



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

Expresión de la proteína EGFP en membrana lisosomal de fibroblastos 3T3 NIH y estudio de la distribución de los lisosomas fluorescentes durante el proceso de infección de *T. cruzi*.

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

J E S U S S A N C H E Z R E Y E S

ASESORES: DRA. REBECA G. MANNING CELA
DRA. GILDA FLORES ROSALES

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

2005

m. 340541



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.



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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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



Departamento de
Exámenes 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 comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Expresión de la proteína EGFP en membrana lisosomal de fibroblastos
3T3 NIH y estudio de la distribución de los lisosomas fluorescentes
durante el proceso de infección de T. cruzi.

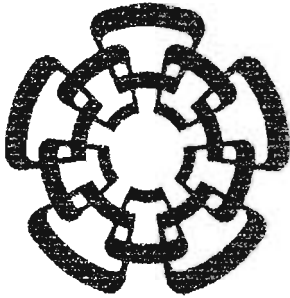
que presenta el pasante: Jesús Sánchez Reyes
con número de cuenta: 09516419-7 para obtener el título de :
Químico Farmacéutico Biólogo

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 10 de Noviembre de 2004.

| | | |
|------------------|--|--|
| PRESIDENTE | <u>Dra. Gilda Flores Rosales</u> | |
| VOCAL | <u>QFB. Ma. Esther Revuelta Miranda</u> | |
| SECRETARIO | <u>Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo</u> | |
| PRIMER SUPLENTE | <u>QFB. Juan Chiu Chan</u> | |
| SEGUNDO SUPLENTE | <u>MFC. Beatriz de Jesús Maya Monroy</u> | |



Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del
IPN
(CINVESTAV)

Este trabajo de tesis titulado “Expresión de la proteína EGFP en membrana lisosomal de fibroblastos 3T3 NIH y estudio de la distribución de los lisosomas fluorescentes durante el proceso de infección de *T. cruzi*”, 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 G. Manning Cela.

Y dijo el maestro:

--- Conviene ahora que te sacudas la pereza, porque no se alcanza la fama descansando entre plumas y colchas; quien consume su vida sin ella deja el mismo vestigio de sí como el humo en el aire y la espuma en el mar. Levántate, pues; vence la fatiga con el ánimo, vencedor de todas las batallas mientras la pesadez de su cuerpo no lo debilita. Tenemos que subir una escalera más larga; no basta haberse alejado de aquellos .
Si bien me entiendes, que mi consejo te sirva de ayuda. ---

DANTE ALIGHIERI - La Divina Comedia. -

AGRADECIMIENTOS

A DIOS Por permitirme llegar a este día, con mucho que agradecer y nada que pedir.

A Jesús Sánchez Rivera MI ABUELO Por su cariño y ejemplo de su fortaleza.

A Jesús Sánchez Ramírez e Irma E. Reyes Hernández MIS PADRES Por su amor y por su apoyo.

A Carlos, Alma, David, Rafael y Ana MIS HERMANOS. Por su apoyo en momentos muy decisivos en mi vida.

A la familia Sánchez y la familia Reyes MI FAMILIA todos sin excepción, porque siempre están presentes cuando mas los necesito. En especial a mis padrinos Alejandro, Rafael, Hortensia, Verónica, Concepción, y Ma. Refugio por su apoyo, cariño y confianza

A MI GENERACIÓN 26 por permitirme ser uno de ustedes.

A Ruth Delgado MI CHAPARRITA por tu táctica y estrategia, funciona.

A MIS COMPAÑEROS de Laboratorio Claudia Márquez por sus enseñanzas, Norma por estos 5 años , Janneth por sus consejos, Luis E por esperar el camión de las 10, Gilberto por ser un gran amigo desde el inicio, Luis A., por el entusiasmo, Julio por la ayuda brindada, Don Pedro por su amistad, Angelica, Marisa Julio C, portéense bonito y especialmente a David E. Fragoso (Chavo chavito) por su participación activa en este trabajo .

Agradezco a la QFB. Claudia Marquez Dueñas por la asesoría técnica prestada para la realización de este proyecto.

A la Universidad Nacional Autónoma de México MI UNIVERSIDAD y a su gente a todas las personas que hicieron mas fácil el recorrido Gracias Don Memo.

A MIS MAESTROS. A todos los que tanto dentro de aulas y fuera de ellas se preocuparon por que recibiera una educación de calidad.

A la Dra. Gilda Flores, Dra. Sandra Diaz y QFB. Ma. Esther Revuelta MIS ASESORES por el apoyo en la revisión de esta tesis.

A MIS AMIGOS.

A todos ellos que de alguna u otra manera influyeron para que llegara este momento solo les puedo decir. GRACIAS

POR QUE UN PUENTE, ES ALGUIEN CRUZANDO OTRO PUENTE...

Y ellas han sido un puente, por ello les dedico este trabajo.

A TI MADRE CON TODO MI AMOR Y MI SER, PORQUE ERES LO MAS MARAVILLOSO QUE TENGO EN ESTE MUNDO Y POR DARME SIEMPRE ANIMO Y APOYO.

A LA DOCTORA REBECA POR CONFIAR Y CREER EN MI Y DESCUBRIRME ESTE FANTÁSTICO MUNDO QUE ES LA CIENCIA.

POR ELLAS DOS ESTE TRABAJO ES POSIBLE.

ÍNDICE

| | Página |
|---|--------|
| Índice de figuras..... | i |
| Abreviaturas..... | ii |
| Resumen..... | iii |
| 1.- Introducción..... | 1 |
| 1.1.- <i>Typanosoma cruzi</i> | 1 |
| 1.1.1.- Generalidades y prevalencia..... | 1 |
| 1.1.2.- Clasificación..... | 2 |
| 1.1.3.- Morfología..... | 3 |
| 1.1.4.- Ciclo de vida..... | 5 |
| 1.1.5.- Hospederos reservorios..... | 7 |
| 1.2.- Tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas..... | 8 |
| 1.2.1.- Generalidades..... | 8 |
| 1.2.2.- Distribución..... | 8 |
| 1.2.3.- Manifestaciones clínicas..... | 10 |
| 1.2.4.- Diagnóstico..... | 11 |
| 1.2.5.- Tratamiento..... | 12 |
| 1.2.6.- Prevención..... | 12 |
| 1.3.- Mecanismos de invasión de <i>T. cruzi</i> a célula hospedera..... | 13 |
|1.3.1.- Mecanismos de invasión..... | 13 |
| 1.4.- Lisosomas y proteínas asociadas..... | 16 |
| 1.4.1.- Lisosomas..... | 16 |
| 1.4.2.- LAMP 1..... | 19 |
| 1.5.- Proteína Verde Fluorescente..... | 21 |
| 2.- Antecedentes directos..... | 24 |
| 3.- Justificación..... | 26 |
| 4.- Objetivos..... | 27 |
| 4.1.- Objetivo general..... | 27 |
| 4.2.- Objetivos particulares..... | 27 |
| 5.- Materiales y métodos..... | 28 |
| 5.1.- Diagrama experimental..... | 28 |
| 5.2.- Material..... | 29 |
| 5.2.1.- Bacterias..... | 29 |
| 5.2.2.- Parásitos..... | 29 |
| 5.2.3.- Plásmidos..... | 29 |
| 5.3.- Métodos..... | 30 |
| 5.3.1.- Extracción de ADN de plásmido..... | 30 |
| 5.3.2.- STET PREP(miniprep)..... | 30 |
| 5.3.3.- Lisis alcalina..... | 31 |
| 5.3.4.- CsCl/Bromuro de Etidio..... | 31 |
| 5.3.5.- Cuantificación de ADN..... | 32 |
| 5.3.6.- Electroforesis horizontal de ADN en geles de agarosa..... | 33 |
| 5.3.7.- Digestión del ADN con enzimas de restricción..... | 34 |

| | |
|--|----|
| 5.3.8.- Purificación de ADN en geles de agarosa..... | 35 |
| 5.3.9.- Diseño de oligonucleotidos o cebadores..... | 36 |
| 5.3.10.- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)..... | 37 |
| 5.3.11.- Purificación del producto de PCR..... | 39 |
| 5.3.12.- Ligación..... | 39 |
| 5.3.13.- Transformación de las células calcio competentes..... | 40 |
| 5.3.14.- Transfección de fibroblastos NIH por el método de Fosfato Calcio..... | 41 |
| 5.3.15.- Tinción con Lyso Tracker® | 42 |
| 5.3.16.- Infección con <i>Trypanosoma cruzi</i> | 42 |
| 5.3.17.- Fijación..... | 42 |
| 5.3.18.- Captura de imágenes..... | 43 |
| 6.- Resultados..... | 44 |
| 7.- Discusión..... | 55 |
| 8.- Conclusiones..... | 58 |
| 9.- Referencias..... | 59 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|--------|---|--------|
| 1 | Morfología del <i>Trypanosoma cruzi</i> | 4 |
| 2 | Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> | 5 |
| 3 | Distribución de la enfermedad de Chagas..... | 9 |
| 4 | Signo de Romaña..... | 10 |
| 5 | Modelo integrado de la invasión de <i>T. cruzi</i> en células fagocíticas no profesionales..... | 14 |
| 6 | Formación de los lisosomas..... | 17 |
| 7 | Unión de dos moléculas de doble cadena de ADN por T4 ADN ligasa..... | 40 |
| 8 | Digestión del ADN de pEGFP -N1 con <i>Kpn I</i> y <i>Not I</i> | 46 |
| 9 | Purificación de los fragmentos de 700 y 4000 pb del plásmido pEGFP-N1 digerido con <i>Kpn I</i> y <i>Not I</i> | 46 |
| 10 | Amplificación del fragmento EGFP- SSL1..... | 47 |
| 11 | PCR de colonia de clones de pEGFPSSL1 resistentes a kanamicina..... | 48 |
| 12 | Lisis Alcalina de pEGFP- SSL1..... | 49 |
| 13 | Fibroblastos 3T3 HIH transfectados con pEGFP-SSL1..... | 50 |
| 14 | Fibroblastos 3T3 NIH transfectados con pEGFP-SSL1 y teñidas con Lyso Tracker®..... | 52 |
| 15 | Fibroblastos 3T3 NIH transfectados de manera estable con pSSL1-EGFP infectados con <i>T. cruzi</i> | 54 |

ABREVIATURAS.

| | |
|------------|---|
| μ l | Micro litros |
| μ M | Micro molar |
| μ m | Micro metro |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| cADN | ADN complementario |
| Ca | Calcio |
| EGFP | Proteína verde fluorescente aumentada (<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>) |
| EGFP-SSL1 | Proteína verde fluorescente aumentada unida con la secuencia señal de LAMP 1 |
| GFP | Proteína verde fluorescente (<i>green fluorescent protein</i>) |
| LAMP 1 | Proteína asociada a membrana lisosomal (<i>Lysosomal associated membrane protein</i>) |
| pb | Pares de bases |
| PCR | Reacción en Cadena de la Polimerasa |
| pEGFP-N1 | Plásmido que contiene la proteína verde fluorescente |
| pN1 | Plásmido que no contiene a la proteína verde fluorescente |
| pEGFP-SSL1 | Plásmido que contiene a la proteína verde fluorescente unida a la secuencia señal de LAMP 1 |
| SSL1 | Secuencia señal de LAMP 1 |
| ST LAMP1 | Secuencia terminal de LAMP1 |

RESUMEN

Trypanosoma cruzi es el agente causal de la tripanosomiasis americana ó enfermedad de Chagas la cual esta ampliamente distribuida en América Latina.

Durante su ciclo de vida *T. cruzi* se presenta en varios estadios, manifestando un ciclo de vida bifásico entre hospederos invertebrados que sirven como vectores para la transmisión y hospederos vertebrados donde se establece la infección. *T. cruzi* es un parásito obligado dentro del hospedero vertebrado por lo que es necesaria su entrada a la célula hospedera, invadiendo y multiplicándose en una gran variedad de células nucleadas. El proceso de penetración a la célula hospedera esta aún en debate en donde se ha sugerido en algunos casos que es dependiente y en otros independiente del citoesqueleto de actina, siguiendo un proceso inusual en que se detona una vía de señalización que produce un aumento transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ que recluta lisosomas en el sitio de entrada para la formación de la vacuola parasitófora. Ya dentro de las células de diversos organismos el parásito se libera de la vacuola parasitófora para transformarse dentro del citoplasma en amastigote que es la fase replicativa del parásito, el cual se multiplica por fisión binaria durante cuatro o cinco días, transformándose posteriormente en tripomastigote sanguíneo y liberándose al torrente sanguíneo donde pueden infectar células vecinas o ser tomados nuevamente por el insecto vector, donde se transforma y multiplica para continuar así su ciclo de vida. La invasión de células fagociticas no profesionales por *T. cruzi* coincide con la formación de una vacuola parasitófora en la que reside transitoriamente (Andrews, 1990; Ley, 1990; Lopez, 2002). Aunque su formación esta todavía en discusión, unos proponen que esta formada por membrana de la propia célula y otras, que es resultado de la fusión de lisosomas.

El presente trabajo tiene como objetivo diseñar el vector de transfección pEGFP-SSL1 que contiene un gen que codifica la proteína verde fluorescente (EGFP) fusionada a una secuencia señal de membrana de lisosomas (SSL1).

Se obtuvo el vector pEGFP-SSL1, así como su transfección exitosa en células 3T3 NIH, en la que se logró la expresión de la proteína verde fluorescente. La proteína verde fluorescente se localizó en la membrana de los lisosomas 24 horas después de la transfección con fosfato de calcio.

La proteína EGFP se expresa en membrana de los lisosomas pero de un modo particular ya que la prueba (Lyso Tracker®) que tiñe los lisosomas demuestra un patrón diferente, ya que se observan lisosomas verdes en posiciones diferentes a los lisosomas rojos de la tinción, lo que nos sugiere que los lisosomas son diferentes en cuanto a su composición y/o características.

El uso de este vector junto con la técnica de tinción (Lyso Tracker®) nos permitirá visualizar todos los lisosomas presentes en la célula durante cualquier proceso relacionado con la célula, en caso particular de nuestro grupo de investigación se utilizará en futuros proyectos para ver la relación de los lisosomas durante el proceso de invasión de *T. cruzi*.

I.- INTRODUCCIÓN

1.1.- *Trypanosoma cruzi*

1.1.1.- Generalidades y Prevalencia

El parásito *Trypanosoma cruzi* es un protozooario flagelado de importancia médica y biológica, catalogado como parásito intracelular obligado que afecta a gran cantidad de células nucleadas. Es miembro de la familia *Trypanosomatidae* del orden *Kinetoplastida*, en donde además se agrupan otros parásitos patógenos de mamíferos como *Trypanosoma brucei* y *Leishmania*. Estas tres especies juntas son responsables de enfermedades que afectan a más de 200 millones de personas de manera directa, y a un número aún mayor a través del impacto económico que producen (Velasco O, 1991; Sánchez-Hernández, 1996). *T. cruzi* es la especie que afecta a zonas rurales en América Latina y es uno de los principales problemas de salud en América del Sur. La enfermedad en los países del cono sur afectan alrededor de 10 a 11 millones de habitantes y existen más de 50 millones con riesgo de presentarla (Organización Panamericana de Salud, 2001). En México, se han confirmado más de 400 casos agudos de infección por *T. cruzi*, esto en los 23 estados situados al sur del Trópico de Cáncer. Sin embargo, el número de infectados podría ser mucho mayor pues estudios sero epidemiológicos mostraron que hay un 1.6% de casos seropositivos en todo el país, siendo mayor la prevalencia en la región central de la Huasteca, que es una área tropical (Guzmán-Bracho, 2001).

A menudo se refiere indistintamente a *T. cruzi* y *T. brucei*, sin embargo, pertenecen a subgéneros diferentes teniendo por lo tanto, algunos aspectos biológicos particulares. Por ejemplo *T. brucei* vive y se replica en el torrente sanguíneo y *T. cruzi* es un parásito intracelular del hospedero vertebrado. *T. brucei* se inocula con el piquete del vector, mientras que *T. cruzi* es depositado en las heces del vector hematófago que defeca después

de la ingesta sanguínea. Además, los vectores de transmisión pertenecen a géneros diferentes produciendo enfermedades distintas, *T. brucei gambiense* o *T. brucei rhodesiense*, causan la enfermedad del sueño, las subespecies *T. brucei brucei* produce enfermedad en el ganado y la subespecie *T. cruzi* produce la enfermedad de Chagas. Geográficamente, ambos se distribuyen diferencialmente encontrando a *T. brucei* en África, mientras que *T. cruzi* se encuentra en América, por lo que suele referirse a estos organismos como tripanosomas africanos y tripanosomas americanos respectivamente (Cevallos y Hernández, 2002; Cabello, 1998 y Delgado y cols, 1994).

Su alta prevalencia y sus elevadas tasas de morbilidad y mortalidad le confieren gran importancia médico sanitarias, especialmente a nivel de poblaciones campesinas y pobres de las áreas endémicas (Esquerdo,1993).

