

Caracterización Molecular de los genes
codificantes de la proteína de choque térmico
de 70 kDa (HSP70) de *Trypanosoma rangeli*

CLAUDIA LILIANA CUERVO PATIÑO



Bogotá, D.C
Pontificia Universidad Javeriana
Facultad de Ciencias
Programa de Post-grado
2010

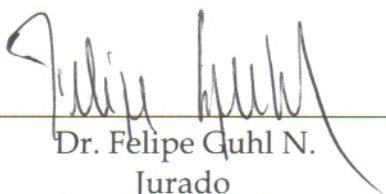
Caracterización Molecular de los genes codificantes de la proteína
de choque térmico de 70 kDa (HSP70) de *Trypanosoma rangeli*

CLAUDIA LILIANA CUERVO PATIÑO

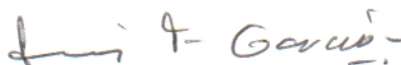
Aprobado



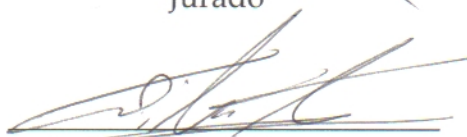
Dra. Concepción Puerta B. PhD
Directora



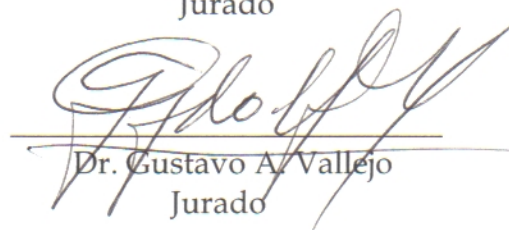
Dr. Felipe Guhl N.
Jurado



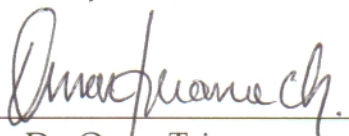
Dr. Luis Fernando García
Jurado



Dr. Wilson Teran
Jurado



Dr. Gustavo A. Vallejo
Jurado



Dr. Omar Triana
Jurado

Ingrid Schuler, Biol. PhD
Decana Académica
Facultad de Ciencias

Manuel Antonio Franco, MD, PhD
Director de Postgrado
Facultad de Ciencias

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la resolución No. 13 de julio de 1946:

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará por que no se publique nada contrario a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

RESUMEN

Las proteínas de choque térmico son parte esencial en la supervivencia celular gracias a su función como moléculas protectoras del daño inducido por estrés y su papel biológico como chaperonas moleculares. Dada la importancia biológica de las proteínas de choque térmico de 70 kDa (HSP70), se caracterizó el gen que codifica esta proteína en las cepas Tre y H14, representantes de los dos grandes grupos evolutivos de *Trypanosoma rangeli*. Dicho gen tiene un tamaño de 2.500 pb aproximadamente, se encuentra repetido en tándem cabeza-cola, se ubica en un cromosoma de 1.174 kb en la cepa H14 y 1.098 kb en la cepa Tre y presenta polimorfismo de restricción entre cepas.

La comparación de la organización genómica entre los genes para ambas cepas de *T. rangeli* y con otros tripanosomátidos no mostró diferencias significativas en cuanto a su organización genómica, sin embargo, los análisis de la secuencia de nucleótidos revelaron variabilidad en el tamaño de la región codificante del gen *hsp70* entre las diferentes copias génicas de la cepa Tre y de la cepa H14, las cuales se traducen en un número variable de repeticiones MPPG en el extremo carboxilo terminal de la proteína. Así mismo, un polimorfismo de restricción para la enzima *SphI* presente en el extremo 3' de la región codificante del gen *hsp70* de la cepa Tre y ausente en la cepa H14 permitió desarrollar un ensayo de PCR-RFLP el cual agrupó diferentes cepas de *T. rangeli* procedentes de diversos orígenes geográficos y hospederos en los dos grandes sub-grupos KP1(-) y KP1(+) del parásito, convirtiéndose en el primer marcador molecular de los dos grandes sub-grupos, correspondiente a un gen nuclear codificante para una proteína.

Adicionalmente, análisis filogenéticos realizados con la proteína HSP70 soportaron los 5 grupos de proteínas inicialmente propuestos y confirmaron la estrecha relación evolutiva entre *Trypanosoma cruzi* y *T. rangeli* y el carácter monofilético de tripanosomas y leishmanias.

Por otra parte, se pudo establecer que los epítopes humorales y celulares reportados en la proteína HSP70 de *T. cruzi* se encuentran altamente conservados en su homóloga de *T. rangeli*, por lo que se puede pensar que dicha proteína estaría involucrada en la reactividad inmunológica cruzada entre las dos especies. Similar a lo descrito para la proteína de *T. cruzi*, la proteína HSP70 de *T. rangeli* fue capaz de inducir la proliferación de esplenocitos de ratones vírgenes.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág
1. Introducción	1
2. Justificación	4
3. Marco teórico	6
3.1 <i>Trypanosoma rangeli</i>	6
3.2 Ciclo de vida de <i>T. rangeli</i>	7
3.3 Taxonomía y Sistemática del género <i>Trypanosoma</i>	8
3.4 Clasificación de <i>T. rangeli</i>	11
3.5 Variabilidad de <i>T. rangeli</i>	13
3.6 Estudios del ADN de <i>T. rangeli</i>	18
3.6.1 Cariotipo	18
3.6.2 Genes nucleares	19
3.6.3 ADN del cinetoplasto	20
3.7 Proteínas de choque térmico	22
3.7.1 La proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70)	25
3.7.2 La proteína HSP70 de tripanosomátidos	29
4. Objetivos	34

4.1 Objetivo general	34
4.2 Objetivos específicos	34
5. Materiales y métodos	35
5.1 Parásitos	35
5.2 Obtención de ácidos nucleicos	36
5.2.1 Obtención de ADN	36
5.2.2 Obtención de ARN	37
5.3 Ensayos de “Southern blot”	38
5.3.1 Digestión del ADN con enzimas de restricción	38
5.3.2 Electroforesis	38
5.3.3 Transferencia e inmovilización del ADN a soporte sólido	38
5.4 Ensayos de “Northern blot”	39
5.5 Obtención y marcaje de la sonda	39
5.6 Ensayos de hibridación	40
5.7 Electroforesis en campo pulsado	40
5.7.1 Preparación de los cromosomas de <i>T. rangeli</i>	41
5.7.2 Electroforesis en campo pulsado y transferencia a membranas de “nylon”	41

5.8 PCR (reacción en cadena de la polimerasa)	42
5.9 Clonación del gen <i>hsp70</i> de las cepas H14 y Tre de <i>T. rangeli</i>	46
5.10 Secuenciación del ADN	48
5.11 Análisis “in silico”	48
5.12 Diseño y estandarización de un ensayo de PCR-RFLP para diferenciar subpoblaciones KP1(+) y KP1(-) de <i>T. rangeli</i>	49
5.13 Producción de la proteína HSP70 recombinante de <i>T. rangeli</i>	50
5.13.1 Clonación en vector de expresión	50
5.13.2 Ensayos de inducción de la proteína	52
5.13.3 Ensayo de solubilización de la proteína inducida	54
5.13.4 Ensayo de purificación de la proteína inducida	54
5.13.5 Ensayos de linfoestimulación	55
6. Resultados	59
6.1 Organización genómica y expresión del gen <i>hsp70</i> de <i>T. rangeli</i>	59
6.1.1 Análisis de “Southern blot”	59
6.1.2 Determinación del número de copias del gen <i>hsp70</i>	66

6.1.3 Localización cromosómica del gen <i>hsp70</i> de <i>T. rangeli</i>	67
6.1.4 Análisis de “Northern blot”	70
6.2 Caracterización de la secuencia del gen <i>hsp70</i> de <i>T. rangeli</i>	71
6.2.1 Amplificación, clonación y secuenciación de la región codificante del gen <i>hsp70</i> de las cepas Tre, KP1(-) y H14, KP1(+) de <i>T. rangeli</i>	76
6.2.2 Amplificación, clonación y secuenciación de la unidad completa del gen <i>hsp70</i> de las cepas Tre, KP1(-) y H14, KP1(+) de <i>T. rangeli</i>	86
6.2.2.1 Región codificante	86
6.2.2.2 Región no codificante	116
6.3 Diseño y estandarización de un ensayo de PCR-RFLP para diferenciar subpoblaciones KP1(+) y KP1(-) de <i>T. rangeli</i>	124
6.4 Análisis filogenéticos de la proteína HSP70	129
6.5 Producción de la proteína HSP70 recombinante de <i>T. rangeli</i>	147
7. Discusión	157
7.1 Organización genómica del gen <i>hsp70</i> de <i>T. rangeli</i>	158

7.2 Genes <i>hsp70</i> y diferencia entre cepas KP1(-) y KP1(+) de <i>T. rangeli</i>	162
7.3 Análisis de la variabilidad de la región codificante de los genes <i>hsp70</i> de <i>T. rangeli</i>	166
7.4 Análisis de la región intergénica de los genes <i>hsp70</i> de <i>T. rangeli</i>	167
7.5 Proteína HSP70 de <i>T. rangeli</i>	173
7.6 Relaciones filogenéticas entre tripanosomátidos mediante el uso de la proteína HSP70	176
7.7 Respuesta inmune y HSP70	180
8. Conclusiones	187
9. Recomendaciones	189
10. Referencias bibliográficas	190
11. Anexos	219

1. INTRODUCCIÓN

Trypanosoma rangeli es la segunda especie de tripanosomátido causante de infección en mamíferos en América Latina. A pesar de carecer de patogenicidad para el hombre, *T. rangeli* siempre se ha estudiado dentro del contexto biológico de *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas, ya que estos protozoos son simpátricos, comparten reservorios, vectores y han sido reportados en infecciones mixtas (Guhl & Vallejo, 2003; Cuba, 1998).

Basado en la asociación entre el polimorfismo presente en el ADN del cinetoplasto y el gen mini-exón, *T. rangeli* ha sido dividido en dos grupos, las cepas KP1(-) y KP1(+) (Vallejo et al., 2003; 2002). Se ha reportado que estos grupos se encuentran asociados con las líneas evolutivas del vector *Rhodnius*, encontrándose las cepas KP1(-) asociadas a la línea evolutiva Pallescens y las KP1(+) a la línea evolutiva Prolixus (Vallejo et al., 2007; Urrea et al., 2005); de tal manera que aún cuando ambas cepas del parásito se encuentren presentes en el intestino de todos los insectos, sólo aquellas adaptadas a cada línea evolutiva podrán alcanzar las glándulas salivales y ser transmitidas por el vector (Vallejo et al., 2009); es así como, en *R. prolixus* se ha detectado la presencia en hemolinfa de un factor tripanolítico contra las cepas KP1(-), el cual actúa como un filtro biológico en la transmisión del parásito, seleccionando las poblaciones KP1(+) (Pulido et al., 2008).

Estudios adicionales, usando los genes ribosomales como marcadores moleculares han sugerido que la división de *T. rangeli* se extiende más allá de los dos grupos inicialmente propuestos, los cuales se encuentran estrechamente relacionados con las especies simpátricas del complejo *Rhodnius* (Maia da Silva et al., 2004; 2007; 2009).

Por otra parte, las proteínas de choque térmico (HSP) son parte esencial en la supervivencia celular gracias a su función como moléculas protectoras del daño inducido por estrés y su papel biológico como chaperonas moleculares. Dentro de las HSP, la familia de proteínas HSP70 constituye el grupo de proteínas más conservado presente en todos los organismos (Boorstein et al., 1994), altamente conservada en su secuencia de aminoácidos, regulación y funciones bioquímicas (Lindquist & Craig, 1988), hecho indicativo de su función esencial en la supervivencia celular.

Este grupo de proteínas resulta de gran interés en los organismos digenéticos, en los cuales ocurre un cambio en la temperatura ambiental al momento de la infección del hospedero mamífero. Se reportó que estos genes se inducen muy pronto durante la infección y juegan un papel muy importante en la adaptación del parásito al nuevo ambiente (Maresca & Kobayashi, 1994), sin embargo, no es claro si la expresión de las proteínas de choque térmico es parte del proceso de diferenciación por si mismo o es un fenómeno involucrado en la adaptación a las nuevas condiciones ambientales.

Por otra parte, en *Leishmania* se ha visto que esta proteína confiere resistencia a la toxicidad mediada por peróxido de hidrógeno (Miller et al., 2000) y sales de antimonio (Brochu et al., 2004), además promastigotes deficientes del gen *hsp-11* muestran alteraciones en el crecimiento y una limitada capacidad de multiplicación dentro de los macrófagos, por lo que la expresión de la proteína HSP70 se constituye en un factor importante en la virulencia del parásito (Folgueira et al., 2008).

Adicionalmente, se ha visto que la HSP70 de *T. cruzi* es una proteína altamente inmunogénica, que induce una fuerte respuesta tanto humoral como celular en sistemas experimentales murinos y es reconocida por sueros de pacientes chagásicos (Krautz et al., 1998). Además, esta proteína posee un singular efecto estimulador sobre células de bazo y de ganglio de ratones vírgenes no estimulados, el cual da lugar a una rápida e intensa estimulación de linfocitos T (Marañón et al., 2000a). Recientemente, también se ha observado que la proteína HSP70 de *T. cruzi*, así como un fragmento interno de la misma, el cual no contiene los dominios chaperona es capaz de madurar células dendríticas inmunológicamente funcionales (Planelles et al., 2002).

Teniendo en cuenta la importancia de las proteínas de choque térmico, se aislaron y caracterizaron los genes *hsp70* en dos cepas de *T. rangeli*, pertenecientes a cada uno de los grupos establecidos del parásito y se comparó la organización genómica, secuencia de nucleótidos y aminoácidos entre ellos y con varios organismos tripanosomátidos, con el objetivo de contribuir al conocimiento genómico de *T. rangeli* y a la sistemática de la especie y su relación con *T. cruzi* y los demás tripanosomátidos.

2. JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas el estudio de *Trypanosoma rangeli* ha sido enmarcado en el contexto de la biología y epidemiología de *Trypanosoma cruzi*; tendiente al desarrollo de pruebas diagnósticas que permitan la diferenciación entre estos dos parásitos, así como al análisis de genes y productos de *T. rangeli* que sean relevantes, teniendo en cuenta su asociación con *T. cruzi* y la relación hospedero-parásito (Guhl & Vallejo, 2003).

Estudios recientes han demostrado cómo la inmunización de ratones y perros con cepas de *T. rangeli* inducen una respuesta protectora frente al reto con cepas virulentas de *T. cruzi* (Basso et al., 2008; 2007; 2004; Paláu et al., 2003), siendo de vital importancia la dilucidación de las proteínas responsables de esta inmunidad cruzada, así como también el estudio de las variaciones existentes entre los distintos grupos de *T. rangeli*.

Por otra parte, preguntas fundamentales acerca de *T. rangeli* siguen sin respuesta. Su posición taxonómica dentro del subgénero *Herpetosoma* sigue siendo una controversia, dadas las características biológicas de capacidad de infección a un amplio rango de hospedadores y vectores que lo alejan claramente de la especie tipo de este subgénero *Trypanosoma lewisi*, la característica biológica compartida con *Trypanosoma brucei* (Subgénero *Trypanozoon*) de completar su ciclo de vida en las glándulas salivales del vector, su proximidad filogenética con *T. cruzi* (Subgénero *Schizotrypanum*) y el poder ser transmitido ocasionalmente por las heces del insecto vector.

A pesar de los avances en los proyectos genoma de muchas especies, incluidos los tripanosomas *T. cruzi* y *T. brucei* (El-Sayed et al., 2005a), el conocimiento del genoma de *T. rangeli* se encuentra en estado incipiente reportando hasta hoy sólo 310 secuencias de nucleótidos y 151 de proteínas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gquery/?term=Trypanosoma+rangeli>, revisado 31/01/2010), que incluyen unos pocos genes nucleares y mitocondriales claramente caracterizados y secuenciados, con énfasis en secuencias que permiten su diferenciación de *T. cruzi*.

Teniendo en cuenta lo anterior y la importancia de las proteínas de choque térmico en el funcionamiento normal de las células, en la protección celular frente al daño inducido por estrés y su participación en la infección por organismos tripanosomátidos, en el presente trabajo se estudió la organización genómica y se caracterizó molecularmente el gen que codifica la proteína HSP70 de *T. rangeli*.

Todo esto con el objetivo de contribuir al conocimiento genómico de *T. rangeli* y a la sistemática de la especie, factores determinantes en la utilización de *T. rangeli* como modelo de aproximación al estudio de *T. cruzi*, y a su uso en el desarrollo de estrategias de inmunización contra la infección por *T. cruzi*.

3. MARCO TEORICO

3.1 *Trypanosoma rangeli*

Trypanosoma rangeli es un protozoo digenético que utiliza insectos de la familia *Reduviidae* como vector, principalmente del género *Rhodnius* e infecta una amplia variedad de mamíferos en Centro y Sur América. Este flagelado mide alrededor de 31 micras de longitud y posee una membrana ondulante más desarrollada que *Trypanosoma cruzi*. Su cinetoplasto es sub-terminal y pequeño, característica que en condiciones normales permite la diferenciación morfológica con *T. cruzi* (D'Alessandro & Saravia, 1999; Cuba, 1998) (Figura 1).



Figura 1. Formas epimastigotas de *T. rangeli* teñidas con Giemsa (Pavía, P. Laboratorio de Parasitología Molecular, PUJ)

Trypanosoma rangeli se considera como un parásito no patógeno para el hombre y otros vertebrados, pero sí para los insectos vectores, en los cuales tras su desarrollo en el intestino, invade el hemocel y ocasiona lesiones tales como aumento excesivo de la hemolinfa, procesos anormales de muda y malformaciones (D'Alessandro & Saravia, 1999).

Desde su hallazgo en Venezuela en 1920 (Tejera, 1920), *T. rangeli* ha sido encontrado predominantemente en Guatemala, Panamá, Colombia y

Venezuela, y en menor extensión en El Salvador, Costa Rica, Perú, Brasil, Guyanas, Paraguay, Chile y Uruguay (D'Alessandro & Saravia, 1999; Cuba, 1998).

3.2 Ciclo de vida de *T. rangeli*

Los insectos triatómíneos de las especies *Rhodnius prolixus*, *Rhodnius pallescens*, *Rhodnius ecuadoriensis*, *Rhodnius dallesandroi*, *Rhodnius pictipes*, *Rhodnius robustos* y *Rhodnius colombiensis*, entre otros han sido reportadas como vectores naturales de *T. rangeli* (Vallejo et al., 2007; Guhl & Vallejo, 2003; D'Alessandro & Saravia, 1999).

Estos insectos se infectan durante la ingesta de sangre contaminada, los parásitos ingeridos se multiplican en la porción delgada del intestino medio y algunos de ellos van al recto y en el intestino se transforman en epimastigotes. Estas formas invaden la hemolinfa, donde se multiplican intra y extracelularmente. Después de 10 a 15 días de estar en la hemolinfa ascienden a las glándulas salivales, donde finalmente se transforman en las formas infectantes, los metatripomastigotes. Los hospederos vertebrados se infectan durante la picadura del insecto infectado, al inocularle durante la picadura saliva rica en las formas metatripomastigotes infectantes (Guhl & Vallejo, 2003; D'Alessandro & Saravia, 1999).

Tres días después de la picadura, los parásitos se agrandan y transforman en tripomastigotes sanguíneos. La forma como estos tripomastigotes se mantienen en el mamífero se desconoce hasta el momento, existiendo una gran controversia acerca de las capacidades replicativas e invasivas de los tripomastigotes sanguíneos (Guhl & Vallejo, 2003; D'Alessandro & Saravia, 1999) (Figura 2).

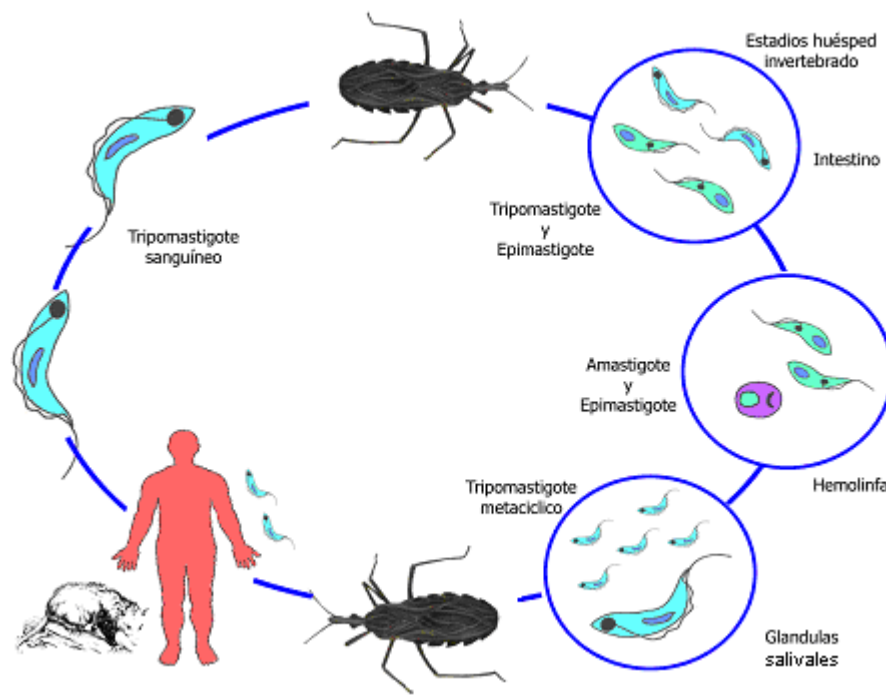


Figura 2. Ciclo de vida de *Trypanosoma rangeli*. (Pavía, P. Laboratorio de Parasitología Molecular, PUJ)

3.3 Taxonomía y sistemática del género *Trypanosoma*

El orden *Kinetoplástida* constituye un grupo importante de protistas, los cuales se caracterizan por la presencia de una organela denominada cinetoplasto (Liu et al., 2005; Lukes et al., 2002), y por la existencia de un número amplio de especies de vida libre y patógenos de invertebrados, vertebrados y plantas. Este grupo se ubica dentro del phylum *Euglenozoa*, el cual incluye dos órdenes adicionales, morfológicamente diferentes, *Euglenida* y *Diplonemida*; históricamente este phylum se ha considerado como uno de los primeros en divergir del linaje de los eucariotas (Sogin et al., 1986).

Dentro de los *Euglenozoa*, las relaciones filogenéticas han empezado a esclarecerse recientemente, y proponen el hecho de que los euglenidos constituyen el grupo basal dentro del phylum, seguido por la división en dos

grupos hermanos, los diplomonida, un grupo de protozoos de vida libre, aunque ocasionalmente parásitos facultativos de invertebrados y los kinetoplástidos (Simpson et al., 2006; Marande et al., 2005; Simpson et al., 2002).

