



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

Construcción de vectores de transfección  
para la expresión de LYTI<sub>pn</sub> y LYTI<sub>ps</sub>.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**

P R E S E N T A :

**ANGELICA DULCE MARIA OLEA MARTINEZ**

ASESORES: DRA. REBECA G. MANNING CELA

DRA. GILDA FLORES ROSALES



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES**

**ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS**

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE  
EXAMENES PROFESIONALES

**DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
P R E S E N T E**

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicarle a usted que revisamos la TESIS:

"Construcción de vectores de transfección para la expresión de LY1pn y LY1ps".

que presenta 1a pasante: Angélica Dulce María Olea Martínez  
con número de cuenta: 40005323-5 para obtener el título de :  
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

**ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 3 de Mayo de 2005.

PRESIDENTE	<u>Dra. Gilda Flores Rosales</u>	
VOCAL	<u>Dr. Francisco Montiel Sosa</u>	
SECRETARIO	<u>Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>MC. Marina L. Morales Galicia</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>OFB. René Damián Santos</u>	



**Centro de Investigaciones y Estudios  
Avanzados del IPN  
(CINVESTAV)**

Este trabajo de tesis titulado: "Construcción de vectores de transfección para la expresión de LYT1pn y LYT1ps", se realizó en su totalidad en el Departamento de Biomedicina Molecular, Laboratorio de Biología molecular y celular de parásitos bajo la dirección de la Dra. Rebeca Manning Cela.

## Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme dado la oportunidad de ser universitaria.

Al Departamento de biomedicina molecular del CIVESTAV por todo el apoyo otorgado durante la realización de esta tesis.

A la Dra. Rebeca Manning Cela, no sólo por el apoyo que me ha dado, también por el tiempo que me dedicó así como por sus consejos, compañía y confianza que siempre serán invaluable. Gracias.

A Claudia Dueñas Márquez por todo su apoyo y la colaboración técnica que me brindó durante la realización de este proyecto así como por su compañía.

A la Dra. Gilda Flores, el Dr. Francisco Montiel, la Dra. Sandra Díaz, la Mta. Marina Morales y al Profesor René Santos por los consejos otorgados en la revisión de este trabajo.

Al Sr. Pedro por su apoyo y ayuda durante todo este tiempo.

A mis compañeros de laboratorio: Julio César, Julio García, David, Janneth, Gilberto, Joel, Luis "conejo", Luis Enrique, Luis Alberto, Marisa, Jesús y Norma por haber hecho tan placentero el trabajo de laboratorio.

A mis padres por todo el apoyo y amor que siempre me han dado.

A mis hermanos por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas.

A mi abuelita y a mis tíos por el apoyo incondicional que siempre me han dado.

A Miguel Resendiz Capetillo por todas las risas que ha compartido conmigo.

# ÍNDICE

	Páginas
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	i
<b>Lista de figuras</b> .....	ii
<b>Lista de tablas</b> .....	iii
<b>Resumen</b> .....	iv
<b>Introducción</b> .....	1
<i>Trypanosoma cruzi</i> .....	1
Aspectos generales .....	1
Morfología .....	1
Ciclo de vida .....	4
<b>Enfermedad de Chagas</b> .....	6
Manifestaciones clínicas .....	6
Fase aguda .....	6
Fase latente .....	7
Fase crónica.....	8
Diagnóstico .....	9
Tratamiento .....	10
Prevención .....	10
<b>Antecedentes generales</b> .....	11
Mecanismo de invasión .....	11
Unión .....	11
Internación .....	12
<b>Antecedentes directos</b> .....	14
Proteínas involucradas en el proceso de invasión .....	14
Tc Tox .....	14
Peptidil prolil isomerasa .....	15
Glucoproteína 82 .....	15
Oligopeptidasa B .....	15
LYT1 .....	16

<b>Justificación</b> .....	18
<b>Hipótesis</b> .....	19
<b>Objetivos</b> .....	20
<b>Esquema experimental</b> .....	21
<b>Materiales y métodos</b> .....	22
Bacterias .....	22
<i>Escherichia coli</i> DH10B .....	22
Plásmidos .....	22
pGEM-T-Easy .....	22
pEGFP .....	23
Diseño de oligonucleótidos .....	24
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	25
Electroforesis en geles de agarosa .....	27
Ligación .....	28
Transformación de bacterias calcio competentes .....	30
Extracción del ADN de plásmido .....	31
Lisis alcalina .....	31
Extracción de ADN por la técnica de STET.....	32
Enzimas de restricción .....	33
Purificación de ADN de geles de agarosa .....	36
<b>Resultados.</b> .....	38
Amplificación por PCR de las secuencias de LYT1 (1°ATG) y LYT1 (2°ATG).....	38
Clonación de la secuencia de LYT1 (1°ATG) y LYT1 (2°ATG) en pGEM-T Easy .....	39
Subclonación de la secuencia de LYT1 (1° ATG) y LYT1 (2° ATG) en pEGFP .....	41
<b>Discusión</b> .....	44
<b>Conclusiones</b> .....	50
<b>Perspectivas</b> .....	51

<b>Bibliografía</b> .....	52
<b>Apéndices</b> .....	56
A. Secuencia del gen LYT1 alelo b .....	56
B. Secuencia de pEGFP.....	57
C. Secuencia de pGEM-T Easy.....	59
D. Medios y soluciones.....	61

## Lista de abreviaturas

<b>3'T</b>	Timidina en el extremo 3' de la cadena de ADN
<b>µg</b>	Micro gramos
<b>µl</b>	Micro litros
<b>a.a.</b>	Aminoácido (s)
<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	cDNA (Ácido Desoxirribonucleico complementario)
<b>ADP</b>	Adenosin Difosfato
<b>Agua mQ</b>	Agua desionizada con una resistencia de 18MOhms
<b>AMP</b>	Adenosina-3', 5'-monofosfato
<b>ATP</b>	Adenosin Trifosfato
<b>cols</b>	Colaboradores
<b>dNTP's</b>	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
<b>EGFP</b>	Proteína Verde Fluorescente Aumentada ( <i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i> )
<b>GFP</b>	Proteína Verde Fluorescente ( <i>Green Fluorescent Protein</i> )
<b>hr (s)</b>	Hora (s)
<b>IPTG</b>	Isopropiltio-β-D-galactósido
<b>kb</b>	Kilo bases
<b>kDa</b>	Kilo Daltones
<b>LYT1</b>	Proteína LYT1
<b>LYT1</b>	<i>Gen LYT1</i>
<b>LYT1p</b>	Diferentes derivados de la proteína LYT1
<b>LYT1pn</b>	Proteína LYT1 nuclear
<b>LYT1ps</b>	Proteína LYT1 secretada
<b>MCS</b>	Sitio de multiclonación
<b>min</b>	Minutos
<b>ng</b>	Nanogramos
<b>NAD</b>	Alcohol deshidrogenasa
<b>N-terminal</b>	Amino terminal
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polimerase Chain reaction</i> )
<b>STET</b>	Solución compuesta por Sucrosa, Tritón, EDTA y Tris.
<b>Tm</b>	Tiempo de desnaturalización
<b>X- Gal</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-galactósido

## Lista de figuras

	Páginas
<b>Figura 1</b>	Fases morfológicas de <i>Trypanosoma cruzi</i> ..... 3
<b>Figura 2</b>	Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> ..... 5
<b>Figura 3</b>	Chancro tripanosomal y signo de Romaña ..... 7
<b>Figura 4</b>	Cambios en el electrocardiograma presentes en pacientes que cursan la fase crónica de la enfermedad ..... 8
<b>Figura 5</b>	Radiografías de las visceromegalias más frecuentes en la enfermedad de Chagas ..... 9
<b>Figura 6</b>	Amplificación por PCR de las secuencias que codifican para LYT1 (1°ATG) y LYT1 (2°ATG) ..... 38
<b>Figura 7</b>	Extracción de ADN total de las colonias blancas resistentes a ampicilina y su digestión con <i>EcoRI</i> ..... 40
<b>Figura 8</b>	ADN de pEGFP, pGEM-T Easy-LYT1 (1°ATG) y pGEM-T Easy-LYT1 (2°ATG) extraído por el método de lisis alcalina ..... 41
<b>Figura 9</b>	ADN's purificados de pEGFP, pGEM-T Easy-LYT1 (1°ATG) y pGEM-T Easy-LYT1 (2°ATG) digeridos con <i>BamHI</i> y <i>KpnI</i> ..... 42
<b>Figura 10</b>	Extracción de ADN de dos colonias representativas resistentes a ampicilina y su digestión con <i>Hind III</i> y <i>KpnI</i> ..... 43

## Lista de tablas

	Páginas
<b>Tabla 1</b>	Mezcla para la amplificación por PCR ..... 27
<b>Tabla 2</b>	Adición de adeninas en los extremos 5' de los productos de PCR ..... 29
<b>Tabla 3</b>	Mezcla de ligación de los productos de PCR a pGEM-T Easy ..... 29
<b>Tabla 4</b>	Mezcla de ligación de LYT1 (1° y 2° ATG) en pEGFP ..... 30
<b>Tabla 5</b>	Mezcla para la reacción de digestión de pEGFP con <i>Bam</i> HI y <i>Kpn</i> I ..... 34
<b>Tabla 6</b>	Mezcla para las reacciones de digestión de pGEM-T Easy-LYT1 (1° y 2° ATG) con <i>Eco</i> RI ..... 35
<b>Tabla 7</b>	Mezcla para la reacción de digestión de pEGFP-LYT1 (1° y 2° ATG) con <i>Hind</i> III y <i>Kpn</i> I ..... 36
<b>Tabla 8</b>	Eficiencia de transformación de las ligaciones de pGEM-T Easy-LYT1 (1° y 2° ATG) ..... 39
<b>Tabla 9</b>	Eficiencia de clonación de pGEM-T Easy-LYT1 (1° y 2° ATG) ..... 40
<b>Tabla 10</b>	Eficiencia de transformación de las ligaciones con pEGFP-LYT1 (1° y 2° ATG) ..... 43
<b>Tabla 11</b>	Eficiencia de clonación de pEGFP-LYT1 (1° y 2° ATG) ..... 43

## Resumen

El protozooario *Trypanosoma cruzi* es el agente causal de la enfermedad de Chagas, la cual representa un problema de salud pública muy importante en América Latina. El ciclo de vida de este parásito alterna entre hospederos vertebrados, en donde se establece la infección y hospederos invertebrados que sirven como vectores para la transmisión. Dentro de los hospederos vertebrados, es capaz de invadir y replicarse en una gran variedad de células. Aún cuando el mecanismo de infección se ha estudiado por varios años, son pocas las proteínas a la fecha descritas que se haya demostrado están involucradas en el proceso de invasión, dentro de las cuales está LYT1, que es la molécula en estudio en el presente proyecto. En trabajos previos nuestro grupo demostró que parásitos deficientes en LYT1 muestran tres fenotipos sobresalientes: una infección deficiente, actividad hemolítica disminuida y un desarrollo de estadio acelerado *in vitro*. Estos fenotipos tan diversos son posiblemente el resultado del "trans-splicing" alternativo de LYT1 observado. De ser activos los diferentes transcritos de LYT1 darían lugar a distintas proteínas, una de las cuales sería secretada (LYT1ps) siendo consistente con el papel de LYT1 en la hemólisis y la infección y otra nuclear (LYT1pn) la cual jugaría un papel en el desarrollo de estadio del parásito. Por lo tanto, en este proyecto nos propusimos clonar la secuencia que codifica para LYT1 con y sin la posible secuencia señal del amino terminal, fusionada a la secuencia que codifica para la proteína verde fluorescente. Se obtuvieron las construcciones pEGFP-LYT1 (1°ATG) y pEGFP-LYT1 (2°ATG) en el presente trabajo, sentando las bases para investigaciones futuras dirigidas a la caracterización de LYT1ps y LYT1pn.

## Introducción

### *Trypanosoma cruzi*

#### Aspectos generales

Este protozooario pertenece al orden *Kinetoplastidae*, de la familia *Trypanosomatidae*. Dentro de esta familia se encuentran muchas especies del género *Trypanosoma*, pero pocas causan enfermedades significativas en humanos. En África, *Trypanosoma brucei* causa la enfermedad del sueño o tripanosomiasis africana, y en América, *Trypanosoma cruzi* provoca la enfermedad de Chagas, padecimiento que afecta a millones de personas en el centro y sur del Continente Americano principalmente.

#### Morfología

Una de las características más especiales del orden *Kinetoplastidae* es la presencia del cinetoplasto (formado por la unión del cuerpo parabasal y el blefaroplasto).

En *Trypanosoma cruzi*, la posición del cinetoplasto y del núcleo; junto con la ausencia o presencia de la membrana ondulante, son utilizados para diferenciar las distintas morfologías del parásito. Se han identificado bajo estos criterios cuatro estadios del parásito (Fig. 1):

**Amastigote:** Esta es la forma intracelular del parásito en el vertebrado, aunque se han encontrado en la sangre de vertebrados infectados. Se caracteriza por ser redondeado u oval, multiplicarse por división binaria, medir de 1.5-4µm de diámetro y no poseer flagelo. Presenta modificaciones en el cinetoplasto, el cual se observa como un cuerpo oscuro cerca del núcleo.

---

**Tripomastigote metacíclico o promastigote:** Esta es la forma infectante para el hospedero vertebrado presente en el insecto. Se caracteriza por ser alargado y afilado terminado en punta, de 8 $\mu$ m de longitud con un núcleo central y en el extremo anterior el cinetoplasto de donde emerge un flagelo corto, sin membrana ondulante.

**Epimastigote:** Forma presente en el insecto vector. Se caracteriza por su forma oval alargada de 20-40 $\mu$ m de longitud, se multiplica por división binaria, su cinetoplasto se localiza en la parte media del organismo en la parte anterior al núcleo, éste último presenta una forma redondeada. Se puede identificar un flagelo que emerge de la parte media del parásito el cual empieza a formar una pequeña membrana ondulante más pequeña que la observada en tripomastigotes.

**Tripomastigote sanguíneo:** Se encuentra en la sangre de mamíferos infectados. No se multiplica, pero constituye la forma infectante para invertebrados. Es alargado, fusiforme y su tamaño es de alrededor de 20 $\mu$ m de longitud. Tiene el cinetoplasto localizado posterior al núcleo, usualmente en la porción más posterior del parásito. El flagelo sale del extremo posterior y se dobla hacia adelante a lo largo del cuerpo del parásito, formando una membrana ondulante por todo el parásito y emerge en forma libre en su extremo anterior (Botero y Restrepo, 1992; Razo y Resendiz, 1992; Tyler y Engman, 2001).

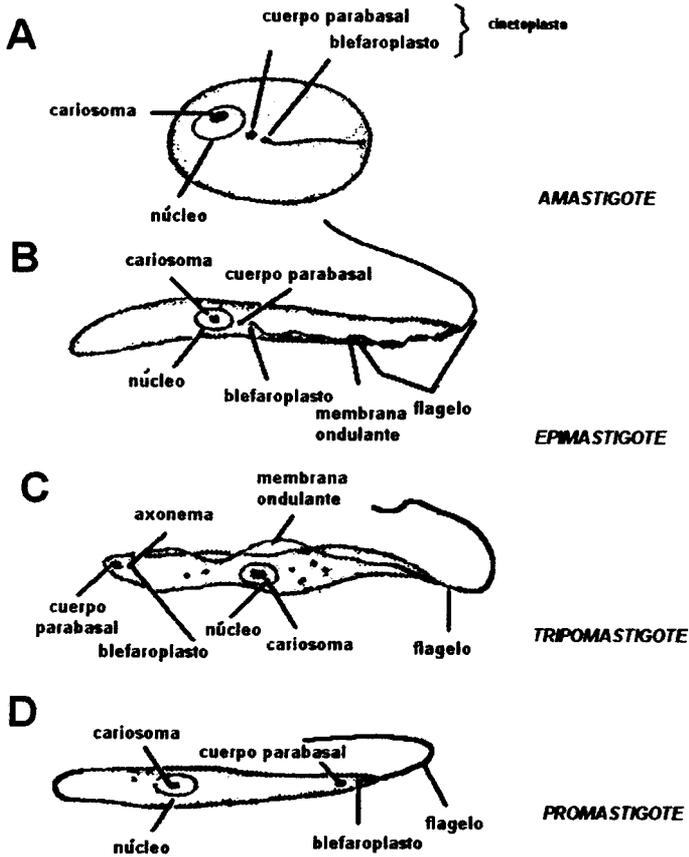


Figura 1. Fases morfológicas de *Trypanosoma cruzi*. Estructura de los diferentes estadios de *T. cruzi*, A, amastigote; B, epimastigote; C, tripomastigote sanguíneo y D, promastigote o tripomastigote metacíclico (Razo y Resendiz, 1992).