1.1.2.- Clasificación

Los organismos pertenecientes a la familia *Trypanosomatidae* pertenecen al súper reino Eucariota, subreino *Protozoa*, orden *kinetoplastida*, los cuales están caracterizados por tener un organelo llamado cinetoplasto, poseen uno o dos flagelos desiguales que se originan de una depresión, la forma del cuerpo puede variar de oval a alargada en forma de hoja. Este orden comprende dos subórdenes. Los representantes del orden *Trypanosomatida* como *T. cruzi* y *T. brucei*, revisten gran importancia debido a que son parásitos tanto del hombre como de animales domésticos. Presentan un ciclo biológico polimórfico (descrito más adelante), la reproducción es de tipo asexual por fisión binaria o múltiple (Martínez Pérez y Elías Gutierrez, 1985). En el orden de los cinetoplástidos, hay varios géneros siendo *Trypanosoma* y *Leishmania* los más estudiados, ya que parasitan al hombre (Cevallos y Hernández, 2002).

1.1.3.- Morfología

Durante su ciclo de vida *T. cruzi* presenta distintas morfologías que pueden ser fácilmente identificadas bajo microscopia de luz, principalmente cuatro formas morfológicas o estadios de los tripanosomas diferenciándose entre sí por la posición del cinetoplasto con relación al núcleo y por la presencia o ausencia de la membrana ondulante, ver figura 1.

a) Tripomastigote sanguíneo, 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 delante a lo largo del cuerpo del parásito, formando una membrana ondulante por todo el parásito y emerge en forma libre en su extremo anterior, este estadio es observado en sangre periférica del hospedero mamífero, se ha descrito como una población compuesta por una mezcla de dos morfologías básicas: delgadas y anchas. Estas formas son resultado del cambio de estadio replicativo a estadio no replicativo-infectivo, tienen una longitud de aproximadamente 25 μm y un diámetro de 2 μm y no son capaces de dividirse.

b) Epimastigote, este estadio se ha observado como una forma oval alargada de 20-40 μm de longitud, su cinetoplasto se localiza en la parte media del organismo en la parte anterior al núcleo, este último presenta una forma redonda. 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, ambas son formas replicativas y se encuentran en el intestino del hospedero invertebrado.

c) Tripomastigote metacíclico o promastigote, se ha visto como una estructura alargada de 8 μm de longitud con un núcleo central y en el extremo anterior el cinetoplasto de donde emerge un flagelo corto, sin membrana ondulante.

d) Amastigote, estadio caracterizado por presentar una morfología esférica, generalmente de 3 a 5 μm , presenta modificaciones en el cinetoplasto, el cual se observa como un cuerpo oscuro cerca del núcleo, esta es la forma replicativa intracelular del parásito, aunque se han encontrado en el intestino del hospedero invertebrado así como en sangre de vertebrados infectados. (Tyler y Engman, 2001; Tyler y Engman, 2000; Almeida-de-Faria, 1999; Brener, 1973, De Souza, 2002 y Cabello, 1998).

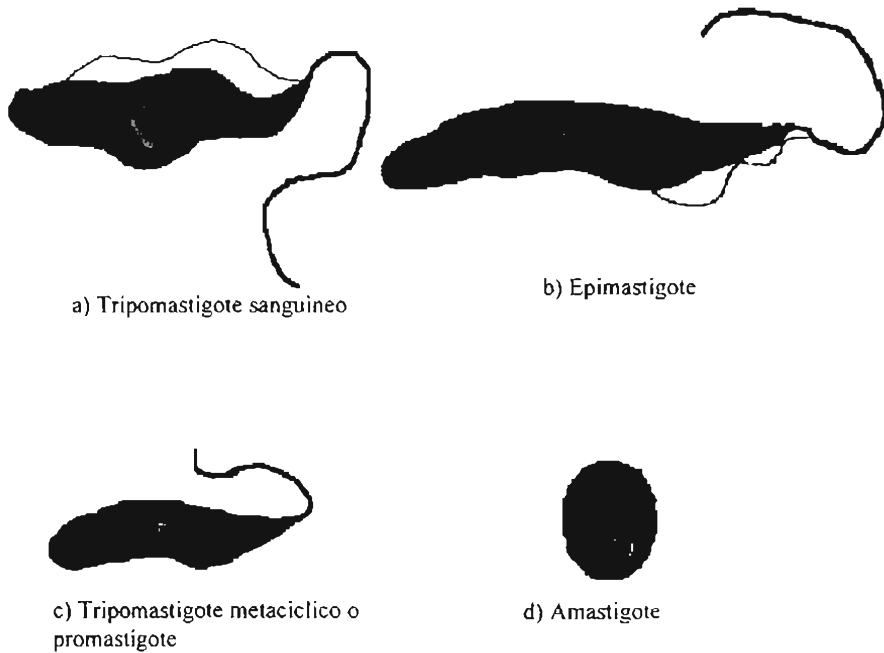


Figura 1. Morfología de *Trypanosoma cruzi*. Estructura de los diferentes estadios de *T cruzi*, los estadios a, b y c tienen flagelo; b y d son las formas replicativas en hospedero invertebrado y vertebrado respectivamente.

1.1.4.- Ciclo de Vida.

Durante su ciclo de vida, *T. cruzi* se presenta en varios estadios, manifestando un ciclo de vida bifásico entre hospederos vertebrados donde las infecciones son establecidas y hospederos invertebrados que sirven como vectores para la transmisión ver figura 2.

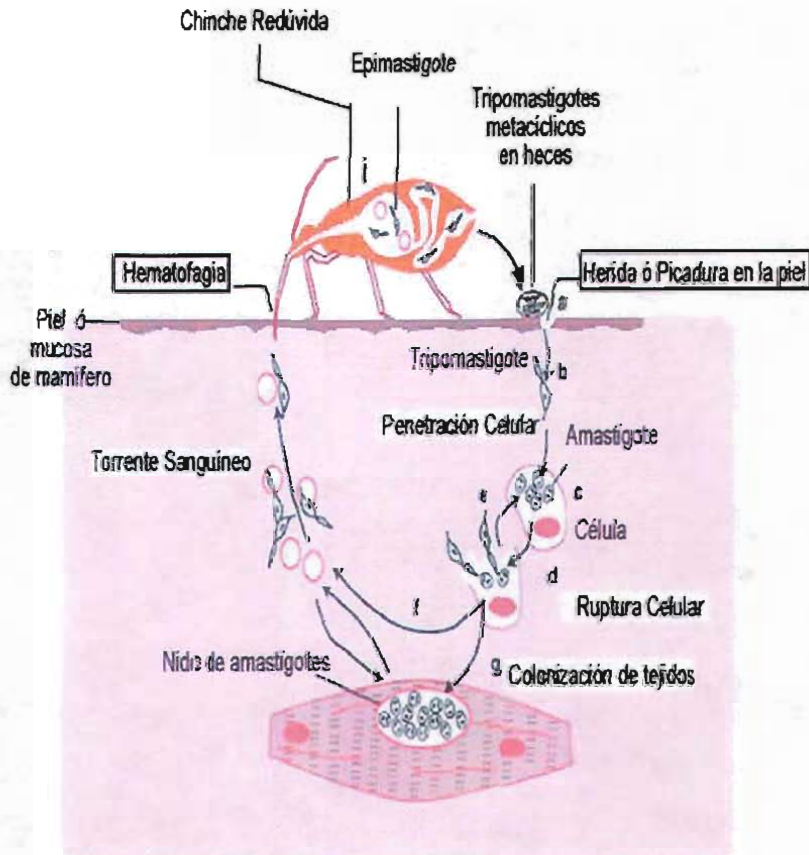


Figura 2. Ciclo de vida de *T. cruzi*. El proceso de infección en el mamífero se produce cuando la fase tripomastigote penetra por la piel o mucosa, este fase debe introducirse en la célula para transformarse en amastigote que es la fase replicativa, multiplicándose y rompiendo la célula hospedera. De esta forma puede comenzar un subciclo en donde infectará nuevas células o se dirigirá a torrente sanguíneo pasando a la forma de tripomastigote sanguíneo, será ingerido nuevamente por el triatómico donde se convertirá en epimastigote (fase infectiva en el vector), multiplicándose para después transformarse en tripomastigote metacíclico y así continuar su ciclo de vida.

El ciclo de vida inicia cuando el triatomido (chinche besucona, vector invertebrado) se alimenta de sangre de un mamífero parasitado, infectado con la forma de tripomastigote, transformándose y multiplicándose en el mesogastrio del vector en forma de epimastigote, que es la fase replicativa dentro del insecto. Posteriormente, se transforma después de 15 a 30 días en tripomastigotes metacíclicos en el recto del vector invertebrado, este estadio esperará a ser expulsado con las deyecciones que deposita el parásito en la herida causada con la probóscide en la membrana mucosa durante la ingesta sanguínea, penetrando y alcanzando así a su hospedero secundario. El prurito producido por la picadura a menudo da como resultado una infección causada por rascado o frotamiento de la herida en la piel o mucosas cercanas, por donde el parásito entra al organismo continuando así su ciclo de vida.

Es un parásito obligado por lo que debe penetrar a la célula del mamífero, cuyo mecanismo se encuentra aún en debate, en donde en unos casos se sugiere es dependiente y en otro es independiente de actina siguiendo un proceso inusual en que se denota una vía de señalización que produce un aumento transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ que recluta lisosomas al sitio de entrada para la formación de la vacuola parasitófora. Ya dentro de las células de diversos organismo vertebrados se tiene que liberar de la vacuola parasitófora para transformarse dentro del citoplasma en amastigote que es la fase replicativa del hospedero vertebrado, los cuales se multiplican por fisión binaria durante cuatro a cinco días dando lugar hasta 500 parásitos generados por cada uno originalmente internado, transformándose en tripomastigotes sanguíneos desintegrando entonces la célula hospedera y liberándose en el torrente sanguíneo donde infectan otras células del organismo o son tomados nuevamente por el insecto vector (Kelly, 2000; Brener, 1973; Zeledon, 1997; Tyler y Engman, 2001; Mortara, 1999; Burleigh y Andrews, 1995; Kolien y Schaub, 2000; Garcia y Azambuja, 1991).

Un subciclo alternativo puede ocurrir en el hospedero mamífero en donde los amastigotes originados de la lisis prematura de células infectadas

definidos como amastigotes intracelulares (Hudson, 1984; Umezawa, 1985), o por diferenciación extracelular de tripomastigotes definidos como amastigotes extracelulares, estos invaden fagocitos profesionales o no profesionales, donde pueden sobrevivir y continuar con el ciclo de vida del parásito (Andrews, 1987; Ley, 1988; Mortara, 1991; Pan, 1978). Aunque los amastigotes intracelulares son más largos y ligeramente más elongados que las formas extracelulares, ambos comparten similitudes inmunológicas, bioquímicas y ultraestructurales, además de que, expresan marcadores específicos del estadio de amastigotes (Barros, 1997; Hudson, 1984; Lima, 1988; Ley, 1988; Pan y McMahon-Pratt, 1989).

1.1.5.- Hospederos reservorios

Los hospederos reservorios de *T. cruzi* juegan un papel fundamental en los diferentes ciclos, la transmisión del vector en el ciclo doméstico es de animal a animal, animal a humano y de humano a humano (transfusión sanguínea). En el ciclo silvestre, el cual se da en animales silvestres, la infección rara vez pasa al hombre; en humanos y animales domésticos el ciclo es el resultado de la adaptación de los triatomidos a las viviendas. Muchos seres salvajes se infectan en forma natural incluyendo marsupiales, armadillos, roedores, murciélagos y primates. *T. cruzi* se transporta desde un foco natural a las casas como resultado de la entrada de animales selváticos o por medio de transporte o atracción de triatomidos a las viviendas. Cuando se presenta este tipo de transmisión, los principales reservorios de *T. cruzi* son perros, gatos e incluso la rata común. Algunos reservorios domésticos pueden ir de acuerdo a la ecología y región que habitan las personas (Bolivia y Perú) donde animales como el cerdo de Guinea puede jugar un papel muy importante en el ciclo ya que se crían en las casas como una fuente de alimento y funcionan como reservorios de la enfermedad humana (Cabello, 1998; Heyneman, 1995 y Wendel, 1992).

1.2.- Tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas

1.2.1.- Generalidades

Recibe su nombre en honor del Dr. Carlos Chagas, médico brasileño que describió la enfermedad por primera vez en 1909 e identificó al tripanosoma dándole el nombre de su profesor, el Dr. Oswaldo Cruz. El Dr. Chagas también discernió el ciclo de vida del parásito y los insectos que lo transmiten, así como el grupo de pequeños mamíferos que actúan como reservorio en la naturaleza (Cevallos, 2002; WHO, 1996). La enfermedad de Chagas es una zoonosis causada por *T. cruzi*, parásito protozoario que se localiza exclusivamente en el continente americano.

1.2.2.- Distribución

La enfermedad de Chagas sólo se encuentra en América, a partir del paralelo 41° Norte en el sur de USA., hasta el 45° Sur en Argentina como se observa en la figura 3. La distribución de la enfermedad de Chagas se relaciona con factores socioculturales. Es más frecuente en áreas rurales con bajo nivel de vida, habitación estándar, pobreza y desconocimiento de medidas higiénicas. Es de especial importancia, el uso de ciertos materiales en la construcción de las viviendas como tejados de paja, de adobe, paredes de tabloncillos de adobe, suelos sucios, que favorecen la colonización de insectos (Heyneman, 1995).

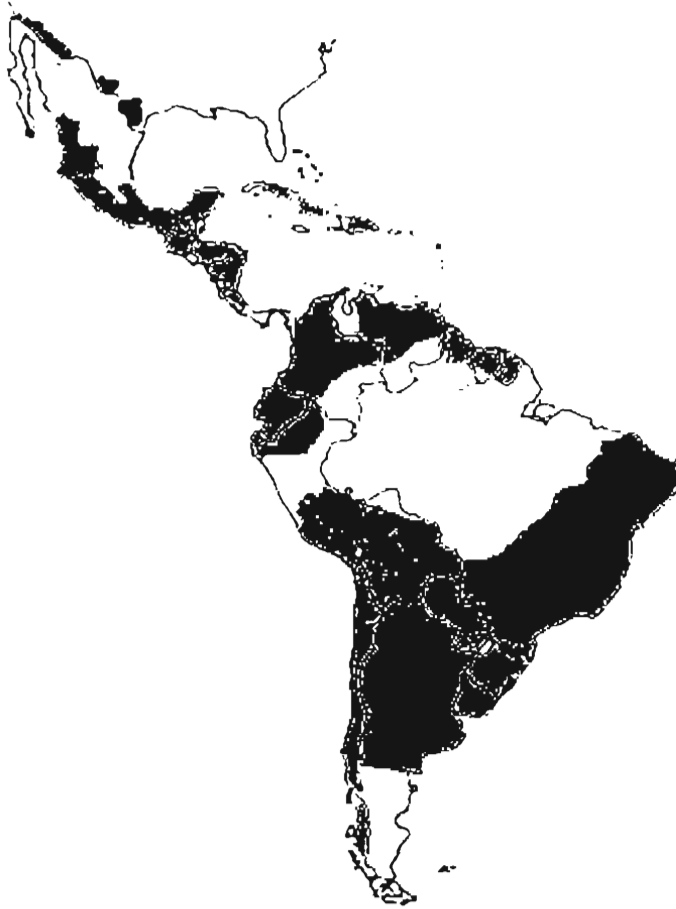


Figura 3. Distribución de la enfermedad de Chagas. Obsérvese en color que la enfermedad de Chagas va desde América del Norte en el sur de USA., hasta Argentina, teniendo mayor prevalencia en el cono sur de América.

1.2.3.- Manifestaciones Clínicas.

El *T. cruzi* penetra en el organismo humano a través de la piel y de las mucosas, seguido de la penetración y establecimiento en la piel o membrana mucosa, los tripomastigotes metacíclicos son fagocitados por macrófagos u otras células locales. Una vez internalizado el organismo, se replica en el citoplasma, causando la ruptura y la generación de una reacción inflamatoria de intensidad variable que es el verdadero chancro de inoculación, conocido con el nombre de *chagoma*. Cuando la inflamación se produce en la región palpebral superior, este signo inflamatorio recibe el nombre de signo de Romaña como se observa en la figura 4.



Figura 4. Signo de Romaña. Inflamación producida por *T. cruzi* en zona palpebral superior.

A partir de esta primera lesión inflamatoria, los parásitos se dirigen a la circulación sanguínea, para localizarse en diferentes tejidos del organismo, principalmente invadirán los siguientes órganos: corazón, músculo esquelético y músculo liso. La infección por *T. cruzi* tiene un periodo de incubación de cuatro a diez días, casi siempre sin síntomas, posteriormente puede presentar tres fases:

Fase aguda: Puede durar de uno a cuatro meses, cuando ocurre en niños puede ser desde asintomática hasta grave o fatal. Se caracteriza por fiebre variable, malestar general, irritabilidad, dolor de cabeza, crecimiento de hígado, bazo y ganglios. En esta fase es común encontrar una reacción inflamatoria local de tejidos blandos, con crecimiento de los nódulos linfáticos dando origen a un nódulo oftalmo-linfoide (signo de Romaña) o del nódulo linfocutáneo (Chagoma). Con el desarrollo de la parasitemia, cualquier tipo de célula se puede infectar, aunque hay predilección por el miocardio, músculo liso y células glias. Las manifestaciones que amenazan la vida o que son mortales incluyen inflamación del músculo del corazón así como el cerebro y las meninges. Durante esta etapa el diagnóstico de la enfermedad es muy difícil y a veces suele confundirse con otras enfermedades.