Estudios basados en las secuencias del gen 18S del ARN ribosomal (ARNr) han propuesto tratar el orden *Kinetoplástida* como una clase y dividirla en dos sub-clases, la *Prokinetoplastina*, constituida por los géneros *Ichthyobodo* y *Perkinsiella* y de origen temprano y la *Metakinetoplastina*, un clado de origen tardío constituido por los ordenes *Eubodonida*, *Parabodonida*, *Neobodonida* y *Trypanosomatida* (Moreira et al., 2004). Estudios filogenéticos adicionales realizados con secuencias de proteínas de choque térmico (HSP70 y HSP90) y ARNr de la sub-unidad pequeña ribosomal (SSU rRNA, por sus siglas en inglés) apoyan la propuesta sub-división de los kinetoplástidos (Simpson et al., 2004; Simpson et al., 2002).

Por su parte, la familia *Trypanosomatidae* incluye un amplio número de especies parásitos de vertebrados, invertebrados y plantas, las cuales se incluyen en 9 géneros, 5 de los cuales son monogenéticos e infectan insectos (*Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Leptomonas*, *Herpetomonas* y *Rhynchoidomonas*) y los 4 restantes digenéticos, *Trypanosoma*, *Leishmania* y *Endotrypanum* parásitos de vertebrados e invertebrados; y *Phytomonas* cuyos miembros son fitoparásitos (Stevens et al., 2001; McGhee & Cosgrove, 1980).

Las relaciones entre los kinetoplástidos y la posición de los tripanosomátidos dentro de la sub-clase se mantienen inciertas. Estudios realizados con las secuencias del SSU rRNA, plantean que los tripanosomátidos surgieron tempranamente en el grupo (Moreira et al., 2004), mientras que filogenias

construidas con las proteínas de choque térmico de 70 y 90 kDa, indican un surgimiento tardío de los tripanosomátidos, los cuales se originaron dentro de los bodoninos y tienen una estrecha relación con *Bodo saltans*, un protozoo perteneciente a la sub-clase *Eubodonida* (Simpson et al., 2006; Simpson et al., 2004).

Entre tanto, el género *Trypanosoma* ha sido dividido en 7 subgéneros, que incluyen dos secciones, la sección Estercoraria (sub-géneros *Schizotrypanum*, *Megatrypanum* y *Herpetosoma*) y la Salivaria (sub-géneros *Nannomonas*, *Trypanozoon*, *Duttonella* y *Pycnomonas*). De acuerdo al desarrollo de la infección en el vector, los tripanosomas que completan su ciclo de vida en las glándulas salivales pertenecen a la sección Salivaría, mientras que los tripanosomas que migran al extremo final del intestino del vector se incluyen dentro de la sección Estercoraría (Santa-Izabel et al., 2004; Hoare, 1972).

Estudios realizados por Simpson et al., 2006; Hamilton et al., 2004 y Stevens et al., 1998, consideran al género *Trypanosoma* un grupo monofilético de parásitos protozoos, los cuales parece, aparecieron primero como parásitos monogenéticos de vertebrados o invertebrados acuáticos y posteriormente se adaptaron al ciclo de transmisión digenético, el cual involucraba vertebrados acuáticos y sanguijuelas como vectores. La transición a insectos vectores pudo haber venido después, seguida a la colonización de la tierra por parte de los vertebrados y a la aparición de los hemípteros y dípteros (Stevens et al., 2001).

3.4 Clasificación de *T. rangeli*

Hasta el momento, *T. rangeli* se incluye dentro del subgénero *Herpetosoma*, el cual se ubica en la sección Estercoraria (Santa-Izabel et al., 2004, Hoare, 1972).

A pesar de que se ha reportado que *T. rangeli* puede ser ocasionalmente transmitido por la inoculación de las heces infectadas del vector (D'Alessandro & Saravia, 1999), su transmisión se da principalmente por la picadura de un vector infectado (Guhl & Vallejo, 2003; Cuba 1998), razón por la cual su posición taxonómica y relación evolutiva dentro del género *Trypanosoma* ha sido controversial, llegando a ser considerado como un subgénero enlace entre los flagelados pertenecientes a la sección Estercoraria y Salivaria. Dado que *T. rangeli* presenta características únicas (como penetrar el intestino del vector, pasar a hemolinfa para finalmente invadir y desarrollar las formas infectivas en glándulas salivales, patogenicidad para el vector e incapacidad de desarrollar infección en el hospedero vertebrado), suficientes para ser considerado perteneciente a un grupo taxonómico independiente, se ha propuesto ubicarlo en un nuevo subgénero, el *Tejeraia* dentro de la sección Salivaría (Añez, 1982).

Estudios realizados por Stevens et al., 1998, basados en las secuencias del gen 18S del ARNr separaron las especies de tripanosomas transmitidos por saliva (*T. brucei*) de las transmitidas por heces (*T. cruzi*) en dos clados bien constituidos, suministrando evidencia de la evolución diferente de cada uno de estos grupos. En este mismo estudio, una cepa de *T. rangeli* usada se ubicó dentro del grupo de los parásitos transmitidos por heces, clasificándose firmemente como una especie del sub-género *Schizotrypanum*, sección Estercoraría. Hallazgos posteriores ampliando el número de cepas de *T. rangeli* y usando secuencias del ARN ribosomal confirmaron este resultado,

indicando la estrecha relación evolutiva entre *T. rangeli* y *T. cruzi* (Stevens et al., 1999).

Análisis posteriores basados en las secuencias de los espaciadores transcritos internos de los genes ribosomales (ITS, por sus siglas en inglés) y los SSU rRNA, realizados con un número mayor de cepas de tripanosomas, mostraron que las cepas de *T. rangeli* forman un clado independiente, el cual se encuentra estrechamente relacionado al clado compuesto por tripanosomátidos de la sección Estercoraria (Maia da Silva et al., 2004).

Adicionalmente, otros estudios del ADN nuclear realizados con los genes codificantes de la proteína KMP-11 (Diez et al., 2005) y la histona H2A (Puerta et al., 2009; Suárez et al., 2007; Cuervo et al., 2006) han mostrado que *T. rangeli* se encuentra más próximo filogenéticamente a *T. cruzi* que a *T. brucei*, contrario a lo inicialmente reportado para el gen de la β -tubulina, con el cual se encontró a *T. rangeli* más cercano a *T. brucei* que a *T. cruzi* (Amorim et al., 1993).

A pesar de la estrecha relación evolutiva entre *T. cruzi* y *T. rangeli*, varios estudios realizados, entre ellos, con la secuencia completa del ARNr 5,8S (ITS1+5,8S+ITS2) y la región intergénica del gen *h2a* han mostrado un alto grado de polimorfismo inter-específico, el cual permite diferenciar claramente las cepas de *T. rangeli* de las de *T. cruzi* y agruparlas siempre en clados cercanos pero diferentes (Puerta et al., 2009; Beltrame et al., 2005; Maia da Silva et al., 2004).

Los anteriores hallazgos hacen que la posición taxonómica y la relación evolutiva de *T. rangeli* con las especies pertenecientes al género *Trypanosoma* sea de llamativo interés, además de que debe ser sujeta a revisión y análisis más riguroso.

3.5 Variabilidad de *T. rangeli*

Adicional a la controvertida posición taxonómica de *T. rangeli*, debida a sus peculiares características biológicas, este flagelado presenta una alta variabilidad intra-específica. Los primeros reportes sobre esta variabilidad fueron realizados por Souza & Dawson, 1976 y Zeledón, 1965, quienes encontraron que las cepas de *T. rangeli* aisladas de Panamá, no se desarrollaban en el vector *R. prolixus*, contrario a lo encontrado para las cepas aisladas de Colombia y Venezuela.

Estudios posteriores basados en isoenzimas y amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) indicaron que dicha variabilidad entre las cepas de *T. rangeli* se incrementaba cuando la distancia geográfica entre los aislados aumentaba, siendo las cepas de Colombia, Venezuela y Honduras más parecidas entre sí, que a las cepas de Santa Catarina (Brasil) (Steindel et al., 1994), llegando a constituir dos grupos distintos de cepas, uno formado por las cepas de Brasil y el otro, por las cepas procedentes de Centro América y la región Norte de Sur América. La existencia de estos dos grandes grupos de cepas fue igualmente confirmada por estudios basados en la huella del ADN (del inglés DNA fingerprinting) y caracterización del gen mini-exon (Grisard et al., 1999; Steindel et al., 1994; Macedo et al., 1993).

Posteriormente, estudios del ADN del cinetoplasto de *T. rangeli* evidenciaron en una misma región de Colombia la existencia de dos grupos molecularmente diferentes. Un grupo de cepas aisladas de *R. prolixus* las cuales presentan en su cinetoplasto tres clases de minicírculos (KP1, KP2 y KP3) y otro grupo de cepas aisladas de *R. colombiensis* que presentan solamente los minicírculos KP2 y KP3 (Vallejo et al., 2002; Vallejo, 1998). Adicionalmente, varios estudios revelaban que estos grupos de *T. rangeli* no solamente diferían en la clase de minicírculo que portan, sino que la diversidad se extendía a otras características moleculares, bioquímicas y biológicas (Vallejo et al., 2000) (Tabla 1).

Tabla 1. Características de los grupos 1 y 2 de *T. rangeli*.

	Grupo 1	Grupo 2	Referencia
Minicírculo KP1	Ausente	Presente	Vallejo et al, 2003; 2002; 1998
Amplificación del gen mini-exón	380 pb	340 pb	Vallejo et al., 2003; Carranza et al., 2001
% lisis mediada por el complemento	0,5 – 5 %	36,6 – 31,4 %	Bernal et al., 2001
Afinidad por lectinas (<i>Phytolaca americana</i>)	Negativo	Positivo	Bernal et al., 2001
Producción de neuroaminidasas	Mayor	Menor	Bernal et al., 2001
Reactividad cruzada antigénica	Si	Si	Aya et al., 2001

Teniendo en cuenta lo anterior, y la asociación entre el perfil de minicírculos y el polimorfismo de amplificación del gen mini-exón (Tabla 1), Vallejo et al., 2003; 2002 dividieron a *T. rangeli* en dos grupos epidemiológicamente importantes, definidos según la ausencia o presencia del minicírculo KP1, el grupo 1 ó KP1(-) y 2 ó KP1(+) del parásito.

Adicionalmente, estudios realizados por Urrea et al., 2005 y Vallejo et al., 2004 demostraron que los dos grupos establecidos de *T. rangeli* se encuentran estrechamente asociados con las líneas evolutivas del vector. Es así como, las cepas que carecen del minicírculo KP1 han sido aisladas de las glándulas salivales del vector *R. colombiensis*, *R. ecuadoriensis* y *R. pallescens* del grupo Pallescens, mientras que las cepas que poseen el minicírculo KP1 han sido aisladas de las glándulas salivales de los vectores *Rhodnius neglectus* y *R. prolixus* del grupo Prolixus, indicando que *T. rangeli* puede subdividirse en al menos dos linajes, cada uno de ellos asociado a diferentes grupos de especies de *Rhodnius*. Es importante resaltar que en la hemolinfa del vector *R. prolixus* se ha demostrado la existencia de un factor tripanolítico, de naturaleza proteica, el cual actúa como una barrera biológica impidiendo la transmisión de las cepas KP1(-) por la picadura del vector, lo que determina la actividad vectorial del insecto (Pulido et al., 2008).

Estudios adicionales realizados con diferentes marcadores moleculares confirman la propuesta división de *T. rangeli*. Es así como, el uso del gen 24S α del ARN ribosomal y del gen mini-exón permitieron claramente diferenciar los grupos establecidos del parásito (Puerta et al., 2009). Adicionalmente, estudios de RAPD y de reacción en cadena de la polimerasa de baja astringencia con un único oligonucleótido (LSSP-PCR) orientados a evaluar la heterogeneidad dentro de cada uno de los subgrupos propuestos

del parásito, confirmaron el polimorfismo de los grupos KP1(-) y KP1(+) de *T. rangeli* reforzando la hipótesis de dos linajes filogenéticos con una relativa variabilidad intra-específica. Las cepas KP1(+) colombianas son menos homogéneas entre ellas que las KP1(+) de Brasil, sin embargo, la similitud observada entre los aislados KP1(+) de Brasil y Colombia sugiere un origen filogenético común (Márquez et al., 2007).

Por otra parte, Vallejo et al., 2007 mediante estudios de RAPD con cepas aisladas de varios insectos vectores del grupo Pallescens y Prolixus, confirmaron el hecho de que las cepas de *T. rangeli* aisladas del grupo Pallescens (KP1(-)) son genéticamente divergentes de las cepas del grupo Prolixus (KP1(+)), siendo importante el hecho de que la distancia genética de Nei observada entre ellas fue muy alta, semejante a la reportada entre especies diferentes. Adicionalmente, se observó que la divergencia genética entre los aislados de *T. rangeli* va más allá de los grupos KP1(-) y KP1(+) propuestos, encontrándose la existencia de 4 grupos de cepas asociados con la especie de *Rhodnius* evaluada, evidencia de que cada especie del vector transmite al hospedero vertebrado poblaciones del parásito con claras diferencias genotípicas, soportando la propuesta co-evolución entre las poblaciones del parásito y su vector (Vallejo et al., 2007).

De igual forma, estudios previos realizados con los patrones de RAPD de ITS y SSU rRNA en varias cepas de *T. rangeli* aisladas de humanos, primates no humanos y otros mamíferos silvestres, demostraron que *T. rangeli* es más complejo de lo que inicialmente se había descrito, proponiéndose la existencia de por lo menos 4 subgrupos del parásito, diferentes a los encontrados por Vallejo et al., 2007. El grupo A, constituido por varias cepas clasificadas como KP1(+), aisladas de Centro América (Honduras y Guatemala), el norte de Sur América (Colombia y Venezuela) y Brasil; el

grupo B, formado exclusivamente por cepas brasileras; el grupo C, constituido por 2 cepas de El Salvador y Panamá y el grupo D, conformado por una cepa KP1(-) procedente de Santa Catarina, Brasil (Da Silva et al., 2004; Maia da Silva et al., 2004). Análisis recientes realizados con las secuencias del gen de la secuencia líder (SL) o mini-exón mostraron la presencia de un nuevo linaje, el grupo E constituido por una cepa aislada de un murciélago (*Platyrrinus lineatus*) procedente de Miranda, Brasil (Maia da Silva et al., 2009).

Otros análisis realizados con base en el polimorfismo del gen SL y de los genes de la proteasa similar a la catepsina-L (Ortiz et al., 2009) confirmaron la presencia de los 5 linajes filogenéticos previamente descritos por Maia da Silva et al., 2009; 2004, dentro de *T. rangeli*, los cuales muestran un solapamiento significativo con la distribución de las especies del vector *Rhodnius*. El grupo o linaje A, relacionado con *R. prolixus* doméstico y silvestre; el linaje B relacionado con *R. brethesi* silvestre, el cual es el más divergente de todos los linajes y el linaje C, relacionado con *R. pallescens* doméstico y silvestre. Además se observó que los aislados de Brasil se segregaron en los linajes A (*R. prolixus*) y B (*R. brethesi*) y los aislados colombianos se segregaron en los linajes A (*R. prolixus*) y C (*R. pallescens*) (Maia da Silva et al., 2007). Resultados concordantes con los encontrados por Márquez et al., 2007, quienes observaron que los aislados de Brasil transmitidos por *R. neglectus* (grupo Prolixus) y de Colombia (aislados de *R. prolixus*) son similares, indicativo de un origen filogenético común.

Por su parte, los estudios realizados con los genes de la proteasa similar a la catepsina-L, asociaron varias cepas aisladas del vector *R. pictipes* (Brasil) con el linaje E, el cual mostró ser cercano al linaje A (Ortiz et al., 2009).

Adicional a los hallazgos anteriores, la concordancia encontrada entre las filogenias de *T. rangeli* y *Rhodnius* revela una larga historia de co-evolución y co-divergencia entre ambas especies. De igual forma la congruencia entre los linajes encontrados con los diferentes marcadores evaluados reflejan la ausencia de flujo génico entre los grupos propuestos de *T. rangeli*, así como un fuerte desequilibrio de ligamiento entre ellos (Maia da Silva et al., 2007).

3.6 Estudios del ADN de *T. rangeli*

En comparación con otras especies de tripanosomátidos, el genoma de *T. rangeli* no es bien conocido, presentando un número pequeño de entradas en la base de datos de GenBank, 310 de nucleótidos y 151 de proteínas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gquery/?term=Trypanosoma+rangeli>, revisado 31/01/2010). Razón por la cual, poco se conoce acerca de sus características biológicas, de su controversial posición taxonómica y su filogenia.

Teniendo en cuenta lo anterior y la importancia de *T. rangeli* en el contexto de la biología de *T. cruzi*, recientemente se ha dado inicio al estudio del transcriptoma de *T. rangeli*, el cual busca promover el descubrimiento génico a través del estudio de etiquetas de secuencias expresadas (EST) y de EST de marcos de lectura abiertos (ORESTES) tanto en formas epimastigotas como tripomastigotas de la cepa Choachí KP1(+) y SC-58 KP1(-) del parásito (Quimelli et al., 2004).

3.6.1 Cariotipo

Dada la limitada compactación que sufre el ADN de los tripanosomas durante la mitosis (Solari, 1980), el cariotipo molecular de estos parásitos ha sido analizado mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).

Para *T. rangeli* se ha encontrado que los cromosomas se encuentran divididos en dos grupos, uno conformado por cromosomas de tamaño intermedio y el otro por unos pocos cromosomas de gran tamaño, variando entre 350 kb y 5,7 Mb (Henriksson et al., 1996).

Sin embargo y teniendo en cuenta que el número de cromosomas observado se relaciona directamente con las condiciones del corrido electroforético usadas, se ha reportado variabilidad en el número y tamaño de los cromosomas intermedios, es así como Henriksson et al., 1996, reportaron 16 a 20 cromosomas entre 350 a 1.500 kb; Tanaka et al., 1994, 14 cromosomas entre 350 a 2.000 kb y Toaldo et al., 2001, 16 a 24 cromosomas entre 350 a 3.130 kb.

Por otra parte, polimorfismo en la localización cromosómica de algunos genes de *T. rangeli* también ha sido reportado para: la Cisteína proteinasa (CP) (Martínez et al., 1995), las proteínas fijadoras de calcio (TrCaBP) (Porcel et al., 1996), la β -tubulina (Toaldo et al., 2001), la KMP-11 (Diez et al., 2005; Urueña et al., 2004), la histona H2A (Cuervo et al., 2006) y las proteasas similares a catepsina-L (Ortiz et al., 2009), los cuales varían su localización de acuerdo a la cepa analizada.

3.6.2 Genes nucleares

Un análisis de la base datos de GenBank (31/01/2010) usando a *T. rangeli* como entrada reveló el poco conocimiento existente del ADN nuclear de dicho parásito. Los genes que codifican la histona H2A (No. de acceso AF169130, AY147905), KMP-11 (No. de acceso EF101350, EF101349, DQ194346, DQ194345, DQ194344, DQ194343, DQ194342, DQ194341, AY147904), factor de elongación 1 α (No. de acceso AY785727, AY785728,

AY785729), ARN nucleolares pequeños (No. de acceso AY028385, EF100612), mini-exón (No. de acceso X62775), glicoproteína de superficie TrTel4 (No. de acceso AF426022), proteína de unión a calcio (No. de acceso Z54192), tirosina-amino transferasa (No. de acceso AF165323), precursores de sialidasas (No. de acceso U83180), un gen homólogo a las trans-sialidasas (No. de acceso L14943) y de la familia de las trans-sialidasas (No. de acceso FJ404803, FJ404802), proteasas similares a catepsina L (No. de acceso FJ997556, FJ997557, FJ997558, FJ997559, FJ997560, FJ997561, FJ997562, FJ997563, FJ997564, FJ997565, FJ997566, FJ997567, FJ997568, FJ997569, FJ997570, FJ997571, FJ997572, FJ997573 y FJ997574), fosfatasa específica de tirosina (EU325665, EU325664), entre otros, y varios ARN ribosomales son algunos de que aparecen reportados con secuencias completas.

Dentro de los genes de *T. rangeli* que han sido parcial o completamente caracterizados, como los que codifican la α y β tubulina (Esquenazi et al., 1989), mini-exón (Aksoy et al., 1992), cisteína proteinasa (CP) (Martínez et al., 1995), proteínas de unión a calcio (TrCaBP) (Porcel et al., 1996), sialidasas (Buschiazzo et al., 1997), tirosina-amino transferasa (TAT) (Bontempi et al., 2000), histona H2A (Cuervo et al., 2006; Puerta et al., 2000), ARN nucleolares pequeños (Nocua et al., 2009; Morales et al., 2002), KMP-11 (Diez et al., 2005) y proteína transportadora de D-Glucosa (TrHT1) (Miletti et al., 2006), entre otros, han mostrado, en general una alta identidad con sus homólogos de *T. cruzi*, además, que se encuentran repetidos y organizados en tándem, característica común a la familia de los tripanosomátidos.

3.6.3 ADN del cinetoplasto

El ADN del cinetoplasto (ADNk) presente en el orden *Kinetoplastida*, representa el genoma mitocondrial de estos parásitos y constituye entre el 10 y 20 % del ADN celular. Éste se encuentra formado por una red compacta compuesta por la concatenación de maxicírculos y minicírculos. Los maxicírculos se caracterizan por ser moléculas de 20 a 38 kb, repetidas unas 20 a 50 veces por genoma, codificantes de algunas de las enzimas mitocondriales y ARN ribosomales de la mitocondria, siendo relativamente conservados entre las diferentes especies de cinetoplastidos (Recinos et al., 1994; Thomas et al., 1993).

Los minicírculos se caracterizan por tener un tamaño de 0,7 a 2,5 kb, repetirse entre 5.000 y 10.000 veces por genoma y codificar los ARN guías que participan en la edición de los genes codificados en los maxicírculos (Recinos et al., 1994; Thomas et al., 1993). Todos los minicírculos presentan por lo menos una región conservada o “minirepeat” que varía entre 100 y 200 pb. Cada una de estas regiones presenta 3 bloques de secuencia conservada (BSC) (Figura 3) los cuales son uniformes en su secuencia, ordenamiento y distancia entre ellos (Vallejo, 1998). De estos BSC, el BSC-3 o secuencia invariable de 12 mer ha sido propuesto como el origen de replicación.

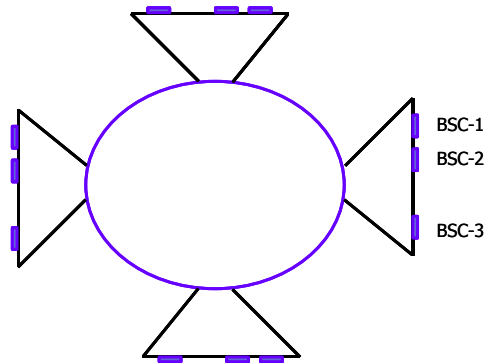


Figura 3. Representación esquemática del minicírculo KP3 de *Trypanosoma rangeli*. Se muestran las cuatro regiones conservadas y en cada una de ellas se representan los bloques de secuencia conservada (BSC-1, BSC-2 y BSC-3). Tomado de Vallejo, 1998.

