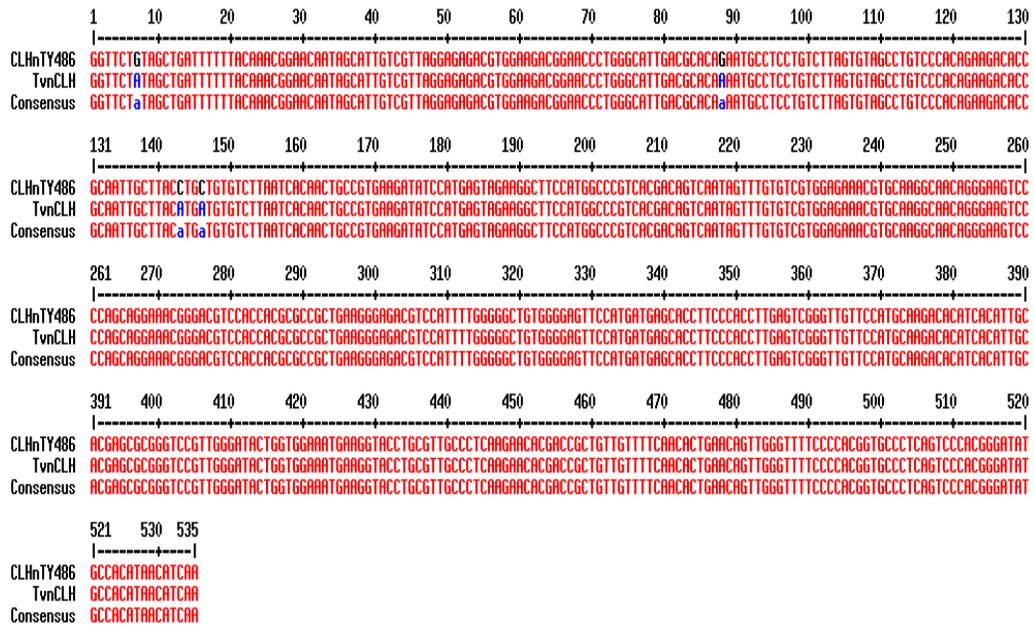


Figura 33. Alineación a nivel de nucleótidos de la Tv_nCLH, de la colonia 4, con la secuencia parcial de la CLH de TvY486, utilizando el programa Multialin.

La secuencia obtenida de la colonia clonada reveló una identidad con las diferentes especies de *Trypanosoma* y *Leishmania*. En la tabla 17 se observa la comparación, a nivel de nucleótidos realizada con BLAST, de la secuencia parcial de la CLH con diferentes tripanosomatideos.

Tabla 16. Estudio comparativo de los nucleótidos de la Tv_nCLH, de la colonia 4, con distintos tripanosomatideos a nivel de cobertura e identidad máxima.

CADENA PESADA DE LA CLATRINA DE	COBERTURA	E VALUE	MAX IDENT
<i>Trypanosoma vivax</i>	96%	0.0	99%
<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>	89%	2,00E ⁻⁷⁷	73%
<i>Trypanosoma brucei</i>	89%	2,00E ⁻⁷⁷	73%
<i>Trypanosoma congolense</i>	53%	3,00E ⁻⁴⁴	74%
<i>Trypanosoma cruzi</i>	89%	6,00E ⁻⁴⁰	68%
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	79%	1,00E ⁻³⁵	69%
<i>Leishmania major</i>	56%	1,00E ⁻²³	68%
<i>Leishmania mexicana</i>	79%	2,00E ⁻²¹	66%
<i>Leishmania donovani</i>	56%	6,00E ⁻²¹	68%
<i>Leishmania infantum</i> JPCM5	56%	6,00E ⁻²¹	68%
Humano	5%	0,79	93%

5.2.5.1 Árbol filogenético de la secuencia parcial peptídica de la CLH.

Con los resultados obtenidos, se realizó un árbol filogenético a través de las secuencias peptídicas de la CLH.

En la figura 34 se muestra el árbol filogenético con las relaciones evolutivas de las secuencias peptídicas parciales de la CLH de distintos organismos, ubicando a *T. vivax* en la misma rama de los tripanosomatideos y separándolas de la secuencia del ovino y del humano. La secuencia de *T. vivax* no reveló diferencias con *T. cruzi*, reflejando un 100% de homología entre estas dos especies.

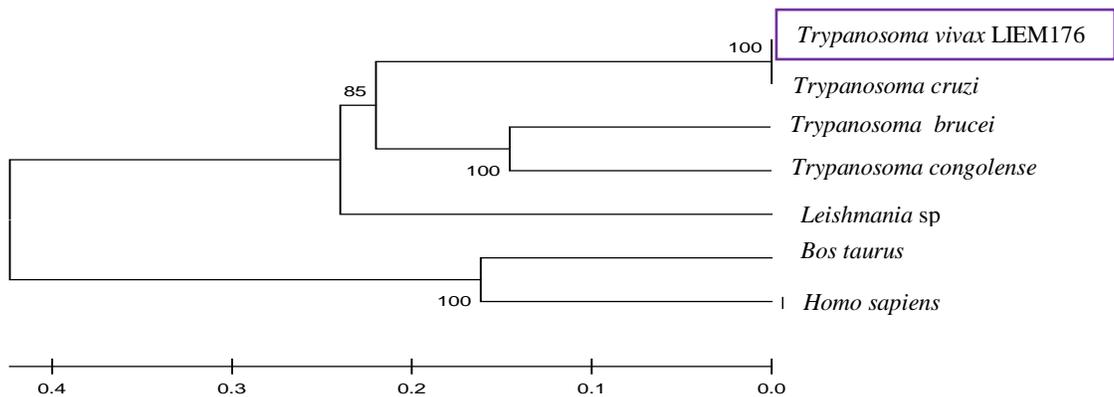


Figura 34. Árbol filogenético de la secuencia peptídica de la CLH de TvLIEM176. Modelo de distancia de Kimura de dos parámetros. Los números en las bases de las ramas significan el porcentaje de sustitución derivado de 500 replicas.

5.2.5.2 Características Físico-Químicas de la proteína PFR2 y la secuencia peptídica parcial de la CLH.

En la figura 35 se encuentra el análisis de las características físico-químicas de la secuencia peptídica parcial de la CLH de *T. vivax*, la cual está acotada por barras. Esta secuencia presenta dos grandes picos antigénicos de interés relacionado con un gran pico de hidrofobicidad.

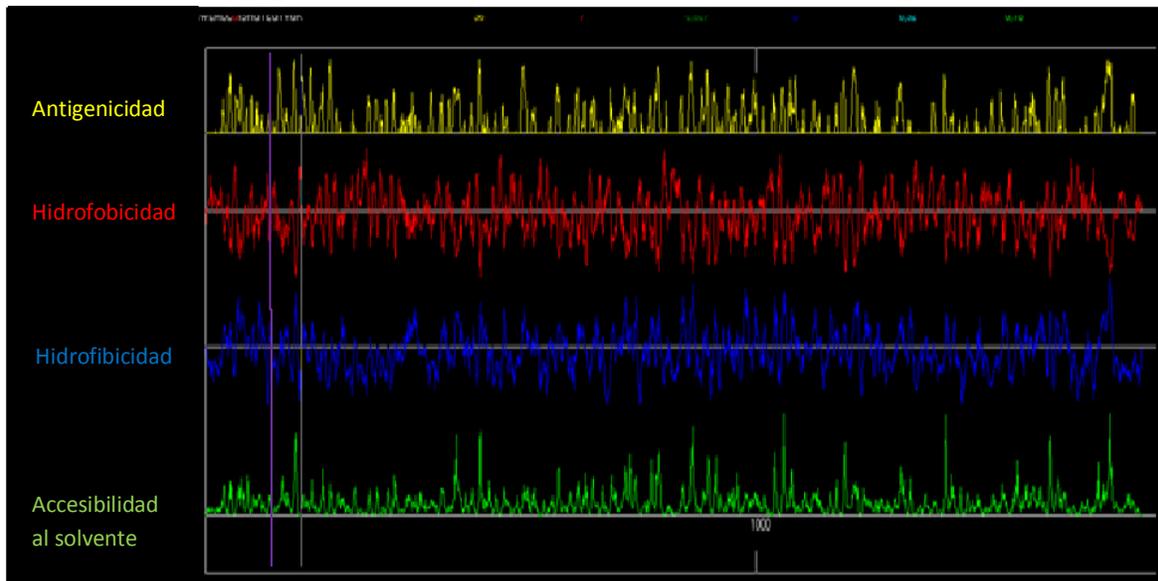


Figura 35. Predicción de antigenicidad, hidrofobicidad, hidrofobicidad y accesibilidad al solvente del gen que codifica la CLH de TvY486 utilizando el programa Antheprot.