## Ciclo de vida

*Trypanosoma cruzi* es transmitido por insectos pertenecientes a la subfamilia *Triatominae* de la familia *Reduviidae* (orden *Hemiptera*). Los vectores más importantes son *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y *Pastronylus megistrus*, aunque *T. cruzi* puede ser transmitido por más de 100 especies de insectos de esta familia.

Estos insectos Reduvii se infectan al alimentarse de sangre humana o animales infectados con *T. cruzi*. Esta sangre contiene parásitos circulantes y durante la ingesta sanguínea el insecto toma una mezcla de tripomastigotes sanguíneos (y cerca del 10% de amastigotes). En el insecto, estos tripomastigotes sanguíneos se diferencian a epimastigotes, los cuales proliferan en la parte media del intestino antes de diferenciarse en tripomastigotes metacíclicos en el recto del insecto. Los insectos infectados, al picar nuevamente al hombre o a los animales, deyeccan fácilmente sobre la superficie de la piel. Cuando estas deyecciones se frotan sobre la piel, contaminan el sitio de la picadura u otro punto lesionado y los parásitos penetran al tejido. Las deyecciones infectantes también pueden llegar a la conjuntiva al ser depositadas en la hendidura palpebral o porque el mismo paciente, por medio de sus manos las lleva hasta el ojo u otras mucosas, a través de las cuales penetran los parásitos sin necesidad de tener excoriaciones.

Dentro del hospedero, los tripomastigotes son capaces de invadir una gran variedad de células nucleadas, proliferando en el citoplasma y dando lugar a amastigotes y, posteriormente, a tripomastigotes sanguíneos. Los tripomastigotes sanguíneos salen al torrente sanguíneo para infectar nuevas células o son ingeridos por un nuevo vector completando así su ciclo de vida (Fig. 2).

Además de ser transmitido por la picadura del vector, *Trypanosoma cruzi* se puede transmitir por placenta, accidentes en el laboratorio, transfusión de sangre y transplante de órganos (Botero y Restrepo, 1992; Prata, 2001; Tyler y Engman, 2001).

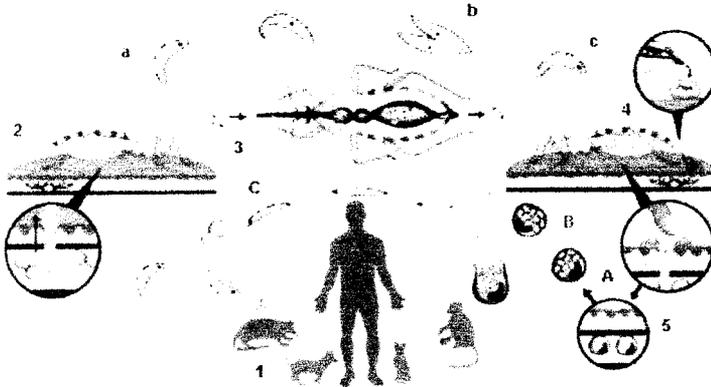


Figura 2. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. 1. Los hospederos definitivos son animales vertebrados, incluyendo el hombre. 2. Los vectores son insectos de la familia Reduviidae, los cuales se infectan al picar a los hospederos definitivos e ingerir tripomastigotes. 3. En el tubo digestivo del vector se encuentran tripomastigotes (a), epimastigotes (b) y en el recto del insecto y las deyecciones aparecen tripomastigotes metacíclicos que son las formas infectantes (c). 4. El hombre se infecta con las deyecciones del vector, depositadas en piel o mucosas durante la picadura. 5. Los tejidos son invadidos por tripomastigotes (A), los cuales se convierten en amastigotes intracelulares (B) que se convierten en tripomastigotes circulantes (C) infectivos para el vector ([www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle](http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle)).

En 1990 se estimó mediante encuestas serológicas que aproximadamente de 16-18 millones de personas en América estaban infectadas con *Trypanosoma cruzi*. Si bien este estimado ha descendido a 11 millones como resultado de un extenso programa para el control del vector y monitoreo de la sangre en los bancos de sangre, 120 millones de personas permanecen en riesgo de contraer la enfermedad (Guzmán-Bracho, 2001).

Aunque en México actualmente se está tratando de prevenir la transmisión en los bancos de sangre, factores como la amplia distribución de posibles vectores en toda la república (se han reportado la existencia de 31 especies de *Triatoma*, especialmente en Veracruz, Hidalgo, San Luis Potosí y Oaxaca), la migración desde áreas endémicas, la pobreza económica en algunos estados, entre otros, han dificultado la erradicación del parásito en el país (Guzmán-Bracho, 2001; Flisser y cols, 2002).

## **Enfermedad de Chagas**

### **Manifestaciones clínicas**

Aunado a los problemas para el control del vector, se suma el hecho de que la mayoría de las infecciones por *Trypanosoma cruzi* cursan en forma asintomática. En algunos casos se manifiestan mucho tiempo después de la infección inicial. Sin embargo, el avance de la enfermedad se ha dividido en tres fases: aguda, latente y crónica.

**Fase aguda:** Esta fase de la enfermedad se observa más en niños que en adultos y puede durar de uno a cuatro meses. La lesión primaria o chagoma de inoculación, se desarrolla en el sitio de entrada del parásito y se presenta como un nódulo inflamatorio. Cuando esta inflamación compromete el párpado constituye el signo de Romana (Fig.3).

Esta fase se caracteriza por fiebre variable, malestar general, irritabilidad, dolor de cabeza, dolores musculares y postración. A partir de la invasión a los ganglios linfáticos hay invasión a bazo, hígado, médula ósea y corazón. Posteriormente se encuentra hepato y esplenomegalia y más tarde anemia discreta. En la forma grave, se presenta meningoencefalitis y miocarditis aguda. Esta última puede originar insuficiencia cardíaca y llevar al paciente a la muerte de 2 a 4 semanas.

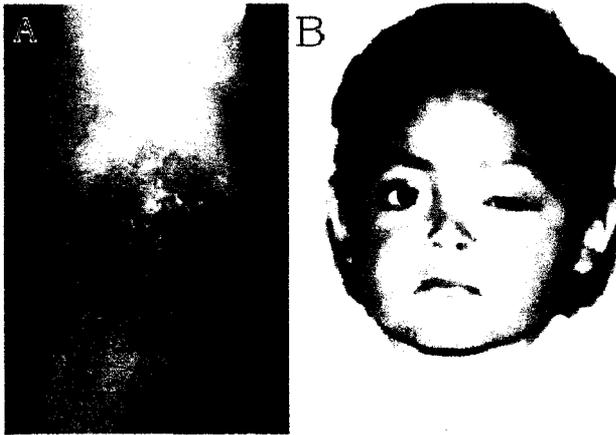


Figura 3. Chancro tripanosomal (A) y signo de Romãña (B) (Barret y cols, 2003).

En esta fase, el parásito se disemina por la sangre, y puede ser relativamente fácil verlo mediante un examen directo de sangre. Sin embargo, para la mayoría de los pacientes en fase aguda, la enfermedad no es reconocida o pasa desapercibida, debido a una respuesta inmune deprimida promovida por el parásito para facilitar su invasión y reproducción. Sin tratamiento, cerca del 5-10% de pacientes sintomáticos mueren debido a la encefalomiелitis o fallo cardiaco severo.

En ocasiones, el paciente puede aparentar curarse y entrar a la fase latente de la enfermedad (Botero y Restrepo, 1992; Markell y Krotoski, 1999; Prata, 2001; Barret y cols, 2003).

**Fase latente:** Es llamada también fase intermedia. Aunque puede haber baja parasitemia, el paciente no presenta sintomatología. Este periodo puede durar meses o años, antes de manifestarse la fase crónica. Las pruebas serológicas son positivas y si se estudia adecuadamente al paciente, se encontrarán datos sugestivos de miocarditis (Prata, 2001; Barret y cols, 2003).

**Fase crónica:** Generalmente esta fase de la enfermedad aparece tardiamente y las localizaciones principales corresponden a la miocarditis y alteraciones en el electrocardiograma (Fig 4). Menos frecuentes pero también presentes en esta fase de la enfermedad son las visceromegalias especialmente corazón, esófago y colon (Fig. 5). En esta forma de la enfermedad, puede ocurrir muerte súbita sin haber desarrollado insuficiencia cardiaca congestiva y en otros casos la miocarditis progresa hasta producir insuficiencia (Botero y Restrepo, 1992; Markell y Krotoski, 1999; Prata, 2001; Barret y cols, 2003).

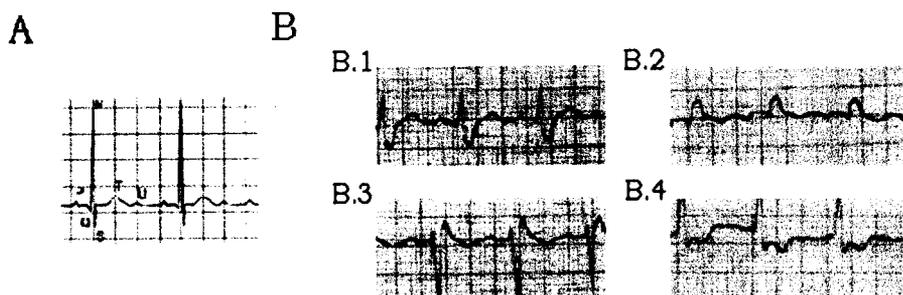


Figura 4. Cambios en el electrocardiograma presentes en pacientes que cursan la fase crónica de la enfermedad. A. Electrocardiograma normal. B. Anormalidades en los complejos QRS consistentes en la prolongación en los intervalos P-R y Q-T (B.1), bajo voltaje en los complejos QRS (B.2), depresión de las ondas S-T (B.3) e inversión de las ondas T (B.4) (Markell y Krotoski, 1999).

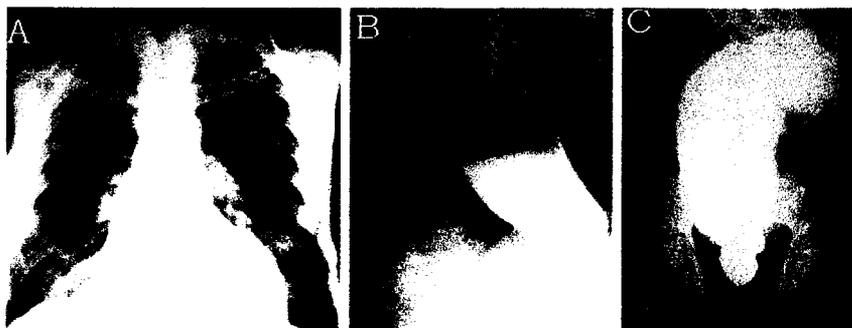


Figura 5. Radiografías de las visceromegalias más frecuentes en la enfermedad de Chagas. (A) Corazón agrandado, (B) megaesófago y (C) megacolon (Barret y cols, 2003).

## Diagnóstico

Los procedimientos de laboratorio propios para el diagnóstico de la enfermedad, se utilizan de acuerdo a la fase de infección en la que se encuentre el paciente. Los métodos disponibles los dividimos en parasitológicos directos, los cuales detectan al parásito o sus productos, parasitológicos indirectos que detectan anticuerpos específicos contra *Trypanosoma cruzi*, xenodiagnóstico, PCR, pruebas serológicas, cultivos e inoculaciones en animales.

Las pruebas de gabinete, principalmente electrocardiogramas y radiografías de corazón, esófago y colon ayudan al diagnóstico.

Diagnóstico epidemiológico: lugar de procedencia, tipo de habitación, conocimiento de los triatomidos, picadura por triatomidos (Botero y Restrepo, 1992; Markell y Krotoski, 1999).

## **Tratamiento**

El tratamiento para la enfermedad de Chagas usualmente es efectivo si se administra durante la fase aguda de la infección. Los fármacos de elección son nifurtimox y benznidazol.

El uso de estos medicamentos en la fase crónica o latente, aunque no garantiza su curación, puede producir algún efecto benéfico principalmente en cuanto a la reducción de la parasitemia. Sin embargo, estos fármacos inducen en muchas ocasiones efectos colaterales serios y; una vez que la enfermedad ha progresado a la fase crónica, ningún fármaco ha probado ser efectivo para un tratamiento exitoso. El tratamiento de la enfermedad en su fase crónica está dirigido también hacia los síntomas causados por los órganos afectados, por ejemplo, usando antiarrítmicos, anticoagulantes, marcapasos y tratamientos quirúrgicos en caso de dilatación visceral (Prata, 2001).

## **Prevención**

Se ha tratado de combatir esta antropozoonosis por medio del ataque a los vectores en las viviendas utilizando insecticidas. Otras medidas de control incluyen la construcción adecuada de paredes y techos, educación de los habitantes en relación con la presencia de los vectores y vigilancia epidemiológica de los focos de transmisión. La educación sanitaria es básica para que las comunidades aprendan a evitar la transmisión. El monitoreo de órganos transplantados y sangre donada también se ha convertido en una medida de control obligatoria (Botero y Restrepo, 1992; Guzmán-Bracho, 2001).

Desgraciadamente, no se adquiere inmunidad después de contraer la enfermedad y, aunque recientemente se han desarrollado vacunas que proporcionan una buena protección, éstas se encuentran aún en fase experimental (Fralish y Tarleton, 2003).

Como se ha mencionado, no existen fármacos eficaces contra la fase crónica de la enfermedad, además, no se ha logrado comprender de manera completa el porqué el parásito deriva en un estado de latencia después de causar la fase aguda. Por estos motivos, se han intensificado los estudios sobre *Trypanosoma cruzi*, no solo a nivel farmacológico, sino también a nivel molecular, para poder comprender mejor los mecanismos de infección así como caracterizar a las moléculas involucradas en este proceso. Estas estrategias están encaminadas hacia la búsqueda de blancos adecuados para el diseño de fármacos y vacunas.

## **Antecedentes generales**

### **Mecanismo de invasión**

El proceso de invasión a la célula hospedera puede dividirse en tres fases: la unión del parásito a la membrana plasmática de la célula hospedera, la internación a través de la vacuola parasitófora y la ruptura de la membrana vacuolar con la consecuente salida del parásito hacia el citoplasma donde se replica y diferencia (Burleigh y Andrews, 1995).

### **Unión**

Se piensa que para promover la entrada a la célula hospedera, los tripomastigotes se adhieren a la superficie de la célula blanco y utilizan un arsenal de receptores de superficie celulares, segundos mensajeros y agonistas de señalización para mediar la invasión.

El espectro completo de las respuestas celulares moduladas por *Trypanosoma cruzi* aún no están del todo claras. A la fecha se sabe que la unión del parásito a la célula blanco es un proceso dependiente de energía (ATP) que parece ser específico y depende de un conjunto de receptores y ligantes ubicados tanto en la célula como en el parásito. Debido a que *Trypanosoma cruzi* puede invadir diferentes tipos celulares, se ha sugerido que existe un receptor celular común, o bien, que las glucoproteínas de superficie del parásito pueden unirse a diferentes receptores específicos con características bioquímicas similares, los cuales no han sido identificados. Ha sido posible identificar algunas moléculas que poseen relación con los procesos de invasión tales como las trans-sialidasas, la penetrina y glucoproteínas de superficie.