Cada especie de tripanosomátido posee el mismo número de regiones; por el contrario, *T. rangeli* es hasta ahora el único tripanosomátido en el cual se ha podido comprobar la existencia de minicírculos con una, dos y cuatro regiones conservadas o “minirepeat” en una misma cepa del parásito (Vallejo, 1998).

En cuanto a la estructura concreta del cinetoplasto de *T. rangeli*, se han encontrado tres tipos de minicírculos, denominados KP1, KP2 y KP3. El primero conformado por 1.764 pb, contiene una copia de la región conservada y la secuencia invariante de 12 mer presenta una sustitución (Vallejo, 1998; Vallejo et al., 1994). El siguiente tipo de minicírculo, KP2 se caracteriza por poseer 1.587 pb y tener dos copias de la región conservada (Vallejo et al., 1994). KP3 por su parte, presenta un tamaño de 1.600 pb y contiene 4 bloques de secuencias conservadas (Vallejo, 1998).

3.7 Proteínas de choque térmico

Desde la descripción inicial por Ritossa en 1962 del abultamiento inducido en los cromosomas de glándulas salivales de *Drosophila busckii* por incremento

en la temperatura y la posterior identificación del producto génico por Tissieres et al., 1974; las proteínas de choque térmico (HSP) han sido identificadas en las células de todos los organismos tanto procariotes como eucariotes. Dichas proteínas se encuentran presentes en el citosol de procariotes y en el citosol, núcleo, retículo endoplásmico, mitocondria y cloroplastos de los eucariotes. Las proteínas de choque térmico son proteínas evolutivamente ancestrales y altamente conservadas en su secuencia de aminoácidos, regulación y funciones bioquímicas (Lindquist & Craig, 1988), indicativo de su función esencial en la supervivencia celular.

La nomenclatura inicial para las HSP fue basada en su peso molecular, pero la reciente disponibilidad de secuencias de nucleótidos y aminoácidos ha llevado a una clasificación sistemática con bases filogenéticas. Miembros de una familia muestran un alto grado de identidad de secuencia mientras que no hay homología entre familias (Robert, 2003). Las HSP se encuentran clasificadas dentro de grupos de acuerdo a su filogenia y estructura (Sghaier et al., 2004), siendo las principales clases: HSP de alto peso molecular (≥ 100 kD), HSP90 (81 a 90 kD), HSP70 (65 a 80 kD), HSP60 (55 a 64 kD), HSP40 (35 a 54 kD) y las pequeñas HSP (≤ 34 kD) (Macario & Conway, 2005).

Las proteínas de choque térmico son expresadas constitutivamente y en respuesta a estrés celular, en condiciones normales las HSP constituyen el 5% de las proteínas intracelulares totales, sin embargo bajo condiciones de estrés pueden aumentar su nivel hasta un 15% o más (Srivastava, 2002). Aunque, por su descubrimiento las HSP se asocian a condiciones de estrés térmico, dichas proteínas también pueden ser inducidas bajo condiciones de estrés ambiental (radiación ultravioleta, metales pesados), patológico

(infección o malignidad) y estímulos fisiológicos (factores de crecimiento o diferenciación celular) entre otros, un fenómeno conocido como respuesta al estrés (Tsan & Gao, 2004), el cual involucra la inhibición de muchos de los genes de expresión constitutiva y activación de los genes de estrés, los cuales no son transcritos o son transcritos a bajos niveles en ausencia de estrés (Gao et al., 2004, Verbeke et al., 2001). Actualmente se sabe que estas proteínas también desempeñan funciones fisiológicas importantes en condiciones celulares normales, denominándose “chaperonas moleculares” (Requena et al., 1997).

Las chaperonas moleculares son definidas como un grupo de proteínas no relacionadas entre sí, que en condiciones normales participan en el plegamiento, ensamblaje y desensamblaje de proteínas y complejos macromoleculares, translocación de polipéptidos a organelos tales como mitocondria, retículo endoplásmico y cloroplastos, presentación antigénica y desensamblaje de vesículas recubiertas de clatrina (Feige & Polla, 1994). En general las proteínas chaperonas son un grupo de proteínas funcionalmente competentes bajo condiciones de daño o estrés celular, la función típica de estas proteínas es asistir a la cadena polipeptídica nascente para lograr una conformación funcional y luego ayudar al transporte de la nueva proteína al compartimento celular donde cumple su función (Macario & Conway, 2005).

Las principales funciones atribuidas a las HSP incluyen (i) Prevenir los agregados y malos plegamientos de proteínas bajo condiciones de estrés físico; (ii) Funcionar como chaperonas moleculares en el transporte de proteínas entre organelos celulares; y (iii) contribuir al correcto plegamiento de proteínas nascentes y alteradas (Lindquist & Craig, 1988). Bajo condiciones de estrés térmico o químico, estas proteínas se inducen transcripcionalmente y facilitan la renaturación de las proteínas denaturadas,

confiriendo así tolerancia al estrés, que de otra manera sería letal para la célula (Hartl, 1996). Adicionalmente, las HSP han sido implicadas en enfermedades autoinmunes, presentación antigénica e inmunidad a tumores (Tsan & Gao, 2004).

De particular interés resultan los organismos digenéticos, en los cuales ocurre un cambio en la temperatura ambiental de 22 – 28 °C a 37 °C en el momento de la infección, acompañado de otros inductores de estrés. En parásitos, los genes HSP se inducen muy pronto durante la infección y juegan un papel muy importante en la adaptación del parásito al nuevo ambiente (Maresca & Kobayashi, 1994), encontrándose proteínas HSP en el curso de varias infecciones parasitarias, tales como aquellas producidas por *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Plasmodium*, *Giardia*, *Schistosoma* y nematodos (Shapira et al., 1988). En estos organismos se ha visto que la inducción de las HSP es fundamental para los cambios morfológicos que acompañan la entrada en el huésped mamífero (Shapira et al., 1988). Adicionalmente, análisis del proteoma de *T. cruzi* y *Leishmania donovani* al momento de la diferenciación mostraron un incremento en la síntesis de HSP60, HSP70 y HSP90 (Paba et al., 2004; Bente et al., 2003). A pesar de lo anterior, no es claro si la expresión de las proteínas de choque térmico es parte del proceso de diferenciación por sí mismo o es un fenómeno involucrado en la adaptación a las nuevas condiciones medio ambientales.

De otra parte, se ha visto que el aumento de la expresión de HSP70 confiere a *Leishmania chagasi* resistencia a la toxicidad mediada por peróxido de hidrógeno (Miller et al., 2000) y protege parcialmente del daño causado por sales de antimonio a cepas de *Leishmania tarentolae* (Brochu et al., 2004).

3.7.1 La proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70)

La familia de proteínas HSP70 constituye el grupo de proteínas más conservado presente en todos los organismos (Boorstein et al., 1994). Análisis filogenéticos han identificado 4 grupos monofiléticos entre las HSP70 de los organismos eucariotas, cada uno con una localización intracelular común (Folgueira & Requena 2007). La HSC70 presente en el citosol y de expresión constitutiva, la HSP70 proteína con localización citoplasmática o nuclear e inducible por estrés, Bip/Grp78 del retículo endoplásmico y la mt-HSP70 mitocondrial (Hartl & Hayer-Hartl, 2002; Fink, 1999; Lindquist & Craig, 1988).

En *Escherichia coli* y otras bacterias, la principal proteína HSP70 es conocida como la proteína dnaK, encontrada también en el genoma de cloroplastos y de algas rojas, la cual es muy similar a la mt-HSP70 de organismos eucariotas (Gupta et al., 1994).

En levaduras existen al menos 10 proteínas HSP70 conocidas: SSA1 a SSA4, SSB1, SSB2, SSC1, SSD1 (KAR2), SSE1 (MSI3) y SSE2. Por su parte, *Drosophila* tiene al menos 8 genes diferentes para la proteína HSP70: HSP70, HSP68 y HSC-1 al 6, así mismo en mamíferos se han reportado 8 diferentes proteínas: HSPA1 a 6, HSC70 y GRP78 (www.expasy.org; Heat shock Hsp70 proteins family signatures. Documentation PDOC00269). Mientras que en el genoma humano han sido identificados 47 genes *hsp70*, de los cuales 17 corresponden a genes verdaderos y 30 son pseudogenes (Brocchieri et al., 2008)

La hipótesis evolutiva más aceptada es que los genes *hsp70* citoplasmáticos y del retículo endoplasmático surgieron como resultado de un evento de duplicación que ocurrió antes del surgimiento del último ancestro común de

todos los eucariotas (Germot & Philippe, 1999), los cuales presentan en el citoplasma dos tipos de proteínas HSP70 principalmente, la constitutiva (HSC70) y la inducible (HSP70), las cuales presentan un alto grado de conservación entre ellas (Folgueira & Requena, 2007). Por otra parte, Simpson et al., 2004 estudiando la evolución de los kinetoplástidos con proteínas de choque térmico y definieron 3 grupos de proteínas HSP70 citoplasmáticas en estos organismos, denominadas HSP70-A, HSP70-B y HSP70-C. El grupo de proteínas HSP70-A constituido por secuencias de proteínas citosolicas previamente reportadas y consideradas “normales” y los nuevos grupos, HSP70-B y HSP70-C los cuales representan dos clados hermanos, evolutivamente diferentes que surgieron por eventos de duplicación génica. De acuerdo a estos hallazgos, HSP70-B y HSP70-C forman un grupo monofilético evolutivamente distante del HSP70-A. Mientras que HSP70-C, ha sido hasta ahora sólo reportado en tripanosomátidos, HSP70-B ha sido reportado también en bodoninos, sugiriendo que la divergencia ocurrió tiempo atrás y que estas proteínas están restringidas a los *Euglenozoa* (Simpson et al., 2004).

Adicionalmente, Folgueira & Requena, 2007 encontraron dos nuevos miembros de la familia de proteínas HSP70 en tripanosomátidos, llamados HSP70.a los cuales no tienen homólogos aparentes en otros organismos y HSP70.b los cuales presentan una homología significativa con la proteína DnaK de algunas bacterias, incluso, mayor que la encontrada con los miembros de la familia de proteínas mt-HSP70 de kinetoplástidos, indicando que estos organismos contienen dos subfamilias de proteínas HSP70 de origen bacteriano, lo que sugiere la ocurrencia de dos eventos endosimbióticos en la historia evolutiva de estos parásitos (Folgueira & Requena, 2007).

Por otra parte, la proteína HSP70 está compuesta de dos dominios funcionales principales. Una región de 44 kDa localizada en el extremo NH₂-terminal de la proteína, la cual tiene actividad ATPasa y es altamente conservada (alrededor de un 64 % de los residuos son idénticos entre las HSPs de los eucariotes), se une a ADP y ATP e hidroliza ATP, y una región de 15 kDa cercana al extremo COOH-terminal que constituye el dominio de unión al polipéptido, la cual es más variable en su secuencia. Ambas regiones se unen por un sitio sensible a proteasas (Hartl & Hayer-Hartl, 2002; Fink, 1999; Demand et al., 1998; Freeman et al., 1995).

Los miembros de la familia HSP70 reconocen dominios no nativos de las proteínas que son expuestos durante la traducción, translocación de membrana, oligomerización y degradación de las proteínas. Las condiciones que alteran la estructura proteica resultan en la exposición de regiones hidrofóbicas que normalmente están escondidas dentro de la molécula, llevando a la agregación y pérdida de función de la proteína (Hartl, 1996). Las HSP70s se asocian a estas regiones peptídicas cortas, en conformación extendida o desplegada y ricas en aminoácidos hidrofóbicos, evitando que estas cadenas polipeptídicas se agreguen por interacciones hidrofóbicas intermoleculares (Luque et al., 2002). La capacidad de unión y separación, reversible de las regiones hidrofóbicas del péptido por parte de la HSP70 está dada por la función ATPasa propia de ella que previene y asiste en el establecimiento de la conformación nativa. Dichos cambios conformacionales mediados por la hidrólisis de ATP se estabilizan por una asociación altamente afín entre la HSP70 y el sustrato. Estos procesos a menudo se encuentran modulados por otro tipo de proteínas HSP pertenecientes a la familia HSP40, con capacidad de activación de la HSP70 (co-chaperonas), las cuales se unen al dominio ATPasa y a una región de 10 kDa COOH-terminal, altamente conservada en su secuencia de aminoácidos en todos los

miembros de la familia HSP70 de eucariotes (Luque et al., 2002; Demand et al., 1998; Freeman et al., 1995). Así pues, las chaperonas moleculares HSP70, estabilizan las cadenas polipeptídicas nacientes, protegiéndolas de la agregación y mediante los ciclos controlados de unión y separación proporcionan un entorno “seguro” para que la proteína pueda plegarse adecuadamente. Adicionalmente, se ha visto que la función chaperona de la HSP70 protege a la célula de una muerte celular programa inducida por estrés térmico interviniendo en la vía apoptótica a nivel de liberación de citocromo c y en la activación de la iniciación de la vía de las caspasas (Mosser et al., 2000).

Además de la función chaperona, las HSP70 ha sido implicadas en enfermedad y envejecimiento ya que presentan cambios a nivel funcional y cuantitativo relacionados con la senescencia celular (Macario & Conway, 2005).

También las proteína HSP70 han sido involucradas en varios estados de la respuesta inmune, iniciación de la producción de citoquinas proinflamatorias, reconocimiento y procesamiento antigénico, activación de células presentadoras de antígenos, presentación antigénica y procesos autoinmunes (Tsan & Gao, 2004; Robert, 2003). El mecanismo molecular por el cual la HSP70 participa en la respuesta inmune no ha sido bien elucidado. Sin embargo, es claro, que esta se une con péptidos bacterianos, virales y tumorales a través de su dominio de unión a péptidos y hace inmunogénico al péptido. Otro efecto de la HSP70 en el sistema inmune es la estimulación de la producción de IL-12, TNF- α y óxido nítrico, los cuales son mediados por el dominio COOH-terminal de la proteína (Lehner et al., 2004).

3.7.2 La proteína HSP70 de tripanosomátidos

Los genes que codifican las proteínas de choque térmico han sido caracterizados en *T. cruzi*, *T. brucei* y varias especies de *Leishmania*. En *T. rangeli*, Toaldo et al., 2001 reportaron su ubicación cromosómica en varias cepas del parásito. En general, dicho gen presentó polimorfismo en cuanto a su ubicación cromosómica dependiendo de la cepa del parásito evaluada y una localización en cromosomas en un rango entre 950 y 1.200 kb.

En *T. cruzi* más de 10 copias del gen *hsp70* han sido identificadas, las cuales se localizan en una sola agrupación génica, presentan polimorfismo en la secuencia de nucleótidos entre cada una de las unidades, tienen un tamaño de 2,5 kb, aproximadamente (Requena et al., 1988) y se ubican en cromosomas de 1.000 y 1.100 kb (Olson et al., 1994). En el proyecto genoma de *T. cruzi* (www.genedb.org) se han identificado 12 posibles genes *hsp70*, 3 HSP70-A, 2 HSP70-B, 3 HSP70-C, 2 HSP70.a y 2 HSP70.b, de los cuales sólo 6 tienen la secuencia completa para la región codificante, las cuales presentan polimorfismo en su tamaño. Sólo dos copias del gen han sido mapeadas juntas, unidas cabeza-cola (Tc00.1047053511211.170 y Tc00.1047053511211.160). Arner et al., 2007, basados en estudios computacionales de las secuencias reportadas en el proyecto genoma de *T. cruzi*, reportan 18 copias anotadas en el borrador del genoma para la familia de genes *hsp70*, pero estiman que el número de copias para esta familia en el genoma *T. cruzi* puede llegar a 100.

Al igual que la mayoría de los genes de tripanosomátidos, estos genes se transcriben como un policistrón; sólo una clase de ARN mensajero (ARNm) de 2,4 kb aproximadamente es transcrito de la agrupación *hsp70* (Klein et al., 1995), el cual es constitutivo a 28 °C, sin embargo después de un choque térmico a 37 °C la abundancia del ARNm *hsp70* se incrementa 4 veces,

dando lugar a un aumento de la proteína, la cual empieza a disminuir con el aumento en la temperatura (Requena et al., 1992). Se ha visto que a 42 °C se inhibe el procesamiento por poli-adenilación y trans-splicing de los transcritos *hsp70* de *T. cruzi* (Engman et al., 1995).

Poco se sabe acerca de la regulación de la expresión de los genes *hsp70* de *T. cruzi*. Giambiagi et al., 1996 observaron la expresión de 8 isoformas de la proteína HSP70, de las cuales 5 fueron sobre-expresadas luego de choque térmico. Por su parte, Requena et al., 1992 encontraron 9 isoformas para la proteína HSP70, las cuales fueron expresadas de manera diferente luego del choque térmico. En *Drosophila* y *Saccharomyces cerevisiae* existe evidencia de que las isoformas constitutivas e inducibles de la proteína HSP70 son codificadas por genes diferentes pero homólogos (Lindquist & Craig, 1988), por lo cual Requena et al., 1992 sugieren la existencia de diferentes genes *hsp70* dentro de la agrupación, evidenciado por el polimorfismo de restricción reportado entre las copias del gen *hsp70* de *T. cruzi* (Requena et al., 1988), las cuales están sometidas a vías regulatorias diferentes, similar a lo reportado para estos mismos genes en *T. brucei*, en el cual existen genes *hsp70* con diferente sensibilidad a la temperatura (Lee et al., 1990).

La proteína HSP70 de *T. cruzi* ha sido ampliamente caracterizada tanto molecular como bioquímicamente (Olson et al., 1994), encontrando que dicha proteína tiene una potente actividad ATPasa, que aumenta en presencia de péptidos, a favor de su actividad moduladora de la conformación de otras proteínas y que en condiciones de choque térmico, esta proteína migra masivamente al núcleo (Martín et al., 1993) o a la membrana celular (Giambiagi et al., 1993).

Los genes *hsp70* de *T. brucei* se han caracterizado en un locus de aproximadamente 23 kb y de transcripción constitutiva (Lee, 1995), en el cual se identificaron 5 genes (gen 2 a 6) organizados en tándem y un gen (gen 1) separado del tándem y localizado aproximadamente 6 kb corriente arriba de los genes 2 a 6, el cual presenta un extremo 3' divergente respecto a los genes organizados en el tándem (Lee et al., 1990; Glass et al., 1986). De manera interesante, se ha visto que el gen 1 y los genes 2 a 6 muestran diferente sensibilidad a la temperatura (Glass et al., 1986). El gen 1 de *T. brucei* genera un transcrito de 2.400 b, el cual no aumenta su expresión debido a choque térmico y se expresa a niveles bajos pero constitutivos en las formas sanguíneas y procíclicas del parásito, por lo cual ha sido considerado el gen *hsp70* "cognate" de *T. brucei* (Lee, 1995; Lee et al., 1990). Por su parte, se ha visto que los genes 2 a 6 son 100 veces más estables que el gen 1 (Lee et al., 1990) y son altamente expresados en las formas procíclicas y sanguíneas del parásito y a diferencia del gen 1, son sensibles a la temperatura (Lee, 1995; Lee & VanDerPloeg, 1990; Lee et al., 1990). Adicionalmente, se ha visto que la región 3' no traducida (UTR) de los genes *hsp70* de *T. brucei* se encuentra involucrada en el aumento de la estabilidad del ARNm en condiciones de choque térmico y que al igual que ocurre para muchos genes de tripanosomátidos, la regulación de la expresión ocurre principalmente a nivel post-transcripcional (Lee, 1998).

Por otra parte, los genes *hsp70* de varias especies de *Leishmania* han sido mejor caracterizados. *Leishmania major* posee 2 loci HSP70 independientes pero ubicados en un mismo cromosoma, uno de los cuales contiene 4 genes agrupados inducidos por temperatura mientras que el otro contiene un único gen cuya expresión no es afectada por la temperatura (Lee et al., 1988).

En *Leishmania donovani* se ha observado la presencia de 12 a 15 copias del gen *hsp70* arregladas en tándem y ubicadas en un único cromosoma (MacFarlane et al., 1990), mientras que para *Leishmania amazonensis* se ha visto la presencia de 7 genes organizados en tándem y un octavo localizado en un sitio distante, pero en el mismo cromosoma (Bock & Langer, 1993).

En *Leishmania infantum* hay 6 genes HSP70 arreglados en tandem cabeza-cola (Quijada et al., 1997), los cuales muestran muy poca divergencia en su secuencia. Todos estos genes son conservados en su secuencia 5'UTR y región codificante, pero el gen HSP70-6 (HSP70-II) varía en su secuencia en la región 3'UTR. Dicha secuencia se ha que visto es la encargada de la regulación a nivel post-transduccional de la expresión de los genes HSP70 en *L. infantum*, ya que participa en la estabilidad del ARNm, además de promover su unión al ribosoma en condiciones de choque térmico (Folgueira et al., 2006; Folgueira et al., 2005).

En general, Folgueira et al., 2006 reportaron que la organización del locus *hsp70* entre las especies de *Leishmania* se encuentra conservada, varios genes repetidos en tándem y el último del tándem (HSP70-II) con una región 3'UTR divergente. Adicionalmente, un polimorfismo de restricción para la enzima *BamHI* permite la diferenciación entre especies del viejo mundo (*L. infantum*, *L. major* y *L. tropica*) y del nuevo mundo (*L. mexicana* y *L. amazonensis*) (Folgueira et al., 2006). De manera interesante, en *L. braziliensis* el gen HSP70-II no ha podido ser identificado, además el patrón de restricción para la enzima *BamHI* difiere del observado en las otras especies del nuevo mundo, por lo cual se considera que el locus *hsp70* en *L. braziliensis* es menos conservado respecto al de otras especies de *Leishmania* (Folgueira et al., 2006).