6. DISCUSIÓN

Los estudios que se realizaron en este trabajo consistieron en la amplificación del gen que codifica la proteína paraflagelar 2, presente en el flagelo y una secuencia parcial de la región N-terminal de la clatrina, localizada en el bolsillo flagelar de los tripanomatideos, que hasta la fecha no han sido reportados para *T. vivax*. Por lo que, el objetivo de este trabajo fue la identificación y clonación del gen que codifica la PFR2 y una secuencia parcial de la CLH de un aislado venezolano de *T. vivax* (TvLIEM176). Al ser ambas proteínas estructurales, las investigaciones sobre ellas derivan la posibilidad de convertirlas en blancos terapéuticos para el control de la enfermedad causada por este parásito (Adbille y col., 2008b; Stijlemans y col., 2011).

El curso de la infección experimental con el aislado en Venezuela de *T. vivax* LIEM176 permitió realizar el seguimiento de la infección. La fase de incubación de parásito en el hospedador fue de 4 días, coincidiendo con lo señalado con Sandoval y colaboradores (1995) y Gómez (2011). El pico de parasitemia, correspondiente a la fase aguda, se alcanzó al onceavo día de infección, en donde se obtuvieron 20 try/campo, con un valor de parasitemia de 1×10^7 try/mL. Además hubo una disminución del hematocrito y un aumento de la temperatura. Estos resultados coincidieron con la curva de parasitemia y los valores de hematocrito y temperatura reportados por Gómez (2011) para esta misma cepa.

El análisis y estudio del gen que codifica la PFR2 es muy importante, debido a que se encuentra en el filamento paraflagelar que forma parte del órgano locomotor del parásito. Si ocurriese una mutación en este gen, que impidiese la formación del filamento paraflagelar, el parásito perdería la motilidad. Por lo tanto, disminuiría la población de parásitos en sangre del hospedador (Maga y col., 1999). Santrinch y colaboradores (1997), Maga y colaboradores (1999) y Saravia y colaboradores (2005) han encontrado que la PFR2 es esencial en la formación del filamento paraflagelar y por ende en la supervivencia del parásito.

Para la amplificación del TvPFR2 fue necesario el diseño de cebadores TvPFRF/TvPFRR, con base en la secuencia putativa de la PFR2 de TvY486, ya que no hay reportes de estos iniciadores para *T. vivax* (Tabla 7). Al mismo tiempo, se diseñaron cebadores internos que permitieron obtener la secuencia completa del gen por secuenciación automática a través de un barrido de la secuencia y la construcción de una secuencia consenso (Tabla 10).

Los resultados obtenidos de la amplificación del TvPFR2 demostraron que los cebadores utilizados fueron capaces de mostrar la banda esperada de 1800 pb. El gradiente de temperatura realizado para la mezcla de reacción permitió identificar que la temperatura de hibridación fue de 64° C. Dicha temperatura fue la óptima para la amplificación de una única banda de 1800 pb (Figura 11). A menor temperatura se observó que hay mayor número de bandas, lo cual indica que hay una mayor inespecificidad. Por lo que, a temperaturas mayores se favorece la

amplificación de la secuencia de interés, ya que existe una relación de máxima afinidad entre los nucleótidos y su ADN templado (McPherson y Molle., 2006; Luque y Herráez, 2008).

Así mismo, el tamaño del gen que codifica la PFR2 de la secuencia putativa de *T. vivax* es consistente con el tamaño obtenido en otras especies de tripanosomas, sugiriendo que el tamaño de esta secuencia es conservada en la mayoría de los kinetoplastideos (Saravia y col., 2005; Abdille y col., 2008b).

El ADN utilizado para la amplificación del TvPFR2 no fue proveniente de parásitos purificados, sino de sangre de ovino infectado con *T. vivax*, debido a que la secuencia de la PFR2 no se encuentra en mamíferos, estando esta secuencia únicamente en los tripanosomatideos (Clark y col., 2005; Abdille y col., 2008a). Por otro lado, ensayos iniciales realizados con la sangre infectada dieron lugar a la amplificación del gen que putativamente codifica la PFR2, lo que deriva en un ahorro de materiales.

Como se mencionó anteriormente, la secuencia del gen que codifica la PFR2 de los tripanosomatídeos, no está presente en mamíferos, por lo que ésta podría servir como diagnóstico para determinar la presencia de *T. vivax* en el hospedador. Se conoce que *T. vivax* presenta un mecanismo de variación antigénica, en la cual tienen la capacidad de expresar el repertorio de VSG durante la infección, evadiendo así la respuesta inmune de los hospedadores y permitiendo la

transmisión de los mismos a nuevos hospedadores (Gardiner y col., 1996). En este sentido, la proteína PFR2 es una proteína estructural única en los tripanosomatídeos que pudiera servir como diagnóstico, y al ser una proteína estructural podría servir como inmunógeno para el control de la tripanosomosis, ya que no evade la respuesta inmune del hospedador.

A partir de la estandarización de la PCR, se purificó el producto obtenido por centrifugación en minicolumnas, teniendo como resultado una única banda de 1800 pb. Esta purificación fue necesaria para eliminar cualquier reactivo que pueda inhibir la digestión con enzimas de restricción y la secuenciación automatizada (Figura 12). Para poder hacer la selección de la enzima se realizó el mapa de restricción *in silico* mostrado en la figura 13. Como la enzima *EcoRV* no corta el vector de clonación a utilizar en la transformación y está disponible en el laboratorio, ésta fue la enzima seleccionada para hacer las digestiones en la práctica. Los resultados obtenidos de la digestión con *EcoRV* del producto purificado fueron los fragmentos de 1152 pb y 648 pb (Figura 14), cuyos tamaños son acordes a los esperados según el mapa de restricción, sugiriendo así la presencia del inserto adecuado.

La molécula recombinante pGEMT/TvPFR2 fue incorporada en la célula *E. coli* TOP10 por electroporación. Las colonias transformadas resultaron ser resistentes a la ampicilina, ya que el vector pGEMT easy le confiere esta resistencia (Figura 15). De las catorce colonias blancas obtenidas, todas fueron sometidas a la

mezcla de reacción con los cebadores TvPFRF/TvPFRR, teniendo como resultado que sólo dos de ellas tenían el inserto de interés. Las doce colonias blancas restantes que no poseían el inserto, pudieron ser positivas, probablemente debido a la presencia de dímeros de cebadores presentes en el producto purificado que lograron ser transformadas o debido a la presencia de un agente contaminante, tal como lo expresan McPherson y Mølle (2006), en el planteamiento de los posibles problemas en las transformaciones bacterianas. La baja eficiencia en la transformación también pudo deberse a problemas con el vector de clonación, que impidieron la ligación del inserto al mismo.

Las amplificaciones del ADN plasmídico con los cebadores TvPFRRF/TvPFRR permitieron realizar la amplificación del gen que codifica la PFR2 dentro del vector recombinante, mientras que los cebadores T7/SP6 permitieron amplificar el inserto en su totalidad (Figura 16). Esto se debe a que los cebadores T7/SP6 flanquean al inserto clonado de interés, sumando 183 pb desde los cebadores T7/SP6 hasta el inserto clonado (Figura 36), obteniéndose una banda acorde con el tamaño esperado como se muestra en la figura 16.