Durante la unión del parásito con la célula blanco, hay un reclutamiento de lisosomas, resultado de un proceso en donde se piensa que el parásito activa una cascada de señalización para inducir dicha movilización. En este proceso se encuentran la participación de fosfolipasa C con formación de inositol trifosfato (IP3) y un incremento en la concentración de calcio intracelular (Burleigh y Woolsey, 2002; Caler y cols, 2002; Schenkman y cols, 1991; Vieira y cols, 2002; Woolsey y cols, 2003).

### **Internación**

La internación del parásito en la célula hospedera aún no se encuentra del todo dilucidada. Estudios realizados por varios grupos han demostrado que los filamentos de actina del hospedero tratados con citocalasina D, interfieren con la internación de tripomastigotes a células vertebradas (Barbosa y Meirelles, 1995; Burleigh y Andrews, 1995; Burleigh y Andrews, 1998; Caler y cols, 2002; Carvalho y cols, 1999; Mortara y cols, 1999; Schenkman y cols, 1991). En la mayor parte de los

estudios tal interferencia es negativa, con un decremento en el grado de infección y un incremento en la adhesión (Barbosa y Meirelles, 1995; Meirelles y cols, 1982). En otras situaciones, sin embargo, se ha demostrado que el tratamiento con citocalasina D aumenta la penetración del parásito (Nogueira y Cohn, 1976; Procopio y Mortara, 1994).

En el 2002 Rosestolato y colaboradores observaron que la incubación de células fagocíticas y no fagocíticas en presencia de citocalasina D presentan una marcada inhibición en la internación de tripomastigotes unido a un incremento en la adhesión de parásitos a la célula. Las imágenes obtenidas no indicaron que se lleve a cabo un típico proceso fagocítico, por lo que se sugiere que los parásitos también pudieran penetrar por otro proceso el cual no requiere la concentración de filamentos de actina.

Woolsey y Burleigh en 2004 reportaron que la invasión de *Trypanosoma cruzi* a fagocitos no profesionales se facilita por el proceso de despolimerización del citoesqueleto de actina de la célula hospedera y que la entrada de tripomastigotes a la célula se debe al aprovechamiento del parásito de un proceso de reparación del daño celular que involucra  $Ca^{2+}$  regulando la exocitosis de lisosomas (lisosoma dependiente) o comprometiendo una vía lisosomal independiente recientemente conocida.

Estos resultados aparentemente contradictorios han llevado a proponer tres posibles modelos de invasión a las células hospederas, sin saber hasta el momento si más de uno se puede llevar a cabo de manera simultánea o si alguno predomina bajo ciertas condiciones:

- Un proceso fagocítico que involucra la formación de proyecciones tipo filopodios que dependen de la acumulación de filamentos de actina.

- Un proceso endocítico independiente de la formación de proyecciones tipo filopodios, pero dependiente de la acumulación de filamentos de actina para internar al parásito.
- Un proceso endocítico que no depende de los filamentos de actina, sino de la formación de una vacuola parasitófora, en donde esta vacuola es lisada por enzimas posiblemente liberadas por el parásito (Burleigh y Woolsey, 2002; Rosestolato y cols, 2002; Schenkman y cols, 1991; Woolsey y Burleigh, 2004).

## **Antecedentes directos**

### **Proteínas involucradas en el proceso de invasión**

Al mejorar nuestro conocimiento acerca del parásito así como de la forma en que lleva a cabo el proceso de infección, podremos ser capaces de diseñar estrategias que permitan el control de la enfermedad a través de la identificación de moléculas susceptibles a ser blancos eficientes para el diseño de vacunas y fármacos, los cuales, aunados a los esfuerzos que se han implementado, nos permitirán en un futuro controlar la enfermedad y su propagación.

A la fecha se han identificado algunas proteínas que indudablemente están involucradas en el proceso de infección de *Trypanosoma cruzi* y podrían ser utilizadas como blancos para diseño de vacunas y fármacos:

**Tc Tox:** Es una proteína de peso molecular de 75 kDa (peso similar a la molécula C9 del complejo de ataque a la membrana) y reacciona de forma cruzada con anticuerpos contra C9. Presenta una actividad formadora de poros, la cual ayuda en la disrupción de la vacuola durante el escape de

*T. cruzi* de la vacuola parasitófora. Se expresa en todos los estadios del parásito, encontrándose mayormente en tripomastigotes. Su inestabilidad *in vitro* no ha permitido determinar la secuencia de aminoácidos ni ha sido posible clonar su gen. La evidencia de su importancia en el proceso de infección es indirecta, limitándose a la demostración *in vitro*, no habiendo hasta la fecha evidencias genéticas que lo comprueben (Andrews, 1990; Andrews y cols, 1990; Burleigh y Woolsey, 2002; Manning Cela y cols, 2001).

**Peptidil prolil isomerasa o TcMIP** ( por sus siglas en inglés *macrophage invasión potenciador*): Es uno de los principales factores de virulencia secretado por tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* del que se ha sugerido es necesaria para la invasión celular (Burleigh y Woolsey, 2002).

**Glucoproteína 82 o gp82**: Es una glucoproteína de superficie de 82kDa presente en tripomastigotes metacíclicos. Media la unión de tripomastigotes metacíclicos a la célula hospedera induciendo en ambos la activación de cascadas de señalización que llevan a la movilización de  $Ca^{+2}$  intracelular, el cual es un requerimiento para la internación de *T. cruzi*. Infecciones en ratones llevadas a cabo con tripomastigotes deficientes en gp82, mostraron una baja parasitemia en comparación con aquellas infecciones llevadas a cabo con tripomastigotes normales. Aunado a esto, ensayos de invasión en presencia de mucina gástrica mimetizando la infección *in vivo*, mostraron una inhibición del 70-75% en la internación de parásitos deficientes en gp82 comparando con parásitos no deficientes. Estos trabajos llevan a pensar que gp82 es importante, pero no suficiente, para la adhesión de *T. cruzi* a la mucina gástrica y la subsecuente penetración a células epiteliales (Cortez y cols, 2003; Neira y cols, 2003).

**Oligopeptidasa B**: Su papel en la señalización celular y en la invasión ha sido confirmada usando mutantes por reemplazo (*knock out*), los cuales

---

revelaron que *T. cruzi* utiliza una vía mayor dependiente de oligopeptidasa B para la invasión a células mamíferas, y una vía menor independiente de oligopeptidasa B.

Se postuló después que oligopeptidasa B funciona como una enzima que genera un agonista de calcio para las células mamíferas seguida de la hidrólisis de una molécula precursora específica de tripomastigotes (Burleigh y Andrews, 1998; Caler y cols, 1998).

**LYT1:** Una de las pocas proteínas que se ha demostrado de manera convincente está involucrada en el proceso de invasión de la célula hospedera es LYT1, la cual fue aislada de una biblioteca genómica de ADNc de *Trypanosoma cruzi* basándose en la reactividad del producto del gen a anticuerpos contra el componente C9 del complejo de ataque a la membrana. Ensayos tipo *Southern Blot* demostraron que LYT1 corresponde a un gen de copia única de 1656pb que codifica para una proteína de 552 aminoácidos. La búsqueda en la base de datos de ADN y proteínas falló para encontrar homología significativa con proteínas conocidas o productos potenciales de traducción.

Estudios posteriores de biología molecular evidenciaron que, aunque *LYT1* no es requerido para la viabilidad de los parásitos; parásitos deficientes de *LYT1* exhiben tres distintos fenotipos: muestran un desarrollo acelerado *in vitro*, una infectividad reducida y una actividad hemolítica disminuida. La reintroducción del gen *LYT1* reconstituye el fenotipo de infectividad de los parásitos nulos, demostrando que el gen *LTY1* juega un papel importante en la infección (Manning Cela y cols, 2001).

Sin embargo, aún no se sabe cómo esta proteína puede afectar procesos biológicos tan diversos. Una explicación podría ser que LYT1 está situado en una vía de señalización celular común a estos procesos. Otra posibilidad es que se estuvieran expresando diferentes formas de la proteína.

Esta idea es apoyada por experimentos llevados a cabo por nuestro grupo donde se encontró que la secuencia que codifica para LYT1 sufría un “*trans-splicing*” alternativo dando como resultado tres distintos ARN’s mensajeros de LYT1; dos que codifican para la proteína completa de LYT1 y un tercero que codifica para la proteína truncada sin la posible secuencia señal y que contiene una secuencia nuclear. La producción de diferentes derivados de la proteína LYT1 (LYT1p), una poseyendo una posible secuencia señal de exportación y otra sin esta secuencia, es consistente con la idea de que ambas formas de la proteína, tanto intracelular (citosólica o nuclear) como secretada son producidas y podrían entonces explicar el papel de esta proteína en procesos tan diversos como la hemólisis y la regulación de diferenciación de estadio del parásito (Manning Cela y cols, 2002).

En el 2003, esta proteína fue evaluada como posible vacuna genómica contra la infección de *T. cruzi*. Los resultados mostraron que esta vacuna fue capaz de activar la respuesta inmune confiriendo inmunidad contra la infección de *T. cruzi* al 80% de los ratones que fueron mortalmente inoculados con el parásito (Fralish y Tarleton, 2003).

## Justificación

Cada año, millones de personas en América, principalmente en centro y sur, son afectadas por la enfermedad de Chagas. En México esta enfermedad ha sido difícil de controlar debido a la amplia distribución del vector a lo largo de toda la República, la migración desde áreas endémicas, la pobreza económica en algunos estados y la falta de fármacos eficientes contra la fase crónica de la enfermedad. Por esto se han intensificado las investigaciones en busca de proteínas candidatas a ser blancos eficientes de fármacos y vacunas. Una de estas proteínas es LYT1, la cual ya ha sido probada en una vacuna genómica experimental mostrando resultados prometedores (Fralish y Tarleton, 2003). Por estas razones es importante continuar con los esfuerzos en su caracterización.

Como se ha mencionado, LYT1 participa en el proceso de infección y de diferenciación de estadio del parásito. Su participación en fenotipos tan diversos es posible ya que por “*trans-splicing*” alternativo se obtienen transcritos distintos conteniendo o sin contener los primeros 29 aminoácidos que corresponde a una posible secuencia señal.

Para determinar si estos transcritos son activos y realmente producen dos diferentes proteínas con distinta función, se decidió continuar con la caracterización de los productos de *LYT1* (*LYT1p*) (Manning Cella y cols, 2001).

Para encontrar la ubicación de los posibles productos de *LYT1*, en este trabajo fusionaremos la secuencia que codifica para LYT1 a partir del 1° y 2° ATG a la secuencia que codifica para la proteína verde fluorescente (usada como gen reportero).

## Hipótesis

Al realizar la fusión de la secuencia que codifica para la proteína LYT1 a partir del 1° y 2° ATG con la secuencia que codifica para la proteína verde fluorescente e introducirla posteriormente en un vector de expresión para *Trypanosoma cruzi*, se podrán localizar los distintos posibles productos de *LYT1* dentro de los parásitos transfectados con dichas secuencias, mediante microscopía de fluorescencia.

## Objetivos

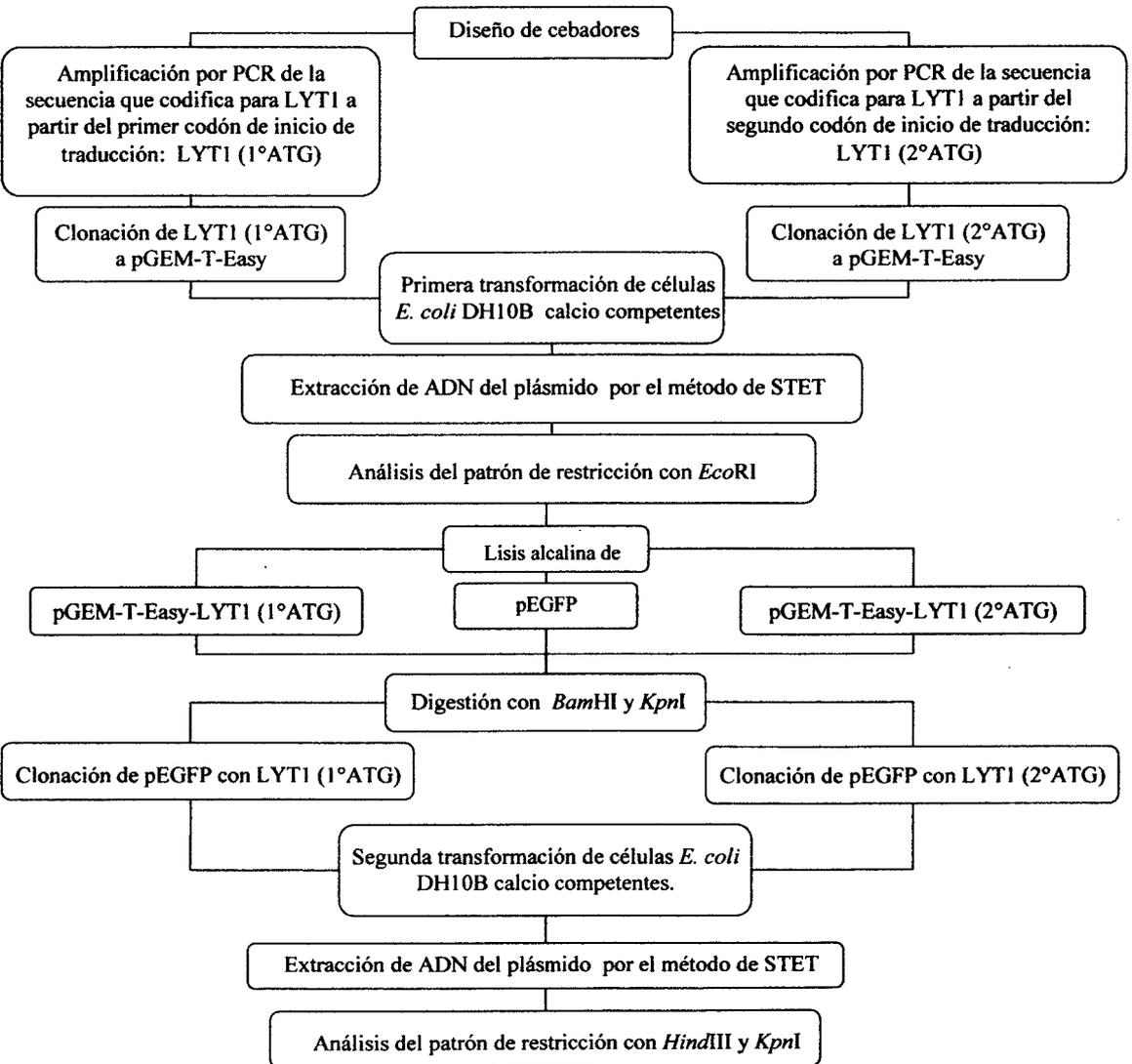
### Objetivo general

Construcción de los plásmidos: pEGFP-LYT1 (1°ATG) y pEGFP-LYT1 (2°ATG) para la expresión de LYT1 fusionada a la proteína verde fluorescente (EGFP).

### Objetivos particulares

- Amplificación de la secuencia que codifica para la proteína LYT1 por PCR, utilizando dos cebadores sentido, uno diseñado para amplificar *LYT1* a partir del primer codón de inicio de traducción y otro a partir del segundo codón de inicio de traducción.
- Clonación de los productos de PCR anteriores en pGEM-T Easy para la obtención de pGEM-T Easy-LYT1 (1°ATG) y pGEM-T Easy-LYT1 (2°ATG).
- Subclonación de LYT1 (1° y 2° ATG) en pEGFP para la obtención de pEGFP-LYT1 (1°ATG) y pEGFP-LYT1 (2°ATG) en bacterias *Escherichia coli* DH10B calcio competentes.

## Esquema experimental



## **Materiales y métodos**

### **Bacterias**

#### ***Escherichia coli* DH10B**

Es conocido que *E. coli* se vuelve competente para ser transformada con ADN exógeno cuando las células se resuspenden en una solución de cloruro de sodio a baja temperatura y posteriormente se someten a un breve choque térmico. Una vez transformadas, estas células son altamente eficientes y químicamente competentes para generar bibliotecas genómicas. La cepa DH10B posee una eficiencia máxima de  $1 \times 10^9$  transformantes/ $\mu\text{g}$  de ADN de pUC19 en una reacción de transformación de 100 $\mu\text{l}$ .