Fase indeterminada: No se encuentran signos o síntomas, sin embargo, las pruebas serológicas son positivas y si se estudia adecuadamente al paciente, se encontrarán datos sugestivos de miocarditis.

Fase crónica: Las manifestaciones aparecen casi siempre en personas de 20 a 50 años de edad. La enfermedad cardíaca generalmente conduce a la muerte. También se observan algunos órganos agrandados (visceromegalias o dilatación visceral), especialmente el esófago y el colon; con menos frecuencia se encuentran formas que afectan al sistema nervioso central, o bien la inflamación de mucosas y glándulas (Paul, 1986; Cevallos, 2002; Cabello, 1998 y Heyneman, 1995).

1.2.4.- Diagnóstico

La enfermedad de Chagas es diagnosticada utilizando técnicas directas (detectan el parásito o sus productos), o bien, indirectas (detectan anticuerpos específicos contra *T. cruzi*, el cultivo, xenodiagnóstico, PCR o pruebas serológicas). Otras pruebas de gabinete, principalmente electrocardiogramas y radiografías de corazón, esófago y colon.

Diagnóstico epidemiológico: lugar de procedencia, tipo de habitación, conocimiento de los triatomidos, picadura por triatomidos. La selección de la prueba depende de la fase clínica en la que se encuentre el paciente y de su especificidad y precisión.

1.2.5.- Tratamiento

El nifurtimox y el benznidazol son dos fármacos efectivos contra los tripomastigotes, sin embargo, no garantizan la curación completa aunque pueden reducir la parasitemia. Ambos medicamentos producen serios efectos adversos si se usan por largo tiempo, siendo otro problema la sensibilidad entre diferentes cepas del parásito. El tratamiento de la enfermedad de Chagas 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 (Cevallo, 2002 y Cabello, 1998).

1.2.6.- Prevención

En las áreas endémicas, las medidas profilácticas para el control de la enfermedad de Chagas incluyen:

- ♦ Mejora de las viviendas y de las condiciones de vida
- ♦ Uso de insecticidas para eliminar el vector de las viviendas (principalmente piretroides)
- ♦ Educación al público en general sobre las formas de transmisión de la enfermedad
- ♦ Monitoreo obligatorio de los donadores de sangre y educación del personal de salud
- ♦ Implantar programas de control de calidad de las pruebas serológicas para la detección eficaz de la infección (Heyneman, 1995; Esquerdo, 1993).

1.3.- Mecanismo de invasión de *T. cruzi* a célula hospedera.

3.1.- Mecanismos de Invasión

El mecanismo molecular mediante el cual el tripomastigote es reconocido e internado por las células huésped esta aun en debate. Originalmente se asumió que este proceso era similar al mecanismo de entrada de muchas bacterias patógenas, en donde se moviliza el citoesqueleto de actina de la célula huésped en un proceso tipo fagocitosis. Sin embargo, estudios posteriores, mostraron que el proceso de invasión de la célula hospedera por *T. cruzi* es un evento complejo que parece involucrar diversas etapas, iniciando con la unión del parásito a la célula (Brener, 1973). Este mecanismo comienza con la unión del parásito a la membrana plasmática de células susceptibles, seguida de la internación a través de la vacuola parasitófora, y termina con la ruptura de la membrana vacuolar y la salida del parásito hacia el citoplasma donde se replica y diferencia.

La unión del parásito a la célula blanco es un proceso energía (ATP) dependiente que parece ser específico y depende de los receptores ubicados tanto en la célula como en el parásito, y ya que *T. cruzi* puede invadir diferentes tipos celulares se ha sugerido que existe un receptor celular común, o bien, que las glicoproteínas de superficie del parásito pueden unirse a diferentes receptores específicos con características bioquímicas similares, los cuales no han sido identificados. Algunas moléculas del parásito, tales como trans-sialidasas, la penetrina y glicoproteínas de superficie (como gp82, gp90), parecen ser importantes en los procesos de unión e invasión celulares. Se piensa que moléculas con carga negativa en la superficie de las células, como el ácido siálico, pueden promover la unión y entrada del parásito, además, estas cargas negativas se han relacionado con el tropismo de los tripomastigotes por tejidos específicos en el vertebrado. La invasión de células fagocíticas no profesionales por, *T. cruzi* coincide con la formación de una vacuola parasitófora apretada en la que reside temporalmente el parásito (Andrews, 1990; Ley, 1990; Lopez, 2002).

Para evitar la necesaria despolimerización de la actina de la célula hospedera para la entrada en la misma (Schenkman,1991), los tripomastigotes de *T. cruzi* explotan dos estrategias distintas para la elaboración de la vacuola parasitófora naciente durante la invasión de fagocitos no profesionales (Tardieux, 1992; Woolsey, 2003).

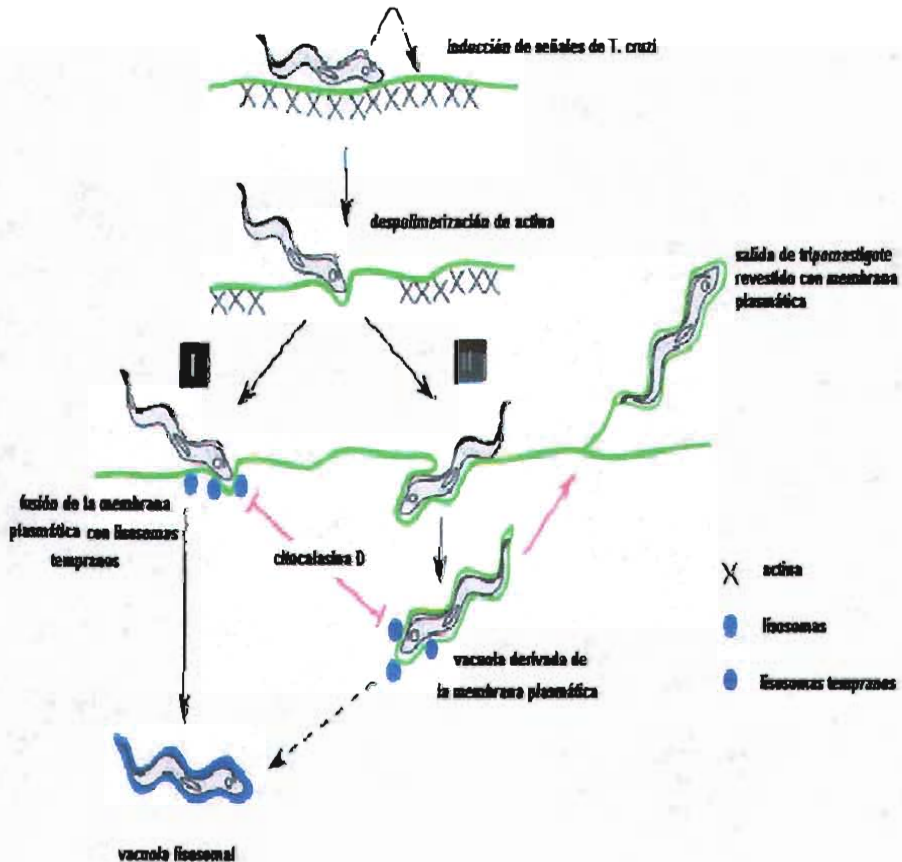


Figura 5. Modelo integrado de la invasión de *T. cruzi* en células fagocíticas no profesionales. Tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* se unen a la superficie de las células huésped del mamífero activando las secuencias de señales que crearan una despolimerización temporal de actina cortical del citoesqueleto. La entrada inicial del parásito es por alguno de los dos caminos, invaginación de la membrana plasmática que se fusiona directamente con algunos lisosomas de la célula (camino I lisosoma dependiente) o la entrada por medio de una vacuola derivada de la membrana plasmática (camino II lisosoma independiente) seguida de la fusión de endosomas y lisosomas (Woolsey, 2003).

El primer mecanismo, implica la exocitosis de los lisosomas de la célula hospedera dirigidos al sitio de unión del parásito (Tardieux, 1992), esto en respuesta a señalización por parte del parásito, así los lisosomas son reclutados por medio de microtubulos a la membrana plasmática de una manera dependiente de cinasa (Rodríguez, 1996), en donde experimentan una fusión dependiente de $[Ca^{2+}]_i$ (Rodríguez, 1995; 1996; 1997; Reddy, 2001) y una vez internalizado el parásito se forma la vacuola parasitófora (Figura 5) (Tardieux, 1992). Recientemente se ha descrito un mecanismo de invasión independiente de lisosomas, el cual involucra la invaginación inducida por la membrana plasmática de la célula y la formación de una vacuola inicial derivada de la membrana plasmática ausente de marcadores lisosomales. La vacuola que resulta de la entrada independiente de lisosomas entra a un proceso de maduración, en el cual adquiere gradualmente marcadores endosomales y/o lisosomales para convertirse en verdadera vacuola parasitófora (Woolsey, 2003).

1.4.- Lisosomas y proteínas asociadas.

1.4.1.- Lisosomas

Los lisosomas representan el destino final de moléculas endocitadas, autofagositadas y secretadas, marcadas para su destrucción o reciclaje (De Duve, C., 1959), entre sus numerosas funciones incluye autorregulación de receptores de superficie, liberar y endocitar nutrientes, inactivación de organismos patógenos y reparación de la membrana plasmática en condiciones normales (Mullins, 2001).

Los lisosomas son orgánulos rodeados de membrana que contienen en su interior enzimas hidrolíticas capaces de degradar todo tipo de polímeros biológicos; existen en todas las células animales y son el sistema de recolección y disposición de elementos no esenciales para la célula (Figura 6). Degradan los productos de ingestión, tales como bacterias que han sido tomadas por fagocitosis. Luego de que la bacteria ha sido encerrada en una vacuola, las vesículas que contienen las enzimas lisosomales (algunas veces llamados lisosomas primarios) se funden con la vacuola que lleva la bacteria, el pH se vuelve más ácido, y esto activa a las enzimas; la vacuola, entonces se vuelve un lisosoma secundario y degrada a la bacteria. Los lisosomas también degradan a organelos tales como las mitocondrias, esto después de que una sección del retículo endoplásmico rugoso se enrolla alrededor de una mitocondria formando una vacuola; entonces las vesículas que llevan las enzimas lisosomales se funden con la vacuola y se vuelve un lisosoma secundario activo. Una tercera función del lisosoma es el manejo de los productos de la endocitosis mediada por receptores tales como un receptor, ligando y membranas asociadas. Además de orgánulos, hay proteínas citoplasmáticas que deben entrar en los lisosomas para su destrucción. Estas proteínas están marcadas por ciertas secuencias de aminoácidos, como la secuencia Lys-Phe-Glu-Arg-Gln, mediante estas secuencias, esas proteínas citosólicas se unen a los orgánulos viejos que van a ser lisados.

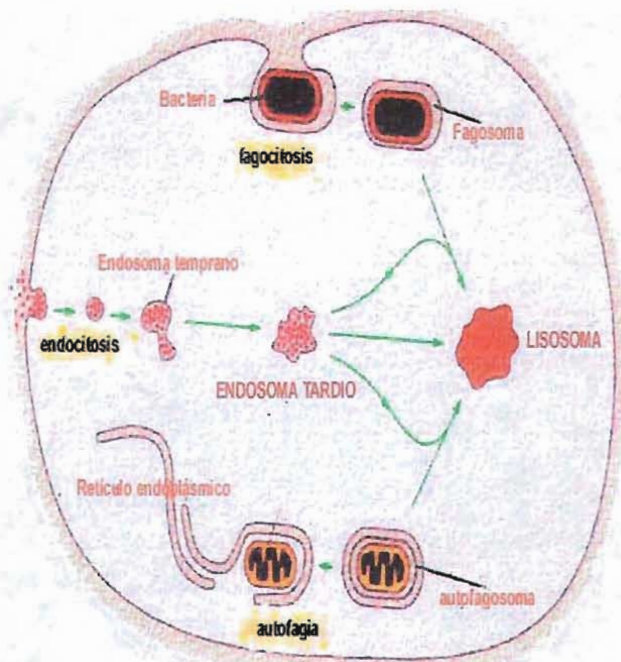


Figura 6. Formación de los lisosomas. Tres vías de la formación de lisosomas, por endocitosis, fagocitosis y autofagia.

También es posible que esas proteínas citosólicas entren directamente en los lisosomas porque las secuencias que las marcan sean reconocidas por receptores de la membrana del lisosoma y se incorporen a éste.

Se diferencian dos clases de lisosomas:

- Lisosomas primarios:** están recién formados y no han encontrado todavía sustrato para la digestión. Sólo contienen enzimas hidrolíticas, son muy pequeños ($0,05-0,5 \mu\text{m}$ de diámetro) y corresponden a vesículas emanadas de la cara trans del complejo de Golgi. Son de contenido denso y homogéneo.
- Lisosomas secundarios:** contienen materiales en digestión en su interior, muestran contenido heterogéneo y mayor tamaño.

La heterogeneidad de la morfología lisosomal contrasta con la de otros orgánulos. Sus dimensiones y contenido son muy variables. Su polimorfismo se debe a que actúan como vacuolas digestivas, y esto les proporciona un contenido heterogéneo.

El interior del lisosoma tiene un pH ácido, de aproximadamente 5. Para conseguir este pH, en la membrana del lisosoma existe una bomba de protones, que utiliza ATP para bombear H⁺ hacia el interior. Además, la membrana del lisosoma contiene proteínas de transporte que facilitan el paso de productos finales de la degradación de sustancias hacia el citoplasma. Una característica común a todos los lisosomas es que contienen hidrolasas ácidas, con actividad óptima cerca de pH 5 el cual se mantiene en su interior. Aunque normalmente la membrana del lisosoma es impermeable a estas enzimas, el hecho de que los enzimas requieran un pH ácido para una actividad óptima protege al citoplasma contra las lesiones que se pudieran producir en caso de fuga. El lisosoma se autoprotege de las hidrolasas ácidas y de la acidez de su matriz, porque su hemimembrana interna está intensamente glicosilada. La hidrolasas son activas a un pH ácido, si ellas se salen del lisosoma no dañan a un pH de 7.2 (Mullins, 2001).

Hasta ahora se han identificado unas 40 enzimas diferentes que degradan proteínas (proteasas), ácidos nucleicos (nucleasas: DNAasa y RNAasa), glúcidos (glucosidasas y lisozima), ésteres de sulfato (arilsulfatasas), lípidos (lipasas y fosfolipasas) o fosfatos de moléculas orgánicas (fosfatasas). No todas las enzimas están presentes en cada lisosoma siendo la más común la fosfatasa ácida.

No está claro aún cómo se desplazan las moléculas endocitadas de un compartimiento endosomal a otro y acaban en los lisosomas. Una hipótesis sería que los endosomas tempranos van desplazándose lentamente hacia el interior de la célula y pasan a ser endosomas tardíos; éstos se convierten en lisosomas como resultado de su fusión con las vesículas que transportan hidrolasas desde la cara *trans* del complejo de Golgi y del incremento de la acidez en la matriz lisosomal. Otra hipótesis sería que los endosomas

tempranos y tardíos son dos compartimientos separados, y que el transporte entre ellos tiene lugar a través de un compartimiento intermediario de transporte mediante una red dinámica de túbulos o mediante el desprendimiento de trozos del endosoma temprano que son transportados al interior celular, donde se fusionan con los endosomas tardíos. Lo mismo ocurre en la fagocitosis de microorganismos o partículas de mayor tamaño. Las vacuolas de endocitosis, denominadas fagosomas en este caso, se unen a lisosomas procedentes del compartimiento endolisosomal, formándose un fagolisosoma.

En ambos casos, completada la digestión, las moléculas resultantes difunden al citoplasma. Quedan los residuos, que o bien son exocitados (por unión de la membrana del lisosoma a la plasmática y liberación del contenido al exterior), o bien, se acumulan en el lisosoma y permanece allí por el resto de la vida de la célula, formando los denominados cuerpos residuales o telolisosomas (Bannykh, 1997).

1.4.2.- LAMP 1 (*Lysosomal associated membrane protein*)

Una función importante de la membrana que engloba los endosomas tardíos y lisosomas, es la de separar las hidrolasas ácidas del lumen de los otros constituyentes de una degradación no deseada. En los primeros estudios se reportaban colesterol y fosfolípidos en su composición, además de un elevado número de carbohidratos, posteriormente se comenzó a asociar a proteínas en las funciones esenciales de estos organelos. Por ejemplo la acidificación del lumen por la bomba de protones, además de aminoácidos, ácidos grasos y carbohidratos resultado de la degradación hidrolítica y la liberación de nutrientes por hidrolasas lisosomales específicas (vitamina B12 y colesterol) que pueden ser atribuido a las proteínas de membrana de los lisosomas. Las proteínas de membrana lisosomal se fusionan a las membranas de otros organelos, entre los cuales se incluyen otros lisosomas, endosomas, fagosomas y la membrana plasmática (Fukuda, 1991).