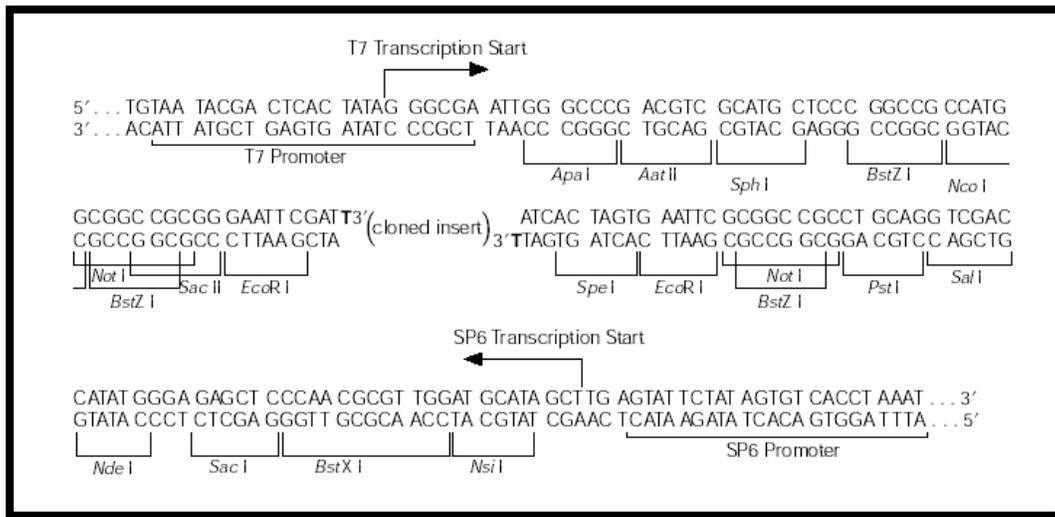


Figura 36. Secuencia nucleotídica del sitio de inserción de los cebadores T7/SP6, correspondiente al vector pGEMT.

Los resultados obtenidos del producto de purificación del plásmido (Figura 17) permitieron realizar la digestión del ADN plasmídico purificado con las enzimas de restricción, *EcoRI* y *EcoRV*, obteniendo los fragmentos esperados según el mapa de restricción (Figura 18). La enzima de restricción *EcoRI*, es una enzima que flanquea el sitio donde se inserta el gen de interés (Figura 37). Al realizar el corte con esta enzima se libera el inserto, en este caso el inserto de 1800 pb, del vector pGEMT easy que genera una banda de 3015 pb (Figura 18).

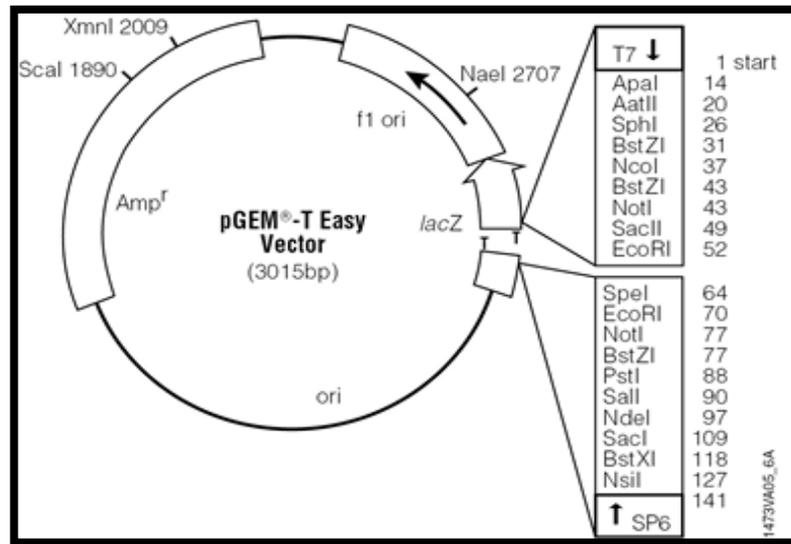


Figura 37. Mapa del vector pGEMT easy. En el lateral se observan las enzimas de restricción que cortan el vector.

Los resultados mostrados en la figura 18 de la colonia 1 (carril 3) indican que la digestión fue parcial, es decir, no actuó completamente la enzima *EcoRV* sobre todos los sitios de restricción presentes en el ADN. Esto puede deberse a la alta concentración del producto de Miniprep. Al considerar que la colonia 2 tuvo una menor cantidad de plásmido, el resultado parece indicar que el exceso de plásmido en la colonia 1, pudo inhibir la enzima, dando como resultado la digestión parcial de la colonia 1 (Luque y Herráez, 2008). En caso contrario, en el carril 5, ocurrió una digestión completa, observándose una sola banda correspondiente al vector recombinante de la colonia 2.

Cuando se compararon las secuencias del TvPFR2 amplificada por la PCR con los cebadores T7/SP6 y con los cebadores internos (Tabla 11), los cuales

permitieron obtener la secuencia completa del TvPFR2, con la secuencia del gen que codifica la PFR2 de TvY486 (Figura 20), se obtuvo una identidad de 95%. Esta variabilidad entre ellas, pudiera deberse a que en este gen ocurrieron mutaciones transicionales y transversales, sustituyendo un par de bases por su alternativa o por otra de otro tipo. Por ejemplo, la sustitución del par AT por GC, en donde esta mutación podría ocasionar cambios en la sustitución de aminoácidos y por ende en la proteína resultante. Sin embargo, las mutaciones presentes en la secuencia pudieran deberse a problemas en la secuenciación de la misma, ya que solo se secuenció una vez y una única colonia. Cabe del tamaño del gen que codifica la PFR2 se encontró en los intervalos señalados en otros estudios reportados por Abdille y colaboradores (2008) y Portman y Gull (2010).

Los resultados obtenidos de la comparación aminoacídica de la proteína PFR2 con otros tripanosmatideos (Tabla 12) indicaron que la secuencia de la PFR2 es conservada en las diferentes especies de *Trypanosoma*, como lo expuso Abdille y colaboradores (2008b).

El árbol filogenético de la proteína PFR2 construido mediante el empleo de las secuencias aminoacídicas completas de la PFR2 de distintos organismos (Figura 21), reveló variabilidad entre grupos, agrupándose *T. brucei* y *T. evansi*, sin diferencias entre ellos. Al mismo tiempo, separó a los tripanosomas de las leishmanias en ramas diferentes. *L. infantum*, *L. major*, *L. mexicana* y *L. braziliensis* formaron un grupo distinto a partir de un ancestro en común. El árbol

filogenético realizado por Abdille y colaboradores (2008b) mostró el mismo patrón de dos ramas que separa a las diferentes especies de *Leishmania* de las especies de los *Trypanosoma* (Anexo 1), con ausencia de *T. vivax*. Con los estudios realizados en este trabajo, se incorporó la secuencia de la proteína PFR2 en un nuevo árbol filogenético (Figura 21).

Los resultados obtenidos en este trabajo, en relación a las características Físico-Químicas, demuestran que la proteína PFR2 presenta una región antigénica, ideal para la obtención de anticuerpos. En relación a la hidropatía, los resultados señalaron que la PFR2 presenta tres regiones hidrofóbicas y 3 regiones hidrofílicas y la región de accesibilidad al solvente está estrechamente relacionada con el carácter hidrofílico de la proteína. Mientras más hidrofílica es la proteína, es más accesible al solvente, más cargas exponen y por ende es más antigénica (Figura 22) (Hofmann y Hadge, 1987). Por lo que podría usarse como inmunógeno para la creación de anticuerpos, y así poder controlar la tripanosomosis bovina.

Como se ha mencionado anteriormente, la CLH es una proteína vital en la formación de la vesícula que cubre los nutrientes que se introducen en el parásito (Landfear e Ignatushchenko, 2001). Una mutación en el gen, impide la formación de la vesícula y por ende la incorporación de nutrientes.