### **Plásmidos**

#### **pGEM-T Easy (Promega)**

El vector pGEM-T Easy (Apéndice C) es un sistema conveniente de clonación para productos de PCR. Los vectores son preparados cortando con *EcoRV* y añadiendo una timidina terminal en ambos extremos 3'. Estos únicos extremos 3'-T sobresalientes en los sitios de inserción aumentan la eficiencia de ligación del producto de PCR en plásmidos previniendo la recircularización del vector.

El vector contiene un promotor de polimerasas RNAT7 y SP6 flanqueando una región de clonación múltiple dentro de la región codificante alfa-péptido de la enzima beta-galactosidasa. La inactivación insercional del alfa péptido permite la identificación directa de las clonas recombinantes por una selección en placas conteniendo IPTG y X-Gal como sustratos para la enzima beta-galactosidasa (Promega, *pGEM-T and pGEM-T-Easy Vector Systems Protocol*).

## pEGFP

La GFP (proteína verde fluorescente) es una proteína que se encuentra de forma natural en celenterados, tales como la medusa del Pacífico, *Aequoria victoria*. Los componentes requeridos para su bioluminiscencia son una foto proteína activada con  $\text{Ca}^{2+}$  llamada aequorina, la cual emite una luz azul-verde y una proteína verde accesoria que capta la energía de la aequorina y la re-emite como una luz verde. Su fluorescencia natural es ocasionada por un único cromóforo unido covalentemente que se origina de una secuencia interna Ser-Tyr-Gly (residuos 65, 66 y 67 respectivamente) la cual es modificada después de la traducción por ciclización y oxidación a un p-hidroxibencilidenimidazolina.

El pEGFP lleva una variante de la proteína verde fluorescente (GFP) la cual ha sido optimizada para dar una mayor fluorescencia y una mayor expresión en células de mamíferos. Su emisión máxima es de 507nm. Este gen fue clonado entre dos sitios de multiclonación (MCS), así que puede ser fácilmente extraído del pEGFP. Alternativamente, la secuencia codificante para EGFP puede ser amplificada por PCR.

El gen de esta proteína (Apéndice B), es un gen reportero muy usado en la biología molecular como control en los experimentos de transfección, para el monitoreo de la transfección en células vivas, para monitorear cotransfecciones (cuando se desea retener la viabilidad de las células después de probar la eficiencia de transfección), para marcar células en protocolos de separación de células activadas por fluorescencia (FACS), y para determinar la localización de proteínas de fusión como lo usado en este trabajo en que se fusionó la secuencia que codifica a EGFP y *LYT1* para monitorear la expresión conjunta de estos dos genes en parásitos de *T. cruzi* (Tsien, 1998).

## Diseño de oligonucleótidos

Un oligonucleótido es una cadena de ácido nucleico formado por un número variable de bases nitrogenadas que van desde 10 hasta 30 nucleótidos. También conocidos como cebadores o iniciadores, sirven para alinearse con el ADN de cadena sencilla y formar un segmento de cadena doble para iniciar la amplificación de la cadena molde utilizando la reacción en cadena de la polimerasa. Para el diseño de los cebadores es necesario conocer la secuencia de nucleótidos de la cadena que se desea amplificar, también se debe considerar que los cebadores posean un tiempo de desnaturalización ( $T_m$  por sus siglas en inglés *melting time*) muy parecido, esto se logra aumentando o disminuyendo el número de nucleótidos de cada cebador hasta lograr su homogenización en contenido de GC y por lo tanto de su  $T_m$ .

Finalmente se debe incluir al inicio y al final del cebador ciertas secuencias que sean reconocidas por enzimas de restricción, con el fin de manipular el producto de PCR y así facilitar su clonación a secuencias circulares de ADN auto replicativas como plásmidos, cósmidos, etc (Sambrook y Russel, 2001).

Tomando en cuenta lo anterior, el diseño de los cebadores fue el siguiente: el oligonucleótido LYT 15S sentido contiene del nucleótido 202 al 221 de la secuencia de *LYT1* (a partir del 1° ATG) alelo b (No. Acceso AF320626) en el extremo 3' y el sitio de restricción reconocido por *Bam*H1 en su extremo 5'. Este cebador junto con LYT 17AS se utilizó para la amplificación de *LYT 1* (1°ATG). La secuencia que codifica para *LYT1* puede ser consultada en el apéndice A.

5' G GCG GAT CCC GCG **ATG CGG AAG AAA** GCG GCA GC 3'  
                   *Bam* H I                   202                   LYT 1                   221

El cebador LYT 16S contiene en su extremo 3' del nucleótido 286 al 303 del *LYT1* (a partir del 2° ATG) alelo b (No. Acceso AF320626) en su extremo 3' y el sitio de reconocimiento para *Bam*H1 en su extremo 5'. El cebador junto con LYT 17AS se utilizó para la amplificación de *LYT1* (2°ATG).

5' C GCG GAT CCC GCG **ATG GGA CGT GCC GGC CC** 3'  
                   *Bam* H I                   286                    *LYT 1*                   303

El cebador LYT1 17AS es complementario a los nucleótidos del 1857 a 1837 de *LYT1* alelo b (No. Acceso AF320626) en su extremo 3' eliminando de manera deliberada el codón de paro y añadiendo el sitio de restricción para *Kpn*I en su extremo 5'.

5' G GGG TAC CCC **ATC AGC TGC CAG CAT GTT TTC** 3'  
                   *Kpn* I           1857                    *LYT 1*                   1837

El templado utilizado fue el plásmido pBS + 4.3 *LYT1* alelo b c-2.

### **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) tiene como objetivo el amplificar un segmento de ADN que se encuentre entre dos regiones de secuencia conocida.

La técnica se basa en el proceso que naturalmente utilizan las células para replicar su ADN, el componente principal es la cadena molde o templado de ADN que contiene la región que se desea copiar. La única información necesaria para que este fragmento sea replicado es la secuencia de dos pequeñas regiones de nucleótidos en ambos extremos de la región de interés. Estas dos secuencias cortas del templado deben ser conocidas para que puedan ser sintetizados, de manera artificial, los dos

cebadores. Estos se unen con el templado (utilizando el criterio de complementariedad de bases) y sirven como sitio de inicio para que se de la replicación del ADN (recordando que todas las ADN polimerasas requieren de un extremo OH 3' terminal) y en consecuencia se replica el segmento a clonar. También se necesita agregar nucleótidos libres para construir una nueva cadena de ADN y la enzima ADN taq polimerasa I.

La enzima ADN polimerasa I interviene en la síntesis de ADN de la célula. A esta enzima utilizada comercialmente en PCR se le conoce como "Taq" ya que proviene de la bacteria *Thermus aquaticus* y es capaz de soportar la incubación prolongada a temperaturas de hasta 95°C con una pérdida insignificante de actividad. Esta enzima consiste de un solo polipéptido con un peso molecular de 94 kDa y tiene una actividad ADN polimerasa en dirección 5'→3'.

La reacción de PCR consiste en varios pasos repetidos a diferentes temperaturas para amplificar ADN, las etapas son las siguientes:

- 1.-Desnaturalización: Esta etapa tiene como objetivo separar todo el ADN de doble cadena y convertirlo en ADN de cadena sencilla. Es necesario que se lleve a cabo a una temperatura superior a 90°C e inferior a 100°C en un tiempo de 20 a 30seg.
- 2.-Alineamiento: Consiste en el acoplamiento del cebador, con la cadena molde de ADN para ayudar a la enzima Taq polimerasa a reconocer un segmento de doble cadena. Esta etapa se realiza a una temperatura que varía de acuerdo a la Tm (temperatura de desnaturalización de cada cebador) y el tiempo fluctúa entre 10 y 50seg.
- 3.-Síntesis: Como su nombre lo indica, esta etapa consiste en la reacción de la enzima Taq para incorporar nucleótidos y completar la síntesis del

ADN. La reacción se lleva a cabo a 72°C y el tiempo se encuentra en función del tamaño de la cadena a amplificar (Lewin , 2000).

Las condiciones para llevar a cabo la amplificación por PCR fueron las siguientes: 1 ciclo de 95°C/2min; 30 ciclos de 95°C/30seg, 60°C/30seg, 72°C/2min y un ciclo más de 72°C/7min.

En la tabla 1, se muestran las cantidades utilizadas en las amplificaciones de las secuencias que codifican a la proteína LYT1:

Tabla 1. Mezcla para la amplificación por PCR

Reactivos	LYT1 (1°ATG) ( $\mu$ l)	Reactivos	LYT1 (2°ATG) ( $\mu$ l)
Amortiguador Herculasa 10X	5	Amortiguador Herculasa 10X	5
d NTP's 1.25mM	8	d NTP's 1.25mM	8
pBS + 4.3 LYT 1 alelo b (20ng/ $\mu$ l)	6	pBS + 4.3 LYT 1 alelo b (20ng/ $\mu$ l)	6
LYT 15 S (0.1 $\mu$ g/ $\mu$ l)	0.5	LYT 16 S (0.1 $\mu$ g/ $\mu$ l)	0.5
LYT 17 AS (0.1 $\mu$ g/ $\mu$ l)	0.5	LYT 17 AS (0.1 $\mu$ g/ $\mu$ l)	0.5
Herculasa	0.5	Herculasa	0.5
Agua mQ	29.5	Agua mQ	29.5
Total	50	Total	50

### Electroforesis en geles de agarosa

El objetivo de la electroforesis es determinar el peso molecular de una cadena de ADN, mediante un campo eléctrico se hacen migrar los ácidos nucleicos en una matriz porosa como la agarosa. La migración del ADN depende del voltaje aplicado, las condiciones salinas del medio (amortiguador), la posible conformación del ácido nucleico y el tamaño del poro de la matriz. El tamaño de la molécula de ADN será lo que defina su migración durante la electroforesis (Sambrook y Russel, 2001).

Las muestras se corrieron en geles de agarosa 1% en amortiguador TBE 0.5X, en una cámara de electroforesis con amortiguador TBE 0.5X a 100volts. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se analizaron en un transiluminador de luz UV capturando las imágenes con una cámara digital KODAK y se procesaron con el programa KODAK ID 3.5.

## Ligación

En la ligación se utilizan enzimas de ligación de *Escherichia coli* y del bacteriófago T4, las cuales codifican para una ADN ligasa. Estas enzimas sellan cortes entre nucleótidos adyacentes en ADN de cadena doble. Aunque las reacciones catalizadas por ambas enzimas son muy similares, difieren en el cofactor utilizado. La enzima T4 requiere de ATP mientras que la de *E. coli* utiliza NAD<sup>+</sup>. En cada caso el cofactor se rompe y forma un complejo enzima-AMP, éste se une al corte (el cual debe exponer un grupo fosfato 5' y un grupo OH 3') y genera un enlace covalente. Se requiere que los extremos sean compatibles, romos con romos o cohesivos con cohesivos (Sambrook y Russel, 2001).

Al realizar la clonación de los productos de amplificación LYT1 (1°ATG) y LYT1 (2°ATG) en pGEM-T Easy es necesario conocer la cantidad de inserto a utilizar, para este propósito se usó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{ng de vector} \times \text{tamaño del inserto (kb)}}{\text{tamaño del vector (kb)}} \times \frac{\text{inserto}}{\text{vector}} = \text{ng de inserto}$$

Ejemplo: Para realizar la ligación de LYT1 (1°ATG) en pGEM-T Easy:

$$\frac{50 \text{ ng} \times 1.655 \text{ kb}}{3.015 \text{ kb}} \times \frac{3 \text{ inserto}}{1 \text{ vector}} = 82.33 \text{ ng de inserto}$$

El ADN amplificado y purificado se cuantificó y se realizaron los cálculos del volumen a usar. Antes de realizar la ligación, se agregaron al inserto adenina en los extremos 3', complementarias a las terminaciones de timidina que posee el vector en su extremo 3', ésta reacción se llevó a cabo incubando 30min a 70°C, de acuerdo a la tabla 2.

Tabla 2. Adición de Adeninas en los extremos 3' de los productos de PCR

Reactivos	LYT 1 (1°ATG) ( $\mu$ l)	Reactivos	LYT 1 (2°ATG) ( $\mu$ l)
Go Taq pol. Amortiguador 5X	2	Go Taq pol. Amortiguador 5X	2
ADN ya purificado	6.15	ADN ya purificado	6.15
d'ATP 0.2 mM	1.6	d'ATP 0.2 mM	1.6
Go Taq pol 5 U	0.25	Go Taq pol 5 U	0.25
Total	10	Total	10

Posteriormente se realizaron las mezclas para las ligaciones en pGEM-T Easy, como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Mezcla de ligación de los productos de PCR a pGEM-T Easy

Reactivos	LYT1 (1°ATG) ( $\mu$ l)	Reactivos	LYT1 (2°ATG) ( $\mu$ l)
Inserto LYT1 (1°ATG)	3	Inserto LYT1 (2°ATG)	3
pGEM-T Easy 50 ng/ $\mu$ l	1	pGEM-T Easy 50 ng/ $\mu$ l	1
Ligasa T4 ADN 3u/ $\mu$ l	1	Ligasa T4 ADN 3u/ $\mu$ l	1
Amortiguador T4 ADN 2X	5	Amortiguador T4 ADN 2X	5
Total	10	Total	10

Se transformaron células *Escherichia coli* DH10B calcio competentes con las ligaciones anteriores para obtener grandes cantidades del vector con el inserto. El ADN producido fue analizado y tratado para efectuar una segunda ligación, ahora con el plásmido que contiene la secuencia que codifica para la proteína verde fluorescente, la mezcla se realizó de acuerdo a la tabla 4.

Las reacciones de ligación fueron sometidas a un choque térmico de 50°C por 30seg para evitar que se formen estructuras secundarias de ADN durante la ligación y así aumentar la eficiencia de ligación.

Tabla 4. Mezcla de ligación de LYT1 (1° y 2° ATG) en pEGFP

Reactivos	LYT 1 (1°ATG) ( $\mu$ l)	Reactivos	LYT 1 (2°ATG) ( $\mu$ l)
Vector pEGFP	1	Vector pEGFP	1
Inserto LYT 1 (1°ATG)	10	Inserto LYT 1 (2°ATG)	10
Amortiguador 10X T4 ADN ligasa	1.5	Amortiguador 10X T4 ADN ligasa	1.5
T4 ADN ligasa	0.5	T4 ADN ligasa	0.5
Agua mQ	2	Agua mQ	2
Total	15	Total	15

Posteriormente las mezclas se colocaron en el termociclador a 16°C toda la noche para que la ligasa efectúe su función.

### **Transformación de bacterias calcio competentes**

Los ácidos nucleicos no pueden ingresar de manera autónoma a la bacteria. Para poder ser expresados y replicados es necesario que atraviesen primero la membrana. Para permitir el ingreso a la bacteria, en esta técnica se da un choque térmico a bacterias calcio competentes *E. coli* DH10B, con el propósito de que el ADN que se encuentre en el medio pueda introducirse en la célula (Sambrook y Russel, 2001). La metodología empleada fue la siguiente:

Se mezclan 100µl de células calcio competentes *E. coli* DH10, 100µl de amortiguador TFB-2 y 10µl de ADN de la ligación, incubándose 20min en hielo. Posteriormente se dio un choque térmico a 42°C por 1min y medio y se deja reposar 10min en hielo. Se agregó 1ml de medio LB para incubar a 37°C en agitación continua 1 hora, sembrando 100, 200 y 250µl en cajas de agar LB ampicilina (100µg/ml) e incubando a 37°C por 24 hrs.

### **Extracción del ADN de plásmido**

Un prerrequisito para clonar fragmentos de ADN en plásmidos es la propia purificación del plásmido. Para ello es necesario lisar a las bacterias sólo lo suficiente para permitir que el ADN del plásmido sea liberado sin demasiado ADN cromosómico contaminante. Si la lisis es suave, la mayoría del ADN cromosómico liberado será de alto peso molecular y podrá eliminarse junto con los restos celulares, por centrifugación a alta velocidad para dar un lisado claro.