En los 80' dos glicoproteínas abundantes de alto peso molecular fueron descritas bioquímicamente (Burnside, 1982). Pero una comprensión completa de la composición fue llevada a cabo después de la producción de anticuerpos mono y policlonales dirigidos contra el purificado de membranas lisosomales (Barriocanal, 1986; Lewis, 1985). Los estudios revelaron proteínas integrales altamente glicosiladas, en los rangos 90-120- y 30-85-kDa que están en abundancia en endosomas tardíos y/o lisosomas. Las proteínas fueron designadas proteínas de membrana asociadas a lisosomas (LAMPs por su siglas en ingles lysosome-associated membrane proteins), glicoproteínas de membrana lisosomal (LGPs por su siglas en ingles lysosome membrane glycoproteins) y proteína integral de membrana lisosomal (LIMPs por su siglas en ingles lysosome integral membrane proteins). Se propone que LAMPs y LIMPs son un paquete apretado y representa mas del 50% del total de las proteínas de membrana en endosomas tardíos y lisosomas (Marsh, 1987). El DNA complementario (cDNA) de diferentes especies que codifican dos diferentes proteínas fueron aisladas mostrando una alta homología. Ambas proteínas tienen el N-terminal dirigido hacia el interior del lisosomal y a la vez presente en toda la anchura de la membrana. La parte final conservada de LAMP-1 y LAMP-2 es larga de 11 aminoácidos (RKRSHAGYQTT) y contiene la secuencia señal para los blancos intracelulares después de la biosíntesis. La porción larga del N-terminal es altamente glicosilada y reside en el lumen lisosomal. El pequeño dominio C-terminal contiene el blanco señal lisosomal. La ubicación de LAMPs es localizada principalmente en los límites de la membrana de los lisosomas y endosomas tardíos (Fukuda, 1991). Han sido encontradas pequeñas cantidades en membrana de endosomas jóvenes (Griffiths, 1989) y en la membrana plasmática (Lippincott-Schwartz, 1987; Furuno, 1989). LAMP-1 y LAMP-2 están además presentes en los límites de membrana de vacuolas autofágicas tardías (Tanaka, 2000; Eskelinen, 2002). La detección de LAMPs se lleva a cabo por microscopia inmuno-electronica y métodos bioquímicos (Jadot, 1996; Cuervo, 2000).

1.5.-Proteína Verde Fluorescente

La proteína verde fluorescente (GFP por sus siglas en inglés *green fluorescent protein*) a llegado a establecerse como un marcador en la expresión de genes y marcador de proteína en células y organismos. Lo que ha sido de gran utilidad para la localización de proteínas en diversos organelos celulares así como para estudiar el tráfico vesicular permitiendo la descripción de varios de estos. Esta metodología es importante y facilita la realización de estudios *in vivo*.

La proteína verde fluorescente descubierta por Shimomura, es una proteína extremadamente estable, esta compuesta de un monómero de 27-kDa de 238 aminoácidos que se encuentra en forma natural en la medusa del Pacífico *Aequoria victoria*. Los componentes requeridos para su bioluminiscencia son una fotoproteína activada con Ca^{2+} llamada aquarina, la cual emite una luz azul-verde(Shimomura, 1962).

Su fluorescencia natural es ocasionada por un único cromóforo pegado 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 de un p-hidroxibenciliden-imidazolín. El espectro de emisión de la fluorescencia (verde) tiene un pico a 509nm. Esta proteína presenta una estructura de un dominio único compacto en donde el cromóforo se encuentra localizado en el centro de la molécula, lo cual le proporciona algunas ventajas, como la resistencia a la desnaturalización con tratamientos de guanidina-HCl 6 M, urea 8 M, SDS al 1% y dos días de tratamiento con varias proteasas tales como: Tripsina, quimiotripsina o papaina a concentraciones de hasta 1 mg/ml. Deleciones en la secuencia de aminoácidos, en particular del residuo más allá de la metionina del extremo N-terminal o más de siete aminoácidos del extremo C-terminal, resultan en la pérdida total de la fluorescencia aún cuando las características del espectro de absorción del cromóforo se encuentren intactas.

La GFP puede ser fusionada a otras proteínas tanto a su extremo N-terminal como a C-terminal. Este hecho es debido a que ambos extremos de la proteína GFP parecen ser flexibles con respecto a la estructura beta-can,

denominada así, por la forma estructural de la proteína la cual presenta 11 pliegues antiparalelos beta en la parte externa formando un cilindro muy compacto parecido a una lata, por lo que la estructura de la GFP no se distorsiona significativamente por la fusión con otras proteínas (Yang, 1996).

Una de las aplicaciones más exitosas, es fusionarla con otras proteínas y así monitorear la localización y características de las proteínas de interés utilizando a la GFP como marcador o bandera. La fusión es realizada utilizando la secuencia del gen que codifica para la GFP junto con la secuencia del gen que codifica para la proteína de interés y la quimera resultante se introduce a la célula blanco de forma de que se exprese manteniendo las funciones normales.

La GFP original ha sido modificada de varias maneras tanto para la optimización de la fluorescencia así como para una mayor expresión y estabilidad en diferentes sistemas eucariotas, una de ellas es la llamada (*Enhanced Green Fluorescent Protein*= EGFP). Esta proteína ha sido modificada para optimizar la obtención de una mayor fluorescencia y expresión en células de mamífero (excitación máxima =488 nm, emisión máxima = 507nm). El vector de información pEGFP codifica la variante GFPmut1 que contiene una sustitución de doble aminoácido de Phe-64 a Leu y Ser-65 a Thr. El cromóforo de la EGFP tiene una fluorescencia 35 veces más alta que la GFP. Sin embargo la proteína requiere de promotores fuertes para su expresión, tales como el del citomegalovirus (CMV), CV40 y el del VIH, para que la detección sea apreciable y más aún en células de mamífero.

Los factores que afectan la expresión o de los cuales depende la detectabilidad de la GFP son los siguientes: cantidad total de la GFP (número de copias del gen y duración de la expresión), eficiencia de la formación del cromóforo después de la traducción (disponibilidad de las chaperonas, tiempo, temperatura, propiedades moleculares de la GFP madura o dimerización, competencia con otras señales de fondo o con autofluorescencia de células o medio de cultivo, calidad de excitación y filtros de emisión), además, la proteína requiere de la presencia de oxígeno para su expresión en las etapas tempranas, particularmente para el

deshidrogenado de los enlaces α y β del residuo 66 que se localiza en el cromóforo. Una vez que la proteína ha madurado el oxígeno no tiene efecto (Tsien, 1998).

El pH óptimo para la GFP tipo silvestre es de 11-12 y se apaga a pH ácidos con valores cercanos a pKa 4.5, Mientras que la variante EGFP se apaga en un 50% en pH 5.5. La expresión de la GFP puede verse disminuida en organelos ácidos como lisosomas, endosomas y aparato de Golgi.

Existen varios métodos por medio de los cuales se puede conseguir la transferencia de genes con una alta eficiencia en células, particularmente de mamífero. Cada una de las técnicas esta asociada a problemas de equipo como la electroporación y la microinyección en comparación con técnicas como la transfección por medio de DEAE-Dextran y la Co-precipitación con fosfato de Calcio, siendo estas últimas técnicas sencillas de realizar y las cuales no requieren de equipo especial y por medio de las cuales se pueden transfectar células eucariotas con ADN genómico de otro origen (Pollad, 1990).

2.- ANTECEDENTES DIRECTOS

La infección de *T. cruzi* abarca una gran variedad de células, usualmente involucra dos procesos por separado (De Souza, 2002). En el primero, el parásito se une a la superficie de la célula huésped por un proceso mediado principalmente por glicoconjugados expuestos tanto en la superficie de la célula como en la del parásito (Acosta-Serrano, 2001; Araujo-Jorge y De Souza, 1988). Seguido de un mecanismo de internalización que aparentemente depende de la naturaleza fagocitaria de la célula. En el caso de las células fagocíticas no profesionales se han sugerido en unos casos que el proceso es dependiente de actina mientras que en otros se propone que es independiente del citoesqueleto de actina permaneciendo aún esta controversia (Galan y Bliska, 1996; Tardieux, 1992). También se ha reportado que este mecanismo involucra la migración de lisosomas al sitio de unión del parásito (Andrews, 2002). Por otro lado, en el caso de los macrófagos se propone la formación de una vacuola endocítica que contiene al parásito para su internalización. Dicha internalización se ve disminuida con tratamientos que despolimerizan microfilamentos, lo cual sugiere una participación directa del citoesqueleto de actina en la entrada del parásito en este tipo de células (Tardieux, 1992).

Recientemente se reportó que el proceso de invasión puede utilizar dos posibles vías de entrada, en donde una es dependiente de lisosomas y otra es independiente de lisosomas utilizando la membrana de la célula huésped para su penetración (Woolsey, 2004). Por lo tanto marcadores de estos compartimentos proveen un método confiable para distinguir estos dos mecanismos de entrada. Cuantificando la relativa asociación de los marcadores con la invasión de *T. cruzi* los datos revelan que sólo un 20 a 30% de los procesos esta relacionado con los lisosomas y un 50% se relaciona con la invaginación con la membrana plasmática. El restante 20-30% del proceso de internalización se encontraron vacuolas enriquecidas con endosomas jóvenes (Woolsey, 2003).

Por otro lado no se conoce cual es el mecanismo de salida del parásito de la vacuola parasitófora hacia el citoplasma y si su permanencia temporal dentro de ésta es un factor necesario para su diferenciación y poder continuar con su ciclo biológico, permaneciendo aún varias interrogantes por dilucidar.

3.- JUSTIFICACIÓN

Aún cuando el mecanismo general de entrada del parásito a la célula hospedera ha sido motivo de varios estudios, aún no se conocen las diversas vías que el parásito pudiera utilizar ni tampoco si existe una vía de entrada preferencial. De igual manera existen aún diversas interrogantes de el o los mecanismos que los diversos estadios de desarrollo del parásito utilizan para invadir la célula huésped. Los resultados hasta ahora reportados muestran que el proceso de invasión es significativamente mas complejo de lo que originalmente se pensó. Por ello en este estudio desarrollamos una serie de herramientas moleculares para poder estudiar de manera directa el proceso de invasión de *T. cruzi*.

4.- OBJETIVOS

4.1.- Objetivo general

Expresión de la proteína EGFP en la membrana lisosomal de fibroblastos 3T3 NIH para estudiar su redistribución durante el proceso de infección de *T. cruzi*.

4.2.- Objetivos particulares.

Diseño de oligonucleótidos para la amplificación de la secuencia de localización en lisosomas LAMP1 fusionada a la secuencia que codifica para una variante de la proteína verde fluorescente (EGFP) llamada EGFP- SSL1.

Amplificación por PCR de la secuencia EGFP- SSL1.

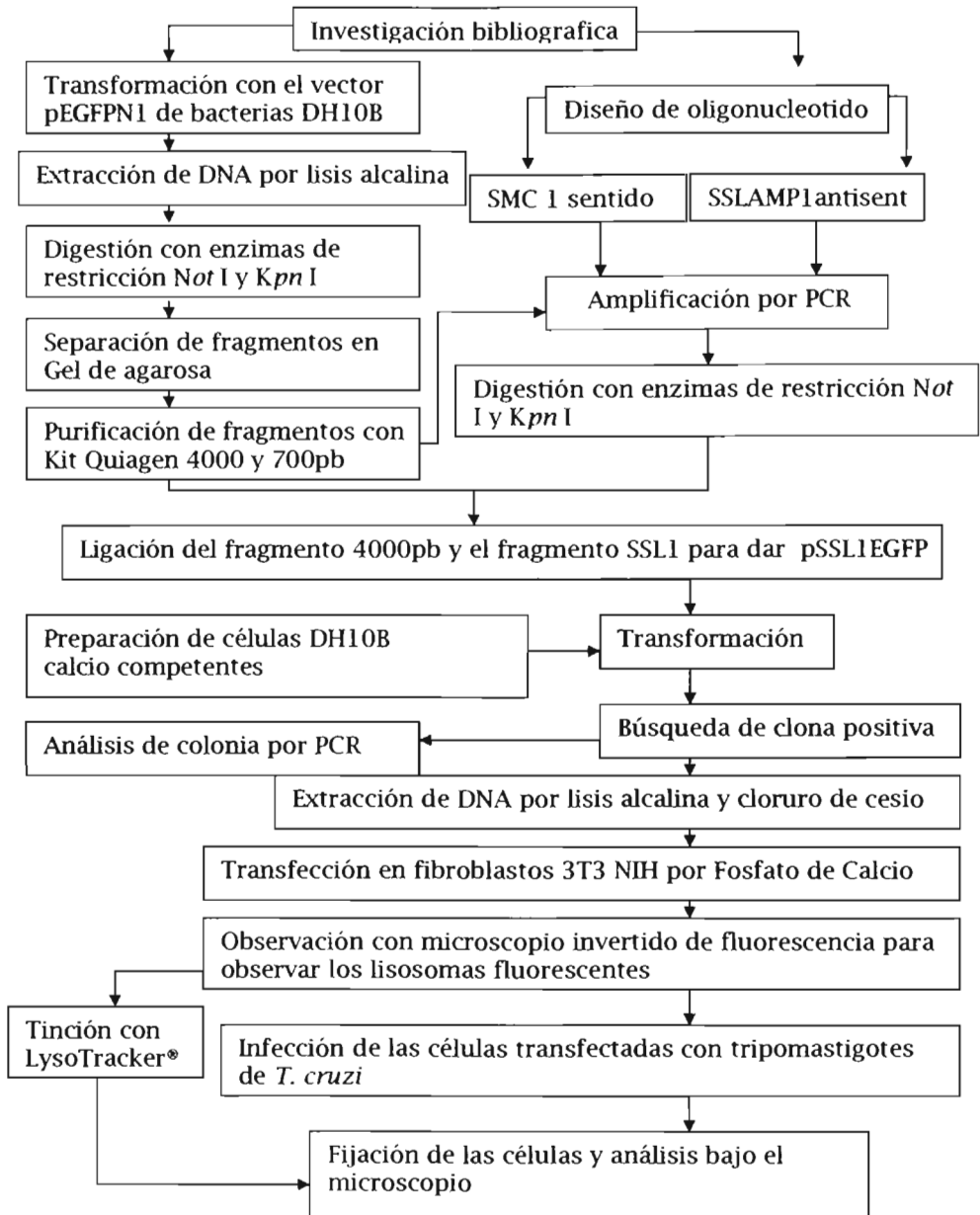
Clonación del producto de amplificación EGFP-SSL1 para obtener el plásmido pEGFP- SSL1.

Transfección de fibroblastos 3T3 NIH con ADN de pEGFP- SSL1 y análisis de su expresión y localización bajo el microscopio de fluorescencia.

Análisis de los fibroblastos transfectados expresando EGFP- SSL1 durante la infección con tripomastigotes *Knock-in* expresando Ds Red1-1.

5.-MATERIALES Y METODOS

5.1.- DIAGRAMA EXPERIMENTAL



5.2.- Material

5.2.1.- Bacterias

Escherichia coli DH10B: Son células para la construcción de bibliotecas geonómicas y clonación de ADN metilado y cADN. La cepa DH10B tiene una mutación *endA1*, la cual incrementa la calidad de ADN de plásmido de los minipreps y *hsdRMS* que permite la clonación del ADN sin cortes por endonucleasas de restricción endógenas. Esta acepta plásmidos de gran tamaño debido a una mutación *deoR* (Catalogo de Life Technologies, 2001).

Genotipo: F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZΔM15 ΔlacX74deoR recA1 araD139 ∓(ara, leu)7697 galU galKλ rpsL nupG.

5.2.2.- Parásitos

Los parásitos utilizados fueron amastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi* cepa Brener que expresan la proteína Ds Red1-1 o EGFP obtenidos en un trabajo previo en nuestro laboratorio, aislados de sobrenadante de monocapas de fibroblastos 3T3 NIH infectadas.

5.2.3.- Plásmidos

Se utilizó el plásmido pEGFP-N1 [4700 Pares de bases (pb)] que contiene la secuencia que codifica para la proteína verde fluorescente (*GFP*) la cual ha sido mutada para optimizar la obtención de una mayor fluorescencia y expresión en células de mamífero (excitación máxima = 488 nm; emisión máxima = 507) denominada *EGFP* que también contiene un sitio multiclonación y el promotor del citomegalovirus CMV.

5.3.- Métodos

5.3.1.- Extracción de ADN de plásmido.