Al no haber reportes de oligos que amplifiquen la TvnCLH, el diseño de los cebadores se realizó con base en la secuencia parcial de la CLH de TvY486 (Figura

23). Los cebadores fueron denominados TvCLHF y TvCLHR (Tabla 13) y fueron diseñados en función de la región N-terminal, porque corresponde a una región antigénica de la proteína. Se seleccionó la secuencia parcial de 535 pb, de las 5100 pb (Anexo 2), ya que la CLH es una proteína de gran tamaño y alta masa molecular (Wakeham y col., 2003). De hecho, los resultados mostrados en la figura 34 indicaron que la clatrina es antigénica en toda su extensión, sin embargo la Tv_nCLH , acotada por las barras, demuestra que en la secuencia seleccionada se encuentran dos de los picos más antigénicos de toda la proteína. Esta secuencia de la región N-terminal fue escogida debido a que es esencial en la unión de los trisqueliones y para la completa formación de la vesícula que ayuda en la incorporación de nutrientes al interior del parásito (Landfear e Ignatushchenko, 2001; Willox y Royle, 2011).

Los resultados obtenidos de la amplificación de la Tv_nCLH demostraron que los cebadores utilizados fueron capaces de mostrar la banda esperada de 535 pb. El gradiente de temperatura realizado para la mezcla de reacción permitió identificar que la temperatura de hibridación fue de 59° C (Tabla 14). Dicha temperatura fue la óptima para la amplificación de una única banda de 535 pb (Figura 24). A menores temperaturas se observó que hay mayor número de bandas, lo cual indica que hay una mayor inespecificidad. La banda obtenida de la amplificación del ADN de parásitos purificados con los cebadores TvCLHF/R fue tenue probablemente debido a que la concentración del ADNpp fue baja, pero a pesar de esto se obtuvo una

única banda sin inespecificidad. Por lo que, a temperaturas mayores se favorece la amplificación de esta secuencia (McPherson y Moller, 2006).

Para la selección de la enzima, se realizó el mapa de restricción *in silico* mostrado en la figura 26. La enzima *KpnI* corta el amplicón en dos fragmentos de tamaños conocidos y no corta en ningún sitio el vector de clonación. Por lo que, ésta fue la enzima seleccionada para hacer las digestiones en la práctica. El corte generó la hidrólisis del enlace fosfodiéster de cada hebra ocasionando la ruptura de la secuencia parcial de la CLH en dos bandas y/o fragmentos, uno de 432 pb y otro de 103 pb (Figura 27), estos tamaños obtenidos concuerdan con el tamaño esperado según el mapa de restricción.

Los resultados obtenidos por secuenciación automática de la secuencia parcial de la CLH amplificada por PCR presentaron un 88% de identidad con la secuencia parcial de la CLH de TvY486 (Figura 28). Como se mencionó anteriormente, la diferencia entre estas secuencias pudiera deberse a problemas en la secuenciación automática, ya que al momento de secuenciar con los cebadores TvPFRF/TvPFRR no se obtuvieron las primeras pares de bases en ambos sentidos, dando así un bajo porcentaje de identidad entre ambas secuencias.

Los resultados obtenidos de la transformación demostraron que de las nueve colonias blancas amplificadas por PCR, con los cebadores TvCLHF/TvCLHR, cuatro tenían el inserto de interés (Figura 30). El resto de las colonias, según el

planteamiento de McPherson y Mølle (2006) pudieron ser positivas, por la presencia de dímeros de cebadores presentes en el producto purificado que lograron ser transformadas o por a la presencia de un agente contaminante.

A su vez, los cebadores TvCLHF/TvCLHR permitieron hacer la amplificación del ADN plasmídico de la Tv_nCLH dentro del vector recombinante, mientras que los cebadores T7/SP6 permitieron amplificar el inserto en su totalidad (Figura 30), ya que estos flanquean la secuencia clonada de interés.

Los resultados obtenidos con la purificación del plásmido (Figura 31) permitieron realizar la digestión del ADN plasmídico purificado con las enzimas de restricción *EcoRI* y *KpnI* dieron los fragmentos esperados según el mapa de restricción (Figura 32). Como se mencionó anteriormente, la *EcoRI* flanquea el inserto de interés (Figura 37), por lo tanto el corte del ADN plasmídico con esta enzima de restricción permitió liberar el fragmento de 535 pb del vector de clonación. Por otro lado, el corte con la *KpnI* linearizó el fragmento, ya que esta enzima corta únicamente al vector de clonación, sugiriendo así que el amplicón corresponde a la Tv_nCLH.

Los resultados obtenidos de la comparación de la Tv_nCLH, de la colonia 6, con la secuencia parcial de la CLH de TvY486 indicaron una identidad de 99% entre ellas (Figura 33), pudiendo atribuir esta diferencia en identidad a errores en la secuenciación automática, ya que la secuencia parcial de la CLH del aislado en

África mostró una homología casi perfecta con respecto a la data disponible en GenBank.

Por otra parte, la alineación de la Tv_nCLH con las secuencias de la CLH con otros organismos permitió confirmar la relación evolutiva que existe entre *T. cruzi*, y *T. vivax* descrita por Desquesnes (2004). Además, el alineamiento permitió conocer que la CLH de *T. vivax* presenta una baja identidad con la CLH del *Bos taurus*, pero con la Tv_nCLH no presentó ninguna identidad (Tabla 16). En este sentido, el árbol filogenético (Figura 34), confirmó el planteamiento expuesto ya que, la Tv_nCLH se encuentra en una rama distinta de la CLH de *Bos taurus*, por lo que ésta no interfiere en el proceso de identificación de la Tv_nCLH. Además, el árbol filogenético ubica la Tv_nCLH dentro del género de los *Trypanosoma*, evidenciando una mayor proximidad filogenética entre *T. vivax* y *T. cruzi*, que entre *T. vivax* y *Leishmania* sp, a pesar de que estos dos últimos parásitos son transmitidos por la saliva del vector (sección salivaria), mientras que *T. cruzi* se transmite por las heces (sección stercoraria).

Por su parte, la CLH presentan una región altamente antigénica, ideal para la obtención de anticuerpos. Presenta 2 regiones hidrofílicas y dos regiones hidrofóbicas localizadas en el extremo amino terminal y otra en el extremo carboxi terminal (Figura 35). En relación a la región correspondiente a la Tv_nCLH, se observa que hay un gran pico hidrofílico que está relacionado con el pico correspondiente a la accesibilidad al solvente, por lo que se podría decir que esta

secuencia es antigénica y como se mencionó anteriormente, es ideal para la obtención de anticuerpos (Hofmann y Hadge, 1987).

Finalmente, las proteínas identificadas en este trabajo pudieran servir como posible inmunógeno para el control de la tripanosomosis en Venezuela. Para ello, se necesitan más investigaciones que finalmente puedan derivar en la creación de vacunas, como por ejemplo, aquellas que impliquen el diseño de nanoanticuerpos, en donde los antígenos serían las proteínas PFR2 y la secuencia peptídica parcial de la CLH. Dado que el bolsillo flagelar representa el 0,43% de la membrana plasmática del parásito (Hung y col., 2004), el nanoanticuerpo sería capaz de entrar con mayor facilidad en el bolsillo flagelar en comparación con un anticuerpo (Stijleman y col., 2011). Por otro lado, la identificación de estas secuencias de *T. vivax*, de un aislado venezolano, podrían servir para llevar a cabo prueba de mutagénesis dirigida como los que se han hecho para otros tripanomatideos (Maga y col., 1999; Saravia y col., 2005; Abdille y col., 2008b). De esta manera se evidencia la importancia de las investigaciones realizadas sobre estas secuencias.

7. CONCLUSIONES

- ✓ Se identificaron las secuencias del TvPFR2 y la Tv_nCLH. En el caso de la TvPFR2 se obtuvo la secuencia completa de 1800 pb, mientras que para la Tv_nCLH se obtuvo una secuencia parcial de 535 pb, que hasta este momento, estas secuencias no han sido reportadas.
- ✓ El diseño de los cebadores específicos TvPFRF/TvPFRR y TvCLHF/TvCLHR permitió la amplificación del gen que codifica la proteína paraflagelar 2 y la secuencia parcial de la clatrina de un aislado venezolano de *T. vivax*.
- ✓ El diseño de cebadores internos, para las amplificaciones de la PFR2, permitieron obtener la secuencia completa del gen al hacer los alineamientos de los productos.
- ✓ Los cebadores TvPFRF/TvPFRR podrían servir para diagnosticar la presencia de *T. vivax* en el hospedador.
- ✓ A nivel de comparación de secuencias aminoacídicas se encontró que tanto PFR2 como CLH, sugieren que *T. vivax* presenta una mayor identidad con *T. cruzi* que con *T. brucei* o *T. evansi*, estos estudios apoyan la proximidad filogenética entre *T. cruzi* y *T. vivax*.