Los métodos utilizados para la extracción del ADN de los plásmidos, así como el análisis del patrón de restricción fueron, respectivamente, lisis alcalina y preparación por el método de STET (Sambrook y Russel, 2001).

#### **Lisis alcalina**

A pH de 12 a 12.5 el ADN lineal se desnaturaliza, pero no se desnaturalizan los círculos covalentemente cerrados (CCC). Las bacterias que contienen el plásmido se tratan con lisozima para debilitar la pared celular y después se lisan con hidróxido de sodio (NaOH) y dodecil sulfato de sodio (SDS). El ADN cromosómico permanece de alto peso molecular y se desnaturaliza. Después de neutralizar con acetato de sodio, el ADN cromosómico se re-naturaliza y forma un agregado insoluble. Simultáneamente la alta concentración de acetato de sodio causa la

precipitación de complejos de proteína-SDS y el ARN de alto peso molecular. Las moléculas CCC del plásmido permanecen en su estado nativo en solución, mientras que las macromoléculas contaminantes se precipitan. El precipitado puede eliminarse por centrifugación y se concentra por precipitación con etanol (Sambrook y Russel, 2001).

Los pasos a seguir fueron los siguientes: se inoculó una colonia bacteriana de cada cepa en 20ml de medio LB más 100µl/ml de ampicilina, incubando a 37°C por 14 horas, 10ml del cultivo anterior se centrifugaron a 4000rpm 10min resuspendiendo posteriormente en 400µl de la solución I y mezclando vigorosamente. Se agregaron 400µl de solución II (preparada al momento) y a continuación se agrega 300µl de solución III. Después de 5min se centrifugó a 12000rpm por 5min y al sobrenadante recuperado se le agregaron 2µl de RNAsas incubando posteriormente 2 horas a 37°C. Se extrajo con un volumen igual de fenol-cloroformo-isoamílico (25-24-1) mezclando vigorosamente hasta formar una emulsión. A continuación se centrifugo a 12000rpm por 5min a 4°C, recuperando la fase acuosa (arriba). El ADN se precipitó después con un volumen igual de isopropanol durante 10min a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 12000rpm 5min a 4°C. El sobrenadante se descartó por aspirado y la pastilla fue resuspendida en 1ml de etanol al 70%. Por último, se centrifugó a 12000rpm 5min a 4°C y el sobrenadante fue aspirado, quedando una pastilla de ADN la cual se resuspendió en 50µl de TE.

### **Extracción de ADN por la técnica de STET**

Este método es el más usado para extraer rápidamente pequeñas cantidades de ADN de plásmido de numerosos cultivos, para la evaluación de la integridad del ADN del plásmido, para la evaluación de la eficiencia

de clonación, para la determinación del patrón de restricción y para la preparación de ADN para clonación (Sambrook y Russel, 2001).

Las colonias transformadas con el ADN de las ligaciones fueron seleccionadas por su resistencia al antibiótico e inoculadas en 5ml de medio LB más 100µg/ml de ampicilina, incubándose a 37°C por 16 horas. Se centrifugaron 3ml de este medio a 13000rpm durante 1min. La pastilla resultante se resuspendió en 350µl de solución STET, centrifugándose a 13000rpm por 1min. Posteriormente se agregaron 25µl de lisozima (10mg/Tris pH 8.0 10mM) recién preparada y se sumergió en agua hirviendo durante 45seg exactos. Después de dejar enfriar, se centrifugó durante 10min a 12000rpm a temperatura ambiente. El sobrenadante se recupera en otro tubo y se adicionan 40µl de acetato de sodio 2.5M y 420µl de isopropanol. Esta mezcla se mantuvo por 10min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000rpm durante 5min, se dejó secar la pastilla para después resuspenderla en 1ml de etanol al 70%, centrifugando a 12000rpm durante 5min a 4°C, para limpiar impurezas, se retiró el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 25µl de TE.

### **Enzimas de restricción**

Las enzimas de restricción son endonucleasas que presentan una alta selectividad para realizar un corte cohesivo o romo cuando reconocen una secuencia específica de ADN, existen tres tipos de enzimas:

Tipo I: Enzima bifuncional (metilasa endonucleasa) de 3 subunidades, cuyo sitio de reconocimiento es asimétrico y el sitio de corte inespecífico.

Tipo II: Enzimas (metilasas endonucleasas) separadas, cuyo sitio de reconocimiento es de 4 a 6 pares de bases (pb) palindrómicas y el sitio de corte es el mismo que el sitio de reconocimiento. Este tipo de enzimas son las utilizadas en el presente trabajo.

Tipo III: Enzima bifuncional (metilasa endonucleasa) de dos sub-unidades, cuyo sitio de reconocimiento es de 5 a 7pb asimétricas y el sitio de corte está 24-26pb adelante del sitio de reconocimiento.

La nomenclatura de las enzimas de restricción tipo II se basa en las tres primeras letras que recuerdan el género y la especie del microorganismo del que fueron aisladas, por ejemplo: de *Escherichia coli* se tiene *EcoRI* y de *Haemophilus influenzae* *HindIII*. La cantidad de enzima a usar, el amortiguador, ADN y condiciones de la reacción varían dependiendo de la aplicación específica (Gerstein, 2001).

Las reacciones de digestión llevadas a cabo fueron, en primera instancia, las utilizadas para subclonar en pEGFP. Para las enzimas *BamHI* y *KpnI*, se recomienda una digestión secuencial debido a que sus amortiguadores son incompatibles. Por tal motivo se realizó primero la digestión con *BamHI*, precipitando el ADN para eliminar el resto de los componentes de la reacción que pudieran interferir en la segunda digestión. A continuación se realizó la digestión con *KpnI*, las cantidades utilizadas se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Mezcla para la reacción de digestión de pEGFP con *BamHI* y *KpnI*

Reactivos	Cantidades (µl)	Reactivos	Cantidades (µl)
BSA 10X	2.5	BSA 10X	2.5
ADN (insertos y vector)	19	ADN (insertos y vector)	19
Amortiguador <i>BamHI</i> 10X	2.5	Amortiguador <i>KpnI</i> 10X	2.5
<i>BamHI</i>	1	<i>KpnI</i>	1
Total	25	Total	25

Después de las ligaciones y la transformación de células calcio competentes, se seleccionan las bacterias que presentan resistencia al antibiótico, a éstas bacterias se les extrae el ADN por el método de STET.

Posteriormente el ADN extraído por este método se somete a digestión con alguna enzima de restricción que pueda ser útil para un análisis del patrón de restricción del plásmido.

El análisis del patrón de restricción de ADN para el ADN extraído de las bacterias transformadas con las ligaciones pGEM-T Easy-LYT1 (1°ATG) y pGEM-T Easy-LYT1 (2°ATG) se llevó a cabo con *EcoRI*. Las cantidades de la solución madre, mostradas en la tabla 6, se calcularon para el análisis del ADN de 17 colonias resistentes a ampicilina; 8 colonias de la ligación pGEM-T Easy-LYT1 (1°ATG) y 9 de la ligación pGEM-T Easy-LYT1 (2°ATG).

Tabla 6. Mezcla para las reacciones de digestión de pGEM-T Easy-LYT1 (1° y 2° ATG) con *EcoRI*

Reactivos	Cantidades ( $\mu$ l)
Amortiguador <i>EcoRI</i> 10X	17
<i>EcoRI</i>	2.125
Agua mQ	62
Total	81.125

Posteriormente a cada tubo se agregaron 5 $\mu$ l de ADN extraído por STET y 5 $\mu$ l de solución madre.

Después de la subclonación en pEGFP, se transformaron células calcio competentes, seleccionando las bacterias que presentaron resistencia al antibiótico, a éstas bacterias se les extrajo ADN por el método de STET. Posteriormente el ADN extraído por este método se sometió a digestión con *HindIII* y *KpnI*. Las cantidades de la solución madre, mostradas en la tabla 7, se calcularon para el análisis del ADN de 22 colonias resistentes a ampicilina; 12 colonias de la ligación pEGFP-LYT1 (1°ATG) y 10 de la ligación pEGFP-LYT1 (2°ATG).

Tabla 7. Mezcla para la reacción de digestión de pEGFP-LYT1 (1° y 2° ATG) con *Hind*III y *Kpn*I

Reactivos	Cantidades ( $\mu$ l)
Amortiguador 2 10X	23
<i>Hind</i> III	2.875
<i>Kpn</i> I	2.875
BSA 10X	23
Agua mQ	63.25
Total	115

A cada tubo se agregaron 5 $\mu$ l de ADN extraído por el método de STET y 5 $\mu$ l de solución madre.

### **Purificación de ADN de geles de agarosa**

El ADN que se deseaba purificar se corrió en un gel de agarosa 1% TAE 0.5X, en una cámara de electroforesis con amortiguador TAE 0.5X a 60 volts. Después se tiñó con bromuro de etidio (protegiendo de la luz para evitar la fragmentación del bromuro) y con ayuda del transiluminador de luz UV se corta la banda de interés. Para realizar la purificación fue utilizado el protocolo del kit de QUIAGEN.

El fragmento de gel de agarosa cortado previamente se pesa y se realiza la conversión de gramos a microlitros asumiendo que 1mg es igual a 1 $\mu$ l. Posteriormente se agregó tres veces el peso de agarosa en un  $\mu$ l de amortiguador QG y la mezcla fue incubada a 50°C por 10min, hasta que la agarosa se disuelve completamente. La mezcla se pasó por una columna QUIAGEN y se centrifuga por 1min a 13,000rpm. El sobrenadante fue desechado y se adicionó 0.5ml de amortiguador QG a la columna, centrifugándose por 1min a 13,000rpm eliminando de esta forma los restos de agarosa. La columna fue lavada con 0.75ml de amortiguador PE y centrifugada a 13,000rpm por 1min (se deja previamente de 2-5min en el amortiguador si el ADN se utilizó en ligaciones o secuenciación). El sobrenadante se desechó y se volvió a centrifugar para eliminar todos los

residuos de etanol. Finalmente la columna fue colocada en un tubo nuevo de 1.5ml para eluir el ADN adicionando 50 $\mu$ l de amortiguador EB y se dejó 1min centrifugándose posteriormente otro minuto a 13,000rpm. El ADN purificado se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## Resultados

### Amplificación por PCR de la secuencia de LYT1 (1°ATG) y LYT1 (2° ATG)

Los productos de amplificación obtenidos se corrieron en un gel de agarosa al 1% y fueron teñidos con bromuro de etidio como se describe en materiales y métodos.

Los cebadores usados en la amplificación de la secuencia que codifican para LYT1 desde el primer codón de inicio de traducción fueron LYT 15S y LYT 17AS. Los cebadores usados en la amplificación de la secuencia que codifican para LYT1 desde el segundo codón de inicio de traducción utilizados fueron LYT 16S y LYT 17AS. En ambas amplificaciones se usó como templado pBS+ LYT1 (4.3Kb).

En la figura 6 se muestran los productos de amplificación obtenidos por PCR cuyos pesos moleculares corresponden a los esperados. En el carril 2 se obtuvo una banda de aproximadamente 1655pb para LYT1 (1°ATG) y de 1571pb para LYT1 (2°ATG). Estos productos de PCR se usaron posteriormente para su clonación en el vector pGEM-T Easy.



Figura 6. Amplificación por PCR de las secuencias que codifican para LYT1 (1°ATG) y LYT1 (2°ATG). 1, Marcador de peso molecular 1Kb Ladder; 2, producto de amplificación de PCR de LYT1 (1°ATG) (1655pb); 3, producto de amplificación de PCR de LYT 1 (2°ATG) (1571pb).

### Clonación de la secuencia de LYT1 (1° ATG) y LYT1 (2°ATG) a pGEM-T Easy

Los productos de PCR se ligaron al vector de clonación comercial pGEM-T Easy como se describe en materiales y métodos. Una vez realizadas las ligaciones de pGEM-T Easy-LYT1 (1°ATG) y pGEM-T Easy-LYT1 (2°ATG), fueron utilizadas para transformar células *E. coli* DH10B calcio competentes. Los resultados mostraron (Tabla 8) colonias blancas (que contenían el inserto) y azules (que contenían únicamente el vector) seleccionadas en placas de agar LB con ampicilina más IPTG y X-Gal.

Tabla 8. Eficiencia de transformación de las ligaciones de pGEM-T Easy-LYT1.

Ligación	Tipo de colonia	No. colonias	Eficiencia de transformación (UFC/ $\mu$ g ADN)
pGEM-T Easy-LYT1(1°ATG)	Azules	700	$6 \times 10^4$
	Blancas	2000	
	Total	2700	
pGEM-T Easy-LYT1(2°ATG)	Azules	450	$7 \times 10^4$
	Blancas	2700	
	Total	3150	

Como es posible observar en la tabla 8, en la transformación de células calcio competentes con la ligación pGEM-T Easy-LYT1 (1°ATG), se obtuvieron 2700 colonias resistentes a ampicilina de las cuales se analizaron al azar 8 colonias blancas.

Cuando la ligación de pGEM-T Easy-LYT1 (2°ATG) fue utilizada para la transformación, se obtuvieron 3150 colonias resistentes a ampicilina de las cuales se analizaron al azar 9 colonias blancas. Se realizó la extracción del ADN por el método de STET de las colonias seleccionadas. Este ADN se sometió a digestión con *EcoRI* para liberar la secuencia de LYT1 (1°ATG) y LTY1 (2°ATG) en cada caso. En la figura 7 se muestra el resultado, donde se aprecia el patrón de restricción esperado de dos colonias. La digestión

del ADN de pGEM-T Easy-LYT1 (1°ATG) mostró una banda de aproximadamente 3001pb correspondiente al vector y una segunda banda de 1655pb correspondiente al inserto. De la misma manera, para la clonación pGEM-T Easy-LYT1 (2°ATG), la primera banda es de aproximadamente 3001pb correspondiente al vector y la segunda de 1571pb correspondiente al inserto. En la tabla 9 se muestra la eficiencia de clonación obtenida en el presente trabajo con pGEM-T Easy, siendo de 87% para la ligación pGEM-T Easy- LYT1 (1°ATG) y 88% para pGEM-T Easy LYT1 (2°ATG).

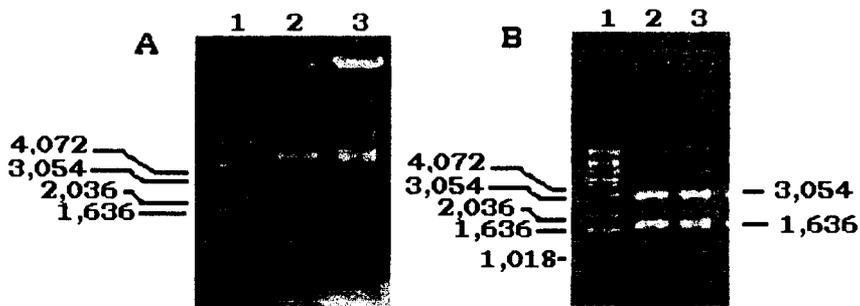


Figura 7. Extracción de ADN total (A) de las colonias blancas resistentes a ampicilina y su digestión (B) con *EcoRI*. 1, Marcador de ADN 1Kb Ladder; 2, pGEM-T Easy-LYT1 (1°ATG); 3, pGEM-T Easy-LYT1 (2°ATG).

Tabla 9. Eficiencia de clonación de pGEM-T Easy-LYT1 (1°ATG y 2°ATG)

Ligación	Colonias blancas	No. colonias	Porcentaje (%)
pGEM-T Easy-LYT1 (1°ATG)	Analizadas	8	100
	Positivas	7	87
pGEM-T Easy-LYT1 (2°ATG)	Analizadas	9	100
	Positivas	8	88

Una vez introducidas de manera exitosa las secuencias que codifican para LYT1 (1°ATG) y LTY1 (2°ATG) dentro del vector pGEM-T Easy, se realizaron subclonaciones con el fin de obtener las secuencias de LYT1 (1°ATG) y LYT1 (2°ATG) unidas a la secuencia que codifica para la proteína

verde fluorescente. Para ello se extrajo el ADN por el método de lisis alcalina de los plásmidos pGEM-T Easy-LYT1 (1°ATG) y pGEM-T Easy-LYT1 (2°ATG) (Fig 8) para obtener los insertos a subclonar y ADN de pEGFP para obtener el vector.