Existen diferentes métodos de extracción y purificación de ADN de plásmido de acuerdo a la pureza y cantidad de ADN deseada a obtener. En este trabajo se utilizaron tres métodos los cuales son: **STET PREP (miniprep)**, **Lisis Alcalina**, **CsCl/Bromuro de Etidio**, los cuales se describen detalladamente a continuación.

5.3.2.- **STET PREP (miniprep)** (Sambrook, 2001).

Este procedimiento es recomendado para preparar pequeñas cantidades de ADN de plásmido cuando se desean analizar una gran cantidad de clonas positivas a la resistencia al antibiótico usado en la selección. Se inoculó una colonia en 5 ml de LB(Luria- Bertani Médium 1lt se prepara 950 ml de agua , 10g bact- tryptone, 5g bacto- yeast extract y 10g de NaCl , esterilizar) + antibiótico de selección y se dejó incubando toda la noche (12 horas. Del cultivo anterior se tomó 1.5 ml, se centrifugó a 12,000 rpm por 30 segundos se desechó el sobrenadante y se le agregaron a la pastilla 350 µl de solución STET (10mM Tris-Cl (pH 8.0), 0.1 M NaCl, 1mM EDTA (pH 8.0), 5% (v/v) Triton X-100). Se mezcló en vortex hasta disolver la pastilla y se le adicionó 25 µl de lisozima preparada en el momento (10 mg/ml). El tubo se colocó 40 segundos exactos, en agua hirviendo. Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente se recuperó el sobrenadante, se le añadió 40 µl de acetato de sodio 2.5 M y 420 µl de isopropanol y se dejó 10 min a temperatura ambiente. Después se centrifugo a 12,000 rpm por 15 minutos a 4°C, la pastilla se lavó con etanol al 70%, se centrifugó 12,000 rpm por 15 minutos a 4°C, se dejó secar para finalmente resuspender en 25 µl de agua o solución TE (Tris-Cl 10mM, EDTA pH 8.0 llevar a 100ml) y almacenar a 4°C.

5.3.3.- Lisis Alcalina (Sambrook, 2001).

Este es un método que permite la obtención de ADN relativamente más limpio y en mayor cantidad que el método anterior.

Se inoculó una colonia en 20 ml de LB + antibiótico de selección, se incubó a 37°C por 24 horas. Se centrifugaron 10 ml del cultivo anterior a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 200 µl de solución I (50 mM glucosa, 25 mM Tris-Cl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0.) Se mezcló con el vortex. Se adicionó 400 µl de solución II (0.2 N NaOH, 1% (w/v) SDS.), preparó la solución al momento de usar, se mezcló por inversión varias veces hasta que la suspensión se vio translúcida, se dejó reposar 5 minutos en un recipiente con hielo, se agregó 300 µl de solución III (60 ml de acetato de potasio 5 M, 11.5 ml de ácido acético glacial, 28.5 ml de agua.), se mezcló por inversión y se colocó en hielo por 5 minutos. Se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se transfirió a un tubo nuevo de 1.5ml, al cual se le agregó 2 µl de RNasa y se incubó a 37°C por 2 horas; posteriormente se agregó un volumen igual de fenol-cloroformo isoamílico; se agitó hasta que se obtuvo una mezcla homogénea, se centrifugó a 12,000 rpm por 5 minutos a 4°C, la fase acuosa se separó de la fase orgánica para transferirla a un tubo nuevo, se le agregó un volumen igual de isopropanol y se dejó a temperatura ambiente por 20 min. Después se centrifugó 12,000 rpm por 5 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y la pastilla obtenida se lavó en 1 ml de etanol al 70%. La pastilla se secó al vacío en un concentrador Savant, y finalmente se resuspendió en 100 µl de TE.

5.3.4.- CsCl/Bromuro de Etidio(Sambrook, 2001).

Este procedimiento se utiliza para extraer gran cantidad de ADN con alta pureza además de permitir la separación de ADN circular y cortado en una sola cadena (*nicked*).

Se inoculó una colonia en 10 ml de LB + antibiótico de selección y se dejó a 37°C 24 horas. Del cultivo anterior se tomaron 5 ml y se pusieron en un

matraz de 1 litro con 500 ml de LB + antibiótico de selección y se dejaron a 37°C toda la noche. Posteriormente se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos a 4°C se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 4 ml de solución TS (Tris-CL 50mM, sucrosa al 25% ajustar a 500ml)después se le agregaron 4 ml de solución ELT (EDTA 100mM, lizozima 2mg/ml, triton X100 0.1% ajustar 200ml) y se colocaron a 70°C por 10 minutos exactos. Pasados los 10 minutos se centrifugó a 40,000 rpm por 20 minutos a 20°C, se recuperó el sobrenadante y se le agregó un volumen de solución PEG-NaCl y se dejó 30 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 7,000 rpm por 10 minutos a 4°C, se resuspendió en 3 ml de solución TE, se adicionó 25µl de RNAsa (5 µg/ml) y se incubó a 37°C aproximadamente 4 horas posteriormente se agregaron 4 g de Cloruro de Cesio + 500 µl de Bromuro de Etidio (5 mg/ml). Se centrifugó a 90,000 rpm por 14 horas a 20°C. Con la ayuda de la luz UV se recuperó la banda de ADN circular, se le agregó un volumen de isopropanol para quitar todo el bromuro de etidio tres veces se realizó este paso, se agregaron tres volúmenes de etanol al 70 % y se dejó a -20°C toda la noche. Se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos a 4°C, se resuspendió en TE y se extrajo con un volumen de fenol-cloroformo. Se centrifugó a 12,000 rpm por 1 min y recuperó la fase superior (dos veces). Se agregó 1/10 de acetato de sodio 2.5 M más 2.5 volúmenes de etanol absoluto y se dejó a -70°C por 20 minutos. Finalmente se lavó con etanol al 70%, se centrifugó 12.000 rpm por 5 minutos y se resuspendió en TE.

5.3.5.- Cuantificación de ADN (Sambrook, 2001).

Para cuantificar la cantidad de ADN se utilizó un método espectrofométrico determinando la densidad optica (DO) de cada muestra a una longitud de onda de 260 nm y a 280nm. Una DO. corresponde a aproximadamente 50 µg/ml de ADN de doble cadena, 40 µg/ml de ADN de cadena sencilla y aproximadamente 20 µg/ml para oligonucleótidos de cadena sencilla. La relación de las lecturas de 260nm/280nm=1.8 indica que el ADN es puro. Las muestras de ADN se diluyeron 1:1000 µl con agua y se

realizó la lectura en una cubeta de cuarzo. La densidad óptica se leyó en un espectrofotómetro UV/VIS Beckman a las longitudes de onda antes descritas.

5.3.6.- Electroforesis horizontal de ADN en geles de agarosa (Sambrook, 2001).

El objetivo de la electroforesis es determinar el peso del ADN basándose en el principio que cuando una corriente eléctrica pasa a través del gel, el ADN se desplazará a través del gel en una relación que es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular. Esto quiere decir que las bandas de ADN más cortas (con un peso molecular menor), migraran más rápido que las bandas de ADN más largas (con un peso molecular mayor).

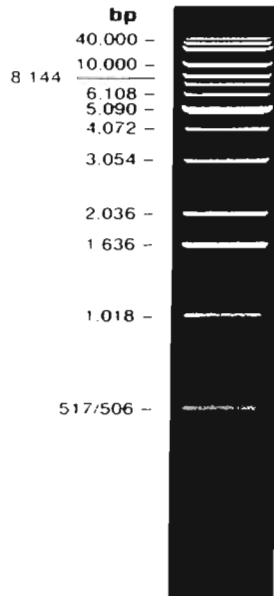
Para facilitar la identificación del ADN, éste se tiñe con una solución de bromuro de etidio, también se usan los colorantes, azul de brofenol, xilencianol, para indicar el frente del corrimiento durante la electroforesis. El bromuro de etidio indica la posición exacta del ADN cuando este es expuesto a la luz ultravioleta ya que se intercala entre las bases nucleotídicas de ADN.

Es importante incluir siempre un estándar de peso molecular para indicar el peso de cada banda de ADN que se desea observar. A continuación se muestran el marcador utilizado en este trabajo figura 5.

Para preparar el gel se disolvió la cantidad de agarosa necesaria a la concentración deseada en solución TBE 0.5X (5X, se preparan con 54 g de Tris base, 27.5 g de ácido bórico, 20ml de EDTA 0.5M pH 8.0); después se calentó hasta disolver y se vertió en un contenedor al cual se le colocó un peine con pozos. Posteriormente ya que se polimerizo el gel se colocó en una cámara de electroforesis con buffer TBE 0.5X y se procedió al corrimiento de las muestras.

El ADN se mezcló con buffer de muestra y se colocó en los pozos, se corrió a 99 volts por 40 minutos se tiñó con bromuro de etidio, se lavó con

agua milliQu durante 20 segundos y finalmente se tomó la fotografía en un analizador de imágenes.



1 Kb DNA Extension Ladder

0.3 µg/lane: 1% agarose
in 1X TAE stained with
ethidium bromide
Cat. No. 10511-012

Marcador de peso molecular, GIBCO BRL se observan las diferentes bandas y los pesos aproximados de cada una de ellas.

5.3.7.- Digestión del ADN con enzimas de restricción

Las enzimas de restricción, o endonucleasas de restricción, son usadas para cortar ADN en secuencias específicas, realizando un corte cohesivo (corte segmentado que libera dos extremos de ADN que son complementarios) o rasurado (corte lineal).

Las enzimas de restricción son útiles por varias razones: (1) tienen únicamente actividad de restricción, (2) cada corte es predecible y de manera

consistente dentro del sitio o adyacente a la secuencia de reconocimiento, (3) éstas solo requieren del ion magnesio (Mg^{2+}) como cofactor y no de ATP.

Desde un punto de vista general, todas las enzimas de restricción necesitan “anclarse o fijarse” previamente a la cadena de ADN para reconocer o cortar en un sitio dado. Las diferentes enzimas tienen sitios específicos de corte los cuales pueden estar de manera única o pueden existir varios de estos sitios dentro de una secuencia de ADN.

Para lograr una digestión eficiente se debe de tener en cuenta:

- ◆ La cantidad de Enzima debe ser suficiente respecto a la cantidad de ADN que se desea digerir
- ◆ El tiempo y temperatura de reacción dependerá de las propiedades de la enzima(s) así como de la marca, generalmente es 2 horas a 37°C
- ◆ Debe de contener el buffer para que la enzima funcione adecuadamente
- ◆ En caso de digestión doble se debe de utilizarse el buffer en la que ambas enzimas tengan mayor rendimiento
- ◆ El volumen de enzima no debe de exceder la proporción de 1:10 de lo contrario la reacción puede inhibirse por la cantidad de glicerol en la que se encuentra suspendida la enzima
- ◆ Después de la digestión las enzimas deben ser inactivadas para evitar efecto estrella o la degradación del ADN, dicha inactivación dependerá de la enzima utilizada
- ◆ El volumen de reacción final debe ser el adecuado para que esta se lleve a cabo eficientemente
- ◆ Todos los reactivos deben de estar libres de ADNasas que puedan degradar el ADN

5.3.8.- Purificación de ADN en geles de agarosa

Se corrieron los fragmentos de ADN que se deseaban purificar en un gel de agarosa TAE al 1% (50X, 242 g de Tris base, 57.1 ml de ácido acético

glacial, 100ml de EDTA 0.5M pH8.0, se utiliza concentración de 0.5 X), en una cámara de electroforesis con buffer TAE 0.5X a 60 volts. El gel se tiñó con bromuro de etidio cubierto de la luz (para evitar la fragmentación de este) y finalmente se cortó la banda de interés con la ayuda del transiluminador de luz UV.

El ADN se purificó con el protocolo del kit de QUIAGEN Cat. No. 28704: Se pesó el fragmento de gel de agarosa conteniendo el fragmento de ADN deseado y se hizo la conversión de gramos a mililitros asumiendo que 1 mg es igual a 1 μ l. Se le agregó tres veces el peso de agarosa en μ l de buffer QG y se incubó a 50°C por 10 min. hasta que la agarosa se disolvió completamente. Se comprobó que el color de la mezcla fuera amarillo; cuando el color fue naranja o violeta se adicionó 10 μ l de acetato de sodio 3M pH 5.0 y se mezcló hasta que el color se tornó amarillo. Se colocó la mezcla en una columna QUIAGEN y se centrifugó por 1minuto a 13,000 rpm Se desechó el sobrenadante y se adicionó 0.5 ml de buffer QG a la columna y se centrifugó por 1minuto a 13,000 rpm eliminando así los restos de agarosa. La columna se lavó con 0.75 ml de buffer PE y se centrifugó por 1minuto a 13,000 rpm (antes de centrifugar se dejó de 2 a 5 min en el buffer si el ADN se utilizó en ligaciones o secuenciación). Se desechó el sobrenadante y se volvió a centrifugar para desechar todos los residuos de etanol. Finalmente se colocó la columna en un tubo nuevo de 1.5 ml para eluir el ADN adicionando 50 μ l de buffer EB, se dejó 1 minuto y se centrifugó 1 minuto a 13,000 rpm. El ADN purificado se almacenó a -20°C.

5.3.9.- Diseño de oligonucleotidos o cebadores (primers)

Los oligonucleotidos son secuencias de ADN de tamaño variable los cuales son diseñados a conveniencia del experimento y sus usos son variados. Para diseñar los oligos consideramos los siguientes criterios para su mejor funcionamiento:

- ◆ El contenido de G + C debe ser aproximadamente del 50% la relación máxima de purinas/pirimidinas será 60%/40%
- ◆ Deben evitarse zonas con largas secuencias de una sola base

- ◆ Se recomienda que en los extremos las últimas bases sean G o C
- ◆ Se debe evitar la complementariedad entre la pareja de oligos, secuencias del primer y con otras regiones no deseadas de la secuencia usada como templado. Si ésta existe entre los extremos 3', se aumenta la posibilidad de que se formen dímeros de oligos
- ◆ Normalmente deben tener un tamaño de 18-30 pb
- ◆ La Tm de hibridación de los oligos ha de ser similar en ambos y será variable en función de la secuencia de los mismos. Generalmente oscila entre 45 y 65°C.

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron diseñados considerando los criterios anteriormente mencionados y se describen en detalle en cuanto a su secuencia y composición en resultados.

5.3.10.- PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) (Sambrook, 2001).

La Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica para la síntesis *in vitro* de secuencias específicas de ADN presente en diferentes muestras biológicas, obteniéndose millones de copias de una determinada secuencia de ADN. El inventor de esta técnica fue Mullis quien se basó en la replicación del ADN de los organismos eucariotas realizada por la ADN polimerasa. Estas enzimas realizan la síntesis de una cadena complementaria de ADN en el sentido 5' al 3' usando un molde de cadena sencilla a partir de una región de doble cadena. Para crear esta región de doble cadena se usan los denominados cebadores (oligo) los cuales son una pareja de oligonucleótidos sintetizados de manera que sean complementarios a cada uno de los extremos 3' del fragmento de ADN que se desea amplificar.

Partiendo de este principio, la PCR se basa en la repetición de un ciclo formado por tres etapas:

1. Desnaturalización: La doble hélice de ADN se separa en dos hebras, para ello se realiza una incubación de la muestra a altas temperaturas (93-97°C)

2. Hibridación: los cebadores se unen a las zonas 3' complementarias que flanquean el fragmento que queremos amplificar. Se realiza cuando la temperatura baja (50-65°C)
3. Extensión: se produce la síntesis de una cadena sencilla (produciéndose un fragmento de doble cadena complementaria) en la dirección 5' a 3' mediante la enzima ADN polimerasa, la cual incorpora los desoxinucleótidos fosfato presentes en el medio siguiendo la cadena molde, la etapa de extensión se realiza a 72°C.

Los componentes para realizar PCR son los siguientes: muestra de ADN, cebadores, Taq ADN polimerasa (enzima termoestable aislada de la bacteria *Thermus aquaticus* que soporta altas temperaturas), deoxinucleotidos trifosfato o dNTPs (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), tampón de la reacción y sales.

La PCR es una técnica muy sensible, por lo que es de gran importancia tener los siguientes cuidados para evitar contaminantes que puedan resultar en resultados falsos positivos:

- ◆ Uso de instrumental exclusivo para PCR
- ◆ Utilización de reactivos y tubos estériles
- ◆ Uso de guantes del manipulador
- ◆ No usar un alto numero de ciclos, normalmente el número de ciclos es de 25-30
- ◆ La concentración de dNTPs debe ser igual para los cuatro
- ◆ Disminuir en lo posible el tiempo de cada etapa
- ◆ El DNA no puede estar fragmentado en trozos más pequeños de los que queremos amplificar, tampoco deben existir trazas de alcohol que pueden inhibir la actividad de la polimerasa
- ◆ Cantidad de la muestra (El mínimo oscila entre 10-100 ng. y el máximo entre 400-500 ng).

Las condiciones de reacción y de amplificación utilizados fueron: buffer 10x Taq Hi Fi , dNTP`s 125mM, MgSO4 50mM, Oligo1, oligo2, templado,

enzima Taq y agua , 1 ciclo de 3 min a 94°, 30 ciclos (1ª 94°/2min -2ª60°/1min - 3ª 72° /2min), 1 ciclo de 10 min a 72° .