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Aislar y caracterizar los genes codificantes de la proteína de choque térmico HSP70 de *Trypanosoma rangeli* en cepas KP1(-) y KP1(+) del parásito, obtener la proteína recombinante y usarla en ensayos inmunológicos preliminares.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar la presencia de los genes *hsp70* en las cepas Tre KP1(-) y H14 KP1(+) *T. rangeli*.
2. Determinar y comparar la organización genómica y estructura de los genes *hsp70* entre las cepas Tre KP1(-) y H14 KP1(+) de *T. rangeli* y de estas con *T. cruzi* y otros tripanosomatidos.
3. Determinar la secuencia de los genes *hsp70* en las cepas Tre KP1(-) y H14 KP1(+) de *T. rangeli* y mediante estudios de bioinformática comparar las secuencias obtenidas entre ellas y con la secuencia respectiva de *T. cruzi* y otros tripanosomátidos.
4. Determinar la expresión de los genes *hsp70* de las cepas Tre KP1(-) y H14 KP1(+) de *T. rangeli*.
5. Obtener la proteína y realizar ensayos inmunológicos preliminares con la proteína HSP70 recombinante de *T. rangeli*.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 Parásitos:

Para la caracterización molecular del gen *hsp70* se trabajó con las cepas de *T. rangeli* H14, KP1(+) (MHOM/Hond/H14) y Tre, KP1(-) (Morales et al., 2002), las cuales fueron donadas por el Laboratorio de Parasitología del Instituto Nacional de Salud (INS) y caracterizadas en primera instancia mediante coloración de Giemsa y perfil enzimático de acuerdo al método descrito por Abderrazack et al., 1993 y modificado por Montilla et al., 1997 utilizando las siguientes enzimas para su caracterización: glucosa fosfato isomerasa (E.C.5.3.1.9. GPI), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (E.C.1.1.1.49. G6PD), isocitrato deshidrogenasa (E.C.1.1.1.42. IDH), malato deshidrogenasa (E.C.1.1.1.37. MDH), enzima málica (E.C.1.1.1.40. ME-1, ME-2), peptidasa (E.C.3.4.11.1. PE-1, PE-1,2), 6-fosfogluconato deshidrogenasa (E.C.1.1.1.44. 6PGD), aspartato aminotransferasa (E.C.2.6.1.1. ASAT), glutamato dehidrogenasa (NAD/NADP) (E.C.1.4.1.3. GDH), y fosfoglucomutasa (E.C.2.7.5.1. PGM). Posterior a su caracterización, el perfil de los minicírculos de ambas cepas fue evaluado en el Laboratorio de Investigaciones de Parasitología Tropical (Ibague, Tolima), utilizando los cebadores S35/S36/KP1L (Vallejo et al., 2002).

Para los ensayos de polimorfismo de restricción de los fragmentos obtenidos por reacción en cadena de la polimerasa (PCR-RFLP) se usaron las cepas KP1(+): 1545, D3493, San Agustín, Duran y Choachi de origen colombiano, las cepas H9 y H8GS originarias de Honduras, las cepas Palma 2 y Macias de origen venezolano, la cepa B450 de origen brasilero y la cepa R1625 aislada en el Salvador. Y las cepas KP1(-): SC58, SC66, SC61, SC68, SC70, SC74, SC75, SC76 y SC85 originarias de Brasil, 5048 y C23 de origen colombiano y la cepa Pit10, las cuales fueron amablemente cedidas por el Laboratorio de Protozoología de la Universidad Federal de Santa Catarina,

Brasil, por el Laboratorio de Parasitología del INS (cepa C23) y por el Laboratorio de Investigaciones de Parasitología Tropical (Ibagué, Tolima) (cepa Duran). El perfil de minicírculos y el grupo de cada una de las cepas fue corroborado mediante la PCR TrINT1/TrINT2 (Grisard et al., 1999).

La obtención en masa de los parásitos se realizó en medio LIT líquido (NaCl 4 g/l, KCl 0,4 g/l, Na₂HPO₄ 8 g/l, glucosa 2 g/l, triptosa 5 g/l, infusión de hígado 5 g/l, hemina 50 mg/l) suplementado con 15 % (v/v) de suero fetal bovino inactivado (SFB), 100 µg/ml de estreptomycin y 100 unidades/ml de penicilina a 26 °C.

5.2 Obtención de Ácidos Nucleicos

5.2.1 Obtención del ADN

El ADN de los parásitos se obtuvo según lo indicado por Sambrook et al., 2001. Una vez obtenida la masa de parásitos en fase logarítmica de crecimiento, se recolectó mediante centrifugación a 2.500 rpm durante 15 minutos (min), y se lavó con solución tampón PBS 1 X (NaCl 8 g/l, KCl 0,2 g/l, Na₂HPO₄ 1,44 g/l, KH₂PO₄ 0,24 g/l, pH 7,4). Tras la última centrifugación, los parásitos fueron resuspendidos en solución tampón de lisis a una concentración final de SDS al 1 % (p/v). Luego, el ADN fue extraído con fenol; fenol-cloroformo-isoamilico 1:24:1; cloroformo-isoamilico 24:1 (v/v) y precipitado con 2,5 volúmenes de etanol absoluto. Finalmente, la madeja de ADN obtenida se lavó con etanol al 70 % (v/v) y se resuspendió en TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4) (Puerta & Urueña, 2005).

El ADN extraído se analizó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1 % (p/v), utilizando TAE 1X como solución tampón (Tris-HCl 0,04 M pH 7,2, ácido acético glacial 29,6 mM y EDTA 2 mM pH 8,0), con posterior

tinción con bromuro de etidio (Sigma), a una concentración final de 0,5 µg/ml. Finalmente, la concentración de ADN se determinó por espectrofotometría de U.V a 260 nm, teniendo en cuenta que una unidad de densidad óptica (DO) a 260 nm equivale a 50 µg/ml de ADN de doble cadena (Sambrook et al., 2001).

5.2.2 Obtención del ARN

El ARN de los parásitos se obtuvo según lo indicado por Marañón et al., 2000b y Sambrook et al., 2001. Una vez obtenida la masa de parásitos en fase de crecimiento logarítmica, se recolectó mediante centrifugación a 2.500 rpm durante 15 min, y se lavó 3 veces con solución PBS 1 X (NaCl 8 g/l, KCl 0,2 g/l, Na₂HPO₄ 1,44 g/l, KH₂PO₄ 0,24 g/l, pH 7,4). Tras la última centrifugación, los parásitos fueron resuspendidos en solución tampón de lisis a una concentración final de NP-40 al 1 % (v/v) y centrifugados a 10.000 rpm durante 5 min, el sobrenadante fue recogido y con él se procedió a la extracción del ARN total mediante una extracción con fenol:cloroformo:isoamilico 1:24:1, dos extracciones con cloroformo:isoamilico 24:1 y precipitado con 2,5 volúmenes de etanol absoluto y 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 6,5. Finalmente, la madeja de ARN obtenida se lavó con etanol al 70 % (v/v), se resuspendió en agua destilada tratada con dietilpircarbonato (DEPC) y se almacenó a -70 °C hasta su uso.

La concentración de ARN se determinó por espectrofotometría de U.V a 260 nm, teniendo en cuenta que una unidad de densidad óptica (DO) a 260 nm equivale a 40 µg/ml de ARN (Sambrook et al., 2001).

5.3 Ensayos de “Southern blot”

5.3.1 Digestión del ADN con enzimas de restricción

Tres microgramos (μg) de ADN total fueron digeridos con las endonucleasas de restricción *SphI*, *PvuII* y *BglII*, las cuales poseen dianas de restricción en el gen *hsp70* de *T. cruzi* (No. de acceso a GenBank: X07083) y las enzimas *NotI*, *HindIII* y *Sau3AI*. Cada digestión se realizó utilizando para cada endonucleasa el amortiguador especificado por la casa comercial fabricante (Promega) y una relación de unidades de enzima/ μg de ADN a digerir, de diez, en un volumen final de reacción de 60 μl , durante 24 h a 37 °C.

5.3.2 Electroforesis

Los fragmentos de ADN resultantes de la digestión fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa (0,8 %) (p/v), visualizados por tinción con bromuro de etidio y transferidos a membranas de “nylon” (Hybond™-N+, Amersham Pharmacia Biotech), usando el método salino, según lo indicado por Puerta & Urueña, 2005.

5.3.3 Transferencia e inmovilización del ADN a soporte sólido

Brevemente, luego de la tinción con bromuro de etidio, los geles fueron sumergidos en HCl 0,25 N durante 10 min, con agitación suave, a temperatura ambiente (T.A), con el fin de realizar depurinación parcial del ADN y facilitar la transferencia del mismo a las membranas. Posteriormente, el ADN presente fue desnaturalizado, al sumergir los geles en una solución de NaOH 0,5 M y NaCl 1,5 M, durante 60 min, con agitación suave a T.A. Transcurrido este tiempo, la reacción fue neutralizada, sumergiendo los geles en una solución de NaCl 1,5 M y Tris-HCl 0,5 M pH 8,0, a T.A, con agitación suave. A los 60 min dicha solución fue removida y cambiada por SSC 2 X (solución salina citrato 20 X, NaCl 3 M, citrato de sodio 0,3 M pH 7,2).

Posteriormente, se realizó la transferencia por capilaridad, utilizando como amortiguador SSC 10 X, durante 12-16 horas (h). Una vez transcurrido el tiempo, las membranas se lavaron durante 10 min a T.A en SSC 2 X, se dejaron secar a T.A y finalmente se expusieron a luz U.V (254 nm), con el objetivo de fijar el ADN a las membranas las cuales fueron almacenadas a T.A hasta su uso (Puerta & Urueña, 2005).

5.4 Ensayos de “Northern blot”

Diez microgramos (μg) de ARN total del parásito fueron separados mediante electroforesis en gel desnaturante de agarosa al 1% (p/v) conteniendo formaldehído 2,2 M en solución tampón MOPS 1 X (MOPS 40 mM, acetato de sodio 5 mM, EDTA 1mM, pH 7,5). Tras su tinción con bromuro de etidio y visualización, el ARN fue transferido a membranas de “nylon” (Hybond™-N+, Amersham Pharmacia Biotech) usando una solución de NaOH 40 mM (Marañón et al., 2000b; Sambrook et al., 2001).

5.5 Obtención y marcaje de la sonda

Como sonda en los ensayos de “Southern blot”, “Northern blot” y electroforesis en gel de campo pulsado se utilizó el inserto del clon TREchS-3 (ver resultados), el cual corresponde a la región codificante completa del gen *hsp70* de la cepa Tre de *T. rangeli*.

Para ello, se obtuvo el ADN plasmídico del clon TREchS-3, a partir de cultivos de las colonias recombinantes en medio LB (caldo Luria-Bertani) con ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y usando el estuche comercial “Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems” (Promega). Posteriormente, el inserto se extrajo mediante digestión del ADN plásmidico con la enzima de restricción *EcoRI* y posterior recuperación del ADN del gel de agarosa

mediante el estuche comercial “GFX Gel Band Purification kit” (Amersham Biosciences). Finalmente, el inserto obtenido fue marcado con [α - ^{32}P]dCTP (Amersham) según lo indicado por el estuche comercial “Rediprime™ II–Random prime labelling system” (Amersham).

5.6 Ensayos de hibridación

La hibridación se realizó de acuerdo al siguiente protocolo: Una vez unido el ADN o ARN a la membrana de “nylon”, estas se sometieron a una reacción de prehibridación durante 2 h a 42 °C en formamida al 50 % (v/v), SSC 5x, SDS 0,1 % (p/v), Denhart’s 5 x, $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0,05 M, y esperma de salmón denaturado 0,25 mg/ml. Seguidamente, los filtros fueron hibridados con la sonda radiactiva previamente denaturada, en una solución nueva de la mezcla anterior a 42 °C durante 24 h. Transcurrida la hibridación, los filtros fueron enjuagados brevemente en una solución de SSC 2 X, SDS al 0,5 % (p/v) a T.A, durante 5 min con agitación constante. Posteriormente los filtros fueron lavados durante 15 min en cada una de las siguientes soluciones: SSC 1 X - SDS al 0,5 % (p/v), SSC 0,5 X - SDS al 0,5 % (p/v) y SSC 0,1 X - SDS al 0,5 % (p/v) a 42, 55 y 65 °C, respectivamente. Finalmente y una vez secos los filtros fueron expuestos a películas curix RP2 medical X-ray (AGFA) durante 1 h.

5.7 Electroforesis en campo pulsado

La separación de los cromosomas de los parásitos fue realizada mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), la cual permite la separación de moléculas de ADN de alto peso molecular.

5.7.1 Preparación de los cromosomas de *T.rangeli*

Para la preparación de los cromosomas de *T. rangeli* se siguió básicamente el método de Schwartz y Cantor, 1984, desarrollado para los parásitos de la familia *Trypanosomatidae* por Van der Ploeg et al., 1984, el cual se basa en embeber al parásito en un bloque de agarosa que mantiene intactas las moléculas de ADN de gran tamaño y permite la libre difusión de detergentes y proteasas que lisan la membrana.

Para su preparación se partió de un cultivo en fase exponencial de crecimiento, al cual se le realizó un recuento de parásitos por ml. A continuación, los parásitos se centrifugaron a 2.500 rpm durante 15 min y se lavaron 3 veces con PBS 1 X frío. Posteriormente, 80×10^6 parásitos fueron mezclados con 300 μ l de agarosa de bajo punto de fusión (Pharmacia-Biotech) al 1,2 % (p/v), disuelta en PBS 1 X y vertidos en los moldes respectivos. Una vez solidificados, los bloques se sumergieron en el tampón de digestión (N-laurilsarcosina-Na al 1 % (p/v), proteinasa K 1 mg/ml y EDTA 0,5 M pH 9). Tras 48 h de incubación a 50 °C se les retiró el tampón de digestión y se lavaron tres veces, durante 3 h por lavado, con EDTA 0,2 M pH 8 y se guardaron a 4 °C hasta el momento de su uso.

5.7.2 Electroforesis en campo pulsado y transferencia a membranas de “nylon”

Las muestras de ADN cromosómico se separaron en geles de agarosa (Pharmacia-Biotech) al 1 % (p/v) en TBE (Tris 40 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM pH 8,3) 0,5 X, usando igualmente como tampón de corrido TBE 0,5 X y cromosomas de *Sacharomyces cerevisiae* (Pharmacia), como patrón de peso molecular.

Las muestras fueron separadas en un equipo Gene Navigator (Pharmacia-Biotech) con las siguientes condiciones electroforéticas: pulsos de 250, 500, 750 y 1000 segundos (s) sobre un período de 24 h cada uno a 70 voltios (V), 65 mAmp y 12 °C. Después de la electroforesis, el gel fue teñido con bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/ml en TBE (p/v) con el fin de visualizar las bandas.

Finalmente los cromosomas fueron transferidos a una membrana de “nylon” (Hybond™-N+, Amersham Pharmacia Biotech), siguiendo el método de transferencia salina descrito por Sambrook et al., 2001, para su posterior hibridación con la sonda radioactiva.

5.8 PCR (reacción en cadena de la polimerasa)

Con el objetivo de conocer la secuencia del gen *hsp70* de *T. rangeli* en las cepas H14 y Tre del parásito, se diseñaron varias PCR, las cuales permitieron amplificar la región codificante (ORF, marco abierto de lectura) y la unidad codificante completa (región codificante + región no codificante) en ambas cepas del parásito.

Para esto, teniendo en cuenta el carácter repetido de los genes *hsp70* y haciendo uso del programa Primer 3 (<http://workbench.sdsc.edu>; Rozen & Skaletsky, 2000) se diseñaron los oligonucleótidos HSP70GCF (5'-GGCTCCCTCGTACGTCAT-3') y HSP70GCR (5'-AAGAACAAGGGCAAGGACC-3'), basados en las primeras 746 pb de la región codificante del gen *hsp70* previamente secuenciadas por el laboratorio de Parasitología Molecular de la Pontificia Universidad Javeriana, No. de acceso a GenBank AY495381 y AY495382 (Cuervo et al., 2004) (Figura 4).

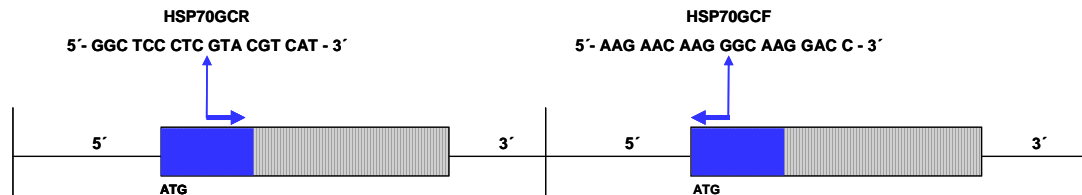


Figura 4. Estrategia de amplificación de la región no conocida del gen *hsp70* de *T. rangeli*. Basados en las primeras 746 pb conocidas del gen (cuadro azul) y en su carácter repetido se diseñaron los oligonucleótidos HSP70GCF/GCR. Se muestran dos unidades HSP70 en tándem con su región codificante (Barra a rayas) y sus extremos 5' y 3' no codificantes.

La reacción de amplificación fue hecha en un volumen final de 25 μ l conteniendo 125 ng del ADN tanto de las cepas KP1(-) como KP1(+), 20 pmoles de cada oligonucleótido, 200 μ M de cada dNTP, 1,5 mM de cloruro de magnesio, 1 X de amortiguador (Tris-HCl 10 mM pH 9,0, KCl 50 mM, triton X-100 al 0,1%) y 1,25 unidades de Taq ADN polimerasa (Corpogen). Usando el siguiente perfil de amplificación: 94°C/5min, 35 ciclos de 94°C/1 min, 52°C/1 min (Cepa Tre) y 46°C/1 min (cepa H14) y 72°C/2 min, y una incubación final de 72°C por 8 min. El producto de la PCR y posterior secuencia permitió conocer la región terminal y la región intergénica del gen *hsp70* en la cepa H14 y Tre del parásito.

Posteriormente, y conocida la región terminal del gen *hsp70* en ambas cepas de *T. rangeli*, se diseñó otra PCR capaz de amplificar la región codificante completa (ORF) correspondiente a una sola copia del gen. Para ello y haciendo uso del programa Primer 3 (<http://workbench.sdsc.edu>; Rozen & Skaletsky, 2000) se diseñó la pareja de oligonucleótidos 70TreATG (5'-ATGACGTACGAGGGAGCCA-3') y 70TreTGA (5'-

TCAGTCAACCTCCTCCACCTTCGG-3'), los cuales amplificaron la región codificante completa del gen *hsp70* en las cepas H14 y Tre (Figura 5).

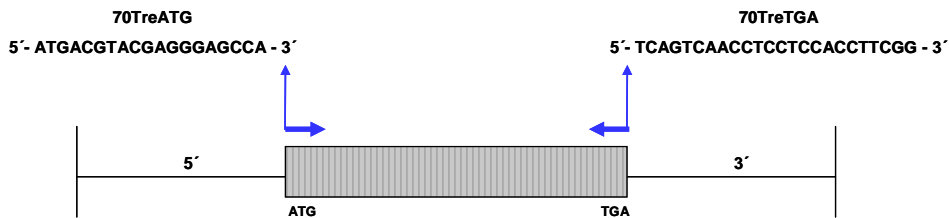


Figura 5. Estrategia de amplificación de la región codificante del gen *hsp70* de *T. rangeli*. Oligonucleótidos diseñados en el codón de inicio (ATG) y codón de parada (TGA) del gen, se muestra una unidad HSP70 con su región codificante (Barra a rayas) y sus extremos 5' y 3' no codificantes.

La reacción de amplificación a partir de ADN de ambas cepas de *T. rangeli* fue hecha en un volumen final de 50 μ l conteniendo 250 ng del ADN genómico puro, amortiguador de la reacción 1X, "expand high fidelity enzyme" 2,6 unidades (Roche), $MgCl_2$ 2 mM, desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) 0,2 mM y de cada oligonucleótido 20 pmol. La reacción fue hecha en un termociclador MJ Research PTC-100 DNA usando el siguiente perfil de amplificación: 94°C/5min, 35 ciclos de 94°C/1 min, 57°C/1 min y 72°C/2:30 min, y una incubación final de 72°C for 10 min.

Finalmente y con el objetivo de amplificar una unidad completa correspondiente a una sola copia del gen *hsp70* (región codificante + región no codificante) se usó la pareja de oligonucleótidos 70TreATG y 70HP6R (5'-GTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTC-3') para amplificar la unidad completa en la cepa Tre de *T. rangeli* (Figura 6).

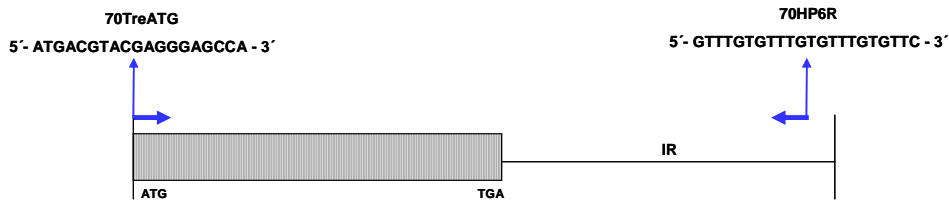


Figura 6. Estrategia de amplificación de una unidad completa del gen *hsp70* para la cepa Tre de *T. rangeli*. Se muestra la pareja de oligonucleótidos usada, región codificante (barra a rayas) y región intergénica (IR).

La reacción de amplificación se llevó a cabo un termociclador MJ Research PTC-100 usando el siguiente perfil de amplificación: 94°C/5min, 35 ciclos de 94°C/1 min, 54°C/1 min, 72°C/30 s, y una incubación final de 72°C por 10 min y las mismas condiciones de la reacción que se describen abajo para la cepa H14.

Con el mismo objetivo, se diseñaron dos nuevos oligonucleótidos HSH14-Fw (5'-GTA^{CTCGTGC}TTGGTGTGT-3') y HSH14-Rv (5'-ACTGCCGAACGCTTACA^{ACT}-3'). Las parejas de oligonucleótidos HSH14-Fw/HSP70GCF y 70TreATG/HSH14-Rv se usaron para la amplificación de la unidad completa en la cepa H14 (Figura 7). Las reacciones de amplificación fueron hechas en un volumen final de 50 µl conteniendo 125 ng del ADN de la cepa H14, amortiguador de la reacción 1X, "expand high fidelity enzyme" 2,6 unidades (Roche), MgCl₂ 2 mM, dNTPs 0,2 mM y de cada oligonucleótido 20 pmol, usando el siguiente perfil de amplificación: 94°C/5min, 35 ciclos de 94°C/1 min, 56°C/1 min y 72°C/2:30 min, y una incubación final de 72°C por 10 min.

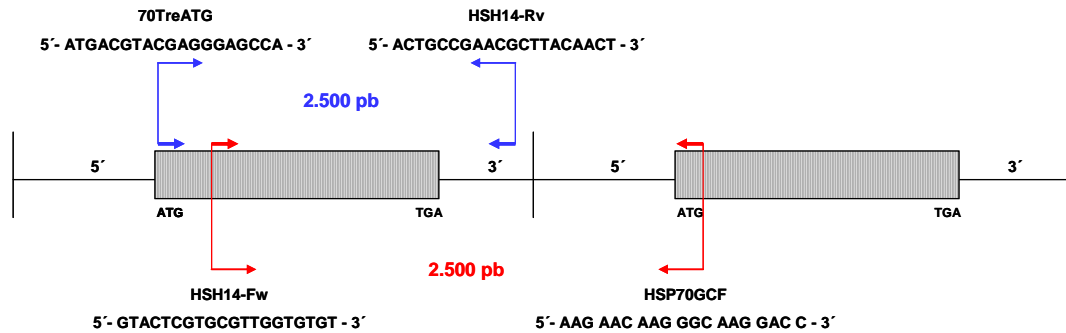


Figura 7. Estrategia de amplificación de una unidad completa del gen *hsp70* para la cepa H14 de *T. rangeli*. Se muestran las parejas de oligonucleótidos usadas y el tamaño de los fragmentos amplificados.

Finalmente, los fragmentos obtenidos para todas las PCRs fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v) teñido con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio (Sambrook et al., 2001).