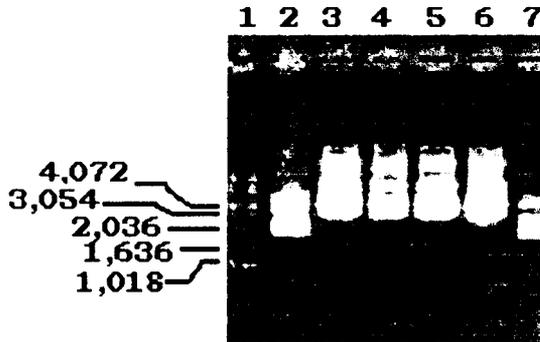


Figura 8. ADN de pEGFP, pGEM-T Easy-LYT1 (1°ATG) y pGEM-T Easy-LYT1 (2°ATG) extraído por el método de lisis alcalina. 1, Marcador de peso molecular 1Kb Ladder, 2 y 7 pEGFP; 3 y 4, pGEM-T Easy-LYT1 (1°ATG); 5 y 6 pGEM-T Easy-LYT1 (2°ATG).

### **Subclonación de la secuencia de LYT1 (1° ATG) y LYT1 (2° ATG) en pEGFP**

Al preparar el vector y el inserto para la construcción de pEGFP-LYT1 (1°ATG) y pEGFP-LTY1 (2°ATG) se realizó la digestión de los plásmidos pEGFP, pGEM-T Easy-LYT1 (1°ATG) y pGEM-T Easy-LYT1 (2°ATG), con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Kpn*II. Estas digestiones se purificaron con el kit Quia quick de QUIAGEN, como se menciona en materiales métodos. En la figura 9 se observan los insertos de LYT1(1°ATG), LYT1 (2°ATG) y el ADN lineal de pEGFP puros.

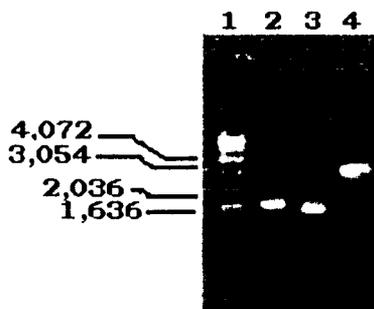


Figura 9. ADN's purificados de pEGFP, pGEM-T Easy-LYT1 (1°ATG) y pGEM-T Easy-LYT1 (2°ATG) digeridos con *Bam*HI y *Kpn*I. 1, Marcador de peso molecular 1Kb Ladder; 2, LYT1 (1°ATG); 3, LYT1 (2°ATG) y 4, pEGFP.

Los insertos y el vector digeridos y purificados se ligaron como se describe en materiales y métodos. Estas ligaciones se usaron para transformar células *E. coli* DH10B calcio competentes, sembradas posteriormente en placas de agar LB con ampicilina.

En la transformación de células calcio competentes con la ligación pEGFP-LYT1 (1°ATG), se obtuvieron 33 colonias resistentes a ampicilina. Así mismo en la transformación de células calcio competentes con la ligación pEGFP-LYT1 (2°ATG), se obtuvieron 24 colonias resistentes al antibiótico. La eficiencia de transformación fue de  $4.1 \times 10^2$  para la pEGFP-LYT1 (1° ATG) y de  $3.0 \times 10^2$  para pEGFP-LYT1 (2° ATG), como se muestra en la tabla 10. Para verificar cuales de estas colonias eran positivas a la clonación, de las colonias resistentes a ampicilina se tomaron 12 resultantes de la ligación pEGFP-LYT1 (1°ATG) y 10 de la ligación pEGFP-LYT1 (2°ATG) extrayendo su ADN por el método STET y analizando su patrón de restricción. La eficiencia de clonación se muestra en la tabla 11, siendo del 33% para pEGFP-LYT1 (1°ATG) y del 40% para pEGFP-LYT1 (2°ATG). Este ADN fue digerido con las enzimas de restricción *Hind*III y *Kpn*I. La figura 10 muestra dos digestiones representativas del ADN de bacterias que en el análisis del patrón de restricción realizado se comprobó que contenían la construcción deseada.

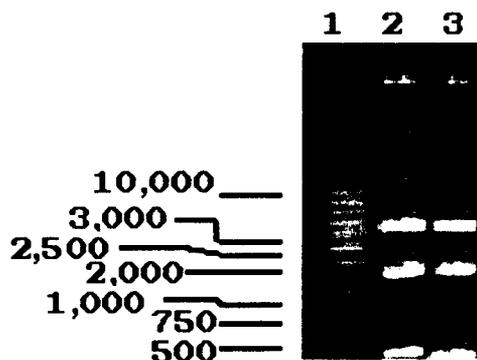


Figura 10. Extracción de ADN de dos colonias representativas resistentes a ampicilina y su digestión con *Hind*III y *Kpn*I. 1, Marcador de ADN 1Kb (Fermentas); 2, pEGFP-LYT1 (1°ATG); 3, pEGFP-LYT1 (2°ATG).

La ligación deseada presenta dos sitios de restricción para la enzima *Hind*III y un sitio para *Kpn*I, por lo que las bandas mostradas en el carril 2 y 3 concuerdan con el peso teórico esperado. El patrón de restricción de pEGFP-LYT1 (1°ATG) mostró tres bandas de un peso de 3316pb, 1330pb y 368pb. De igual forma en el caso de pEGFP-LYT1 (2°ATG) las bandas obtenidas fueron de un peso molecular de 3316pb, 1246pb y 368pb.

Tabla 10. Eficiencia de transformación de las ligaciones con pEGFP-LYT1 (1° y 2° ATG)

Ligación	No. colonias	Eficiencia de transformación (UFC/ $\mu$ g ADN)
pEGFP-LYT1 (1°ATG)	33	$4.1 \times 10^2$
pEGFP-LYT1 (2°ATG)	24	$3.0 \times 10^2$

Tabla 11. Eficiencia de clonación de pEGFP-LYT1 (1° y 2° ATG)

Ligación	Colonias resistentes	No. colonias	Porcentaje (%)
pEGFP-LYT1 (1°ATG)	Analizadas	12	100
	Positivas	4	33
pEGFP-LYT1 (2°ATG)	Analizadas	10	100
	Positivas	4	40

## Discusión

El propósito principal de nuestro equipo de trabajo ha sido poder dilucidar a fondo los procesos biológicos que permiten que *Trypanosoma cruzi* infecte eficientemente al humano. Se han mencionado varias proteínas involucradas en tal proceso, sin embargo, solo en dos de ellas se ha demostrado por evidencias genéticas su participación en el proceso de infección. Recientemente se aisló y caracterizó a LYT1 (Manning Cela y cols, 2001), molécula que se ha demostrado está involucrada en procesos muy diversos del parásito, tales como la regulación de estadio y su capacidad infectiva y hemolítica. Al revisar detenidamente la secuencia que codifica para la proteína LYT1, se observa la existencia de dos codones de inicio de traducción. El primero se encuentra en la posición +1 que podría producir la proteína completa incluyendo los primeros 29 aminoácidos dentro de los cuales se encuentran los nucleótidos con homología a una posible secuencia señal. El segundo codón de traducción en la posición +85 produciría una proteína incompleta sin los primeros 29 aminoácidos y por lo tanto sin la secuencia señal, e incluyendo la presencia de una posible secuencia de localización nuclear presente en los aminoácidos 126 a 132.

Es posible que ambas proteínas se estén expresando en el parásito, ya que los estudios realizados al respecto demuestran que *LYT1* sufre un "trans-splicing" alternativo de su secuencia y hay evidencia de distintos transcritos de *LYT1* en los diferentes estadios de *Trypanosoma cruzi* (Manning Cela y cols, 2002). Sin embargo, la presencia de estos transcritos no garantiza la síntesis de ambas proteínas, por lo que en este trabajo se planteó la construcción de plásmidos que contengan la secuencia que codifica para la proteína LYT1 a partir del primero y segundo ATG, que codificarían para la proteína completa e incompleta respectivamente. Estas secuencias se fusionaron a la secuencia que codifica para la proteína verde

fluorescente para que en trabajos futuros las secuencias de fusión se clonen en vectores de expresión para *Trypanosoma cruzi* bajo un promotor ribosomal (pTREX-n), facilitando así el estudio de la expresión y localización de LYT1 mediante microscopía de fluorescencia.

El uso de proteínas fluorescentes ha sido de gran utilidad para detectar los niveles de expresión de genes *in vivo*, para el control en los experimentos de transfección, para el monitoreo de la transfección en células vivas, para el marcaje celular para protocolos de separación de células activadas por fluorescencia (FACS), para la localización subcelular de proteínas fusionadas a la proteína fluorescente, entre otras aplicaciones.

La mayor parte de los trabajos experimentales que involucran a la proteína verde fluorescente se han enfocado a esta última aplicación. El objetivo principal es fusionar la secuencia codificante para la proteína verde fluorescente a la proteína a estudiar. El resultado es un plásmido expresado en la célula u organismo deseado, donde la proteína de interés mantiene sus funciones y localización normales pero ahora es fluorescente.

A la fecha, la secuencia codificante para la proteína verde fluorescente ha sido dirigida exitosamente a casi todos los organelos celulares, incluyendo la membrana plasmática, núcleo, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, vesículas secretoras, mitocondria, peroxisomas, vacuolas y fagosomas (Tsien, 1998).

Con base en lo anterior, el primer paso a seguir en este trabajo fue la amplificación de las secuencias que codifican para LYT1. Utilizando la secuencia codificante para la proteína LYT1, se diseñaron los cebadores como se menciona en materiales y métodos. Para facilitar la ligación

orientada de los productos de PCR en el plásmido vector, se adicionaron en sus extremos una secuencia reconocida por una enzima de restricción.

La figura 6, muestra el resultado de la amplificación por PCR, siendo los productos de un peso molecular aproximado de 1655pb para LYT1 (1°ATG) y de 1571pb para LYT1 (2°ATG). Como un primer intento se trató de clonar dichos productos de PCR después de su digestión con *Bam*H1 y *Kpn*1 en el vector pEGFP; sin embargo, el resultado fue negativo. Esto no es sorprendente ya que la clonación directa de un producto de PCR digerido no es muy eficiente. Por lo tanto utilizamos un vector de clonación de productos de PCR comercial (pGEM-T Easy) el cual se ha reportado que presenta una eficiencia de clonación elevada de arriba del 60% (Promega, pGEM-T and pGEM-T-Easy Vector Systems Protocol). La dificultad de clonación de los productos de PCR de LYT1 en pEGFP también pudo ser resultado de observación previas hechas en nuestro grupo en donde se ha observado una gran dificultad de clonar las secuencias de LYT1 ya que al parecer tienen un efecto tóxico en bacteria.

Por ello, como se mencionó anteriormente, con el fin de aumentar las probabilidades de éxito en la clonación de LYT1 (1°ATG y 2°ATG) en el plásmido pEGFP, se recurrió primero a su clonación en el vector pGEM-T Easy, y posteriormente subclonaras en pEGFP.

Como se menciona en los resultados, la eficiencia de ligación para pGEM-T Easy-LYT1 (1°ATG) fue del 87 %. Este porcentaje de eficiencia resultó ser satisfactoria, al igual que la eficiencia obtenida en la clonación de pGEM-T Easy-LYT1 (2°ATG) que fue del 88%. Estos resultados concuerdan con lo sugerido por el proveedor, arriba del 60% de eficiencia de clonación reportado por Promega en *pGEM-T and pGEM-T-Easy Vector Systems Protocol*.

La figura 7 muestra que se obtuvieron las ligaciones pGEM-T Easy-LYT1 (1°ATG) y pGEM-T Easy-LYT1 (2°ATG). Al ser sometidos a digestión con la enzima *EcoRI*, ambos plásmidos liberan el inserto del peso molecular esperado. Para pGEM-T Easy-LYT1 (1°ATG) se ven dos bandas, una correspondiente al inserto (1655pb) y otra correspondiente al vector (3015pb), y para pGEM-T Easy-LYT1 (2°ATG) la banda de 1571pb corresponde al inserto y la segunda de 3015pb corresponde al vector.

Una vez obtenidas las ligaciones pGEM-T Easy-LYT1 (1°ATG) y pGEM-T Easy-LYT1 (2°ATG) se realizaron lisis alcalinas para obtener ADN suficiente para realizar la subclonación. La figura 8 muestra los productos obtenidos de las lisis alcalinas. Este ADN se digirió con las enzimas *BamHI* y *KpnI* para la generación de extremos cohesivos tanto en el inserto como en el vector. Cabe señalar que estas enzimas utilizan amortiguadores incompatibles entre sí, por lo que se realizaron las digestiones de forma secuencial y posteriormente se purificaron utilizando el procedimiento descrito en materiales y métodos.

La figura 9 muestra el resultado de la purificación de los productos de digestiones secuenciales de los insertos y el vector. Con este ADN se procedió a realizar las ligaciones y posteriormente se transformaron células calcio competentes con los productos de la reacción de ligación, como se describe en materiales y métodos.

La subclonación presentó una eficiencia del 33% para pEGFP-LYT1 (1°ATG) y 40% pEGFP-LYT1 (2°ATG). Confirmando por su análisis de patrón de restricción que se lograron construir los plásmidos pEGFP-LYT1 (1°ATG) y pEGFP-LYT1 (2°ATG).

La figura 10 muestra el resultado de la digestión del análisis de patrón de restricción con las enzimas *HindIII* y *KpnI*. En el caso de

pEGFP-LYT1 (1°ATG) se observan tres bandas con un peso molecular de 3316pb, 1330pb y 368b. Para la construcción pEGFP-LYT (2°ATG) las bandas que se obtuvieron son de 3316pb, 1246pb y 368pb. La generación de tres bandas se justifica por la presencia de dos sitios de restricción para *HindIII* y un sitio para *KpnI* en los plásmidos construidos.

Dentro de la línea de investigación de nuestro grupo de trabajo se tiene considerado el empleo de estos plásmidos, para la construcción de otros plásmidos: pTREXn-EGFP-LYT1 (1°ATG) y pTREXn-EGFP-LYT1 (2°ATG).

Este vector fue construido por Vázquez y Levin en 1999, derivado de pRibotex. Se han reportado trabajos donde se utiliza pTREX-n como vector con buenos resultados (Pereira y cols, 2003) y, recientemente, se ha discutido sobre la aplicación de pTREX-n en la expresión de proteínas fluorescentes en *T. cruzi* (Gevara y cols, 2005).

El plásmido pTREXn se escogió para introducir las ligaciones EGFP-LYT1 (1°ATG) y EGFP-LYT1 (2°ATG) debido a que contiene un promotor ribosomal que se caracteriza por ser muy fuerte (adecuado para su expresión en *T. cruzi*), un sitio múltiple de clonación (útil para la inserción de la secuencia de fusión LYT1-EGFP) y dos secuencias que codifican para la resistencia a los antibióticos ampicilina y neomicina (adecuado para la selección de bacterias transformadas resistentes a ampicilina y para la selección de parásitos transfectados resistentes a neomicina). De esta forma se facilitará la expresión y localización de la proteína LYT1 dentro de parásitos transfectados de *Trypanosoma cruzi*.

En parásitos transfectados con pTREXn-EGFP-LYT1 (1°ATG) que codificarían para la proteína LYT1 completa, llevando la posible secuencia se espera observar una fluorescencia en la membrana del parásito o ser

secretada al medio, consistente con el papel de la proteína LYT1 en la hemólisis y el proceso de infección. De la misma forma, en parásitos transfectados con pTREXn-EGFP-LYT1 (2°ATG), que codificaría para la proteína LYT1 incompleta, careciendo de la posible secuencia señal e incluyendo una posible secuencia de localización nuclear, se espera observar una fluorescencia en el citosol, lo que sería consistente con el papel de la proteína LYT1 en el proceso de transición de estadio en el ciclo de vida del parásito.