5.3.11.- Purificación del producto de PCR

Este protocolo describe el método más comúnmente usado para purificar y concentrar preparaciones de ADN.

Se precipitó la reacción de PCR con $\frac{1}{10}$ de volumen de acetato de sodio 3 M mas 2.5 volúmenes de etanol absoluto; se dejó a -70°C por 20 minutos, se centrifugo a 12,000 rpm por 15 minutos a 4°C, se lavó con etanol al 70% y finalmente se centrifugó a 12,000 rpm por 15 minutos a 4°C, se secó la pastilla y se resuspendió en 10 µl finales de TE.

5.3.12.- Ligación (Ausubel, 1999)

La clonación consiste en insertar un segmento de ADN de interés dentro de un vector de clonación para obtener grandes cantidades del vector recombinante. La generación de clonas recombinantes usualmente involucra unir covalentemente (ligación) dos o más fragmentos los cuales han sido digeridos previamente. La ligación se lleva a cabo con la enzima T4 ADN ligasa, la cual es producida por el fago T4 ADN ligasa de *E. coli*, requiriendo para su actividad Mg⁺⁺ y ATP como cofactores. La ligasa formara dos uniones covalentes dando como resultado un único fragmento de doble cadena. El tiempo y temperatura de reacción depende de la calidad de enzima que se utiliza generalmente es 2 horas a 16°C. Las muestras a ligar se precipitaron (con la misma técnica con la que se precipitaron los PCR) para concentrar y resuspender directamente en la mezcla de ligación.

Se pudedar un choque térmico a la reacción a 50°C por 30 seg. antes de agregar la enzima para eliminar estructuras secundarias que pudieran bloquear o disminuir la eficiencia de la ligación.

La enzima utilizada fue la T4 ADN Ligasa No. M0202S Lot. No. 71 de BioLabs.

Las condiciones de ligación utilizados fueron: buffer 10x T4 ADN ligasa , dNTP` s 125mM, MgSO4 50mM, Oligo1, oligo2, templado, enzima T4 ADN Ligasa y agua , 1 ciclo de 3 min a 94°, 30 ciclos (1ª 94°/2min -2ª60°/ 1min - 3ª 72° /2min), 1 ciclo de 10 min a 72° .

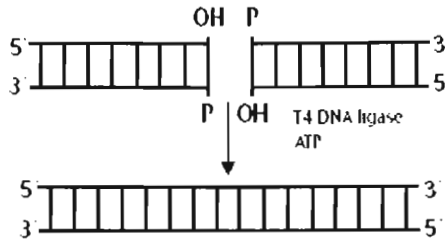


Figura 7. Unión de dos moléculas de doble cadena de ADN por T4 ADN ligasa

5.3.13.- Transformación de las células calcio competentes

La transformación de las células calcio competentes consistió en la introducción del ADN de plásmido en las bacterias calcio competentes mediante un choque térmico.

En un tubo de vidrio se agregaron 50 µg de ADN (dependiendo de lo que se este transformando), 100 µl de solución TFBII (10mM MOPS pH 7, 75 mM CaCl₂, 10mM KCl y 15 % Glicerol) y 50 µl de células calcio competentes; se dejaron en hielo a 4°C durante 10 min. Hasta este paso todo se realiza con material y reactivos pre-enfriados y en el cuarto a 4°C. Posteriormente se le dio un choque térmico a 42°C/ 1.5 min. Se agregó 1 ml de medio de cultivo LB y se incubó a 37°C en agitación por 1 h; finalmente se plaquéó en cajas de medio LB agar + 100 µg/ml de Kanamicina (300 µl de ligación/ placa) y se dejó a 37°C por 24 h.

5.3.14.- Transfección de fibroblastos NIH por el método de Fosfato de Calcio

Podemos considerar dos grandes grupos de técnicas de transfección: 1) métodos físicos que se basan en el uso de sistemas mecánicos, no biológicos, para lograr la inserción de material genético en las células. Los principales son: Electroporación y Microinyección. 2) métodos químicos basados en la formación de complejos que las células sean capaces de adquirir e incorporar, directamente mediante la ruta endocítica (fosfato cálcico, DEAE dextran) material genético.

El método del fosfato cálcico está basado en la obtención de un precipitado entre el cloruro de calcio y el ADN en una solución salina de fosfatos. En esta situación co-precipitan formando unos agregados que son endocitados o fagocitados por las células.

Aparentemente el agregado de calcio protege al ADN de la degradación por las nucleasas celulares. El tamaño y la calidad del precipitado es crítico para el éxito del proceso. Hay dos tipos de transfección (descritos para células de mamíferos) transitoria y estable o permanente. En una transfección transitoria, la transcripción del gen puede ser analizada entre 1 y 4 días después de haber introducido el ADN. Por otro lado, muchos experimentos requieren la formación de líneas celulares que contengan el gen el cual es integrado dentro del ADN cromosomal dando como resultado una transfección estable o permanente.

El experimento se realizó de la siguiente manera. Se precipitó 40 μg de ADN, se le agregó 16 μl de agua estéril, 100 μl de CaCl_2 (0.25 M) y se le agregó lentamente con agitación continua 100 μl de HBS 2X. Se dejó de 30 min a temperatura ambiente. Finalmente se le agregó a una caja de cultivo con 1×10^6 células (70% confluyente) en un volumen final de 2 ml de medio y se dejó a 37°C. Después de 24 h se adicionó la droga G418 (análogo de Neomicina) a una concentración 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en el medio de cultivo.

5.3.15.- Tincion con Lyso Tracker®

La tinción con Lyso Tracker® que es un método que tiñe de modo específico los organelos ácidos de las células como los lisosomas, y el proceso es el siguiente: en una caja petri pequeña se colocan células y se deja crecer el tiempo para que lleguen a una confluencia del 60 al 70% se les quita el medio y se lava con PBS, se agrega un mililitro de medio y un microlitro de Lyso Tracker® se incuba por 20 minutos a 37°C en la oscuridad envueltos en papel aluminio, se les quita el medio y se lava 2 veces con PBS y se observan las células en un microscopio de fluorescencia.

5.3.16.- Infección con *Trypanosoma cruzi*.

Se colocó en una caja petri (pequeña) cubre objetos cortados de tal manera que entren una cantidad considerable los cuales serán acomodados para que no se encimen, se pondrán células y se crecerán hasta una confluencia de 50% para observar separadas las células después se infectara con parásitos en fase de crecimiento logarítmica a una densidad de 1×10^6 epimastigotes y tripomastigotes (previamente lavados con medio DMEM alta glucosa sin complementar para eliminar el medio LIT remanente) con medio DMEM alta glucosa complementado con 2% de SFB. Se centrifugaron las cajas a 3000rpm/20 min a 37°C, para bajar los parásitos a los márgenes de las células posteriormente se incubaran a 37°C.

5.3.17.- Fijación.

Las células que se desean fijar fueron crecidas en condiciones normales y sobre cubreobjetos, se retiró el medio y se lavó con PBS dos veces se le agregó formaldehído al 3.7% y se dejó por 20 minutos a temperatura ambiente, se retiró el formaldehído con vacío y se lavó dos veces más con PBS, se montó en un porta objetos, se quita el exceso de PBS, se deja secar y se conserva a -4°C.

5.3.18.- Captura de imágenes

Para el registro y procesamiento de resultados se utilizan equipos computacionales que nos permite analizar de manera mas rápida y sencillas los resultados.

Todas las células se observaron al microscopio de fluorescencia “Olimpus” y se tomaron las imágenes con ayuda del Software Twin Viewfinder, version 3.0 y fueron procesadas con el Software Image-Pro Plus, versión 4.0.

6.- RESULTADOS

El primer objetivo de este trabajo fue el diseño de oligonucleótidos (oligos) para la amplificación de la secuencia de localización en lisosomas LAMP1 fusionada a la secuencia que codifica para una variante de la proteína verde fluorescente (EGFP), llamada EGFP-SSL1.

De la secuencia de la proteína asociada a membrana lisosomal de sus siglas en inglés LAMP -1 se obtuvo la secuencia señal que lleva a LAMP1 a la membrana de los lisosomas de manera específica la cual tiene un tamaño de 33 pares de bases (pb) (aggaagaggagtgcagcaggctaccagactatc) que codifican para 11 aminoácidos (RKRSHAGYQTI). Esta secuencia se fusionó a la secuencia de la EGFP en su carboxilo terminal antes del codón de paro para continuar la lectura y poder así obtener el péptido de fusión. Por lo tanto el oligonucleótido reverso utilizado contiene los últimos 19 pb del extremo carboxilo terminal de la secuencia que codifica a EGFP, las 33 pb correspondientes a la secuencia señal de LAMP-1, el codon de paro y finalmente la secuencia para las enzimas de restricción *Not I*, *Eco RI* y *Spe I*, como se esquematiza a continuación:

OLIGO ANTISENTIDO SSL1 (76pb)

5' **GTACCTGCTGCACATGTTT** tcctctcctcagtcgctccgatggtctgatag
ATTCGCCGG CG CTTAAGTGATCAG 3'

En mayúsculas y negritas contiene los últimos 19 pb del extremo carboxilo terminal de la secuencia que codifica a EGFP, en minúsculas las 33 pb correspondientes a la secuencia señal de LAMP 1, en mayúsculas subrayadas el codón de paro, y finalmente en mayúsculas cursivas las secuencias de las enzimas de restricción *Not I*, *Eco RI* y *Spe I*.

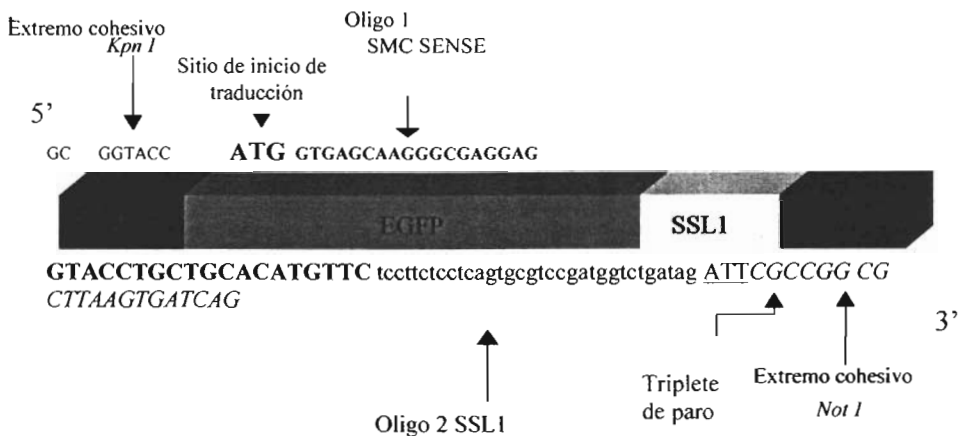
El oligonucleótido sentido utilizado fue SMC-1 SENSE el cual se diseñó en un proyecto anterior que contiene los primeros 21 pb de la secuencia que codifica a EGFP a partir del codón de inicio (+1 al +21 nucleotidos) y la secuencia de la enzima de restricción *Kpn I*, como se esquematiza a continuación.

Oligonucleótido sentido 1. SMC-1 SENSE

5' GCGGTACC ATGG TGA GCA AGG GCG AGG AG 3'

En negrillas se muestra la secuencia de la *EGFP* a partir del sitio de inicio de la traducción. En subrayado se indica el sitio de restricción *Kpn* I. - G+C 19/29 > 50% ∴ 60°.

Con los oligonucleótidos anteriores se obtendrá la secuencia EGFP-SSL1. En donde el oligo 1 representa el inicio (SMC-1 SENSE) y el oligo 2 el final (SSL1 ANTISENTIDO) de la secuencia que codifica para SSL1-EGFP, como se esquematiza a continuación:



Para la amplificación por PCR de la secuencia que codifica a la proteína verde fluorescente fusionada con la secuencia señal para membrana lisosomal (EGFP-SSL1) se utilizó como templado la secuencia de ADN de EGFP (700pb) purificada (Figura 9), obtenida del plásmido pEGFP-N1 digerido con las enzimas *Not* I y *Kpn* I (Figura 8.) y los oligonucleótidos SMC-1 SENSE y el oligo SSL1 ANTISENTIDO.

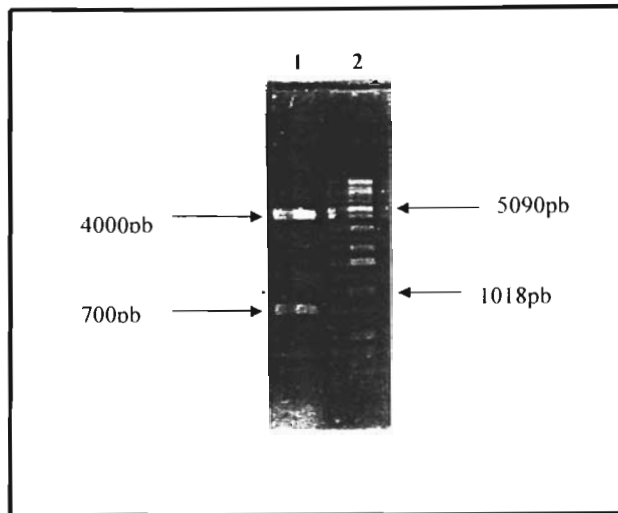


Figura 8. Digestión del ADN de pEGFP -N1 con *Kpn* I y *Not* I. El ADN de pEGFP-N1 se digirió con *Kpn* I y *Not* I (carril 1). Se utilizó 1kb ADN Extensión Ladder como marcador de peso molecular (carril 2).

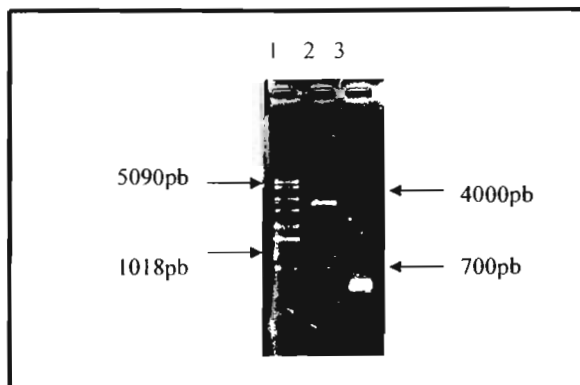


Figura 9. Purificación de los fragmentos de 700 y 4000 pb del plasmido pEGFP-N1 digerido con *Kpn* I y *Not* I. Fragmento purificado de ADN de pN1 de 4000 pb (carril 2). Fragmento purificado de ADN de EGFP de 700 pb (carril 3). Se utilizó 1kb ADN Extensión Ladder como marcador de peso molecular (carril 1).

Como se puede ver en la figura 10 se obtuvo un producto de PCR de 733 pb que corresponde al fragmento EGFP-SSL1. Ya que el tamaño es muy parecido a la secuencia de la EGFP sola no fue posible distinguirla en un gel de agarosa ni al 1 % ni al 4%; sin embargo, consideramos que si hubo amplificación este producto seguramente contendría la secuencia señal de LAMP1 ya que esta contenida en el oligonucleótido antisentido. Lo anterior fue demostrado utilizando un oligo interno de la secuencia señal de LAMP1 como se describe posteriormente (Figura 11).

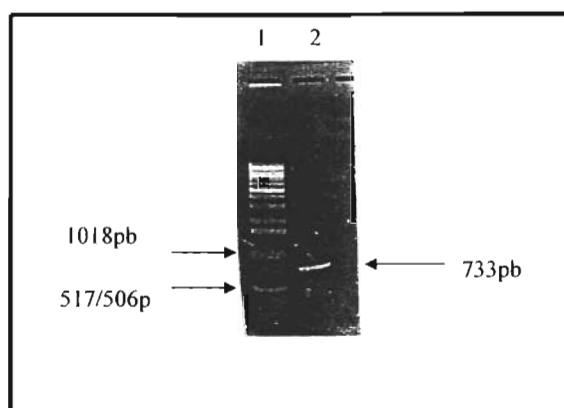


Figura 10. Amplificación del fragmento SSL1-EGFP. Producto de amplificación EGFP-SSL1 (carril 2). 1kb ADN Extensión Ladder se utilizó como marcador de peso molecular (carril 1).

El producto de amplificación SSL1-EGFP se clonó en pN1 para obtener el plásmido pEGFP-SSL1. Esto se logró realizando una ligación del producto de PCR de 733 pb correspondiente a SSL1-EGFP con el fragmento pN1 purificado de 4000 pb. La ligación se utilizó para transformar células competentes DH10B obteniéndose 20 colonias resistentes a kanamicina, las cuales se analizaron por el método de PCR de colonia como se describe en materiales y métodos. Ya que el oligo SSL1 contiene 19 nucleótidos de la secuencia de EGFP no pudo ser utilizado en esta prueba ya que no discriminaría entre las colonias que contuvieran la secuencia que codifica a EGFP o EGFP-SSL1. Por lo tanto se diseñó el oligo ST LAMP 1 (secuencia

terminal de LAMP 1) que contiene las últimas 15 pb (ggctaccagactatc) de la secuencia señal de LAMP1. Como se muestra en la figura 11 se obtuvo amplificación en 4 de las 20 muestras analizadas. También se realizó la extracción de ADN de las muestras anteriores por el método de STET y se digirió con *Kpn* I y *Not* I. Sin embargo, al igual que cuando se analizó el producto de PCR de 733 pb de EGFP-SSL1 no fue posible diferenciar entre las muestras que contenían la secuencia de EGFP y EGFP-SSL1.