5.9 Clonación del gen *hsp70* de las cepas H14 y Tre de *T. rangeli*

Los productos de las PCR previamente descritas se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v); la banda de amplificación fue cortada del gel y purificada haciendo uso del estuche comercial “GFX Gel Band Purification kit” (Amersham Biosciences) y finalmente clonada en el plásmido pGEM-T Easy (Promega) (Figura 8).

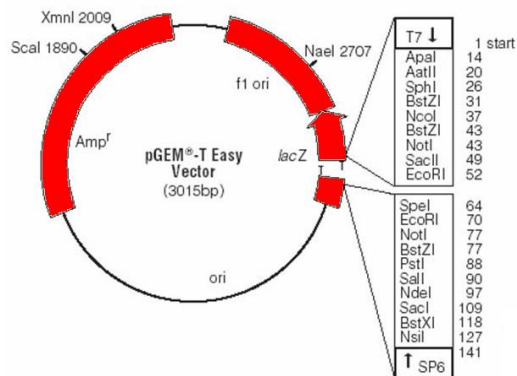


Figura 8. Plásmido pGEM®-T easy. Mapa circular del vector y puntos de referencia de la secuencia.

La clonación se realizó de la siguiente manera: el ADN (producto de PCR) obtenido se ligó en el plásmido pGEM-T Easy (Promega), mediante reacción con la enzima “T4 DNA ligase” (Promega) según indicaciones de la casa comercial (amortiguador de ligación 2 X, pGEM-T Easy- vector 50 ng, T4 ADN ligasa 3 U/μl), a 4 °C durante toda la noche. La reacción de ligación se realizó usando una relación inserto:vector de 3:1.

Posteriormente, bacterias JM109 (40 μl) de alta eficiencia de transformación, fueron transformadas con el producto de ligación (5 μl), mediante un pulso eléctrico. Posterior a la transformación, las bacterias se resuspendieron en 960 μl del medio enriquecido SOC (triptona 2 %, extracto de levadura 0,5 %, NaCl 0,01 M, KCl 2,5 mM, Mg²⁺ 20 mM, glucosa 20 mM), y se incubaron por 1,5 h a 37 °C con agitación constante (aproximadamente 150 rpm).

Finalmente, 100 μl de bacterias transformadas se plaquearon en cajas con medio LB, ampicilina 100 μg/ml, isopropiltio-β-galactosido (IPTG) (Promega) 0,5 mM y 5bromo-4cloro-3-indolil-β-D-galactosido (X-Gal) (Promega) 80 μg/ml e incubaron toda la noche a 37 °C.

Posterior a la incubación, el ADN plasmídico de las colonias blancas fue extraído haciendo uso del estuche comercial “Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification Systems” (Promega) y sometido a digestión con la endonucleasa *EcoRI*, la cual corta a ambos lados del sitio de clonaje (Figura 8).

5.10 Secuenciación del ADN

Los insertos de los clones obtenidos fueron secuenciados en ambas direcciones por el método de Sanger (Sanger et al., 1977). La secuenciación de los fragmentos se realizó en el Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra (Granada-España), mediante reacción de PCR utilizando el “ADN sequencing kit” de Perkin Elmer y la enzima AmplyTaq FS DNA polimerasa, en un secuenciador automático 373 ADN Sequencer Strech de Applied Biosystem. Para la reacción de secuenciación se usaron los iniciadores universales M13F y M13R, y varios oligonucleótidos internos, adicionalmente diseñados con el objetivo de secuenciar los insertos completos. Las secuencias obtenidas fueron ensambladas y la búsqueda de homología fue realizada usando los programas ALIGN (Pearson & Lipman, 1988) y BLASTN (Altschul et al., 1994).

5.11 Análisis “*in silico*”

Los análisis de la secuencia de nucleótidos fueron realizados usando la base de datos de GenBank, los programas ALIGN (Pearson & Lipman, 1988), BLASTN (Altschul et al., 1994), las aplicaciones de la base de datos del Instituto Europeo de Bioinformática, EMBL-EBI (www.ebi.ac.uk), de San Diego Supercomputer Center, workbench <http://workbench.sdsc.edu>, y de la base de datos SWAMI, www.ngbw.org (Rifaieh et al., 2007). Las secuencias de aminoácidos fueron analizadas usando las aplicaciones del servidor ExPASy (“Expert Protein Analysis System”) del instituto Suizo de

bioinformática (Gasteiger et al., 2003). Análisis adicionales de las secuencias fueron realizados usando las aplicaciones del programa CLC Combined Workbench 3.6.1 (www.clcbio.com).

Los análisis filogenéticos y de evolución molecular fueron realizados con las secuencias de la proteína HSP70 usando MEGA versión 4 (Tamura et al., 2007), por los métodos Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987), Mínima evolución (Rzhetsky & Nei, 1992) y Máxima parsimonia (Eck & Dayhoff, 1966) con valores bootstrap obtenidos a partir de 1.000 pseudorréplicas. Para los análisis de Neighbor-Joining y mínima evolución se usó como modelo de sustitución distancia-p (Nei & Kumar, 2000) y para los análisis de Mínima evolución y Máxima parsimonia se usó el nivel 1 de la opción close-neighbor-interchange (CNI, por sus siglas en inglés) con una adición aleatoria para árboles de 10 réplicas (Nei & Kumar, 2000).

Basados en las secuencias de aminoácidos reportadas en los proyectos de secuenciación del genoma de varios protozoos en la base de datos GeneDB (www.genedb.org) y en las secuencias igualmente reportadas en la base de datos de GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Las secuencias fueron alineadas usando el programa Clustal W (Thompson et al., 1997) y ClustalW XXL de la base de datos EMBnet (www.ch.embnet.org) y ajustadas manualmente usando BioEdit versión 7.0.4.1 (Hall, 1999).

5.12 Diseño y estandarización de un ensayo de PCR-RFLP para diferenciar subpoblaciones KP1(+) y KP1(-) de *T. rangeli*.

Análisis de restricción de la región codificante del gen *hsp70* de la cepa H14 y Tre del parásito mostraron una diferencia en cuanto al perfil de restricción para la enzima *SphI*. Basados en esta diferencia se diseñó una PCR-RFLP, la cual permitió diferenciar los grupos 1 y 2 de *T. rangeli*.

Teniendo en cuenta que el polimorfismo para la enzima *SphI* se encuentra en el extremo 3' del gen *hsp70*, se diseñó el oligonucleótido HSP70intR (5'-ACATCCAGGTCTTCGAGGG-3'), el cual, junto con el oligonucleótido 70TreTGA amplifican un fragmento de aproximadamente 700 pb que codifica para el extremo carboxi terminal de la proteína HSP70. La reacción de amplificación fue hecha en un volumen final de 25 μ l conteniendo 125 ng del ADN de las cepas KP1(-) y KP1(+), 20 pmoles de cada oligonucleótido, 200 μ M de cada dNTP, 1,5 mM de cloruro de magnesio, 1 X de amortiguador (Tris-HCl 10 mM pH 9,0, KCl 50 mM, triton X-100 al 0,1% (v/v)) y 1,25 unidades de Taq ADN polimerasa (Corpogen). Usando el siguiente perfil de amplificación: 94°C/5min, 35 ciclos de 94°C/1 min, 59°C/1 min y 72°C/45 s, y una incubación final de 72°C por 10 min.

Luego, 10 μ l del amplificado fueron sometidos a digestión con la enzima de restricción *SphI* (Promega), utilizando una relación de unidades de enzima/ μ g de ADN a digerir, de diez, en un volumen final de reacción de 20 μ l, durante 5 h a 37 °C. Finalmente, 10 μ l del producto de amplificación y los 20 μ l del producto digerido fueron analizados en geles de poliacrilamida al 10 % (p/v) teñidos con coloración de nitrato de plata (Sambrook et al., 2001).

5.13 Producción de la proteína HSP70 recombinante de *T. rangeli*

5.13.1 Clonación en vector de expresión

El fragmento del clon denominado TREchS-3 (ver resultados, Figura 14), el cual contiene un fragmento de 2.082 pb correspondiente al ORF del gen *hsp70* de la cepa Tre de *T. rangeli* se utilizó como molde para amplificar y clonar en un vector de expresión la región codificante completa del gen *hsp70*.

Para esto, se diseñaron los oligonucleótidos 70TreATG-BamHI (5'-CTATAGGATCCATGACGTACGAGGGAGCCA-3') y 70TreTGA-HindIII (5'-CTATAAAGCTTTCAGTCAACCTCCTCCACCT-3'), subrayada las dianas de corte para las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III, respectivamente. Usando la anterior pareja de oligonucleótidos y el inserto del clon TREchS-3 como molde (2 μ l), se realizó la reacción de amplificación (Figura 9): amortiguador de la reacción 1X, "expand high fidelity enzyme" 2,6 unidades (Roche), MgCl₂ 2 mM, dNTPs 0,2 mM y de cada oligonucleótido 20 pmol. La reacción de amplificación se llevó a cabo un termociclador MJ Research PTC-100 usando el siguiente perfil de amplificación: 94°C/5min, 35 ciclos de 94°C/1 min, 57°C/1 min, 72°C/2:30 s, y una incubación final de 72°C por 10 min.

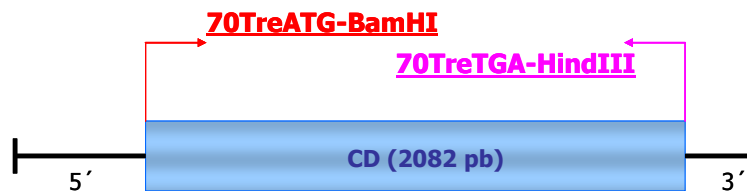


Figura 9. Estrategia de amplificación de la región codificante del gen *hsp70* de la cepa Tre de *T. rangeli* para sub-clonación en el vector pQE-30. Se muestra la pareja de oligonucleótidos usada con las dianas de restricción incluidas para el clonaje dirigido y en fase con la cola de poli-histidinas.

El producto de la PCR se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v); la banda de amplificación fue cortada del gel y purificada haciendo uso del estuche comercial "GFX Gel Band Purification kit" (Amersham Biosciences).

La banda purificada y el vector comercial pQE-30 (Qiagen) (Figura 10) fueron sometidos a digestión con las endonucleasas de restricción *Bam*HI//*Hind*III, según indicaciones de la casa comercial (Promega), durante 4 h a 37 °C, posterior a la digestión, los ADN fueron corridos en gel de agarosa al 1 % (p/v) y extraídos del gel con el estuche comercial “Gel Band Purification kit” (Amersham Biosciences), cuantificados y ligados mediante reacción con la enzima T4 ADN ligasa (Promega) durante 16 h a 16 °C, según indicaciones de la casa comercial. Finalmente, el constructo pQE-30/TrHSP70 fue transformado en bacterias *E.coli* (XL1-Blue) competentes y para la selección de los clones recombinantes se procedió como se indica anteriormente.

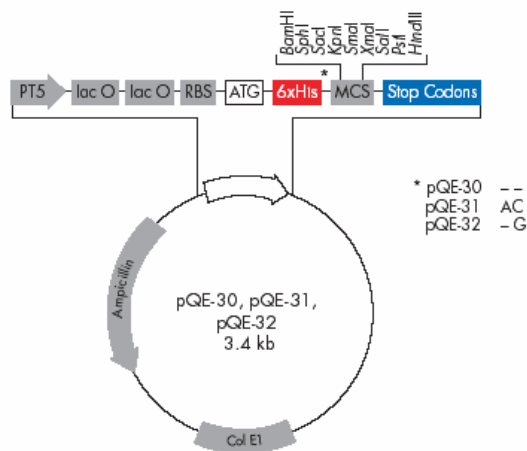


Figura 10. Plásmido pQE-30 (Qiagen). Mapa circular del vector y puntos de referencia de la secuencia.

5.13.2 Ensayos de inducción de la proteína

Para los ensayos de inducción de la proteína recombinante se tomó un inóculo del clon pQHPT-1 (pQE-30/TrHSP70), recombinante para la proteína HSP70 de *T. rangeli*. Dicho inóculo se puso a crecer en 6 ml de medio LB con ampicilina 100 µg/ml, durante toda la noche a 37 °C y 250 rpm. Posteriormente, una dilución de 1 célula/50 ml de medio, aproximadamente se incubó hasta que

el cultivo alcanzó la fase media de crecimiento logarítmico (DO_{600} entre 0,4 y 0,6). Alícuotas de este cultivo se indujeron con concentraciones de IPTG de 0,02 mM; 0,1 mM; 0,5 mM y 2 mM durante 2 horas a 37 °C y 250 rpm (Figura 11).

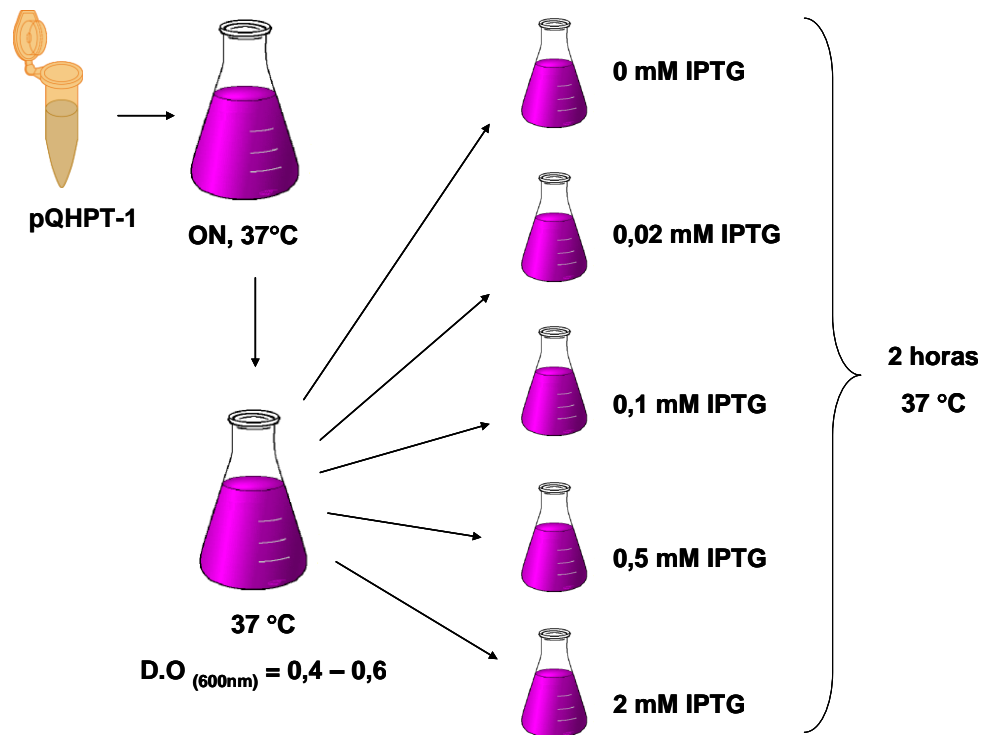


Figura 11. Esquema del ensayo de sobre-inducción de la proteína HSP70 de *T. rangeli*.

Posterior a la inducción, los cultivos fueron centrifugados a 13.000 rpm durante 20 min y el botón celular almacenado para la solubilización de la proteína inducida. Una alícuota de 10 μ l de cada uno de los ensayos fue almacenada para su visualización en geles denaturantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) y tinción con azul de Coomassie.

5.13.3 Ensayo de solubilización de la proteína inducida

El botón de células del cultivo inducido con 0,02 mM se usó para los ensayos de solubilización de la proteína sobre-expresada (ver resultados). Dicho botón de células fue resuspendido en 5 ml de solución 1 (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8) en agitación durante 30 min a 4 °C, para su posterior sonicación por 8 min a 50 %. Luego de la sonicación, la solución se centrifugó a 13.000 rpm durante 20 min a 4 °C y el sobrenadante (1ra. solubilización) se guardó a -20 °C hasta su visualización en geles denaturantes de poliacrilamida. El remanente del botón celular se resuspendió en 5 ml solución 2 (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, SDS 0,025 %, pH 8) en agitación durante 30 min y se sonicó nuevamente bajo las mismas condiciones. La solución se centrifugó a 13.000 rpm durante 20 min a 4 °C y el sobrenadante (2da. solubilización) se guardó a -20 °C hasta su visualización. El protocolo se continuó hasta una cuarta solubilización, resuspendiendo siempre el botón celular en solución 2. Una alícuota de 10 µl de cada una de las solubilizaciones fue almacenada para su visualización mediante SDS-PAGE.

5.13.4 Ensayo de purificación de la proteína inducida

La proteína recombinante se purificó mediante gradientes de pH. Brevemente, 1 ml de resina Ni²⁺ NTA (Qiagen) se equilibró con 5 ml de solución de unión pH 8 (NaCl 0,3 M, NaH₂PO₄ 50 mM, SDS 0,025 %, PMSF 1 mM, βME 10 mM, Glicerol 10%), durante 15 min en agitación. Cinco mililitros del sobrenadante de la mejor solubilización se mezcló con la resina y se mantuvo en agitación toda la noche a 4 °C. Posteriormente, la resina se empaquetó en una columna de fibra de vidrio (BioRad) y se dejó eluir por gravedad, el eluido se pasó nuevamente dos veces por la resina y una alícuota de 10 µl de la última elusión se visualizó en gel para descartar la presencia de la proteína sobre-inducida. Posteriormente, y de manera sucesiva se pasó por la resina 4 ml de una de

una solución a pH 8 (NaCl 0,3 M, NaH₂PO₄ 50 mM, SDS 0.025 % (p/v), PMSF 1 mM, Glicerol 10% (v/v)), pasando 1 ml cada vez (cada ml corresponde a una fracción: F1, F2, F3 y F4 a pH 8). De igual forma y luego de la primera solución, se pasaron las soluciones a pH 7,5; pH 6; pH 5 y pH 4. Finalmente, 10 µl del eluido de cada una de las fracciones y de cada una de las soluciones a los diferentes pH, se guardó para su posterior visualización en geles denaturantes de poliacrilamida.

La pureza de la proteína fue evaluada mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie; y la concentración medida por el método de Bradford.

5.14 Ensayos de linfoestimulación

Con el objetivo de estudiar si la proteína HSP70 de *T. rangeli* es capaz de estimular la proliferación de linfocitos vírgenes, al igual que lo hace la proteína HSP70 de *T. cruzi* (Marañón et al., 2000a), se realizaron ensayos de linfoproliferación de células de baso de ratones vírgenes para calcular el índice de estimulación y el porcentaje de división celular específica en respuesta a la proteína HSP70 de *T. rangeli*. Para esto, bajo condiciones de esterilidad se extrajo el baso de un ratón Balb/c virgen, el fue colocado en una solución de PBS 1 X y SFB 1 % para su homogenización y posterior lisis de los eritrocitos (NH₄Cl 150 mM, KHCO₃ 1 mM, EDTA 0,1 mM pH 7,4). Las células fueron centrifugadas, lavadas y los esplenocitos resuspendidos en medio DMEM completo (Dulbecco's modified eagle medium (Gibco BRL), β-mercaptoetanol 0,5 M, glutamina 200 mM, arginina-asparagina 100X, suero bovino fetal inactivado 10%, HEPES 10 mM, piruvato sódico 100 mM) para finalmente ser mezcladas con una solución 0,4 % de azul de tripan (Gibco-BRL) y contadas en cámara de "Neubauer".

Luego, en placas de 96 pozos, 300.000 células/pozo fueron estimuladas con 10, 2 y 0,4 µg/ml de la proteína recombinante de *T. rangeli*; de igual forma 300.000 células/pozo fueron estimuladas con 10, 2 y 0,4 µg/ml de la proteína HSP70 de *T. cruzi*, la cual fue amablemente cedida por el Departamento de Biología Molecular del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López Neyra”.

Finalmente cada pozo fue llevado a un volumen de 200 µl/pozo con medio DMEM completo. En cada ensayo se pusieron los siguientes controles: proteína HSP70 de *T. rangeli* o *T. cruzi* a las concentraciones indicadas + polimixina B (5 U/ml), LPS (1 µg/ml), LPS (1 µg/ml) + polimixina B (5 U/ml) y un control positivo de Concanavalina A (2 µg/ml) (Figura 12).

Cada pozo (ensayos y controles) se montó por triplicado y en cada ensayo se montaron 4 placas, las cuales se incubaron durante 24 h, 48 h, 72 h y 96 h a 37 °C y 5 % CO₂. Cumplido el tiempo de incubación de cada placa, las células se marcaron con Methyl-³H thymidine (0,5 µCi/pozo), durante 8 horas a 37 °C y 5 % CO₂.

Finalmente, el ADN celular fue inmovilizado en un filtro de fibra de vidrio usando un “Inothech Harvester” y la incorporación de Methyl-³H thymidine medida en un equipo “Wallac 1450 Microbeta counter”. Los cálculos del índice de estimulación (I.E) se hicieron mediante la siguiente ecuación:

$$I.E = \frac{\text{cpm (cultivo estimulado)} - \text{cpm (cultivo sin estimular)}}{\text{cpm (cultivo sin estimular)}}$$

cpm = cuentas por minuto.

Por otra parte y mediante ensayos de citometría de flujo se determinó la población de linfocitos que proliferó luego de la estimulación con la proteína HSP70 de *T. rangeli*.

Para estos ensayos 2×10^6 células/pozo fueron estimuladas con 2 $\mu\text{g/ml}$ de proteína HSP70 de *T. rangeli* y *T. cruzi*. Para cada ensayo se incluyó un control con polimixina B (5 U/ml). Las células fueron estimuladas durante 48 h a 37 °C y 5 % CO₂ (Figura 12).

Finalmente, las células estimuladas fueron marcadas con anti-CD19, anti-CD3 y anti-CD4; subsecuentemente, las células fueron lavadas y analizadas en un citómetro de flujo "FACSscan" (Becton Dickinson) usando el programa CELLQUEST.