## Conclusiones

Se amplificó la secuencia que codifica para la proteína LYT1 por PCR, obteniendo los productos de amplificación: LYT1 (1°ATG) y LYT1 (2°ATG) con un peso molecular de 1655pb y 1571 respectivamente.

Se logró la clonación de los productos de PCR anteriores en pGEM-T Easy, con una eficiencia de clonación de 87% para pGEM-T Easy-LYT1 (1°ATG) y del 88% para pGEM-T Easy-LYT1 (2 °ATG).

Se logró construir a través de la subclonación de los fragmentos de LYT1 (1° y 2° ATG) en pGEM-T Easy, a los plásmidos pEGFP-LYT1 (1°ATG) y pEGFP-LYT1 (2°ATG) que expresarán la secuencia de LYT1 a partir del 1° y 2° ATG fusionadas a la proteína verde fluorescente, con una eficiencia de clonación del 33 y 40%, respectivamente.

## Perspectivas

Este trabajo constituye el primer paso para la construcción de los vectores de transfección pTREXn-EGFP-LYT1 (1°ATG) y pTREXn-EGFP-LYT1 (2°ATG) los cuales serán utilizados para transfectar parásitos de *Trypanosoma cruzi*.

Se espera que los parásitos con pTREXn-EGFP-LYT1 (1°ATG) codifiquen para la proteína LYT1 completa. Esta proteína lleva la posible secuencia señal y se espera observar una fluorescencia en la membrana del parásito o ser secretada al medio consistente con el papel de la proteína LYT1 en la hemólisis y proceso de infección. De la misma forma, en parásitos transfectados con pTREXn-EGFP-LYT1 (2°ATG), que codificarán para la proteína LYT1 incompleta, careciendo de la posible secuencia señal e incluyendo una posible secuencia de localización nuclear, se espera observar una fluorescencia en el citosol, lo que sería consistente con la función de la proteína LYT1 en el proceso de transición de estadio en el ciclo de vida del parásito.

Esto permitirá observar la localización de los diferentes productos de la proteína LYT1 dentro del parásito y aumentar el conocimiento acerca de la posible función de éstos.

## Bibliografía

- Andrews N. W. 1990. The acid-active hemolysin of *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.* **71**: 241-244.
- Andrews N. W., Abrams C. K., Slatin S. L. y Griffiths G. 1990. A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore forming activity at low pH. *Cell* **61**: 1277-1287.
- Barbosa H. S. y Meirelles M. N. L. 1995. Evidence of the participation of cytoskeleton of heart muscle cells during invasion of *Trypanosoma cruzi*. *Cell. Struct. Funct.* **20**:275-284.
- Barret M. P., Burchmore R. J. S., Stich A., Lazzari J. O., Frascch A. C., Cazzulo J. J. y Krishna S. 2003. The trypanosomiasis. *The Lancet* **352**:1469-1480.
- Botero D. y Restrepo M. 1992. *Parasitosis humanas*. Ed. Carvajal, S.A., segunda edición, Colombia, Bogotá, pp 191-207.
- Burleigh B. A. y Andrews N. 1995. The mechanism of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Ann. Rev. Microbiol.* **49**:175-200.
- Burleigh B. A. y Andrews N. W. 1998. Signaling and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Curr. Microbiol.* **1**:461-465.
- Burleigh B. A. y Woolsey. 2002. Cell signaling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cellular Microbiology* **4**(11): 701-711.
- Caler E. V., Vaena de Avalos S., Haynes P. A., Andrews N. W. y Burleigh B. A. 1998. Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Embo J.* **17**:4975-86.
- Caler E. V., Morty R. E., Burleigh B. A. y Andrews N. 2002. Dual role of signaling pathways leading to Ca<sup>2+</sup> and cyclic AMP elevation in host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Infec. Immun.* **68**:6602-6610.
- Carvalho T. M. U., Ferreira A. G., Coimbra E. S., Rosestolato C. T. F. y De Souza W. 1999. Distribution of cytoskeletal structures and organelles of host cell during evolution of the parasitism by *Trypanosoma cruzi*. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* **31**:325-333.
- Cortez N., Neira I., Ferreira D., Luquetti A., Rassi A., Ataíde V. y Yoshida N. 2003. Infection by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms

deficient in gp82 but expressing a related surface molecule, gp30. *Infect. Immun.* **71**(11): 6184-6191.

- Flisser A., Velasco Villa A., Martínez Campos C., González Domínguez F., Briceño García B., García Suárez R., Caballero Servin A., Hernández Monroy I., García Lozano H., Gutiérrez Cogco L., Rodríguez Ángeles G., López Martínez I., Galindo Virgen S., Vázquez Campuzano R., Balandrano Campos S., Guzmán Bracho C., Olivo Díaz A., Luis de la Rosa J., Magos C., Escobar Gutiérrez A. y Correa D. 2002. Infectious diseases in Mexico. A survey from 1995-2000. *Archives of Medical Research* **33**(4): 343-350.
- Fralish, B. H. y Tarleton, R. L. 2003. Genetic immunization with LYT1 or a pool of trans-sialidase genes protects mice from lethal *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine* **21**:3070-3080
- Gerstein, A. 2001. *Molecular Biology*. Ed. Wiley-Liss, Canada, pp43-44.
- Gevara P., Días M., Rojas A., Crisante G., Abreu-Blanco M. T., Umezawa E., Vázquez M., Levin M., Anez N. y Ramírez J. L. 2005. Expression of fluorescent genes in *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* (Kinetoplastidae: Trypanosomatidae): its application to parasite-vector biology. *J. Med. Entomol.* **42**(1): 48-56.
- Guzmán-Bracho C. 2001. Epidemiology of Chagas disease in Mexico: an update. *International Parasitology* **2**:349-355.
- Lewin B. 2000. *Genes VII*. Ed. Oxford University Press, Estados Unidos pp 705-711.
- Markell E., John D. y Krotosky W., *Medical Parasitology*, 8va. Edición, Ed. W.B. Saunders Co., 1999, Estados Unidos, pp 134-146.
- Manning-Cela R. G., Cortés A., González-Rey E., Van V. W. C., Swindle J. y González A. 2001. The LYT1 gene product is required for efficient infection by *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* **69**:3916-3923.
- Manning-Cela R. G., Gonzalez A. y Swindle J. 2002. Alternative splicing of LYT1 transcripts in *Trypanosoma cruzi*, *Infect. Immun.* **70**(8): 4726-4728
- Meirelles M. L. N., Chiari E. y De Souza W. 1982. Interaction of bloodstream, tissue culture-derived trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* with macrophages. *Acta Trop.* **39**:195-203

- Mortara R. A., Procopio D. A., Barros H. C., Verbisck N. V., Andreoloi W. K., Silva R. B. S. y Da Silva S. 1999. Features of host cell invasion by different infective forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **94**(suppl. II): 135-137.
- Neira I., Silva F. A., Cortéz M. y Yoshida N. 2003. Involvement of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecule gp82 in adhesion to gastric mucin and invasion of epithelial cells. *Infect. Immun.* **71**:557-561.
- Nogueira N. y Cohn Z. 1976. *Trypanosoma cruzi* mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. *J. Exp. Med.* **143**:1402-1420.
- Pereira C., Alonso G., Ivaldi S., Silber A., Alves M., Torres H y Flawiá M. 2003. Arginine kinase overexpression improves *Trypanosoma cruzi* survival capability. *FEBS Letters* **554**(1,2) 201-205.
- Prata A. 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet Infectious Diseases* **1**(2): 92-100.
- Procopio D. O. y Mortara R. A. 1994. The mechanisms used by two developmental forms of *Trypanosoma cruzi* to invade mammalian cells are different and may be dependent on host cells. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **89**:61.
- Promega Corporation. 2003. *pGEM-T and pGEM-T-Easy Vector Systems Protocol*.
- Razo-Chávez I. y Resendiz-Muñoz F. 1992. *Revisión bibliográfica del la tripanosomiasis americana (enfermedad de Chagas)*. Tesis, FES Cuautitlán. pp. 220.
- Rosistolato C. F., Furniel D. J., De Souza W. y De Carvalho M. U. 2002. Participation of host cell actin filaments during interaction of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* with host cell. *Cell structure and function* **27**:91-98.
- Sambrook y Russel. 2001. *Molecular Cloning*. Tercera edición, Ed. CHSL Press. Estados Unidos. Tomos 1,2 y 3.
- Schenkman S., Robbins E. y Nussenzweig V. 1991. Attachment of *Trypanosoma cruzi* to mammalian cells requires parasite energy, and invasion can be dependent of the target cell cytoskeleton. *Infection and Immunity* **59**(2): 645-654.

- Tsien R. 1998. The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* **67**:509-44.
- Tyler K. M. y Engman D. M. 2001. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal of Parasitology* **31**(5-6): 472-480.
- Vázquez P. M. y Levin M. J. 1999. Functional analysis of the intergenic regions of Tcpi2β gene loci allowed the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector. *Gene* **2**(1): 217-225
- Vieira M., Dutra M. F., Carvalho T., Cunha-e-Silva N. L., Souto-Padrón T. y Souza W. 2002. Cellular signaling during the macrophage invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Histochem. Cell Biol.* **118**:491-499.
- Woolsey A., Sunwoo L., Petersen C. A., Brachmann S., Cantley L. y Burleigh B. A. 2003. Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. *Journal of Cell Science* **166**(17): 3611-3622.
- Woolsey A. y Burleigh B. A. 2004. Host cell actin is required for cellular retention of *Trypanosoma cruzi* and early association with endosomal/lysosomal compartments. *Cellular Microbiology* 1-10

Sitios consultados en Internet:

[www.clontech.com](http://www.clontech.com)

[www.dpd.cdc.gov](http://www.dpd.cdc.gov)

[www.MolecularCloning.com](http://www.MolecularCloning.com)

[www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

[www.promega.com](http://www.promega.com)

[www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm](http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm)

## Apéndices

### A. Secuencia del gen LYT1 alelo b

LOCUS AF320626 2289 bp DNA linear INV 22-MAY-2001  
 DEFINITION *Trypanosoma cruzi* LYT1p (LYT1) gene, LYT1-b allele, complete cds.  
 ACCESSION AF320626  
 VERSION AF320626.1 GI:12958499  
 KEYWORDS  
 SOURCE *Trypanosoma cruzi*  
 ORGANISM *Trypanosoma cruzi*  
 Eukaryota; Euglenozoa; Kinetoplastida; Trypanosomatidae;  
 Trypanosoma; Schizotrypanum.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 2289)  
 AUTHORS Manning-Cela,R., Cortes,A., Gonzalez-Rey,E., Van Voorhis,W.C.,  
 Swindle,J. and Gonzalez,A.  
 TITLE LYT1 protein is required for efficient in vitro infection by  
*Trypanosoma cruzi*  
 JOURNAL Infect. Immun. 69 (6), 3916-3923 (2001)  
 MEDLINE [21246696](#)  
 PUBMED [11349059](#)  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 2289)  
 AUTHORS Manning-Cela,R.G., Cortes,A., Gonzalez-Rey,E., Van Voorhis,W.C.,  
 Swindle,J. and Gonzalez,A.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (10-NOV-2000) Infection Disease Research Institute, 1124  
 Columbia Street, Suite 600, Seattle, WA 98104, USA  
 FEATURES  
 source Location/Qualifiers  
 1..2289  
 /organism="Trypanosoma cruzi"  
 /mol\_type="genomic DNA"  
 /strain="CL Brenner"  
 /db\_xref="taxon:5693"  
 <202..>1860  
 /gene="LYT1"  
 /allele="LYT1-b"  
 mRNA <202..>1860  
 /gene="LYT1"  
 /allele="LYT1-b"  
 /product="LYT1p"  
 CDS 202..1860  
 /gene="LYT1"  
 /allele="LYT1-b"  
 /codon\_start=1  
 /evidence=not\_experimental  
 /product="LYT1p"  
 /protein\_id="AAK09325.1"  
 /db\_xref="GI:12958500"  
 /translation="MRKKAALVAPTADTRPTCRGAAIANNFMGRAGPREGVGRSTEM  
 PAAGPTGSQRSQTQREVKASQDADAAAISSYFQSELVTSQSHEGVSPLAKTRANERRN  
 GEQEREKELPAVGGAVPTGKGTDPKQRVLQDLPAMHAEGQNHGREGDKGVSVMKMDSP  
 GRVQVLEQMLLHLAALNRQLELELIETRRELTMYKQLLPDVQRQTEAHALSQEHHKAN  
 SAAPPLMSDERRRQMLFTGQQQQQQVEDLHGGISGWETAARRMRYGYEEGERDALSD  
 GEGRPCAGRMGSPKRFSTQPPRSSRNHRNPHAANGTNGNSHVHSSRQKSHPTRGA  
 AVTSVPLAASATNRRGRSMRQHTRPRGPSHLFERLDAEDAIDMLETLKLSLMYRCNHS  
 HHRSTEGDVVPAAKPRKGTRSVAPPPPPSMLSSSQRLAAAVAGAPACSVSARHGR  
 NHGVSAVGDPSRGNRVSETARIAHAPSFGGKKCAPGLTQLHFSSPSRRATPMKKDTP  
 SRGQAAGVAAVVGGDQLEALQRRYWEQSRILEQLENMLAAD"

misc feature 286  
 /gene="LYT1"  
 /allele="LYT1-b"  
 /note="alternate site of translation initiation"

## ORIGEN

1 agtcctttgc tttttatgt taacctgtaa gtttcattga aaatgaaaaa tgcgaaacc  
 61 aaaaggtatg gaattacggc gtatgatgt catccacttc ccatcccoct tacgtgtttc  
 121 gcaactggcc cttttgctct ctgcctgtt gaagtttccc ctcttttt tttttttgt  
 181 ttttggccg tgctgcctt catgcccgaag aaagcccagc cattagtagc acccacagca  
 241 gacacacggc cgactgccc gggggctgcc attgcgaata actttatggg acgtgccggc  
 301 ccccgtagg gcgttggaa atcaacggag atgcccggctg ctggaccgac ggggtctcaa  
 361 agaagtcaaa cgcaacggga ggtgaaagcg tcacaagacg ccgacgccc ggccattagt  
 421 agttatttcc agtccgaatt ggtgacatct cagtcgcacg aggggtgtct tctctggca  
 481 aagactaggc ccaacgaacg gcggaacggg gacgaggagc gggagaagga actgccggcg  
 541 gttgtggcg ccgttccaac tgggaagggg acggaccca aacagcaggt gctcaggat  
 601 ttggcagcga tgcacggga gggacaaaac cagcagcgta gagaggggtga caagggtgtt  
 661 tccgtgaaga tggactcccc tggctgcgta caggtgctgg agcaaatgt gctacacctg  
 721 gctgcattga acagacagct agaattagaa ctatagaaa cgcgacggga actgacgatg  
 781 tacaagcagc ttttacctga tgtgacgagc cagacggagg ccatgcttt gtctcaggag  
 841 catcaaaaag cgaatagtc tgctccgcca ctgatgtag atgagaggcg acgacagatg  
 901 ctcttcacag ggcaacaaca acaacagcaa caagtggaa atctgcatgg cgttattagc  
 961 ggggtggaaa cggcagcgag gagaatgcgc tatggttacg agggggggga gaggagcgc  
 1021 ctttcagatg gtgaggccc tccactgttc gcaggtcgtg tgggctcccc gaagagattc  
 1081 ctttcaaac aaccgctcg aagcagcagg aacctcggga accctcagc tgctaacggg  
 1141 acaaatggca atagtcattg tccccattcg tccagacaaa aaagtcacc gacaagagga  
 1201 gctgctgtaa ctctctacc gttggcggc tccgcaacca atgcccaggc tcttccatg  
 1261 cgacaacata cccgaccocg cggaccttct catcttttcg aacgctcga cgtgacgat  
 1321 gcaattgata tctggagac ctgaaagctc tctctcatgt atcgtgcaa ccactcgcat  
 1381 catcatcaaa cagaaggaga tgttgtcgg cccgcccga agccccgaa aggcacggc  
 1441 tctgttcac caccaccgc accaccgtcc atgtatcat cgtcaaaaag aaagttgoc  
 1501 gccgacgtt ctggagccc ggcacgagc gttcagcac gacacggaag gaaccatggc  
 1561 gtttctcgg tggagatcc gtcaagggc aatcagatt cagaacagc tcgcatagct  
 1621 catgctctt ctttggggg gaagaaatgc gcgccggcc taaccaact cacttctct  
 1681 tcccctoca gaaggctac gccgatgaaa aaagacagc cattgtcac tggtaacagc  
 1741 gctggagtg cagcagtagc ggtggcggt gacggcagc tagaggcact gcagaggcgt  
 1801 tactgggaac agtcccgtgc gatattggag cagcttgaac acatgctggc agctgatga  
 1861 agtcttggc attaggatg acaatcatag tcttttga gcttctgta gtttggata  
 1921 tctgagaat tctatctga cagggtgag tgatacacac acacacacac acatacaaat  
 1981 acatgtacac ttatgtttt tgctatcac caggaggggt gaggagttag tggaaatgag  
 2041 caagcgggtg aaagtttct tctcacagt ctccggcga cgcgaagagc aggagaatgg  
 2101 gaagtcaatg ccgagaagaa gaagaagaag aaggaaaaaa aaaaaaata ggaagtaaaa  
 2161 tgacgttga cgtgtaag cataccctt gactcctgga cagataaac aagccccagg  
 2221 gtcagaaaaa tgaaccggg attgaaaaaa aaaaaaaaaa atttccccca gaggagaagt  
 2281 ttgaaaaaa