- ✓ Los ensayos de predicción de antigenicidad mostraron que tanto la PFR2 como la CLH poseen regiones inmunogénicas. La PFR2 presentó la mayor antigenicidad en el dominio distal, mientras que la CLH presentó mayor antigenicidad en los extremos amino y carboxi-terminal de la proteína.

8. PERSPECTIVAS

- ✓ Expresar la proteína paraflagelar 2 y la secuencia parcial de la clatrina de *T. vivax* en el vector peT28a, ya que ambas proteínas se ha convertido en una diana terapéutica prometedora.

- ✓ Utilizar ambas proteínas como posible inmunógeno en el ganado venezolano.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdille, M., Yong, S., Jia, Y., Suo, X., Mkoji, G. 2008. Evidence for the existence of paraflagellar rod protein 2 (PFR2) gene in *Trypanosoma evansi* and its conservation among other kinetoplastid parasites. *Exp. Parasitol.* **118**: 614-618.
2. Abdille, M., Yong, S., Jia, Y., Ding, J., Suo, X. 2008. *Trypanosoma evansi*: Paraflagellar rod protein 1 and 2 are similar but lack common B cell epitopes. *Exp. Parasitol.* **120**: 411-416.
3. Absalon, S., Blisnick, T., Bonhivers, M., Kohl, L., Cayet, N., Toutirais, G., Buisson y col. 2008. Flagellum elongation is required for correct structure, orientation and function of the flagellar pocket in *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Sci.* **121**: 3704-3716.
4. Allen, C., Goulding, D., Field, M. 2003. Clathrin-mediated endocytosis is essential in *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.* **22(19)**: 4991-5002.
5. Alves, A., Madruga, C., Desquesnes, M., Soares, C., Rios, L., Gonçalves, S. 2008. *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World. A Review *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **103 (1)**: 1-13.
6. Anosa, V. 1988. Haematological and biochemical in human and animal trypanosomiasis. Part I. *Revue D'elevage et de Medicine Veterinaire des pays Tropicaux.* **4 (1)**: 65- 78.

7. Bastin, P., Matthews, K., Gull, K. 1996. The paraflagellar rod of kinetoplastida: Solved and Unsolved Questions. *Parasitol Today*. **12 (8)**: 302-307.
8. Bastin, P., Sherwin, T., Gull, K. 1998. Paraflagellar rod is vital for trypanosome mobility. *Nature*. **391**: 548.
9. Bastin, P., Pullen, T., Moreira-Leite, F., Gull, K. 2000. Inside and outside of the trypanosome flagellum: a multifunctional organelle. *Microbes Infect.* **2**: 1865-1874.
10. Borst, P., Fairlamb, A. 1998. Surface receptors and transporters of *Trypanosoma brucei*. *Annu Rev Microbiol.* **52**: 745-78.
11. Branche, C., Kohl, L., Toutirais, G., Buisson, J., Cosson, J., Bastian, P. 2006. Conserved and specific functions of axoneme components in trypanosome motility. *J. Cell Sci.* **119**: 3443-3455.
12. Brener, Z., Andrade, Z. 1979. Relações hospedeiro-parasito. In *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. 1-41. Editorial Guanabara Koogan, Ríó de Janeiro, Brasil.
13. Brennand, A., Gualdrón-López., M., Coppens, I., Rigden, D., Ginger, M., Michels, P. 2011. Autophagy in parasitic protist: Unique features and drug targets. *Mol. Biochem. Parasitol.* **177**: 83–99.
14. Broadhead, R., Dawe, H.R., Farr, H., Griffiths, S., Hart, S.R., Portman, N., Shaw, M.K y col. 2006. Flagellar motility is required for the viability of the bloodstream trypanosome. *Nature*. **440**: 224–227.

15. Clark, K., April, K., Gennadiy, K.S., Lal, S., Stryker, A.G., 2005. Cloning and expression analysis of two novel paraflagellar rod domain genes in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Research*. **96**: 312–320.
16. Coppens I, Opperdoes FR, Courtoy PJ, Baudhuin P. 1987. Receptor-mediated endocytosis in the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *J Protozool.* **34** (4): 465-73.
17. Correa, J., Menna-Barreto, R., Soares, M. 2007. Clathrin in *Trypanosoma cruzi*: In Silico Gene Identification, Isolation, and Localization of Protein Expression Sites. *J Eukaryot Microbiol.* **54**(3): 297-301.
18. Curasson, M. 1943. *Trypanosoma vivax* et varieties. Editorial M. G Curasson. Tomo I. Vigot Freres, Paris.
19. Dávila, A., Silva. 2000. Animal trypanosomiasis in South America. Current status, partnership, and information technology. *Ann. N. y Acad. Sci.* **916**: 199-212.
20. Deflorin, J., Rudolf, M., Seebeck, T. 1994. The major components of the paraflagellar rod of *Trypanosoma brucei* are two similar but distinct proteins which are encoded by two different gene loci. *J. Biol. Chem.* **269**: 28745-28751.
21. De Souza, W., Souto-Padron, T. 1980. The paraxial structure of the flagellum of trypanosomatidae. *J. Parasitol.* **66**: 229–236.
22. De Souza., W. 2002. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. *Kinetoplastid Biol Dis.* **1** (1): 3.

23. De Stefano, H., González, B., Boada-Sucre, A., Avellaneda, A., Godoy, S., Soto, H. 1999. Efecto de la infección con *Trypanosoma vivax* sobre la calidad espermática de toros Siboney. *Rev. Cient. FCV-LUZ*. **9(5)**: 411-417.
24. Desquesnes M. 2004. Livestock Trypanosomoses and Their Vectors in Latin America. World Organization for Animal Health. Paris, Francia.
25. Docampo, R., De Souza, W., Miranda, K., Rohloff, P. y Moreno, S. 2005. Acidocalcisomes-conserved from bacteria to man. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 251-261.
26. Duszenko, M., Ivanov., IE., Ferguson., M., Plesken, H., Cross, G. 1988. Intracellular transport of a variant surface glycoprotein in *Trypanosoma brucei* . *J. Cell Biol.* **106**: 77-86.
27. Espinoza, E., Aso, P., González, N., Rangel, L. 1996. Clasificación morfológica de la anemia desarrollada en bovinos infectados experimentalmente con *Trypanosoma vivax*. *Vet Trop.* **21 (2)**: 201-214.
28. Field, M., Carrington, M. 2009. The trypanosome flagellar pocket. *Nature Review.* **7**: 775-786.
29. Fuge, H. 1969. Electron microscopical studies on the intraflagellar structures of trypanosomes. *J. Protozool.* **16**: 460- 466.
30. Gadelha, C. Rothery, S., Morphey, M., McIntosh, J., Severs, N., Gull, K. 2009. Membrane domains and flagellar pocket boundaries are influenced by the cytoskeleton in African trypanosomes. *PNAS.* **106 (41)**: 17425–17430.
31. Gardiner, C., Fayer, R., Dubey, J. 1989. An atlas of protozoan parasites in animal tissues. *Agriculture Handbook.* **651**: 70-71.