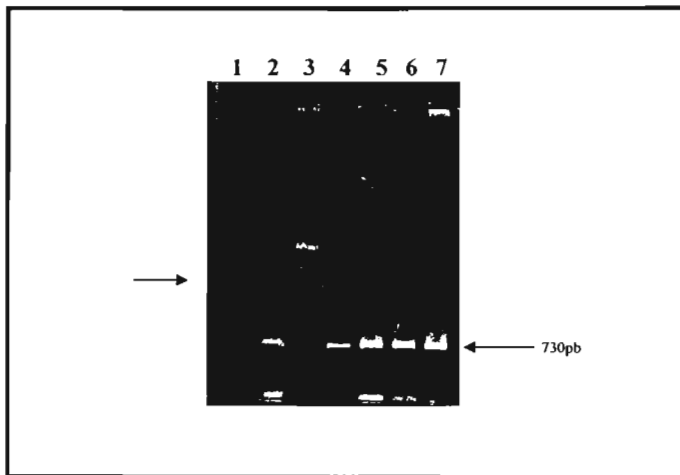


Figura 11. PCR de colonia de las clonas de pEGFP-SSL1 resistentes a kanamicina. Amplificación por PCR de la secuencia EGFP-SSL1 utilizando un oligo interno de la secuencia de LAMP1 llamada TS LAMP 1. Del carril 4 al 7 se muestran las clonas 5,6,11 y 12 de pEGFP-SSL1 resistentes a kanamicina. En el carril 2 se muestra el control positivo consistente a la amplificación utilizando el producto de PCR de 733 pb de EGFP-SSL1. En el carril 3 se muestra en control negativo en el que se utilizó como templado el plasmido pEGFP-N1. 1kb ADN Extensión Ladder se utilizó como marcador de peso molecular (carril 1).

Una vez verificado que nuestra construcción es correcta, el ADN de pEGFP-SSL1 fue extraído por el método de lisis alcalina o cloruro de cesio como se describe en materiales y métodos. La integridad del ADN se verificó corriendo una alícuota en un gel de agarosa como se muestra en la figura 12. Como se esperaba se observaron 3 bandas correspondientes al ADN circular, cortado en una sola cadena (*nicked*) y super enrollado.

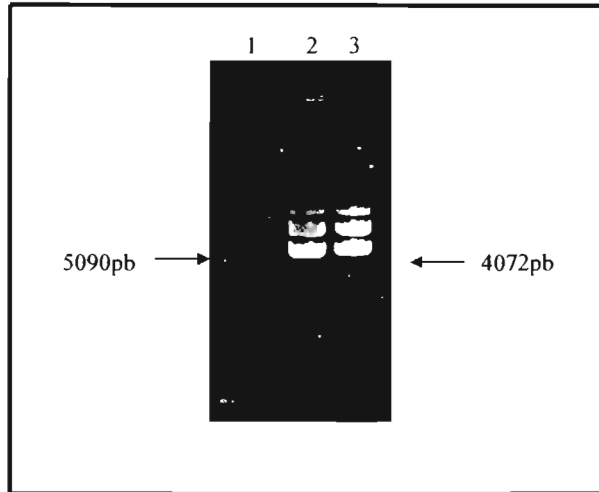


Figura 12. Lisis Alcalina del pEGFP-SSL1. ADN producto de lisis alcalina se observa 3 bandas correspondientes al ADN circular, cortado en una sola cadena (*nicked*) y súper enrollado carriles 2 y 3, 1kb ADN Extensión Ladder se utilizó como marcador de peso molecular (carril 1).

Posteriormente procedimos a transfectar fibroblastos 3T3 NIH con ADN de pEGFP-SSL1 por el método de fosfato de calcio como se describe en materiales y métodos. Se obtuvieron tanto transfecciones transitorias como estables utilizando cada una de ellas de acuerdo a las necesidades del proyecto. Las células transfectadas se analizaron bajo el microscopio de fluorescencia como se observa en las figura 13. Los resultados mostraron que la proteína verde fluorescente se localizó en vesículas pequeñas distribuidas homogéneamente en el citoplasma de éstas (paneles A, B, C y D). En algunos casos cabe resaltar que también se observo fluorescencia en el núcleo de la célula (B, C y D). Estos resultados confirman de manera funcional que nuestra construcción (pEGFP-SSL1) funciona adecuadamente para expresar y dirigir a la proteína fusionada (EGFP-SSL1) a vesículas. Es importante resaltar que las células transfectadas no mostraron cambios fenotípicos comparados con las células no transfectadas.

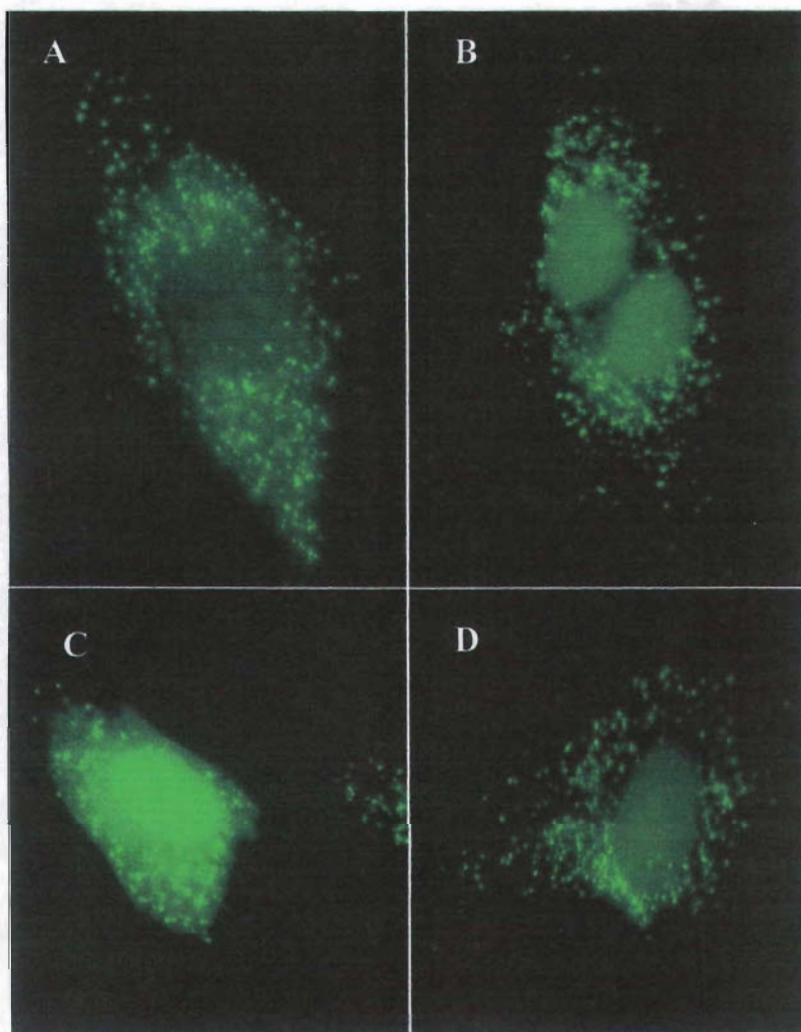


Figura 13. Fibroblastos 3T3 HIH transfectadas con pEGFP-SSL1. Las células transfectadas transitoriamente fueron analizadas bajo el microscopio de fluorescencia mostrando que la proteína EGFP-SSL1 se localizó en vesículas pequeñas distribuidas homogéneamente en el citoplasma de la célula (A, B, C, D) y en algunos casos en el núcleo (B, C y D).

Para verificar que la expresión de la proteína EGFP-SSL1 se encuentra en lisosomas se realizó una tinción de las células transfectadas con el marcador molecular Lyso Tracker® que tiñe específicamente lisosomas maduros ácidos. Los resultados se muestran en la figura 14 en donde inesperadamente se observó un marcaje diferencial en donde no todas las vesículas teñidas en rojo con Lyso Tracker® colocalizaron con aquellas observadas en verde que expresan la proteína EGFP-SSL1. En los paneles B, C, H e I se observan células teñidas únicamente en rojo lo que corrobora que no todas las células fueron transfectadas como es de esperarse en un experimento de transfección transitoria. Considerando que el Lyso Tracker® es un marcador molecular con afinidad por lisosomas ácidos, estos resultados sugieren que posiblemente la proteína EGFP-SSL1 pierde su fluorescencia en los lisosomas maduros cuyo pH disminuye a valores de 5. LAMP1 por otro lado se sabe que está presente en endosomas tardíos como en lisosomas inmaduros y maduros por lo que es de esperarse que encontráramos vesículas teñidas en verde únicamente, lo que concuerda con nuestros resultados (paneles C, F e I).

Una vez que se obtuvieron las transfectantes transitorias expresando pEGFP-SSL1 se sometieron a una selección con G418 para obtener transfectantes estables. En los primeros tiempos de la selección se observó que la fluorescencia permanecía en los lisosomas; sin embargo, al paso del tiempo esta fluorescencia se perdió a pesar de que la resistencia al G418 se mantuvo. Estos resultados fueron inesperados y no tenemos una explicación aún para ellos. Pensando en la posibilidad de que la fluorescencia se perdiera por la falta de formación de vesículas ante un estado de no estimulación realizamos un experimento en el que se indujo la formación de endosomas al exponer a las células transfectadas de manera estable con una mezcla para transfección por el método de fosfato de calcio pero sin ADN. Los resultados mostraron que aproximadamente el 40% de las células resistentes recobraron la fluorescencia en lisosomas (datos no mostrados).

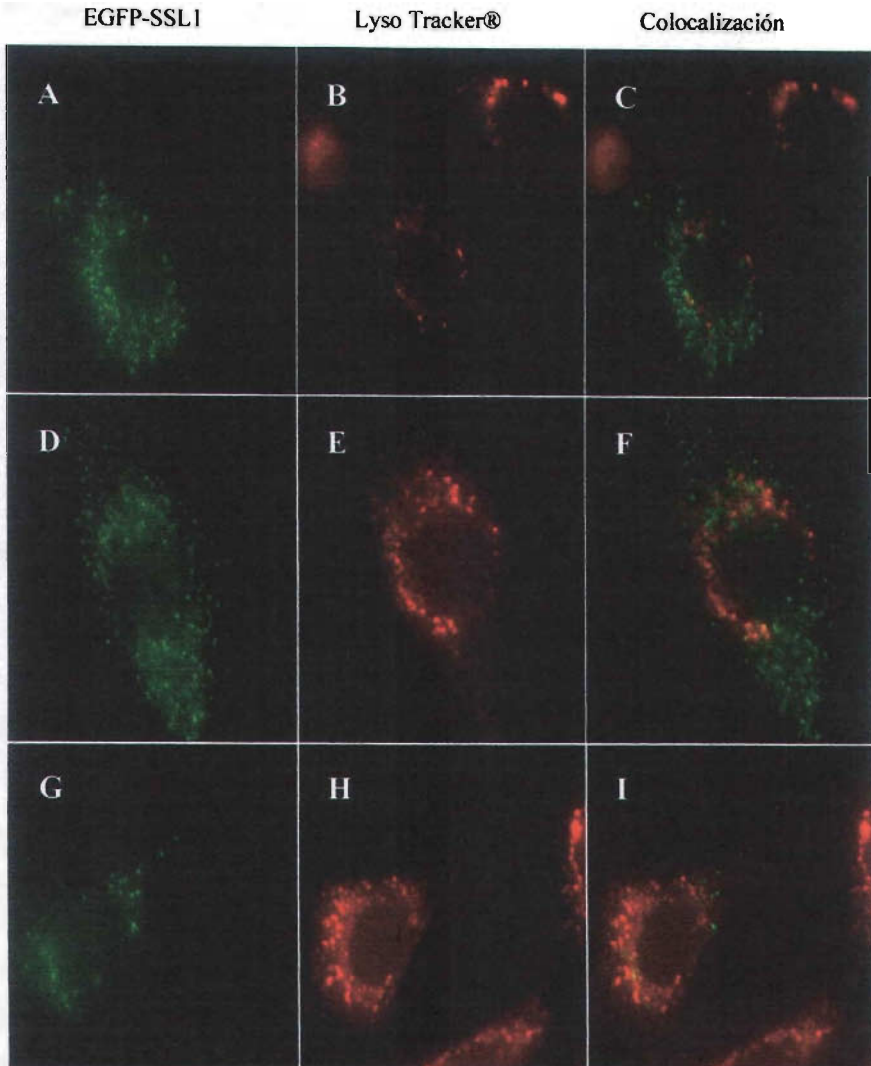


Figura 14. Fibroblastos 3T3 NIH transfectados con pEGFP-SSL1 y teñidas con Lyso Tracker®. Las células transfectadas transitoriamente fueron teñidas y analizadas bajo el microscopio de fluorescencia observándose que la proteína EGFP-SSL1 se localizó en vesículas pequeñas distribuidas homogéneamente en el citoplasma de la célula (A, D y G), de manera diferencial con aquellas vesículas teñidas con Lyso Tracker® (B, E y H). En los paneles (C, F e I) se muestran la colocalización de ambos marcadores.

Finalmente evaluamos la infección de tripomastigotes y amastigotes en las células transfectadas. Para lo cual utilizamos tripomastigotes y amastigotes *Knock-in* expresando la proteína roja fluorescente Ds Red1-1 obtenidos en un trabajo previo (Figura 15). Las células que utilizamos para este experimento fueron las células transfectadas estables considerando que la interacción con el parásito posiblemente estimularía la vía de endocitosis permitiendo así, como en el experimento de inducción anterior, visualizar las vesículas verdes expresando EGFP-SSL1. Los resultados mostraron que las células transfectadas fueron infectadas y que únicamente vesículas en rojo fueron observadas lo que indica que posiblemente no fue estimulada la formación de endosomas expresando la proteína EGFP-SSL1. Ya que los parásitos utilizados expresan la proteína DsRed1-1 no fue posible en las condiciones utilizadas del experimento discriminar entre los parásitos que se encuentran dentro de las vacuolas o en el citoplasma de la célula, ni tampoco distinguir entre aquellos parásitos que utilizaron la vía de lisosomas o de endosomas para penetrar a la célula huésped. Sin embargo, es claro que este trabajo sentó las bases para futuros experimentos en que se podrá estudiar el proceso de invasión de los diferentes estadios de desarrollo del parásito así como el mecanismo vesicular involucrado en este proceso.

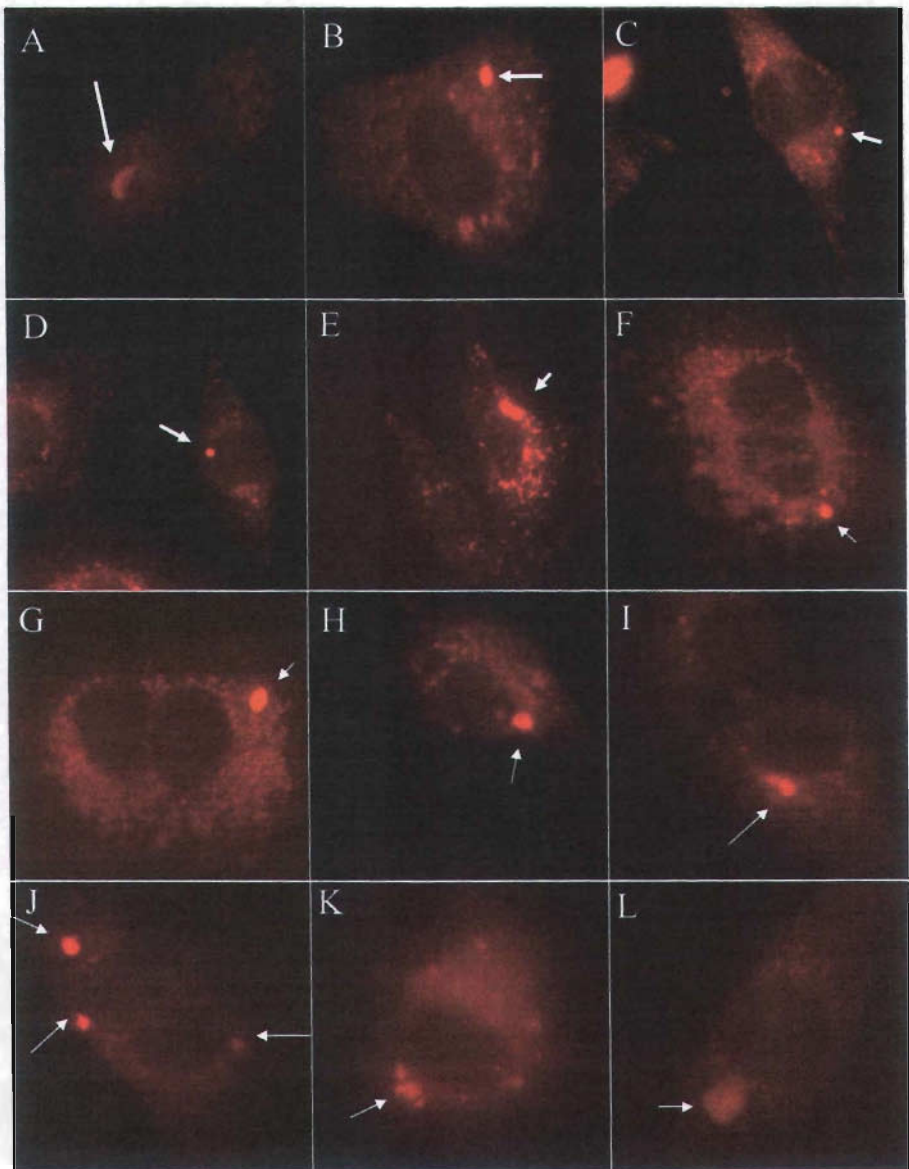


Figura 15. Fibroblastos 3T3 NIH transfectados de manera estable con pSSL1-EGFP infectados con *T. cruzi*. Las células transfectadas establemente fueron infectadas con tripomastigotes y amastigotes de *T. cruzi* y teñidas con Lyso Tracker®. Las flechas indican los parásitos dentro de las células.