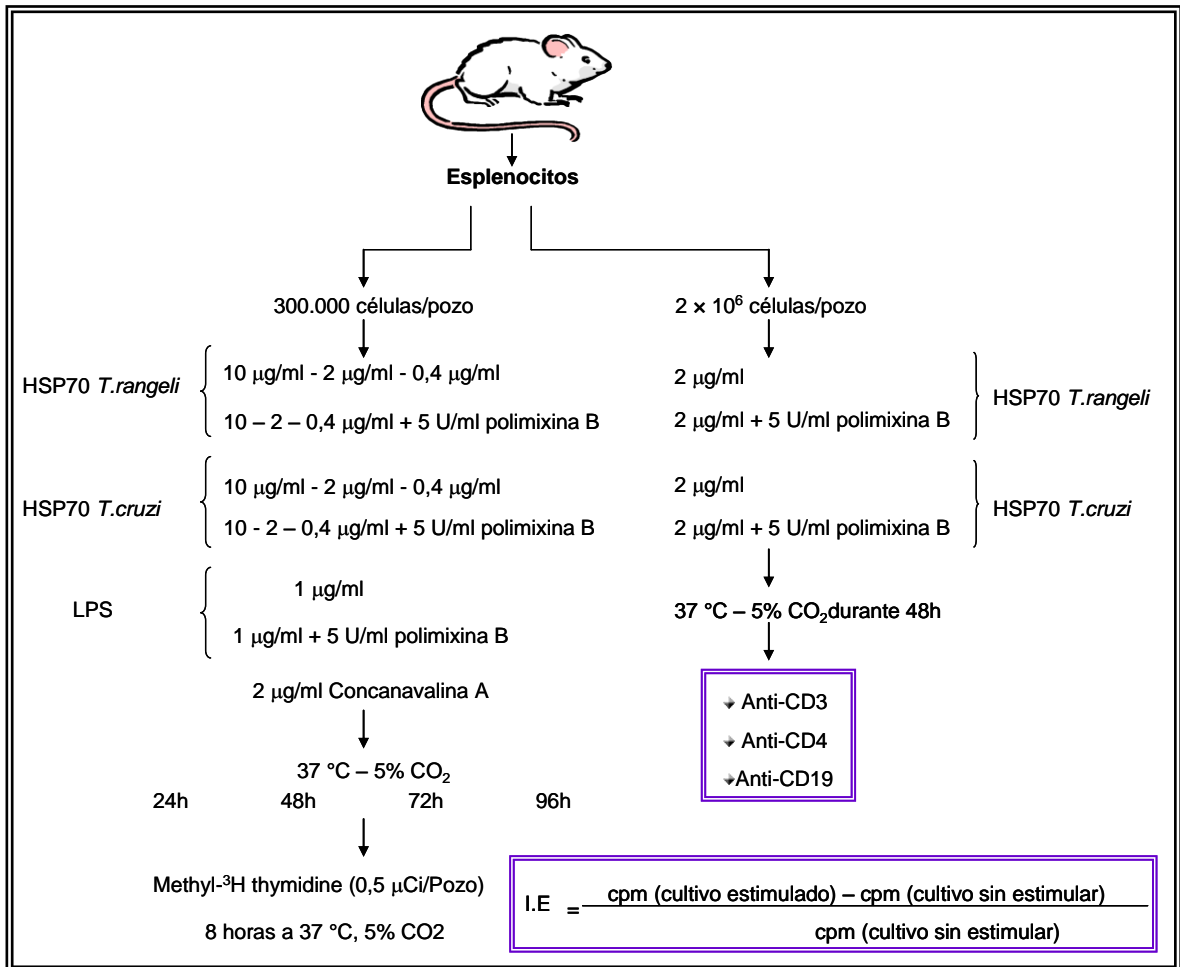


Figura 12. Diagrama del ensayo de linfoestimulación de esplenocitos vírgenes de ratón estimulados con la proteína HSP70 de *T. rangeli*.

6. RESULTADOS

6.1 Organización genómica y expresión del gen *hsp70* de *T. rangeli*

6.1.1 Análisis de “Southern blot”

Con el objetivo de determinar la organización genómica de los genes *hsp70* de *T. rangeli* en las cepas Tre, KP1(-) y H14, KP1(+), se realizaron ensayos de “Southern blot”, usando como sonda la región codificante completa del gen *hsp70* de la cepa Tre de *T. rangeli* obtenida mediante digestión con la endonucleasa *EcoRI* a partir del clon TREcHS-3 (Figura 13). Para ello, el ADN de los parásitos se digirió con las enzimas de restricción *BglII*, *PvuII* y *SphI* (Figura 14), las cuales se sabe cortan 1 vez, 2 veces y 3 veces, respectivamente el gen *hsp70* de *T. cruzi* (No. de acceso a GenBank: X07083).

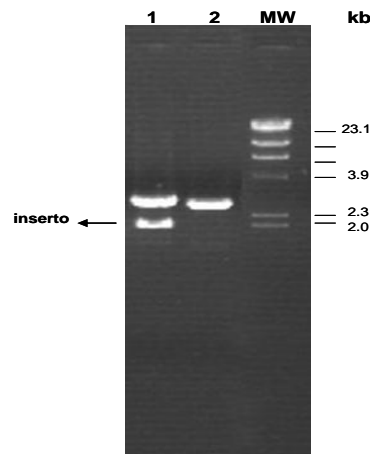


Figura 13. Digestión del ADN plásmidico del clon TREcHS-3. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % del ADN plásmidico del clon TREcHS-3 digerido con la endonucleasa de restricción *EcoRI* (1), ADN plásmidico del clon TREcHS-3 sin digerir (2). Se utilizó λ -HindIII como marcador de peso molecular, cuyos pesos se indican a la derecha.

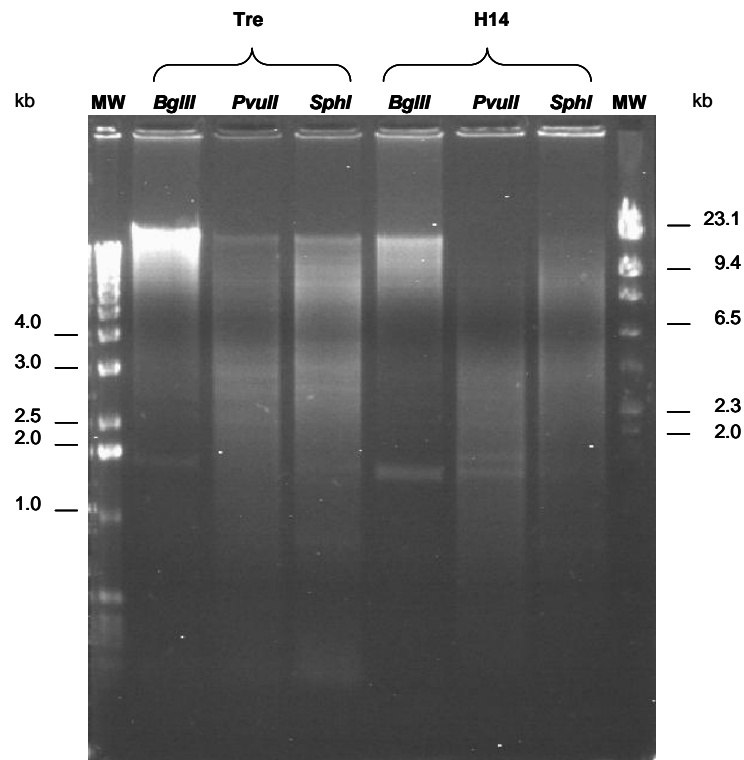


Figura 14. Digestión del ADN de *T. rangeli* con enzimas de restricción. Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 0,8 % del ADN genómico de las cepas KP1(-): Tre y KP1(+): H14 de *T. rangeli*. Se utilizó λ -HindIII cuyos pesos se indican a la derecha y HyperLadder I (Bioline) cuyos pesos se indican a la izquierda, como marcadores de peso molecular.

En la figura 15 se observa cómo estos genes en ambas cepas, Tre y H14, tienen un tamaño de 2.500 pb, aproximadamente y presentan polimorfismo de restricción entre las cepas.

Para la cepa Tre, se observa que las enzimas de restricción *BglII*, *PvuII* y *SphI* liberan una banda intensa de 2.500 pb, aproximadamente. Resultados que concuerdan con estudios previos, en donde el análisis de la región amino-terminal del gen *hsp70* en ambas cepas mostró la presencia de genes repetidos organizados en tándem (Cuervo et al., 2004). Adicionalmente, para todas las enzimas se observan bandas tenues de mayor y menor peso molecular de 2.500 pb, las cuales pueden deberse o bien a polimorfismos de restricción entre las cepas y/o a la presencia de sitios de restricción cercanos a los extremos de la agrupación.

Por su parte, en la cepa H14 se observa un sólo sitio de corte en el gen *hsp70* para la enzima *BglII*, mientras que para la enzima *PvuII* se observan dos bandas de 1.500 y 1.000 pb, lo cual coincide con la presencia de dos sitios de corte para esta enzima dentro de la unidad *hsp70* de esta cepa. Adicionalmente, para la enzima *SphI* no se observan dianas de restricción dentro del gen (Figura 15).

Ensayos de “Southern blot” adicionales realizados para la cepa H14 con las enzimas de restricción *NotI*, *HindIII* y *Sau3AI* y confirmatorios para las enzimas *SphI* y *PvuII* (Figura 16) mostraron que dicho gen no tiene sitio de corte para las enzimas *NotI* y *HindIII* y presenta múltiples sitios de restricción para la enzima *Sau3AI*. Adicionalmente, se corroboró el patrón de restricción con las enzimas *SphI* y *PvuII* las cuales presentaron un patrón igual al previamente encontrado, la enzima *SphI* no corta dentro del gen *hsp70* de la cepa H14, mientras que la enzima *PvuII* presenta dos dianas de restricción,

las cuales generan dos bandas de 1.000 y 1.500 pb aproximadamente, que corresponden con un corte completo de la unidad *hsp70* de H14.

La sobre-exposición de la membrana mostró que la digestión con la enzima *PvuII* no fue completa, observándose bandas superiores de tamaños correspondientes a cortes parciales de la enzima (Figura 16).

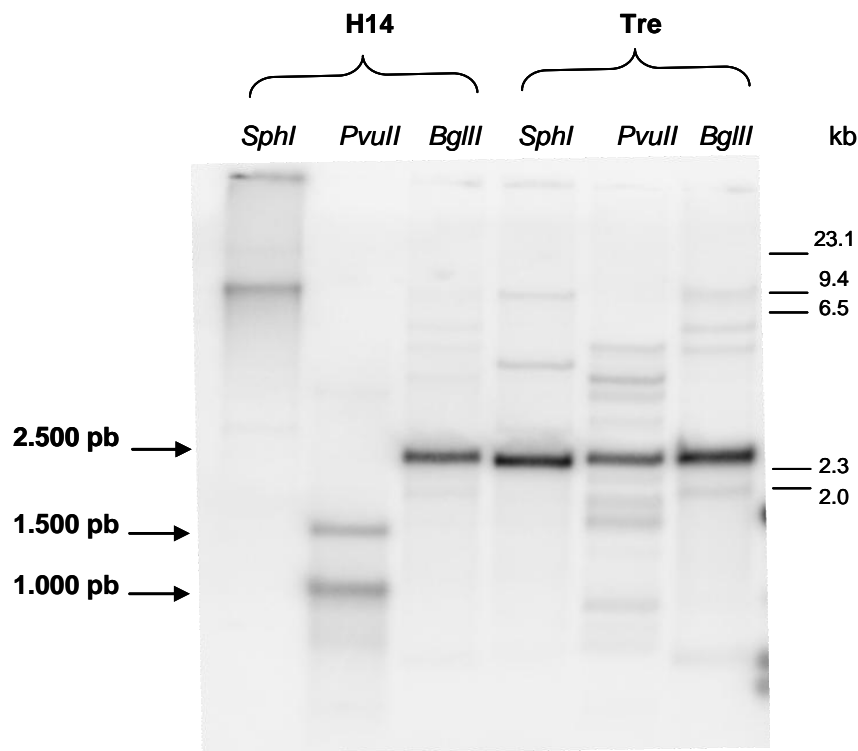


Figura 15. “Southern blot” del ADN de las cepas Tre y H14 de *T. rangeli*. ADN de los parásitos digerido con las enzimas de restricción *BglII*, *PvuII* y *SphI*, transferido a membranas de “nylon” e hibridado con la región codificante del gen *hsp70* de la cepa Tre como sonda. El tamaño de la unidad génica se indica a la izquierda, se utilizó λ -HindIII como marcador de peso molecular, cuyos pesos se indican a la derecha.

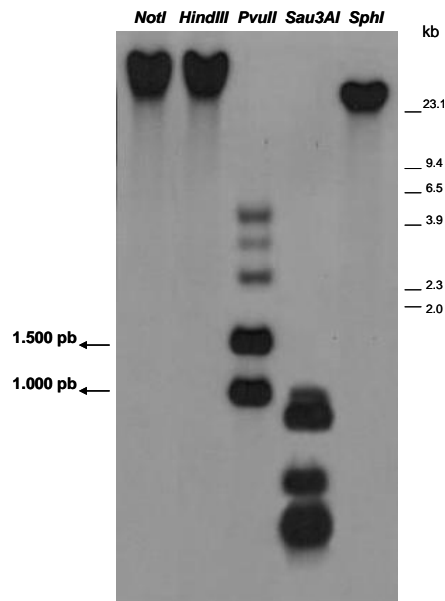


Figura 16. “Southern blot” del ADN de la cepa H14 de *T. rangeli*. ADN de la cepa H14 digerido con las enzimas de restricción *HindIII*, *PvuII*, *Sau3AI* y *SphI*, transferido a membranas de “nylon” e hibridado con la región codificante del gen *hsp70* de la cepa Tre como sonda. El tamaño de algunas de las bandas obtenidas se indica a la izquierda, se utilizó λ -*HindIII* como marcador de peso molecular, cuyos pesos se indican a la derecha.

Tanto los sitios de corte como los polimorfismos de restricción fueron posteriormente analizados y comparados con la secuencia de nucleótidos del gen *hsp70* en ambas cepas del parásito, corroborando la presencia de un sólo sitio de restricción para la enzima *BglII* en ambas cepas de *T. rangeli*, dicha enzima corta una sola vez dentro del gen (posición 1.287), tomando como posición 1 el nucleótido A, del codón de inicio. Igualmente, la enzima *PvuII* posee un sitio de corte en la posición 1.054 en ambas cepas del parásito y adicionalmente en la cepa H14 corta en la posición 2.044 (región no codificante del gen), teniendo en cuenta el carácter repetido de los genes, por tanto, se liberan dos bandas de 1.000 y 1.500 pb, aproximadamente en H14 (Figura 16).

Por otro lado, para las enzimas *SphI*, *NotI* y *HindIII* se confirma la ausencia de diana de restricción tanto en la región codificante como en la región no codificante del gen *hsp70* en la cepa H14. Para la cepa Tre, la enzima *SphI* presenta polimorfismo de restricción entre las diferentes copias secuenciadas del gen *hsp70* (ver más adelante), todas las copias génicas cortan en la posición 1.882, mientras que la copia 1, secuencia del clon TREcHS-3 (Figura 29), presenta 2 sitios de corte adicionales (posición 2.014 y 2.026), las copias 2 (secuencia del clon uHP5, Figura 39) y 3 (secuencia del clon uHP6, Figura 38) presentan un sitio de corte adicional, posición 1.930 y 1.954, respectivamente.

Los resultados obtenidos mediante “Southern blot” y los análisis “*in silico*” de la secuencia del gen *hsp70* para las cepas Tre y H14, permitieron elaborar un mapa de restricción para dichos genes en ambas cepas del parásito *T. rangeli* (Figura 17 A y B). Teniendo en cuenta que los diferentes sitios de corte indicado para la enzima *SphI* en el extremo 3’ del gen *hsp70* en la cepa Tre varían entre las copias y no se encuentran todos presentes en una misma copia.

El polimorfismo de restricción para la enzima *SphI* encontrado en la región codificante del gen *hsp70* entre las cepas Tre, KP1(-) y H14, KP1(+) fue explorado mediante PCR-RFLP para determinar si era una característica propia de cada grupo del parásito, *T. rangeli* (ver más adelante).

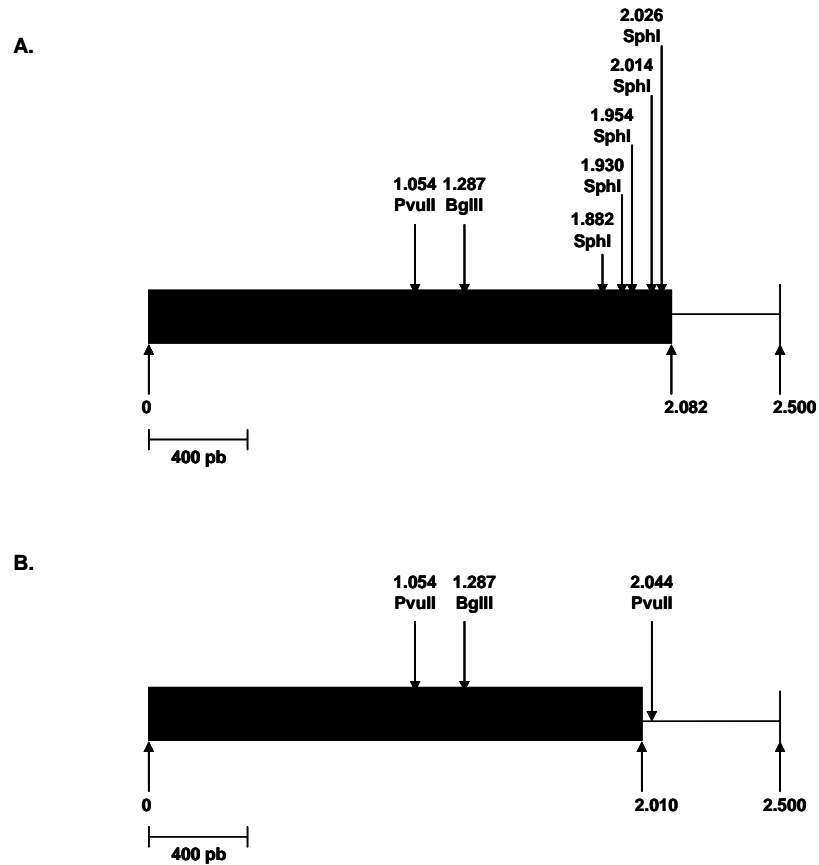


Figura 17. Representación esquemática del patrón de digestión del gen *hsp70* de *T. rangeli*. A. Se muestran los sitios de corte para una unidad codificante en la cepa Tre. **B.** Sitios de corte para la unidad del gen *hsp70* en la cepa H14 de *T. rangeli*. Se muestra la región codificante (caja negra) con su respectiva región intergénica. Se indican los sitios de corte para las enzimas de restricción evaluadas *BglII*, *PvuII* y *SphI*.

6.1.2 Determinación del número de copias del gen *hsp70*

De acuerdo con resultados previos obtenidos que sugieren que el gen *hsp70* se encuentra repetido en tándem cabeza-cola (Cuervo et al., 2004), característica común de la mayoría de los genes de tripanosomátidos, entre ellos el gen *hsp70* de *T. cruzi* (Requena et al., 1988), *T. brucei* (Glass et al., 1986) y *L. major* (Lee et al., 1988), entre otros, se determinó el número de copias del gen presentes en ambas cepas. Es así como en la figura 18 (A y B) se observa que el número de copias varía ligeramente entre las cepas de *T. rangeli* evaluadas. La cepa H14 presenta al menos 6 copias repetidas en tándem por genoma haploide para dicho gen, mientras que la cepa Tre presenta al menos 7 copias génicas del mismo.

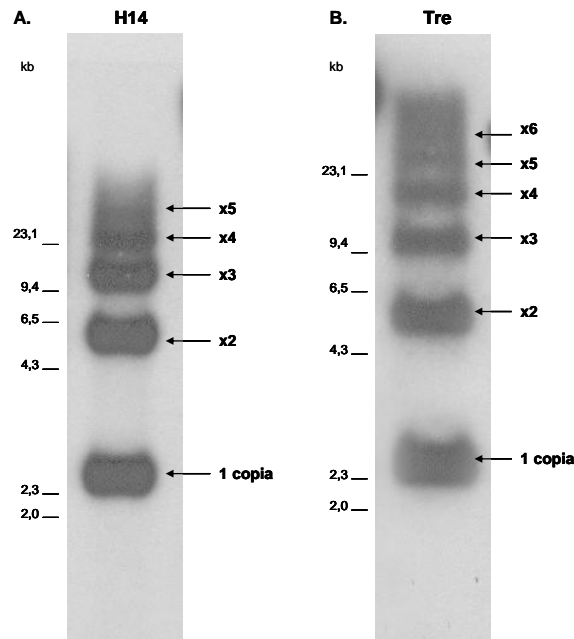


Figura 18. “Southern blot” del ADN genómico de las H14 (A) y Tre (B) de *T. rangeli*. 3 µg de ADN genómico de las cepas de *T. rangeli* fueron digeridos con la endonucleasa de restricción *BglIII*, transferidos a membranas de “nylon” e hibridados con la región codificante del gen *hsp70* de la cepa Tre como sonda. Se utilizó λ -HindIII como marcador de peso molecular, cuyos pesos se indican a la izquierda.

6.1.3 Localización cromosómica del gen *hsp70* de *T. rangeli*

Para determinar la localización cromosómica de los genes *hsp70* en *T. rangeli*, se realizaron ensayos de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE). En la figura 19 se observa que se separaron los cromosomas comprendidos entre 555 kb y 1,9 Mb, en las cepas de *T. rangeli* evaluadas.

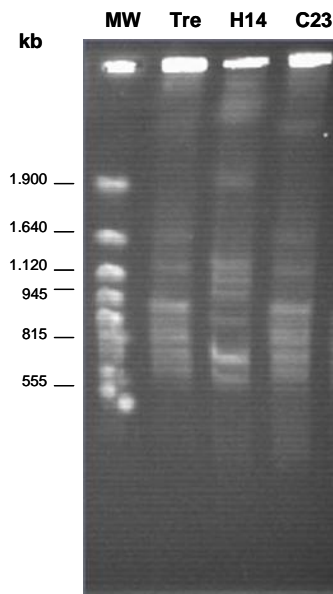


Figura 19. Electroforesis en gel de campo pulsado. Cromosomas de las cepas Tre, H14, y C23 de *T. rangeli* fueron separados con pulsos de 250, 500, 750 y 1.000 segundos por un periodo de 96 horas a 84 voltios y 12 °C y visualizados con bromuro de etidio. Se utilizó como marcador de peso molecular Yeast DNA – PFGE (Amersham Pharmacia Biotech), los tamaños de los fragmentos son indicados a la izquierda.

Al realizar un análisis del cariotipo obtenido para las cepas de *T. rangeli* en varios corridos electroforéticos (datos no mostrados), se observó que las cepas Tre, 5048 y C23 presentan un mayor número de cromosomas de tamaño intermedio (entre 1.100 kb y 815 kb) que la cepa H14. Y que H14, al igual que *T. cruzi* presenta cromosomas mayores de 1.600 kb, a diferencia de las cepas KP1(-) evaluadas (Figura 20).

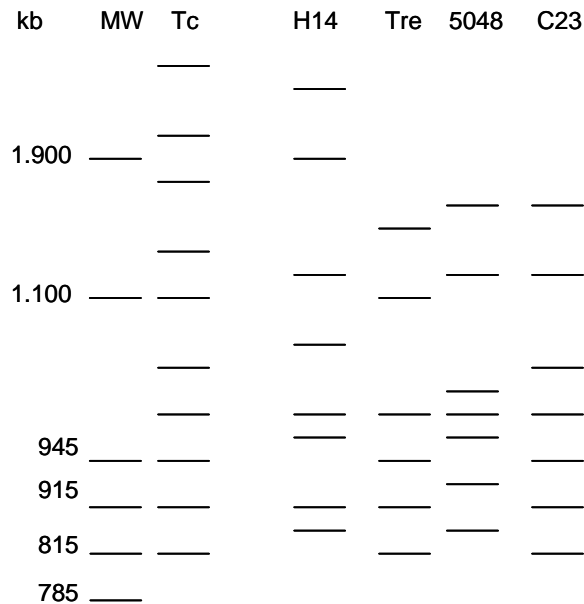


Figura 20. Esquema representativo de los cromosomas de *T. rangeli* separados por electroforesis en gel de campo pulsado. Cromosomas de las cepas H14, Tre, 5048 y C23 de *T. rangeli* y *T. cruzi* fueron separados con pulsos de 250, 500, 750 y 1.000 segundos por un periodo de 96 horas a 84 voltios y 12 °C y visualizados con bromuro de etidio. Se utilizó como marcador de peso molecular Yeast DNA – PFGE (Amersham Pharmacia Biotech), los tamaños de los fragmentos son indicados a la izquierda.