32. Gómez, E. 2011. Caracterización clínica, morfométrica y molecular de aislados venezolanos de *Trypanosoma vivax*. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Central de Venezuela.
33. Gonzales, J.L., Chacón, E., Miranda, M., Loza, A., Siles, L. 2007. Bovine trypanosomosis in the Bolivian Pantanal. *Vet parasitol.* **146**: 9-16.
34. González, L.E., García, J.A., Núñez, C., Perrone, T.M., González-Baradat, B., Gonzatti, M.I., Reyna-Bello, A. 2005. *Trypanosoma vivax*: A novel method for purification from experimentally infected sheep blood. *Exp. Parasitol.* **111**: 126-129.
35. Grab, D., Bwayo, J. 1982. Isopycnic isolation of African trypanosomes on Percoll gradients in situ. *Acta Trop.* **39**: 363- 366.
36. Hirst, J., Robinson, M. 1998. Clathrin and adaptors. *Biochim. Biophys.* **1404**: 173-193.
37. Hoare, C. A. 1972. The Trypanosomes of Mammals. A Zoological Monograph. *Blackwell Scien Publ.* 555-592.
38. Hofmann, H., Hädige, D. 1987. On the theoretical prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Biomed Biochim Acta.* **46 (11)**: 855- 66.
39. Hung, C., Qiao, X., Lee, P., Lee, M.G. 2004. Clathrin-Dependent Targeting of Receptors to the Flagellar Pocket of Procyclic-Form *Trypanosoma brucei*. *Eukaryotic Cell.* **3(4)**: 1004–1014.
40. Kirchhausen, T. 1999. Adaptors for clathrin-mediated traffic. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **15**: 705-732.

41. Kirchhausen, T. 2000. Clathrin. *Annu. Rev. Cell. Biochem.* **69**: 699-727.
42. Kornberg, A. 1995. Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable. *J. Bacteriol.* **177**: 491- 496.
43. Kumar, S., Natesan, A., Black, A., Matthews, A., Mottram, J., Field, M. 2011. *Trypanosoma brucei brucei*: Endocytic recycling is important for mouse infectivity. *Exp. Parasitol.* **127 (4)**: 777-783.
44. Lacomble, S., Portman, N., Gull, K. 2009. A protein-protein Interaction Map of the *Trypanosoma brucei brucei* Paraflagellar Rod. *Plos One.* **4 (11)**: e7685.
45. Ladon, L., Santrich, C., LeBrowitz, J. 1996. Stage-specific expression of the *Leishmania mexicana* paraflagellar rod protein PFR-2. *Mol. Biochem parasitol.* **80**: 125-132.
46. Landfear, S., Ignatushchenko, M. 2001. The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. *Mol. Biochem Parasitol.* **115**: 1-17.
47. Levine, N., Corliss, J., Cox, F., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B., Leedale, G y col. 1980. A newly revised classification of the protozoa. *J Parasitol.* **27 (1)**: 37- 28.
48. Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. 2002. *Biología Celular y Molecular*. Editorial panamericana, Cuarta Edición.
49. Luque, J., Herráez, A. 2008. *Biología Molecular e Ingeniería Genética*. Editoria Elsevier, Madrid, España.
50. Maga, J., Sherwin, T., Francis, s., Gull, K., LeBowitz, J. 1999. Genetic dissection of the *Leishmania* paraflagellar rod, a unique flagellar cytoskeleton structure. *J. Cell Sci.* **112**: 2753-2763.

51. McKean, P.G., Baines, A., Vaughan, S., Gull, K., 2003. Gamma-tubulin functions in the nucleation of a discrete subset of microtubules in the eukaryotic flagellum. *Curr. Biol.* **13**: 598–602.
52. McPherson, M., Moller, S. 2006. PCR. Segunda edición. The Basic. Cornwall, UK.
53. Michels, P., Hannaert, V., Bringaud, F. 2000. Metabolic Aspects of Glycosomes in Trypanosomatidae – New Data and Views. *Parasitol Today.* **16** (11): 482-489.
54. Miranda, G., Esdras, D., Miranda, K., Weissmuller, G., Mascarello, P., De Souza, W. 2010. Structural Changes of the Paraflagellar Rod during Flagellar Beating in *Trypanosoma cruzi*. *PloS one.* **5** (6): e11407.
55. Moore, L., Santrich, C., LeBowitz, J. 1996. Stage-specific expression of the *Leishmania mexicana* paraflagellar rod protein PFR-2. *Mol. Biochem. Parasitol.* **80**: 125-135.
56. Morell, M., García-Perez, JL., Thomas, MC., Lopéz, MC. 2005. Silico identification, molecular characterization and expression analysis of the *Trypanosoma brucei* paraflagellar rod protein PFR3. *Ars Pharm.* **46** (1): 73-84.
57. Morgan, G., Allen, C., Jeffries, T., Hollinshead, M., Field, M. 2001. Developmental and morphological regulation of clathrin-mediated endocytosis in *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Sci.* **114**: 2605-2615.
58. Morgan, G., Hall, B., Denny, P., Carrington, M., Field, M, 2002. The kinetoplastida endocytic apparatus. Part I: a dynamic system for nutrition and evasion of host defences. *TRENDS in Parasitol.* **18**: 491-496.

59. Mousavi, S, Malerod, L., Berg, T., Kjekken, R. 2004. Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem. J.* **377**: 1–16.
60. Osório, A., Madruga, C., Desquesnes, M., Soares, C., Ribeiro, L., Costa, S. 2008. *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World. A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **103** (1): 1-13.
61. Overath,P., Engstler, M. 2004. Endocytosis, membrane recycling and sorting of GPI-anchored proteins: *Trypanosoma brucei* as a model system. *Mol Microbiol.* **53** (3): 735- 44.
62. Owen, D., Luzio, J.P. 2000. Structural insights into clathrin-mediated endocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**: 467-474.
63. St. Pierre, C., Leonard, D., Corvera, S., Kurt-Jones, E., Finberg, R. 2011. Antibodies to cell surface proteins redirect intracellular trafficking pathways. *Exp Mol Pathol.* **91**: 723- 732.
64. Portman, N., Gull, K. 2010. The paraflagellar rod of kinetoplastid parasites: From structure to components and function. *Int J. Parasitol.* **40** (2): 135-148.
65. Reyna, A. 2007. Estado actual de la tripanosomosis y anaplasmosis a partir de muestras realizadas en 4 estados de Venezuela. *Boletín de Malariología y salud ambiental.* XLVII. Sup (1): 76.
66. Rivera, M. 1996. Hemoparasitosis bovina. Caracas. Universidad Central de Venezuela.

67. Sandoval, E., Espinoza, E., Valle, A. 1995. Parasitemia y comportamiento clínico en ovejas infectadas experimentalmente con *Trypanosoma vivax*. *Vet Trop.* **20**: 67-84
68. Santrich, C., Moore, L., Sherwin, T., Bastin, P., Brokaw, C., Gull, K., LeBowitz, J.H. 1997. A motility function for the paraflagellar rod of *Leishmania* parasites revealed by *PFR-2* gene knockouts. *Mol. Biochem Parasitol.* **90 (1)**: 95-109.
69. Saravia, N., Hazbon, N., Osorio, Y., Valderrama, L., Walker, J., Santrich, C., Cortazar, T., LeBowitz, J., Travia, B. 2005. Protective immunogenicity of the paraflagellar rod protein 2 of *Leishmania mexicana*. *Vaccine.* **23**: 984–995
70. Schlaeppli, K., Deflorin, J., Seebeck, T. 1989. The major component of the Paraflagellar Rod *Trypanosoma brucei* is a helical protein that is encoded by two identical, tandemly linked genes. *Cell Bio.* **109**: 1695-1709.
71. Seidl, A., Davila, A., Silva, R. 1999. Estimated Financial Impact of *Trypanosoma vivax* on the Brazilian Pantanal and Bolivian Lowlands. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **94**: (2).
72. Simoes, D., Sánchez, M., González, Y., Rivera, F., Parra, R., Gil, M., García, M., y col. 2009. Brote de tripanosomosis en un rebaño doble propósito del municipio Mara del estado Zulia, Venezuela. *Ciencia.* **17 (2)**: 124 – 132.
73. Souza, W., Souto-Padrón, T. 1980. The paraxial structure of the flagellum of tripanosomatidae. *J. Parasitol.* **66 (2)**: 229- 235.