## B. Secuencia de pEGFP

LOCUS	CVU76561	3355 bp	DNA	circular	SYN 19-NOV-1996
DEFINITION	Cloning vector pEGFP, complete sequence.				
ACCESSION	U76561				
VERSION	U76561.1 GI:1674491				
KEYWORDS	green fluorescent protein.				
SOURCE	Cloning vector pEGFP				
ORGANISM	Cloning vector pEGFP artificial sequences; vectors.				
REFERENCE	1 (bases 1 to 3355)				
AUTHORS	Kitts,P. and Green,G.				
TITLE	pEGFP complete sequence				
JOURNAL	Unpublished				
REFERENCE	2 (bases 1 to 3355)				
AUTHORS	Kitts,P. and Green,G.				
TITLE	Direct Submission				

**JOURNAL** Submitted (28-OCT-1996) CLONTECH Laboratories, Inc., 1020 East Meadow Circle, Palo Alto, CA 94303-4230, USA

**COMMENT** This vector can be obtained from CLONTECH Laboratories, Inc., 1020 East Meadow Circle, Palo Alto, CA 94303-4230, USA. To place an order call (415) 424-8222 or (800) 662-2566, extension 1. International customers, please contact your local distributor. For technical information, call (415) 424-8222 or (800) 662-2566, extension 3.

This sequence has been compiled from information in the sequence databases, published literature and other sources, together with partial sequences obtained by CLONTECH. If you suspect there is an error in this sequence, please contact CLONTECH's Technical Service Department at (415) 424-8222 or (800) 662-2566, extension 3 or E-mail TECH@CLONTECH.COM.

**FEATURES** Location/Qualifiers

**source** 1..3355  
/organism="Cloning vector pEGFP"  
/mol\_type="genomic DNA"  
/db\_xref="taxon:54105"

**BASE COUNT** 829 a 886 c 888 g 752 t

**ORIGIN**

```

1 agcgcccaat acgcaaacg cctctcccg cgcgttgcc gattcattaa tgcagctggc
61 agcagacggt tcccactgg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat gtgagttagc
121 tcaatcatta ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc ggctcgtatg ttgtgtggaa
181 ttgtgagcgg ataaccaatt cacacagggaa acagetatga ccatgattac gccaaagctg
241 catgectgca ggtcgactct agaggatccc cgggtaccgg tcgccacct ggtgacaag
301 ggcgaggagc tttaccgg gggtgtgccc atcctggctg agctggcagg gcagctaaac
361 ggccacaagt tcagcgtgic cggcgagggc gaggcgatg ccaactacgg caagctgacc
421 ctgaagtcca tctgcaccac cggcaagctg cccgtgccct ggcccacct cgtgaccacc
481 ctgacctacg cgtgacgtg cttcagccgc taccgccacc acatgaagca gcagacttc
541 tcaagtccg ccatgccoga aggctactgc caggagcgca ccatcttct caaggacgac
601 ggcaactaca agaccgccgc cgaagtgaa gttcaggcgc acaccctgt gaaccgcatc
661 gagctgaagg gcatcgcact caaggaggac ggcaacatcc tggggcacia gctggagtac
721 aactacaaca gccacaact ctatatcatg gccgacaagc agaagaacgg catcaaggtg
781 aactcaaga tccgccacia catcgaggac ggcagcgtgc agctcggca ccaactaccg
841 cagaacacc ccatcgccga cggccccgtg ctgctgcccg acaaccacta cctgagcacc
901 cagtccgcc tgagcaaaa ccccacgag aagcgcgatc acatggtct gctggagtic
961 gtgaccgccg ccgggatcac tctcggcatg gacgagctgt acaagtaaa gcccggcagc
1021 tctagaatc caactgagc cgggtcgtc ccatlaccaa cttgtctggt gtaaaaaata
1081 ataggcctac tagtcggcg tacggccct ctgctctgc gctttcgtg gatgacggtg
1141 aaaactctg acacatcag ctcccggaga cggtcacagc ttgtctgtaa gccgatgccg
1201 ggagcagaca agcccgtcag ggcgcgtcag cgggtgttg cgggtctcg ggctggctta
1261 actatcgccg atcagagcag atgtactga gactgacca tatcgggtg gaataaccgc
1321 acagatgctg aaggagaaaa taccgatca ggcggcctta agggcctctg gatacgcta
1381 ttttatagg ttaatgcat gataataatg gttcttata cgtcaggtgg cacttttcg
1441 ggaaatgtc gcggaacccc tatttgtaa ttttctaaa tacattcaa tatgtaccg
1501 ctcatgagc aataaccctg ataaatgct caataatatt gaaaaaggaa gatatgagt
1561 attcaacatt tccgtctgc ccttattcc tttttgcg catttgct tctgtttt
1621 gctcaccagc aaagctggt gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacagagt
1681 ggttacatcg aactgcatc caacagcggg aagatccttg agagtttcg ccccgaagaa
1741 cgttttccaa tgatgagc ttttaaagt ctgctatgt gcgcggtatt atcccgtatt
1801 gacgccggc aagagcaact cggctcggc atacactatt ctgagaatga cttggttag
1861 tactcaccag tcacagaaaa gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga attatgagt
1921 gctgcataaa ccatgagta taacactgcg gccaaactac tctgacaac gatcggagga
1981 ccgaaggagc taaccgctt ttgcacaac atgggggatc atgtaactcg ccttgatgt
2041 tgggaaccgg agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta
2101 gcaatggcaa caactgtgc caaactatta actggcgaac tacttactct agcttcccgg
2161 caacaattaa tagactggat ggaggcggat aaagtgcag gaccactct gcctcggcc
2221 cttccggctg gctggttat tctgataaa tctggagcgg gtgagcgtgg gtcctcggt
2281 atcaatgag cactggggcc agatgtaag cctcccgtta tctgattat ctacacgag
2341 gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgccctactg
2401 attaagcatt ggtaaactgc agaccaagt tactacata tactttagat tgatttaaaa
2461 cttcattttt aatttaaaag gatctagggt aagatcctt ttgataatct catgcaaaa
2521 atccctaac gtgagtttc gttccactga cgtcagacc cctgagaaaa gatcaaaagga

```

2581 tctcttgag atccttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg  
 2641 ctaccagcgg tggttgttt gccgcatcaa gagctaccaa ctcttttcc gaaggttaact  
 2701 ggcttcagca gagcgcagat accaaaact gtcttctag tgtagccgta gtaggccac  
 2761 cacttcaaga actctgtagc acccctaca tacctcgtc tctaactct gttaccagtg  
 2821 gctgctcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaacg  
 2881 gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagccag cttggagca  
 2941 agacctaca cgaactgag atacctacag cgtgagctat gaaaaagcg cacgcttccc  
 3001 gaaggagaaa aggcggacag gtatccgta agcggcagg tcggaacag agagcgcac  
 3061 agggagctc caggggaaa cgctggtat ctltatagc ctgctgggt tcgccacct  
 3121 tgacttgagc gtcgatttt gtgatctcg tcagggggcg ggagcctatg gaaaaagcc  
 3181 agcaacgcgg ccttttacg gttcctggc tttgtggc cttttgctca catgtcttt  
 3241 cctgcgttat ccctgattc tgtggataac cgtattaccg cctttgagtg agctgatacc  
 3301 gctcggcca gccgaacgac cgagcgcagc gagtcaagta gcgaggaagc ggaag

## C. Secuencia de pGEM-T Easy

pGEM(R)-T Easy Vector Sequence reference points:

Base pairs	3015
T7 RNA polymerase transcription initiation site	1
multiple cloning region	10-128
SP6 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	139-158
SP6 RNA polymerase transcription initiation site	141
pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site	176-197
lacZ start codon	180
lac operator	200-216
beta-lactamase coding region	1337-2197
phage fl region	2380-2835
lac operon sequences	2836-2996, 166-395
pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site	2949-2972
T7 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	2999-3

1 gggcgaattg gggccgactc gcgatgctcc cggccgccat ggcggccgcg  
 51 ggaattcgat\* atcactagtg aattcggcg cgcttcgagg tcgaccat  
 101 gggagagctc ccaacgcgtt ggatgcatag cttgagtatt ctatagttc  
 151 acctaaatag cttggcgtaa tcatggctcat agctgtttcc tgttgaaat  
 201 tgttatccg tcacaattcc acacaacata cgagccggaa gcataaagt  
 251 taaagcctgg ggtgctaact gagttagcta actcacatta attgctgtc  
 301 gctcactgcc cgcttccag tcgggaaacc tgtcgtgcca gctgcattaa  
 351 tgaatcgcc aacgcgggg gagagggcgt ttgctattg ggcgctctc  
 401 cgcttctcg ctaactgact cgctcgctc ggtcgttcgg ctgcggcgag  
 451 cggtatcagc tcaactcaag gcgtaatac ggttatccac agaatcagg  
 501 gataacgag gaaagaacat gtgacgaaaa ggccagcaaa aggcagga  
 551 cgtaaaaaag gccgcgttgc tggcgtttt ccataggctc cgccccctg  
 601 acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaaccggaca  
 651 ggactataaa gataccagggc gtttcccct ggaagctccc tctgcgctc  
 701 tctgttccg acctgcgcg ttaccggata cctgctcgc tttctcctt  
 751 cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggta tctcagttc  
 801 gttgaggtcg ttcgctcaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgtca  
 851 gcccgaccg tgcgcttat ccgtaacta tctctttag tccaaccgg  
 901 taagacacga cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc  
 951 agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag ttctgaagt ggtgctcaa  
 1001 ctacggctac actagaagaa cagtatttg tatctgcgt ctgctgaagc  
 1051 cagttacctc ggaaaaaaga gtgtgtagct cttgatccg caaacaacc  
 1101 accgctgta ggggtgttt tttgttgc aagcagcaga ttacggcag  
 1151 aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg ggtctgac  
 1201 ctcagtggaa cgaaaactca cgttaagga ttttgctcat gagattatca  
 1251 aaaaggatct tcacctgat ccttttaaat taaaaatgaa gttttaatc  
 1301 aatctaaagt atatatgagt aaacttggc tgacagttac caatgcttaa  
 1351 tcagtgaggc acctatcga cgatctgtc tatttcttc atccatagt

1401 gectgactcc cegtctgtga gataactacg ataccggagg gcttaccatc  
 1451 tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca ccggctccag  
 1501 atttatcagc aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtgg  
 1551 cctgcaactt taccgcctc catccagctt ataatgttt gccgggaagc  
 1601 tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt gcgcaacgtt gtgcccattg  
 1651 ctacaggeat cgtgggtgca cgetcctcgt ttggtatggc ttcatcagc  
 1701 tccgttccc aacgatcaag gcgagttaca tgatccccca tgtgtgcaa  
 1751 aaaagcgtt agctcctcg gtccctccgat cgtgtgcaga agtaagtgg  
 1801 ccgagtggt atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact  
 1851 gtcagccat ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt actcaaccaa  
 1901 gtcattctga gaatagtgta tgcggcgacc gagttgctct tgcccggcgt  
 1951 caatacggga taataccgcg ccacatagca gaactttaa agtctcatc  
 2001 attgaaaaac gttcttcggg gcgaaaaact tcaaggatct taccgctgtt  
 2051 gagatccagt tcatgtaac ccactcgtgc acccaactga tcttcagcat  
 2101 cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaaat  
 2151 gcgcaaaaa agggataag ggcgacacgg aaatgtgaa tactcatac  
 2201 ctctctttt caatattat gaagcattta tcagggttat tctctcatga  
 2251 gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataacaaaat aggggttccg  
 2301 cgcacatttc ccgaaaaagt gccacctgat gcggtgtgaa ataccgcaca  
 2351 gatgcgtaag gaaaaatac cgcacagga aattgtaagc gtaaatatt  
 2401 tgttaaaatt cgcgttaaat tttgttaaa tcagctcatt ttttaacaa  
 2451 taggcccгаа tcggcaaaaat ccctataaa taaaagaat agaccgagat  
 2501 agggttgagt gttgtccag ttggaacaa gagtccacta taaagaacg  
 2551 tggactcaa cgtcaaaggg cgaaaaaccg tctatcaggc cgalggccca  
 2601 ctacgtgaac catcaccta atcaagttt ttgggtcga ggtgccgtaa  
 2651 agcactaaat cggaaccta aaggagccc ccgatttaga gcttgacggg  
 2701 gaaagccggc gaacgtggc agaaaaggaag ggaagaaagc gaaaggagcg  
 2751 ggcgctaggc cgtggcaag ttagcggtc acgctgcgcg taaccaccac  
 2801 acccggcgc ctaatgcgc gcctacaggc cgcgtccatt cgcattcag  
 2851 gctgcgcaac tgttgggaag gcgatcggg gcggcctct tcgctattac  
 2901 gccagctggc gaaaggggga tgtgctgcaa ggcgattaag ttgggtaacg  
 2951 ccagggttt ccagctcag acgttgtaaa acgacggcca gtgaattgta  
 3001 atacgactca ctata

## D. Medios y Soluciones

- **LB/litro:** 10g de bacto triptona, 5g de extracto de levadura y 10g de NaCl. Ajustar a pH 7.5.
- **LB/Agar 1L:** 25g de LB y 12.5g de agar.
- **LB con ampicilina:** Preparar el medio LB de manera normal. Después, esterilizar por autoclave y agregar 100µg/ml de ampicilina.
- **Ampicilina, solución madre:** 500mg/ml en agua. La solución de trabajo es de 100µg/ml.
- **Amortiguador de muestra:** Azul de bromofenol 0.25%, xileno cianol FF 0.25% y glicerol en agua al 30%. Almacenar a 4°C.
- **Amortiguador TFB-2:** 10mM MOPS (pH 7.0), 75mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM de KCL, 15% de glicerol. Esterilizar por filtración (no esterilizar por autoclave).
- **Amortiguador TE 0.1X pH 8.0:** Tris-HCl 1mM (pH 8.0) y EDTA 0.1mM (pH 8.0).
- **Solución I:** Glucosa 50mM, Tris-HCl 25mM (pH 8.0) y EDTA 10mM (pH 8.0). Esterilizar por autoclave y guardar a 4°C.
- **Solución II:** NaOH 0.2N (preparada en el momento a partir de una solución madre 10N) y SDS 1.0%
- **Solución III:** Acetato de potasio 5M, 11.5ml de ácido acético glacial y 28.5ml de agua mQ.
- **STET:** Sucrosa al 8%, Tritón X-100 5%, EDTA 50mM pH 8.0 (3.7g) y Tris-HCl (pH 8.0).
- **dNTPs:** Se preparan a una concentración 1.25mM en amortiguador TE.