Por otra parte y luego de la visualización y análisis del ADN cromosómico del parásito, se realizó la transferencia a membranas de “nylon” para su posterior hibridación con la sonda correspondiente a la región codificante del gen *hsp70* de la cepa Tre (Figuras 14 y 30).

En la figura 21, se observa que los genes que codifican la proteína de choque térmico de 70 kDa se localizan en un único cromosoma en todas las cepas de *T. rangeli*, las cuales difieren en tamaño de acuerdo al grupo del parásito y a las condiciones electroforéticas usadas, es así como dichos genes se localizan en un cromosoma de aproximadamente 1.174 kb en la

cepa H14 KP1(+) y en un cromosoma de aproximadamente 1.098 kb en las cepas Tre y C23, KP1(-).

Por otra parte, Toaldo et al., 2001 reportaron la presencia del gen *hsp70* en la cepa H14 en una sola banda de 1.125 kb, muy similar a lo encontrado en este estudio. Adicional a esto, para las cepas KP1(-) estos autores reportaron que el gen *hsp70* se ubica en un cromosoma de 1.050 kb para la cepa SC-61 y en dos cromosomas de 1.020 y 1.100 kb, aproximadamente en la cepa SC-58. En este estudio, para las cepas KP1(-) evaluadas se encontró el gen *hsp70* ubicado en un único cromosoma del mismo tamaño en todas las cepas. Vale la pena resaltar que las cepas KP1(-) evaluadas en este trabajo son todas de origen colombiano, mientras que las evaluadas por Toaldo et al. 2001, son de origen brasilero.

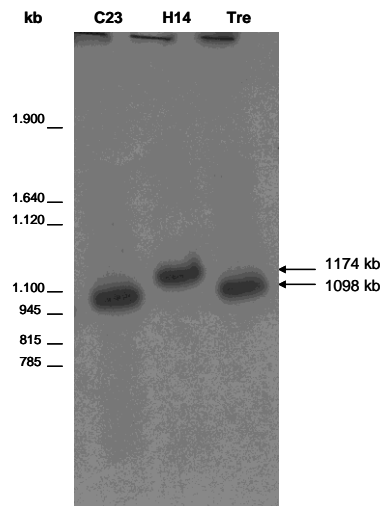


Figura 21. “Southern blot” de los cromosomas de los parásitos separados mediante “PFGE”. Los cromosomas de las cepas H14, Tre y C23 fueron separados mediante electroforesis en gel de campo pulsado, transferidos e hibridados con la región codificante del gen *hsp70* de la cepa Tre como sonda. A la derecha se indican el tamaño de la banda obtenida. Los números a la izquierda indican el corrido del patrón de peso molecular, cromosomas de *S. cerevisiae* (Amersham Pharmacia Biotech).

6.1.4 Análisis de “Northern blot”

El producto de expresión de los genes *hsp70* de *T. rangeli* fue analizado mediante ensayos de “Northern blot” del ARN de epimastigotes de las cepas Tre y H14 del parásito y de la cepa Y de *T. cruzi*, en fase de crecimiento exponencial (Figura 22A). Como se muestra en la figura 22B, una sola banda de hibridación fue observada. Por tanto, el gen *hsp70* de la cepa Tre y H14 origina un único transcrito de 2.300 nucleótidos, muy similar a lo reportado para este mismo gen en *T. cruzi* y *T. brucei*, los cuales generan un sólo transcrito de 2.300 nucleótidos (Klein et al., 1995).

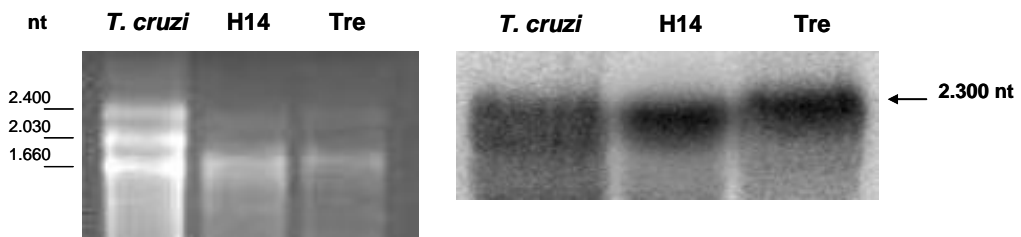


Figura 22. Expresión de los genes *hsp70* de *T. rangeli*. **A.** 10 μ g de ARN total de *T. cruzi* (cepa Y) y *T. rangeli* (cepas H14 y Tre) fueron corridos en geles de agarosa/formaldehído al 1%, el tamaño de los ARN ribosomales de *T. cruzi* es indicado a la izquierda. **B.** Ensayo de “Northern blot” del ARN total de *T. cruzi* y *T. rangeli*. El tamaño del transcrito es indicado a la derecha.

6.2 Caracterización de la secuencia del gen *hsp70* de *T. rangeli*

Con el objetivo de secuenciar la región no conocida del gen *hsp70* en las cepas Tre y H14 de parásito, se diseñaron los oligonucleótidos HSP70GCF y HSP70GCR basados en las primeras 746 pb conocidas del gen *hsp70* de *T. rangeli* (No. de acceso a GenBank AY495381 y AY495382) (Cuervo et al., 2004) (Figura 4). La PCR, para ambas cepas, amplificó una banda de aproximadamente 1.700 pb (Figura 23), la cual luego de su purificación del gel de agarosa fue clonada y secuenciada.

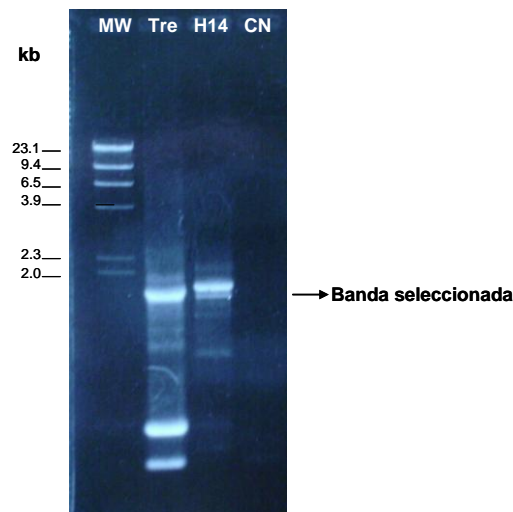


Figura 23. PCR usando los oligonucleótidos HSP70GCF/GCR. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio conteniendo 10 μ l del producto de amplificación. La banda seleccionada para los ensayos de clonación se indica a la derecha, se utilizó λ -HindIII como marcador de peso molecular, cuyos pesos se indican a la izquierda.

Producto de la clonación, se obtuvo el denominado clon HP5 para la cepa Tre, el cual contenía una secuencia de 1.723 pb, que corresponde a las últimas 1.219 pb de la región carboxilo terminal del gen y 504 pb correspondientes a la región intergénica (Figura 24). Y el clon HH1 para la

cepa H14, el cual contenía una secuencia de 1.739 pb, las últimas 1.242 pb de la región carboxilo terminal y la región intergénica de 479 pb (Figura 25). Ambas secuencias presentaron una identidad de 96,2 % entre ellas, presentándose las principales diferencias hacia el extremo 3' de la región codificante y en la región intergénica.

En la región codificante se presenta una inserción de 24 nucleótidos (posición 1.167 a 1.190) en la secuencia de la cepa H14 respecto a la secuencia de la cepa Tre. Llamativamente, los últimos 30 nucleótidos de la región codificante presentaron una identidad de 100 % entre las cepas, lo que permitió el diseño del oligonucleótido 70TreTGA, con el cual se amplificó la región codificante completa correspondiente a una sola copia génica en ambas cepas del parásito. Por el contrario, esta región presenta varios cambios respecto a la misma en *T. cruzi*, razón por la cual un oligonucleótido diseñado basado en su secuencia, no permitió amplificar la región codificante completa de *T. rangeli*, en ensayos previos.

Por otra parte, la región intergénica entre ambas cepas presentó una identidad de 88,1 %, presentándose los principales polimorfismos por cambios de nucleótidos simples (SNP) y las inserciones de 6 nucleótidos (posición 149 a 154) y 9 nucleótidos (posición 191 a 199) en la secuencia de la cepa H14 (Figura 26).

```

1 GACGACGAGC CAGCGGGCGC TCCGCCGCCT CCGCACCGCG TCGGAGCGCG CCAAGCGGAC
61 GCTGTCTGTC GCGGGCGCAGG CGACGATTGA GATCGACGCG CTGTTTCGACA ACGTGGACTT
121 CCAGTCGACC ATCACCCGTG CCCGCTTCGA GGAGCTCTGC GCGGACCTCT TCCGCGGCAC
181 GCTGCAGCCG GTGGAGCGTG TGCTGCAGGA CGCCAAGATG GACAAGCGCG CCGTGCACGA
241 CGTGGTGCTC GTTGGCGGCT CCACCCGCAT CCCGAAGGTG ATGCAGCTGG TGTCGGACTT
301 CTTCGGCGGC AAGGAGCTGA ACAAGAGCAT CAACCCGCAT GAGGCCGTGG CGTACGGCGC
361 CGCCGTGCAG GCCTTCATCC TCACCGGGGG CAAGAGCAAG CAGACGGAGG GCCTGCTGCT
421 GCTCGACGTG ACGCCGCTGA CGCTTGGCAT CGAGACGGCC GGTGGCGTGA TGACGTGCT
481 GATTAAGCGC AACACGACGA TCCCAACCAA GAAGAGCCAG ATCTTCTCGA CGTACGCGGA
541 CAACCAGCCC GCGGTGCACA TCCAGGTCTT CGAGGGGGAG CGTGCGATGA CGAAGGACTG
601 CCACCTGCTC GGTACGTTTG ACCTGTCCGG CATTCCGCCG GCGCCGCGCG GCGTGCCTCA
661 GATTGAGGTG ACCTTCGACC TCGACGCCAA CGGCATCCTG AACGTGTCCG CGGAGGAGAA
721 GGGCACCGGC AAGCGCATCC AGATCGTCAT CACGAACGAC AAGGGCCGTC TGAGCAAGGC
781 GGAGATTGAG CGCATGGTGT CGGAGGCGTC CAGGTACGAG GCGCAGGACA AGGAGCAGCG
841 CGAGCGCATT GATGCAAAGA ACGGCCTTGA GAACTACGCC TTTTCGATGA AGAACACCGT
901 GAACGAGCCG AACGTGAGCG GCAAGATTGA GGAGGCCGAC AAGAACACGA TCACGAATGC
961 CGTGGAGGAG GCGCTGCAGT GGCTGAACAA CAACCAGGAG GCCAGCAAGG AGGAGTACGA
1021 GCACCGCCAG AAGGAGCTGG AGAACCTGTG CACGCCCATC ATGACGAAGA TGTACCAGGG
1081 CATGGGCGCG GCGGGTGGTA TGCCCGGCGG CATGCCTGGG GGTATGCCCC GCGGAATGCC
1141 TGGGGGTATG CCCGGCGGCA TGCTTGGTGG CCGGAACCCG TCATNGTCTG CGGGGCCGAA
1201 GGTGGAGGAG GTTGACTGAg cgcgtggccc cgagaacatt tgcattggcg acctgccttt
1261 gagtgaccgg tctgttggct cctgtcttgc tagaacgtga agggtcggcg gggcctcgtc
1321 cgccattact attttatcta ttgtttgttt ttccattgtt ttattttggt cccccctcct
1381 ccattattat tattattatt attgttcgca cggttattat tattacgatt gttattgttc
1441 gcttggccat tgcggtggtg ctcggtgtgt tgagggtttc tgcggtgctg gaggtgtcg
1501 gagccgccgt gcagaagctg ctgctgctgt gtgtgctgtgt gtgtgtggct ttgctgcacac
1561 ctcaactttta ttggcttctc ttttctcctg cgctgctggc tgcgctcagag ccaacaaaag
1621 ctgatagttg taagcgttcg gcagtagaac cgaaaacaaa cacaacacaca aacacaaaaca
1681 ctaacacaaa cacaacacaca cacaacacata cacagcggaa aca

```

Figura 24. Secuencia de nucleótidos del clon HP5. En mayúsculas se indica la región codificante, región carboxi-terminal del gen *hsp70* de la cepa Tre y en minúsculas la región intergénica. El codón de paro se indica en rojo y subrayado. Los números a la izquierda indican la posición de los nucleótidos en la secuencia.

1	ACGACGAGCC	AGCGGGCGCT	CCGCCGCCTC	CGCACCGCGT	GCGAGCGCGC	CAAGCGGACG
61	CTGTCGTCCG	CGGCGCAGGC	GACGATTGAG	ATCGACGCGC	TGTTTCGACAA	CGTGGACTTC
121	CAGTCGACCA	TCACCCGTGC	CCGCTTCGAG	GAGCTCTGCG	GCGACCTCTT	CCGCGGCACG
181	CTGCAGCCGG	TGGAGCGTGT	GCTGCAGGAC	GCCAAGATGG	ACAAGCGCGC	CGTGCACGAC
241	GTGGTGCTCG	TTGGCGGCTC	CACCCGCATC	CCGAAGGTGA	TGCAGCTGGT	GTCGGACTTC
301	TTCGGCGGCA	AGGAGCTGAA	CAAGAGCATC	AACCCCGATG	AGGCCGTGGC	GTACGGGCC
361	GCCGTGCAGG	CCTTCATCCT	CACCGGGGGC	AAGAGCAAAG	AGACGGAGGG	CCTGCTGCTG
421	CTCGACGTGA	CGCCCGTGAC	GCTTGGCATC	GAGACGGCCG	GTGGCGTTAT	GACGTCGCTG
481	ATTAAGCGCA	ACACGACGAT	CCCAACCAAG	AAGAGCCAGA	TCTTCTCGAC	GTACGCGGAC
541	AACCAGCCCG	GCGTGACAT	CCAGGTCTTC	GAGGGGGAGC	GTGCGATGAC	GAAGGACTGC
601	CACCTGCTCG	GTACGTTTGA	CCTGTCCGGC	ATTCCGCCGG	CGCCGCGCGG	CGTGCCCCAG
661	ATTGAGGTGA	CCTTCGACCT	CGACGCCAAC	GGCATCCTGA	ACGTGTCCCG	GGAGGAGAAG
721	GGCACCGGCA	AGCGCAACCA	GATCGTCATC	ACGAACGACA	AGGGCCGTCT	GAGCAAGGCG
781	GAGATTGAGC	GCATGGTGTC	GGAGGCGTCC	AGGTACGAGG	CGCAGGACAA	GGAGCAGCGC
841	GAGCGCATTG	ATGCAAAGAA	CGGCCTTGAG	AACTACGCCT	TTTCGATGAA	GAACACCGTG
901	AACGAGCCGA	ACGTGAGCGG	CAAGATTGAG	GAGGCCGACA	AGAACACGAT	CACGAATGCC
961	GTGGAGGAGG	CGCTGCAGTG	GCTGAACAAC	AACCAGGAGG	CCAGCAAGGA	GGAGTACGAG
1021	CACCGCCAGA	AGGAGCTGGA	GAACCTGTGC	ACGCCCATCA	TGACGAAGAT	GTACCAGGGT
1081	ATGGGCGCGG	GCGGTGGTAT	GCCCGGCGGA	ATGCCTGGGG	GTATGCCCGG	GGGAATGCCT
1141	GGGGGTATGC	CCGGGGGTAT	GCCTGGGGGT	<u>ATGCCCGGGG</u>	<u>GTATGCCTGG</u>	TGGCGCGAAC
1201	CCGTATCATGT	CGTCGGGGCC	GAAGGTGGAG	GAGGTTGACT	<u>GAG</u> gcgcgtgg	ccccgagAAC
1261	atttgcatgg	cgcagctgcc	tttgagtgac	cggtctgctg	gctccctgct	tgctagaacg
1321	tgaagggtcc	ggcgggcctc	gtccgccatt	actatthttat	ctattgthttg	tctttcccat
1381	tgtttttttt	ttatthtggtt	ccccctcctc	cattattatt	attattgtha	ttatthttgt
1441	tgtttgcgacg	gthattatta	ttacgattgt	tattgttcgc	ttggccattg	cggtggtgct
1501	cggtgctgtt	agggthttctg	cggtgctgga	ggctgtcggg	gcccgcctgc	agaagctgct
1561	gcctgcatgt	gtgctgtgtg	gtgtggcttt	gcacacgcct	cactthttctt	ggctthctctt
1621	ttctcctgcg	ctgctgggctg	gcagagagcc	aacaaaagct	gatagthgta	agcgttcggc
1681	agtagaacccg	aaaacaaaca	caaacataca	cagcggaaac	<u>aATG</u> ACGTAC	GAGGGAGCC

Figura 25. Secuencia de nucleótidos del clon HH1. En mayúsculas se indica la región codificante, región carboxi-terminal del gen *hsp70* de la cepa H14 y en minúsculas la región intergénica. Subrayado se indican los 24 nucleótidos insertados en la secuencia de H14, respecto a la secuencia de la cepa Tre. El codón de inicio de una segunda región codificante se indica en azul y subrayado, el codón de paro se indica en rojo y subrayado. Los números a la izquierda indican la posición de los nucleótidos en la secuencia.

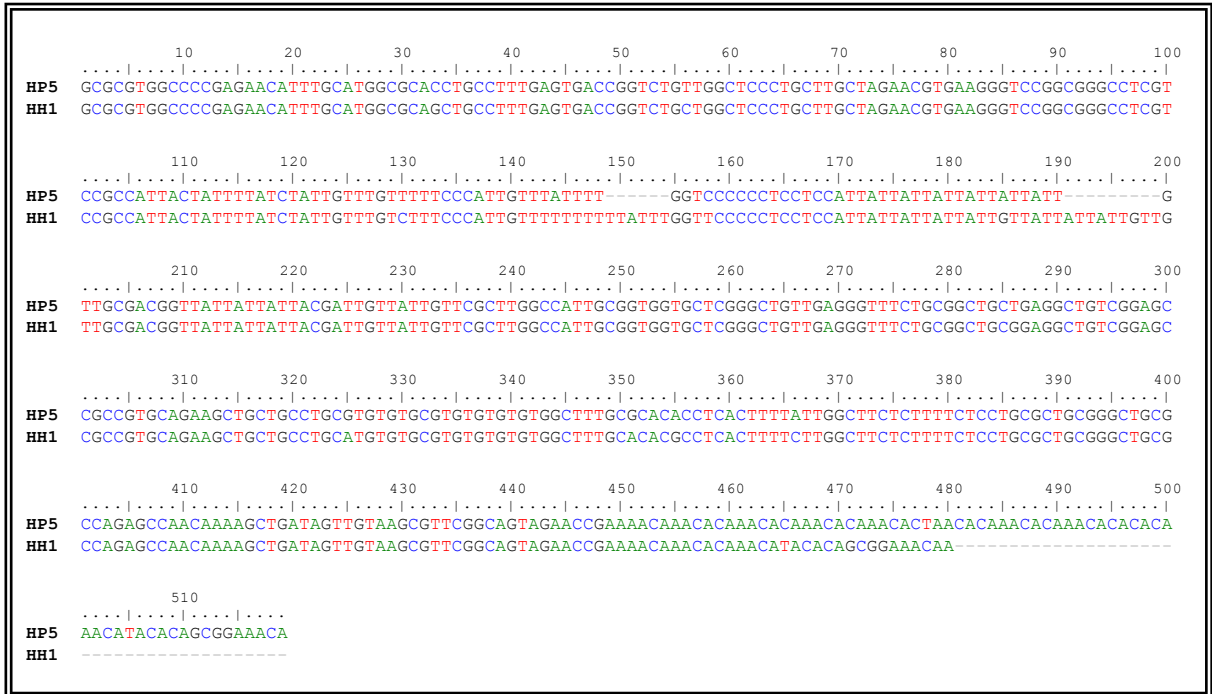


Figura 26. Alineamiento de la región intergénica del gen *hsp70* de *T. rangeli*. Alineamiento entre las regiones intergénicas del clon HH1 (H14) y HP5 (Tre). El punto significa identidad, los guiones inserción/delección y los números indican la posición de los nucleótidos en la secuencia.

Al realizar un solapamiento entre las secuencias obtenidas y las anteriormente secuenciadas y reportadas (No. de acceso a GenBank AY495381 y AY495382, Cuervo et al., 2004), se encontró que la unidad completa codificante de la proteína HSP70 en la cepa Tre tiene un tamaño de 2.490 pb, con una región codificante de 1.986 pb y una región intergénica de 504 pb. Por su parte, la unidad codificante de la proteína HSP70 en la cepa H14 presenta un tamaño de 2.507 pb, con una región codificante de 2.010 pb y una región intergénica de 497 pb. Lo que coincide con el tamaño esperado de acuerdo a lo encontrado mediante análisis de “Southern blot”, además de ser muy similar a lo reportado para la unidad génica, *hsp70* de *T. cruzi*, la cual tiene un tamaño de 2.484 pb, una región codificante de 2.043 pb y una

región intergénica de 441 pb (No. de acceso a GenBank X07083; Requena et al., 1988).

A pesar que los resultados de dicha construcción génica coinciden con lo esperado, teniendo en cuenta que las secuencias ensambladas corresponden al producto de dos fragmentos obtenidos en reacciones de PCR diferentes, se amplificó, clonó y secuenció una unidad completa del gen para cada una de las cepas del parásito.

6.2.1 Amplificación, clonación y secuenciación de la región codificante del gen *hsp70* de las cepas Tre, KP1(-) y H14, KP1(+) de *T. rangeli*

Teniendo en cuenta que Cuervo et al., 2004 ya habían reportado la región amino terminal y que los resultados previos permitieron conocer la región carboxilo terminal del gen, se diseñó una pareja de oligonucleótidos que permitió amplificar la región codificante completa del gen *hsp70* en las cepas Tre y H14 del parásito (Figura 5).

Es así como, la pareja de oligonucleótidos 70TreATG y 70TreTGA amplificaron una banda de aproximadamente 2.000 pb en las cepas Tre (Figura 27) y H14 (Figura 28) de *T. rangeli*. Dichas bandas se extrajeron del gel, purificaron y clonaron. Producto de su clonación se obtuvieron 4 clones positivos para la cepa Tre y 4 para la cepa H14. De estos clones, los denominados clones TREcHS-3 (Tre) y cH70H-3 (H14), luego de digestión con la enzima *EcoRI*, liberaron un fragmento del tamaño esperado (Figura 29 A y B). Con este resultado, ambos clones se enviaron a secuenciar.