74. Stijlemans, B., Caljon, G., Natesan, S., Saerens, D., Conrath, K. 2011. High Affinity Nanobodies against the *Trypanosome brucei* VSG Are Potent Trypanolytic Agents that Block Endocytosis. *PLoS Pathog.* **7(6)**: 1002072.
75. Suarez, C., García, F., Baldizán, G., Mujica, F. 2003. Comportamiento parasitológico, clínico y hematológico en ovinos infectados experimentalmente con un aislado venezolano de *Trypanosoma vivax*. *Vet trop.* **28 (1)**: 79-92.
76. Tafur, M., Amanda, C., Casas, A., Serrano, E. 2002. Prevalencia de *Trypanosoma vivax* en bovinos de selva alta en la provincia de Chachapoyas, Amazonas. *Rev. Inv. Vet.* **13 (2)**: 94-97.
77. Tamasaukas, R., Roa, N., Cobo, M. 2006. Trypanosomosis por *Trypanosoma vivax* en búfalos, en dos fincas del estado Guárico, Venezuela. *Rev Científica, FCV-LUZ.* **16 (6)**: 575-578.
78. Tejera, E. 1920. Tripanosomiasis animales en Venezuela. *Bull. Soc. Path. Exot.* **13**: 297-305.
79. Toro, M., León, E. García, J., Ruiz, A. 1980. Resultados de un muestreo sobre tripanosomiasis bovina mediante técnicas serológicas. *Vet. Trop.* **5 (1)**: 43-50.
80. Toro, M. 1990. Seroepidemiología de las hemoparasitosis en Venezuela. Curso de ampliación de conocimientos sobre técnicas de inmunodiagnóstico de enfermedades causadas por hemoparásitos. Universidad Simón Bolívar/ Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Central de Venezuela.
81. Vanhamme, L., Pays, E. 1995. Control of gene expression in trypanosomes. *Microbiol Rev.* **59**: 223-240.

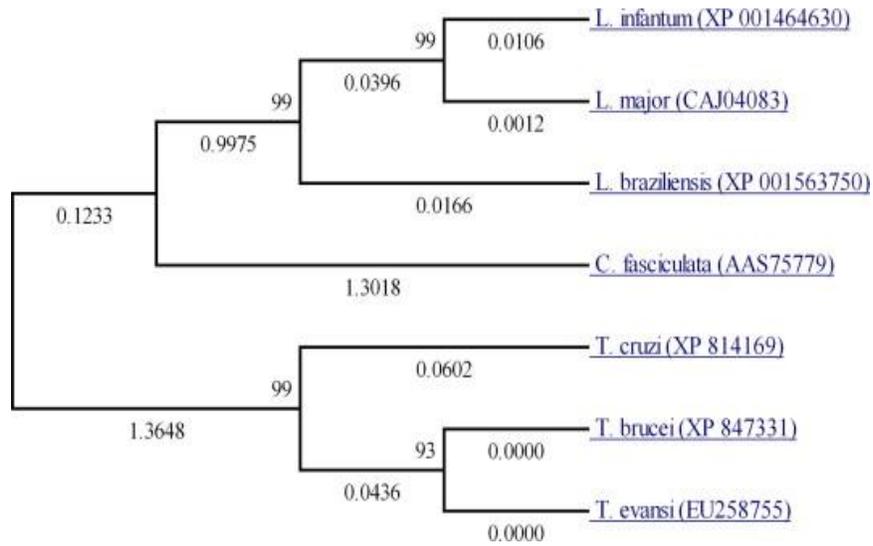
82. Vaughan, S., Gull, K. 2003. The trypanosome flagellum. *Cell Science*. **116**: 757-759.
83. Vickerman, K., 1962. The mechanism of cyclical development in trypanosomes of the *Trypanosoma brucei* sub-group: An hypothesis based on ultrastructural observations. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **56**: 487–495.
84. Vickerman, K. 1974. Antigenic variation in African trypanosomes. In parasites in the immunized Host: Mechanism of Survival, Ciba Foundation Symposium. *Associated Scientific Publishers*. **25**: 53-70.
85. Wakeham, D., Chen, C., Greene, B., Hwang, PK., Brodsky, FM. 2003. Clathrin self-assembly involves coordinated weak interactions favorable for cellular regulation. *EMBO J.* **22 (19)**: 4980–4990.
86. Wells, E. 1984. Animal trypanosomosis in South America. *Rev. Vet. Med.* **2**: 31-41.
87. Wiley y Sons. 1987. Current Protocols in Molecular Biology. Editorial Office.
88. Willox, A., Royle, S.J. 2012. Functional analysis of interaction sites on the N-terminal domain of clathrin heavy chain. *Traffic*. **13**: 70-81.
89. Woodward R, Cardewn MJ, Gull K. 1994. Molecular characterization of a novel, repetitive protein of the paraflagellar rod in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **67**: 31-39.
90. Xing, Y., Böcking, T., Wolf, M., Grigorieff, N., Kirchhausen, T., Harrison, S. 2010. Structure of clathrin coat with bound Hsc70 and auxilin: mechanism of Hsc70-facilitated disassembly. *EMBO J.* **29**: 655 – 665.

9.1 CONSULTAS EN LÍNEA:

1. <http://www.genedb.org>. [Consulta: 24-03-2011].
2. <http://tritrypdb.org/tritrypdb/> [Consulta: 14-03-2011].
3. <http://www.ivic.gob.ve/microbiologia/cesaan/#> [Consulta: 15-03-2011].
4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> [Consulta: 10-01-2011].
5. <http://www.sanger.ac.uk/> [Consulta: 10-01-2011].
6. <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php> [Consulta: 26-04-2011].
7. <http://expasy.org/sprot/> [Consulta: 26-04-2011].
8. <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/> [Consulta: 11-08-2011].
9. http://www.ch.embnet.org/cgi-bin/TMPRED_form_parser [Consulta: 11-02-2012].
10. MEGA 4.
11. OLIGOEXPLORER 1.2.
12. DNACLUB.

10. ANEXOS

Anexo 1. Árbol filogenético de la secuencia de la proteína PFR2, descrito por Abdille y colaboradores (2008b).




```

4291 4300 4310 4320 4330 4340 4350 4360 4370 4380 4390 4400 4410 4420
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
CLHcomplete CLHparcial
Consensus .....
4421 4430 4440 4450 4460 4470 4480 4490 4500 4510 4520 4530 4540 4550
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
CLHcomplete CLHparcial
Consensus .....
4551 4560 4570 4580 4590 4600 4610 4620 4630 4640 4650 4660 4670 4680
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
CLHcomplete CLHparcial
Consensus .....
4681 4690 4700 4710 4720 4730 4740 4750 4760 4770 4780 4790 4800 4810
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
CLHcomplete CLHparcial
Consensus .....
4811 4820 4830 4840 4850 4860 4870 4880 4890 4900 4910 4920 4930 4940
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
CLHcomplete CLHparcial
Consensus .....
4941 4950 4960 4970 4980 4990 5000 5010 5020 5030 5040 5050 5060 5070
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
CLHcomplete CLHparcial
Consensus .....
5071 5080 5090 5100
|-----|-----|-----|-----|
CLHcomplete CLHparcial
Consensus .....