7.- DISCUSIÓN

La construcción del vector de transfección pEGFP-SSL1 se llevo a cabo exitosamente, siendo esto comprobado tanto por la técnica de PCR utilizando un oligo interno de la secuencia señal de LAMP1 (ST LAMP1) y un oligo complementario al inicio de la secuencia de la proteína EGFP (SMC sense) y por la prueba funcional en donde fibroblastos 3T3 NIH transfectados con pEGFP-SSL1 mostraron la expresión de la proteína de fusión en vesículas pequeñas distribuidas homogéneamente en su citoplasma (Figura 13). Ya que la prueba funcional es contundente para confirmar que nuestra construcción es correcta ya no fue necesario realizar la secuenciación de nuestro plásmido.

Para comprobar que la expresión de la proteína de fusión EGFP-SSL1 correspondía a lisosomas, se realizó un tinción con LysoTracker® que es un marcador moléculas de lisosomas. Esperábamos observar una colocalización de ambos marcadores; sin embargo, nuestros resultados mostraron un marcaje diferencial en donde prácticamente el 99% de las vesículas presentaban solo uno de los marcadores (Figura 14). Estos resultados fueron inesperados, sin embargo, aparentemente podrían sugerir que la proteína EGFP-SSL1 pierde su fluorescencia a pH ácidos. Se ha reportado en la literatura que LAMP1 es localizada principalmente en los límites de la membrana de endosomas tardíos, lisosomas inmaduros y maduros (Fukuda, M. 1991). También se sabe que los lisosomas siguen una ruta de maduración que se caracteriza por que su pH se vuelve mas ácido para activar a las enzimas líticas (Bannykh et al 1997). Por otro lado, se ha reportado que la GFP pierde su capacidad de fluorescer a pH menor a 5 (Tsien Y., 1998). Estos antecedentes apoyan la posibilidad de que la proteína de fusión EGFP-SSL1 pierda su fluorescencia en los lisosomas maduros por lo que no sería extraño que solamente los endosomas tardíos y lisosomas inmaduros se observaran verde fluorescentes. Sin embargo, lo anterior necesitaría ser demostrado utilizando marcadores específicos de cada tipo de vesículas. Si éste fuera el caso, sería esperado observar únicamente en rojo las vesículas correspondientes a los lisosomas maduros ya que la tinción con Lyso

Tracker® tiñe de manera específica lisosomas ácidos. Para demostrar esto sería necesario detectar la presencia de EGFP-SSL1 en los lisosomas maduros utilizando para ello un anticuerpo anti-EGFP y un segundo anticuerpo contra esta unido a Alexa en azul, ya que el hecho de que la EGFP pierda su capacidad de fluorescer a pH 5 no limita a que se exprese en la membrana de los lisosomas maduros.

El porqué la fluorescencia de la proteína de fusión (EGFP-SSL1) se pierde durante la selección de las transfectates estables aún no lo sabemos. Sin embargo, consideramos que esto no debería de suceder ya que las células contienen lisosomas continuamente y la presencia de nutrientes en el medio de cultivo debería mantener la vía de endocitosis activa. En el laboratorio tenemos evidencias de que la contaminación de las células con micoplasma causa una pérdida de la fluorescencia de las proteínas fluorescentes transfectadas así como de la inestabilidad de la secuencia genómica transfectada entre otros muchos efectos deletéreos en las células contaminadas. Por ello pensamos que esta podría ser una causa en nuestras células, ya que por técnicas de PCR y microscopía electrónica demostramos que nuestros cultivos estaban contaminados con micoplasma. Sin embargo, mayores estudios serían necesarios para demostrar que la contaminación con micoplasma pudiera ser la causa de la pérdida de fluorescencia.

Finalmente los experimentos de infección con tripomastigotes y amastigotes de *T. cruzi* mostraron que nuestras células transfectadas mostraron una invasión por el parásito con características similares a las células silvestres. Ya que no hubo cambios en el fenotipo de las células transfectadas y tampoco en su susceptibilidad a ser infectadas por el parásito comparado con las células no transfectadas indica que la transfección y expresión de EGFP-SSL1 no tuvo un efecto deletéreo en nuestras células.

En resumen en el presente trabajo logramos la construcción y transfección exitosa de pEGFP-SSL1 en fibroblastos 3T3 NIH, expresándose la proteína de fusión en vesículas pequeñas distribuidas de manera homogénea en su citoplasma marcando aparentemente a endosomas tardíos y lisosomas tempranos. Dicha expresión no tuvo ningún efecto deletéreo en nuestras

células transfectadas, no mostrando cambios fenotípicos y siendo éstas infectadas con tripomastigotes y amastigotes de *T. cruzi* con las mismas características que las células silvestres. Sin duda en este trabajo se obtuvieron exitosamente herramientas moleculares que permitirán en futuros proyectos el poder estudiar el mecanismo de invasión del parásito dilucidando las diferentes vías de entrada de los distintos estadios de desarrollo de *T. cruzi*, proceso que se encuentran en actual debate, teniendo un impacto muy importante no solo en la biología del parásito si no también en la patogenia de la enfermedad de Chagas.

8.- CONCLUSIONES

- 1.- Se construyó exitosamente el vector de transfección pEGFP- SSL1.
- 2.- La amplificación por la técnica de PCR y la expresión de la proteína de fusión EGFP-SSL1 en fibroblastos 3T3 NIH transfectados demostraron que el plásmido pEGFP- SSL1 esta correctamente construido y es funcional.
- 3.- La secuencia de LAMPI utilizada dirige específicamente a la proteína EGFP a vesículas que posiblemente corresponden a endosomas tardíos y lisosomas tempranos.
- 4.- La acidificación de los lisosomas maduros a un pH de 5 aparentemente inhibe la fluorecencia de la EGFP-SSL1.
- 5.- Las células transfectadas fueron capaces de ser infectadas con tripomastigotes y amastigotes de *T. cruzi*.
- 6.- La transfección de pEGFP-SSL1 aparentemente no causó ningún efecto deletéreo en las células transfectadas.

9.- REFERENCIAS

1. Acosta -Serrano Almeida et. Al. IC, 2001 The mucin-like glycoprotein super-family of *Trypanosoma cruzi*: structure and biological roles. *Mol Biochem Parasitol* 114:143-150
2. Almeida-de-Faria M., Freymüller E., Colli W. and Alves M. J. M. 1999 *Trypanosoma cruzi*: Characterization of an intracellular epimastigote-like form. *Experimental parasitology* 92: 263-274
3. Allen, L. A., and Aderem, A. 1996. Mechanisms of phagocytosis. *Current Opinion in Immunology* 8: 36-40.
4. Andrews, N.W., Abrams, C.K., Slatin, S.L., and Griffiths, G. 1990 A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. *Cell* 61: 1277-1287.
5. Araujo-Jorge, T.C. and de Souza W. 1988. Interaction of *Typanosoma cruzi* with macrophages. Involment of surface galactose and N-acetyl-D-galactosamine residues in the recognition process. *Acta Trop.*, 41: 17-28
6. Bannykh S.I. and Bakch, W.E. 1997 Membrane Dynamics at the Endoplasmic Reticulum Golgi Interface. *J Cell Biol.* 138: 1-4
7. Barriocanal, J.G.et. al. 1986 Biosynthesis, glycosylation, movement through the Golgi system, and transport to lysosomes by an N-linked carbohydrate-independent mechanism of three lysosomal integral membrane proteins. *J. Biol. Chem.* 261: 16755-16763.
8. Brener, Z. 1973. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Rev. Microbiol.*, 27: 347-383.
9. Brener, Z. & Gazzinelli, R.T. 1997. Immunological control of *Tripanosoma cruzi* infection and patogénesis of Chagas' disease. It. ARCh. *Allergy immunol.* 114: 103-110.
10. Burleigh B. A., and Andrews N. W. 1995 The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 175-200

11. Cabello R.C. 1998. "Microbiología y parasitología Humana." 1ª ed Ed Medica Panamericana..Buenos Aires Argentina.
12. Cevallos A.M. y Hernández R. 2002 . "Trypanosoma cruzi y la enfermedad de Chagas (trypanosomiasis americana)".Libros Microbios. Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM DGSCA. México.
13. Cerisola, J.A., Rabinovich, A., Álvarez, M., Corleto, C.A: y Pruneda, J.: 1972. "Enfermedad de Chagas y transfusión de sangre." Boletín de la oficina Sanitaria Panamericana, 73: 203-221.
14. Cuervo, A.M. and Dice, J.F. 2000 Regulation of lamp2a levels in the lysosomal membrane. *Traffic* 1: 570-583.
15. De Duve, C. 1959 "Lysosomes, a new group of cytoplasmatic particles. I Subcellular Particles" Hayashi, T., Ed. Ronald Press.
16. De Souza Wanderley.2002. From the cell biology to the developmental of newchemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality.Kinetoplastid. *Biology and Disease* 1:3
17. Delgado I. A.,Amich S., Prieto S., Salve M.L. 1994. "Laboratorio Clínico. Microbiología" Mc Graw Hill.Madrid España.
18. Dias, J:C:P.:Mecanismo de la enfermedad de Chagas. 1979. "En *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*" , Brener, Z, y Andrade, Z. (Eds.) Guanabara Koogan, Río de Janeiro. Brasil.
19. Eskelinen, E.L. et al 2002 Role of LAMP-2 in lysosomes biogenesis and autophagy. *Mol. Biol. Cell* 13: 3355-3368.
20. Fukuda; M. 1991 Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosintesis, and intracellular trafficking. *J. Biol. Chem.* 266: 21327-21330.
21. Furuno, K, et al 1989 Morphological localization of a major lysosomal membrane glycoprotein in the endocytic membrane system. *J. Biochem.* 106: 708-716.
22. Galan, J. E., and J.B. Bliska. 1996 Cross-talk between bacterial pathogens and their host cells. *Annu. Rev. Cell dev. Biol.* 12:221-255.
23. Griffiths, G. et al. 1989 A quantitative analysis of the endocytic pathway in baby hamster kidney cells. *J. Cell Biol.* 109: 2703-2720.

-
24. Guzmán-Bracho, C. 2001. Epidemiology of Chagas disease in Mexico: an update *Trends in parasitology*, 17: 372-376
 25. Heyneman, y cols., 1995. "Parasitología y medicina tropical." 1Ed. El manual moderno. México.
 26. Jadot, M. et al 1996 Soluble form of LAMP II in purified rat liver lysosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 223: 353-359.
 27. Kelly J.M. 2000. A B-Cell activator in Chagas disease. *Nature Medicine*. Vol 6 num 8 August, 865-866.
 28. Ley, V., Robbins, E.S., Nussenzweig, V., and Andrews, N.W. 1990 The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. *J Exp Medical* 171:401-413.
 29. Lewis, V. Et al. 1985 Glycoproteins of the lysosomal membrane. *J. Cell Biol.* 100: 1839-1847.
 30. Lippincott-Schwartz, J. and Fambrough, D.M. 1987 Cycling of the integral membrane glycoprotein, LEP100, between plasma membrane and lysosomes: kinetic and morphological analysis. *Cell* 49: 669-677.
 31. Lopez, M., Huynh, C., Andrade, L.O., Pypaert, M., and Andrews, N.W. 2002 Role for sialic acid in the formation of tight lysosome-derived vacuoles during *Trypanosoma cruzi* invasion. *Mol Biochem Parasitol* 119:141-145.
 32. Marsh, M. Et al. 1987 Rapid analytical and preparative isolation of functional dosomes by free flow electrophoresis. *J. Cell Biol.* 104: 875-886.
 33. Miles MA: Collier L, Balows A, Sussman M, eds. 1997 New world tripanosomiasis In: *Toplay and Wilson's microbiology and microbial infection*. Vol 5. Arnold. London.
 34. Mullins, C. And Bonifacino, J.S. 2001 The molecular machinery for lysosome biogenesis. *Bioessays* 23: 333-343.
 35. Paul Chester, B., Rodney C.J., Eddie W.C., 1986 "Parasitología clínica" 2a Ed JGH. Editores México.
 36. Pollard J. W. and Walker John M. 1990." Animal Cell Culture. Methods in Molecular Biology." Vol 5. Ed. Humana Press. USA.

-
37. Procópio, D.O, Silva, S., Cunningham, C.C. and Mortara, R.A. 1998. *Trypanosoma cruzi*: Effect of protein kinase inhibitors and cytoskeletal protein organization and expression on host cell invasion by amastigotes and metacyclic trypomastigotes. *Exp. Parasitology*, 90: 1-13.
38. Reddy, A., Caler, E.V., and Andrews, N.W. 2001 Plasma membrane repair is mediated by Ca²⁺-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell* 106: 157-169.
39. Rodriguez, A., Rioult, M.G., Ora, A., and Andrews, N.W. 1995 A trypanosome-soluble factor induces IP₃ formation, intracellular Ca²⁺ mobilization and microfilament rear-angement in host cells. *J Cell Biol* 129: 1263-1273.
40. Rodriguez, A., Samoff, E., Rioult, M.G., Chung, A., and Andrews, N.W. 1996 Host cell invasion by trypanosomes requires lysosomes and microtubule/Kinesin-mediated transport. *J Cell Biol* 134:349-362.
41. Rodriguez, A., Webster, P., Ortego, J., and Andrews, N.W. 1997 Lysosomes behave as Ca²⁺-regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells. *J Cell Biol* 137:93-104.
42. Sánchez-Hernández, B.E. 1996. Uso de Elisa, Western Blot y Hemocultivo para el estudio de la enfermedad de Chagas en el estado de Morelos. Tesis para obtener el título de Químico-biólogo, Escuela de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca.
43. Schenkman, S., Robbins, E.S., and Nussenzweig, V. 1991 Attachment of *Trypanosoma cruzi* to mammalian cells requires parasite energy, and invasion can be independent of the target cell cytoskeleton. *Infect immun* 59:645-654.
44. Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. 1962 . *J. Cell Comp. Physiol.* 59:223-39.
45. Tanaka, Y, et al. 2000 Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice, *Nature* 409: 902-906.
46. Tardieux, i., Webster, P., Ravesloot, J., Boron, W., Lunn, J.A., Heuser, J.E., and Andrews, N.W. 1992 Lysosome recruitment and fusion are early

-
- events required for tryposome invasion of mammalian cells. *Cell* 71: 1117-1130.
47. Tsien Roger Y. 1998. The Green Fluorescent Protein. *Annual Review Biochemical*. 67: 509-544.
48. Tyler K. M. and Engman D. M. 2001 The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology* 31: 472-481
49. Tyler K. M. And Engman D. M. 2000 Flagellar elongation induced by glucose limitation is preadaptative for *Trypanosoma cruzi* differentiation. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 46: 269-278
50. Velasco, O. 1991. "La enfermedad de Chagas." Publicación técnica del INDRE, Secretaria de Salud. México D.F. 8:56.
51. Woolsey, A.M., Sunwoo, L., Petersen, C.A., Brachmann, S.M., Cantley, L.C., and Burleigh, B. A. 2003 Novel PI3 kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. *J Cell Sci* 116:3611-3622.
52. Woolsey A.M. and Barbara A. Burleigh 2004. Host cell actin polymerization is required for cellular retention of *Trypanosoma cruzi* and early association with endosomal/lysosomal compartments *Cellular Microbiology*.
53. WHO 1996. World Health Organization. Chagas' Disease
54. Yang, F., Moss, L. G., Phillips, G. N. Jr. 1996. Molecular Structure of Green Fluorescent Protein. *Nature Biotechnology*. 14, 1246-1251