```


2471 2480 2490 2500 2510 2520 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600
 L.brasiliense
 I_brucei
 I_vivax
 Consensus
 2601 2610 2620 2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690 2700 2710 2720 2730
 L.brasiliense
 I_brucei
 I_vivax
 Consensus
 2731 2740 2750 2760 2770 2780 2790 2800 2810 2820 2830 2840 2850 2860
 L.brasiliense
 I_brucei
 I_vivax
 Consensus
 2861 2870 2880 2890 2900 2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970 2980 2990
 L.brasiliense
 I_brucei
 I_vivax
 Consensus
 2991 3000 3010 3020 3030 3040 3050 3060 3070 3080 3090 3100 3110 3120
 L.brasiliense
 I_brucei
 I_vivax
 Consensus
 3121 3130 3140 3150 3160 3170 3180 3190 3200 3210 3220 3230 3240 3250
 L.brasiliense
 I_brucei
 I_vivax
 Consensus
 3251 3260 3270 3280 3290 3300 3310 3320 3330 3340 3350 3360 3370 3380
 L.brasiliense
 I_brucei
 I_vivax
 Consensus
 3381 3390 3400 3410 3420 3430 3440 3450 3460 3470 3480 3490 3500 3510
 L.brasiliense
 I_brucei
 I_vivax
 Consensus
 3511 3520 3530 3540 3550 3560 3570 3580 3590 3600 3610 3620 3630 3640
 L.brasiliense
 I_brucei
 I_vivax
 Consensus
 3641 3650 3660 3670 3680 3690 3700 3710 3720 3730 3740 3750 3760 3770
 L.brasiliense
 I_brucei
 I_vivax
 Consensus
 3771 3780 3790 3800 3810 3820 3830 3840 3850 3860 3870 3880 3890 3900
 L.brasiliense
 I_brucei
 I_vivax
 Consensus
 3901 3910 3920 3930 3940 3950 3960 3970 3980 3990 4000 4010 4020 4030
 L.brasiliense
 I_brucei
 I_vivax
 Consensus
 4031 4040 4050 4060 4070 4080 4090 4100 4110 4120 4130 4140 4150 4160
 L.brasiliense
 I_brucei
 I_vivax
 Consensus
 4161 4170 4180 4190 4200 4210 4220 4230 4240 4250 4260 4270 4280 4290
 L.brasiliense
 I_brucei
 I_vivax
 Consensus
 4291 4300 4310 4320 4330 4340 4350 4360 4370 4380 4390 4400 4410 4420
 L.brasiliense
 I_brucei
 I_vivax
 Consensus
 4421 4430 4440 4450 4460 4470 4480 4490 4500 4510 4520 4530 4540 4550
 L.brasiliense
 I_brucei
 I_vivax
 Consensus
 4551 4560 4570 4580 4590 4600 4610 4620 4630 4640 4650 4660 4670 4680
 L.brasiliense
 I_brucei
 I_vivax
 Consensus
 4681 4690 4700 4710 4720 4730 4740 4750 4760 4770 4780 4790 4800 4810
 L.brasiliense
 I_brucei
 I_vivax
 Consensus
 4811 4820 4830 4840 4850 4860 4870 4880 4890 4900 4910 4920 4930 4940
 L.brasiliense
 I_brucei
 I_vivax
 Consensus
 4941 4950 4960 4970 4980 4990 5000 5010 5020 5030 5040 5050 5060 5070
 L.brasiliense
 I_brucei
 I_vivax
 Consensus
 5071 5080 5090 5100 5110 5120 5128
 L.brasiliense
 I_brucei
 I_vivax
 Consensus

Anexo 6. Secuencia aminoácídica la CLH. En rojo se resalta la secuencia peptídica parcial de la región N-terminal de la CLH.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
conoleta clonada	NDGPISFAEVFLQNSVAGLQPGATISFKTLTLESQKYVCVROVQPGQTSLVIVDLGREGSIRNNVRRDASAIHNPSSKILAIRSGRNLIQYDMDAAKRLKAAAFDEVDVFTHTVDERTVGLVNSAVHH													
Consensus													
conoleta clonada	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
Consensus	HSLDGSIDAPPNRVFDRAPELNGNVQLSYQTDENKKHMLCGISRGTEGTVGKTLQFSVENNSGRVLEGNAGTFISTISIPDPRSCVNYCLAHNNPTQGGKYLIMELPTAPKADVSLQRRVVDVPPFPG MLCGISRGTEGTVGKTLQFSVENNSGRVLEGNAGTFISTISIPDPRSCVNYCLAHNNPTQGGKYLIMELPTAPKADVSLQRRVVDVPPFPG MLCGISRGTEGTVGKTLQFSVENNSGRVLEGNAGTFISTISIPDPRSCVNYCLAHNNPTQGGKYLIMELPTAPKADVSLQRRVVDVPPFPG													
conoleta clonada	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
Consensus	DFPVALHVSPIKLLTVVYTGHSLLLDIIFAVYIKTQQVSNCGVFCGTGYTKTGGILCVNAGGSVFHVSNDNATVFFVKNQLQNPPELALRIAGSANLGGVDDLRYVKLENSLRAGDVEEAVRTCLRAP DFPVALHVSPIKLLTVVYTGHSLLLDIIFAVYIKTQQVSNCGVFCGTGYTKTGGILCVNAGGSVFHVSNDNATVFFVKNQLQNPPELALRIAGSANLGGVDDLRYVKLENSLRAGDVEEAVRTCLRAP DFPVALHVSPIKLLTVVYTGHSLLLDIIFAVYIKTQQVSNCGVFCGTGYTKTGGILCVNAGGSVFHVSNDNATVFFVKNQLQNPPELALRIAGSANLGGVDDLRYVKLENSLRAGDVEEAVRTCLRAP													
conoleta clonada	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
Consensus	NNRLRVPEVLRNFVHPQAGQPAISTYFKIVLAETSLNKHESVELARRILPKGGINVKLQYDEDKLTPSEELGDLISQVDPDELALKIFHKTNAHARVNVLLQRNETQKAVEYCKRAGFSPNARDIL													
conoleta clonada	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
Consensus	NSFIHVPQNAVGLALHRLRAKRPVPPNEIVDFVTAQLIQATEFLEVLRGDSSEATSDLQTKLEINLKHSHSSVAEKIFACGICTHYDGLLAPLCEERAGLPQRAIECYVTAQRDPGIDNLA													
conoleta clonada	651	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780
Consensus	NIRRCFSMAHNFPEVHEFFGKLSQTDHAKLEDLLRNHHQHFVYQLATKYNDALGSDKLELFLHKLVDIILYYLGRAIVPYTRDAEVHYRYEAAAEVGVQVLELRNTRSPCYDPERITLLKLN													
conoleta clonada	781	790	800	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	910
Consensus	KKHADLPLINICDQHNFDLVRVYLETENESIEQYVQRSSPSKTPAVVGAIDCNQAEFIKSLLSVGTMCVRAELVEVVEQRGRRLIETHLEHRYEKKTDEPLHNAKLYVLGNAPKFLT													
conoleta clonada	911	920	930	940	950	960	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040
Consensus	ENEYVPLVIGKYCENRDPHLSYIAYRGGCLSNELIETTSKNGHMKQLARYLVQKNELEHATVLRGEGIDRDLVERVQQTALPESEVTEEVSTTVRAFHNDELTEELVSLDQIVVCGFRKRNFLFN													
conoleta clonada	1041	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170
Consensus	LLNSAVRSKKNVMEYVSTLENYDAKEVAGNCSSEGHEAFVYDYKFEHPVEARRVLRHMDKIDPRGLYAQRCDNPSVHSLVGEALLRADELREAIQVLRRAKNSCVDSVIARAEKNNYGDILKY													
conoleta clonada	1171	1180	1190	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
Consensus	LTHVROESHGEEKSIDITLVLYARTGLSELEELLKSAHHIQVHTYADKCFNGLYDSARVLYSISNHFALALTLVRLNLPAYEAAQSQARSIADEYNLACVEAKENKLANICAIPLALQVETLH													
conoleta clonada	1301	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400	1410	1420	1430
Consensus	DIVRYEDLGLYDOLLAYLKAARNTGAAHGIFTEGVLLAKYRPEKLEHVNMYSKLNAHKLIVACEQYHHLVLRVLRVHNNEDLRAAKTAMHAFGDAADHEVFEKVRCHLGRSDVYVSSISFYLNT													
conoleta clonada	1431	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540	1550	1560
Consensus	SPQLLQDLLSSLFKTLDPERVLREKAVASVHLIAQYLETYQNRNAKLINEALNEFYVEEENFTLRHSVENYHNFDSRELTAKLEKMLELFRKIALFLHRRKNSYAYANTVAKESKLYQEAIEFAES													
conoleta clonada	1561	1570	1580	1590	1600	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680	1690
Consensus	KDISVEDLLDFVVDHPECFYCLVYCYDLLTPQLVLEKALNKCDIARPYLIQSIQYTSRVIRIEKSHSEAHESGKETERRSGQPFHAGNDPLIQAGPAYSRAAPSAMQFQPMGYGNHPQGGHAG													
conoleta clonada	1691	1699												
Consensus	GALYGNVVF.....													