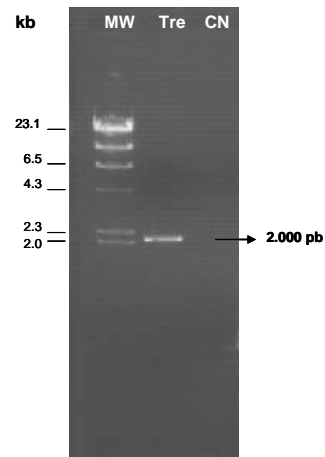


Figura 27. PCR para la cepa Tre usando los oligonucleótidos 70TreATG/70TreTGA. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio conteniendo 10 μ l del producto de amplificación del ADN de la cepa Tre. La banda seleccionada para los ensayos de clonación se indica a la derecha, se utilizó λ -HindIII como marcador de peso molecular, cuyos pesos se indican a la izquierda.

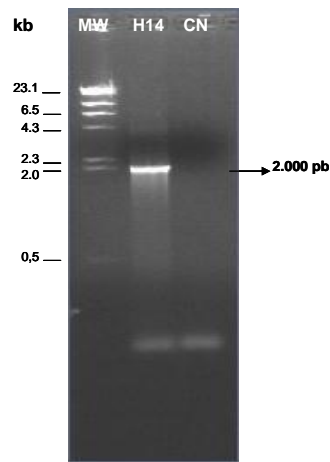


Figura 28. PCR para la cepa H14 usando los oligonucleótidos 70TreATG/70TreTGA. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio conteniendo 10 μ l del producto de amplificación del ADN de la cepa H14. La banda seleccionada para los ensayos de clonación se indica a la derecha, se utilizó λ -HindIII como marcador de peso molecular, cuyos pesos se indican a la izquierda.

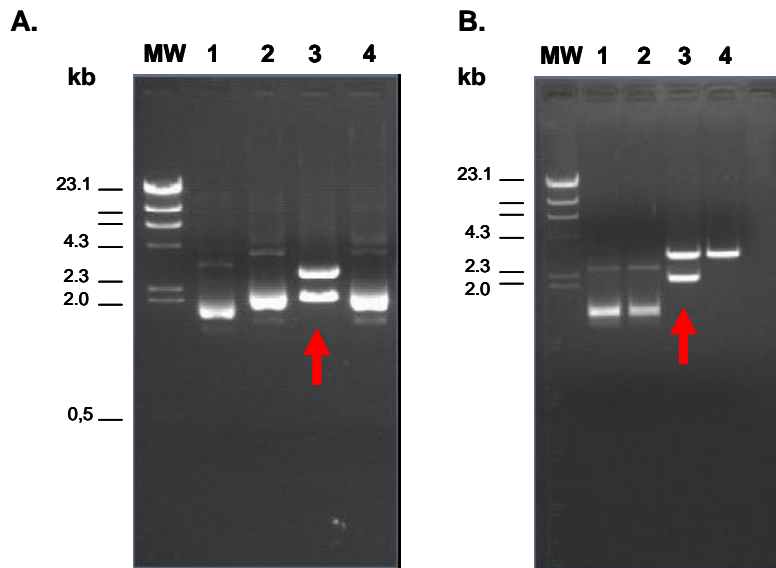


Figura 29. Digestión con la enzima de restricción *EcoRI* del ADN plásmidico de los clones TREcHS y cH70H. Electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1 % del ADN plásmidico digerido con la enzima de restricción *EcoRI* de los clones: **A.** Obtenidos de la clonación de la región codificante del gen *hsp70* de la cepa Tre, TREcHS-1 (1), TREcHS-2 (2), TREcHS-3 (3) y TREcHS-4 (4) y **B.** De la clonación de la región codificante del gen *hsp70* de la cepa H14, cH70H-1 (1), cH70H-2 (2), cH70H-3 (3) y cH70H-4 (4). Con un flecha se indican los clones que liberaron el fragmento esperado.

Ambas hebras del inserto de los clones TREcHS-3 y cH70H-3 fueron secuenciadas. Los resultados de la secuenciación son mostrados en la figura 30, para el clon TREcHS-3 y en la figura 31, para el clon cH70H-3. Ambas secuencias luego de ser depuradas fueron consignadas en la base de datos de GenBank, números de acceso EF108421 (TREcHS-3) y EF108422 (cH70H-3).

La región codificante secuenciada en la cepa Tre, presentó un tamaño de 2.082 pb y de 2.010 pb en la cepa H14, con una identidad de 96,1 % entre ellas, presentándose diferencias debidas a 10 SNPs y a una inserción de 72 nucleótidos a nivel del extremo 3' del gen, en la secuencia de la cepa Tre respecto a la secuencia de la cepa H14 (Figura 32).

Dada la diferencia observada en el tamaño de la región codificante entre el clon TREcHS-3 (2.082 pb) y la secuencia obtenida previamente por solapamiento (1.986 pb) para la cepa Tre, se realizó un alineamiento y análisis de restricción. Dichas secuencias presentaron una identidad de 95 % entre ellas, presentándose el principal polimorfismo a nivel del extremo 3' terminal del gen, y ambas mostraron tener sitios de corte para la enzima *SphI*, la cual previamente se demostró corta el gen *hsp70* en la cepa Tre del parásito. El mismo análisis se realizó para las secuencias obtenidas para la cepa H14, las cuales mostraron una identidad de 99,8 % entre ellas y no poseer diana de restricción para la enzima *SphI*.

Teniendo en cuenta que las amplificaciones fueron realizadas con una Taq polimerasa con actividad correctora y que las dos hebras de los clones fueron secuenciadas en su totalidad, estos resultados confirman la presencia de varias copias del gen, así como también evidencian la presencia de polimorfismo entre la mismas, para el caso de la cepa Tre.

1	ATG ACGTACG	AGGGAGCCAT	TGGCATCGAT	CTCGGCACGA	CGTACTCGTG	CGTTGGTGTG
61	TGGCAGAACG	AGCGCGTGGA	GATCATTGCG	AACGATCAGG	GCAACCGGAC	GACGCCGTG
121	TATGTGGCGT	TCACCGACAC	GGAGCGTCTG	ATCGGTGATG	CGGCGAAGAA	CCAGGTGGCG
181	ATGAACCCGA	CGAACACCGT	CTTCGACGCG	AAGCGCCTCA	TTGGGCGGAA	GTTCAGCGAC
241	TCCGTTGTGC	AGTCGGACAT	GAAGCACTGG	CCCTTCAAGG	TCATCGCGAA	GGGCGACGAC
301	AAGCCGGTGA	TCCAGGTGCA	GTTCGCCGCG	GAGGCCAAGA	CGTTCAACCC	GGAGGAGGTG
361	AGCTCGATGG	TGCTGCTGAA	GATGAAGGAG	GTTCGGGAGT	CGTACCTGGG	GAAGCAGGTG
421	AAGAAGGCCG	TGGTGACGGT	GCCCGCTAC	TTC AACGACT	CGCAGCGGCA	GGCAGCGAAG
481	GACGCCGGCA	CGATCGCGGG	GATGGAGGTG	CTGCGCATCA	TCAACGAGCC	GACGGCCGCC
541	GCCATTGCGT	ACGGGCTGGA	CAAGGTGGAG	GAAGGCAGGG	AGCGCCACGT	GCTGATCTTT
601	GACCTTGGCG	GCGGCACGTT	TGACGTACCC	CTGCTGACGA	TCGACGGCGG	CATCTTTGAG
661	GTGAAGGCGA	CGAACGGCGA	CACGCACCTG	GGCGGCGAGG	ACTTCGACAA	CCGCTTCGTG
721	GCGCACTTCA	CGGACGAGTT	CAAGCGGAAG	AACCGGGGCA	AGGACATGAC	GACGAGCCAG
781	CGGGCGCTCC	GCCGCCCTCCG	CACCGCGTGC	GAGCGCACCA	AGCGGACGCT	GTCGTCGCGG
841	GCGCAGGCGA	CGATTGAGAT	CGACGCGCTG	TTGACAACG	TGGACTTCCA	GTCGACCATC
901	ACCCGTGCCC	GCTTCGAGGA	GCTCTGCGGC	GACCTCTTCC	GCGGCACGCT	GCAGCCGGTG
961	GAGCGTGTGC	TGCAGGACGC	CAAGATGGAC	AAGCGCGCCG	TGCACGACGT	GGTGCTCGTT
1021	GGCGGCTCCA	CCCGCATCCC	GAAGGTGATG	CAGCTGGTGT	CGGACTTCTT	CGGCGGCAAG
1081	GAGCTGAACA	AGAGCATCAA	CCCCGATGAG	GCCGTGGCGT	ACGGCGCCGC	CGTGCAGGCC
1141	TTCATCTTCA	CCGGGGGCAA	GAGCAAGCAG	ACGGAGGGCC	TGCTGCTGCT	CGACGTGACG
1201	CCGCTGACGC	TTGGCATCGA	GACGGCCGGT	GGCGTTATGA	CGTCGCTGAT	TAAGCGCAAC
1261	ACGACGATCC	CAACCAAGAA	GAGCCAGATC	TTCTCGACGT	ACGCGGACAA	CCAGCCCGGC
1321	GTGCACATCC	AGGTCTTCGA	GGGAGAGCGT	GCGATGACGA	AGGACTGCCA	CCTGCTCGGT
1381	ACGTTTGACC	TGTCCGGCAT	TCCGCCGGCG	CCGCGCGGCG	TGCCCCAGAT	TGAGGTGACC
1441	TTCGACCTCG	ACGCCAACGG	CATCCTGAAC	GTGTCCGCGG	AGGAGAAGGG	CACCGGCAAG
1501	CGCAACCAGA	TCGTCAATCA	GAACGACAAG	GGCCGTCTGA	GCAAGGCGGA	GATTGAGCGC
1561	ATGGTGTCCG	AGGCGTCCAG	GTACGAGGCG	CAGGACAAGG	AGCAGCGCGA	GCGCATTGAT
1621	GCAAAGAACG	GCCTTGAGAA	CTACGCCTTT	TCGATGAAGA	ACACCGTGAA	CGAGCCGAAC
1681	GTGAGCGGCA	AGATTGAGGA	GGCCGACAAG	AACACGATCA	CGAATGCCGT	GGAGGAGGCG
1741	CTGCAGTGGC	TGAACAACAA	CCAGGAGGCC	AGCAAGGAGG	AGTACGAGCA	CCGCCAGAAG
1801	GAGCTGGAGA	ACCTGTGCAC	GCCCATCATG	ACGAAGATGT	ACCAGGGCAT	GGGCGCGGGC
1861	GGTGGTATGC	CCGGCGGCAT	GCCTGGGGGT	ATGCCCGGCG	GAATGCCTGG	GGGTATGCC
1921	GGCGGAATGC	CTGGGGGTAT	GCCCGGCGGA	ATGCCTGGGG	GTATGCCCGG	CGGAATGCCT
1981	GGGGGTATGC	CCGGCGGAAT	GCCTGGGGGC	ATGCCCGGCG	GCATGCCTGG	TGGCGCGAAC
2041	CCGTATCGT	CGTCGGGGCC	GAAGGTGGAG	GAGGTTGAC T GA		

Figura 30. Secuencia de nucleótidos de la región codificante de la proteína HSP70 de la cepa Tre, KP1(-) de *T. rangeli*. En rojo y subrayados se indican los codones de inicio y parada, los números indican la posición de los nucleótidos en la secuencia. No. de acceso a GenBank: EF108421.

```

1 ATGACGTACG AGGGAGCCAT TGGCATCGAT CTCGGCACGA CGTACTCGTG CGTTGGTGTG
61 TGGCAGAACG AGCGCGTGGA GATCATTGCG AACGATCAGG GCAACCGGAC GACGCCGTCG
121 TATGTGGCGT TTACCGACAC GGAGCGTCTG ATCGGTGACG CGGCGAAGAA CCAGGTGGCG
181 ATGAACCCGA CGAACACCGT CTTGACGCG AAGCGCCTCA TTGGGCGGAA GTTCAGCGAC
241 TCCGTTGTGC AGTCGGACAT GAAGCACTGG CCCTTCAAGG TCATCGCGAA GGGCGACGAC
301 AAGCCGGTGA TCCAGGTGCA GTTCCGCGGC GAGACCAAGA CGTTCAACCC GGAGGAGGTG
361 AGCTCGATGG TGCTGCTGAA GATGAAGGAG GTTGC GGAGT CGTACCTGGG GAAGCAGGTG
421 AAGAAGGCCG TGGTGACGGT GCCCGCTAC TTCAACGACT CGCAGCGGCA GGCGACGAAG
481 GACGCCGGCA CGATCGCGGG GATGGAGGTG CTGCGCATCA TCAACGAGCC GACGCCGCC
541 GCCATTGCGT ACGGGCTGGA CAAGGTGGAG GAAGGCAGGG AGCGCCACGT GCTGATCTTT
601 GACCTTGGCG GCGGCACGTT TGACGTACC CTGCTGACGA TCGACGGCGG CATCTTTGAG
661 GTGAAGGCGA CGAACGGCGA CACGCACCTG GCGCGCAGG ACTTCGACAA CCGCCTCGTG
721 GCGCACTTCA CGGACGAGTT CAAGCGGAAG AACCGGGGCA AGGACATGAC GACGAGCCAG
781 CGGGCGCTCC GCCGCCTCCG CACCGCTGC GAGCGCGCCA AGCGGACGCT GTCGTCGCG
841 GCGCAGGCGA CGATTGAGAT CGACGCGCTG TTCGACAACG TGGACTTCCA GTCGACCATC
901 ACCCGTGCCC GCTTCGAGGA GCTCTGCGGC GACCTCTTCC GCGGCACGCT GCAGCCGGTG
961 GAGCGTGTGC TGCAGGACGC CAAGATGGAC AAGCGCGCCG TGCACGACGT GGTGCTCGTT
1021 GGCGGCTCCA CCCGCATCCC GAAGGTGATG CAGCTGGTGT CGGACTTCTT CGGCGGCAAG
1081 GAGCTGAACA AGAGCATCAA CCCCATGAG CCGGTGGCGT ACGGCGCCG CGTGCAGGCC
1141 TTCATCCTCA CCGGGGGCAA GAGCAAGCAG ACGGAGGGCC TGCTGCTGCT CGACGTGACG
1201 CCGTGACGCG TTGGCATCGA GACGGCCGGT GCGGTTATGA CGTCGCTGAT TAAGCGCAAC
1261 ACGACGATCC CAACCAAGAA GAGCCAGATC TTCTCGACGT ACGCGGACAA CCAGCCCGGC
1321 GTGCACATCC AGGTCTTCGA GGGGAGCGT GCGATGACGA AGGACTGCCA CCTGCTCGGT
1381 ACGTTTGACC TGTCCGGCAT TCCGCCGGCG CCGCGCGGCG TGCCCAGAT TGAGGTGACC
1441 TTCGACCTCG ACGCCAACGG CATCCTGAAC GTGTCCGCGG AGGAGAAGGG CACCGGCAAG
1501 CGCAACCAGA TCGTCATCAC GAACGACAAG GGCCGTCTGA GCAAGGCGGA GATTGAGCGC
1561 ATGGTGTCCG AGGCGTCCAG GTACGAGGCG CAGGACAAGG AGCAGCGCGA GCGCATGAT
1621 GCAAAGAACG GCCTTGAGAA CTACGCCTTT TCGATGAAGA ACACCGTGAA CGAGCCGAAC
1681 GTGAGCGGCA AGATTGAGGA GGCCGACAAG AACACGATCA CGAATGCCGT GGAGGAGCG
1741 CTGCAGTGGC TGAACAACAA CCAGGAGGCC AGCAAGGAGG AGTACGAGCA CCGCCAGAAG
1801 GAGCTGGAGA ACCTGTGCAC GCCCATCATG ACGAAGATGT ACCAGGTAT GGGCGCGGGC
1861 GGTGGTATGC CCGGCGGAAT GCTGGGGGT ATGCCCGGGG GAATGCCCTG GGGTATGCCC
1921 GGGGGTATGC CTGGGGGTAT GCCCGGGGGT ATGCCTGGTG GCGCGAACCC GTCATCGTCG
1981 TCGGGGCCGA AGGTGGAGGA GATTGACTGA

```

Figura 31. Secuencia de nucleótidos de la región codificante de la proteína HSP70 de la cepa H14, KP1(+) de *T. rangeli*. En azul y subrayados se indican los codones de inicio y parada, los números indican la posición de los nucleótidos en la secuencia. No. de acceso a GenBank: EF108422.

Resultados

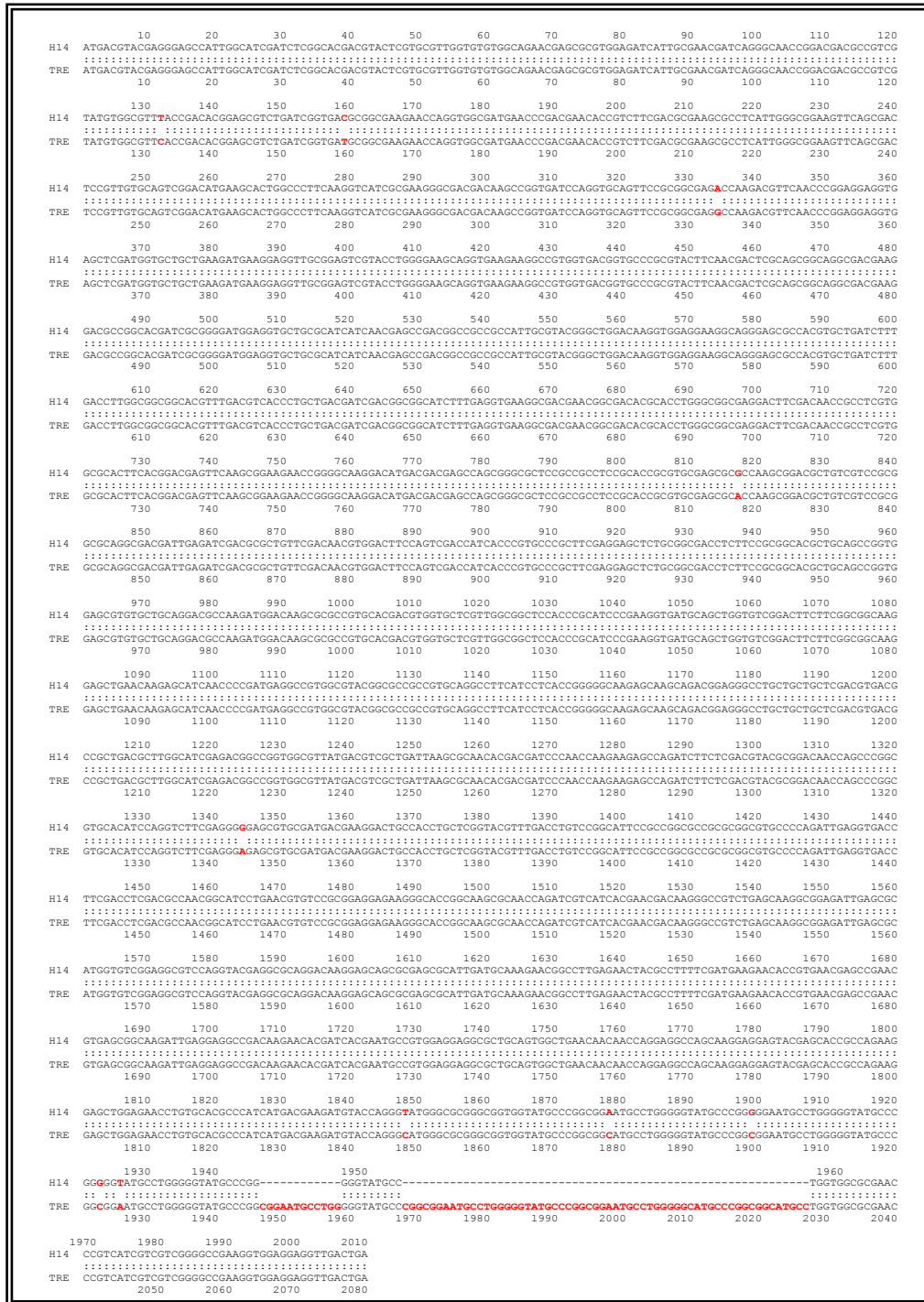


Figura 32. Alineamiento de las secuencia de nucleótidos de la región codificante de la proteína HSP70 de la cepa Tre y H14 de *T. rangeli*. En rojo se muestran las diferencias encontradas entre las secuencias. Los números indican la posición de los nucleótidos en la secuencia.

Análisis BLASTN de las secuencias de nucleótidos de las cepas Tre y H14 reveló que la secuencia del gen *hsp70* de *T. rangeli* presenta una identidad de 90 % con la secuencia del gen *hsp70* de *T. cruzi* (X07083). Además, el gen de *T. rangeli* presenta una identidad de aproximadamente 83 % con varias especies de Leishmania, de 82 % con *T. brucei*, de 81 % con varias especies de la familia *Bodonidae* y de 75 % con la secuencia de humano, lo que confirma que las secuencias obtenidas para las cepas de *T. rangeli* corresponden al gen *hsp70*, además del carácter altamente conservado de los mismos.

Análisis adicionales de las secuencias obtenidas mostraron que la región codificante del gen *hsp70* de ambas cepas presentó un porcentaje de G/C de 64 %, muy similar a lo encontrado para la región codificante del gen *hsp70* de *T. cruzi* (62 %), *T. vivax* (62 %), *L. major* (64 %), *L. braziliensis* (65 %), *L. infantum* (64 %), *L. donovani* (64 %), *L. tarentolae* (64 %), *L. amazonensis* (64 %), pero ligeramente diferente de lo encontrado para el mismo gen en *T. brucei* (56 %).

Adicionalmente, y haciendo uso de la aplicación TACG (Harry Mangalan, 1996 UC Irving, modificado; <http://workbench.sdsc.edu>) se confirmó el polimorfismo de restricción observado para la enzima *SphI* entre las cepas Tre y H14.

Por otra parte, y mediante la herramienta "Translate" del servidor ExpASy se encontró que el ORF del gen *hsp70* en la cepa Tre origina una proteína de 693 aminoácidos (Figura 33), mientras que la secuencia para la cepa H14 origina una proteína de 669 aminoácidos (Figura 34), con una identidad entre ellas de 96,2 % (Figura 35).

Análisis de la secuencia putativa de aminoácidos de la proteína HSP70 para las secuencias analizadas mostró que la diferencia en tamaño de la cadena polipeptídica entre las cepas esta dada por la inserción de 72 nucleótidos en la región 3´ terminal del gen *hsp70* en la cepa Tre, esta inserción se traduce en la adición de 6 repeticiones del motivo MPGG en el extremo carboxilo terminal de la proteína HSP70 de dicha cepa, para un total de 14 repeticiones MPGG en la proteína de la cepa Tre y de 8 repeticiones en la proteína de la cepa H14 (Figura 35).

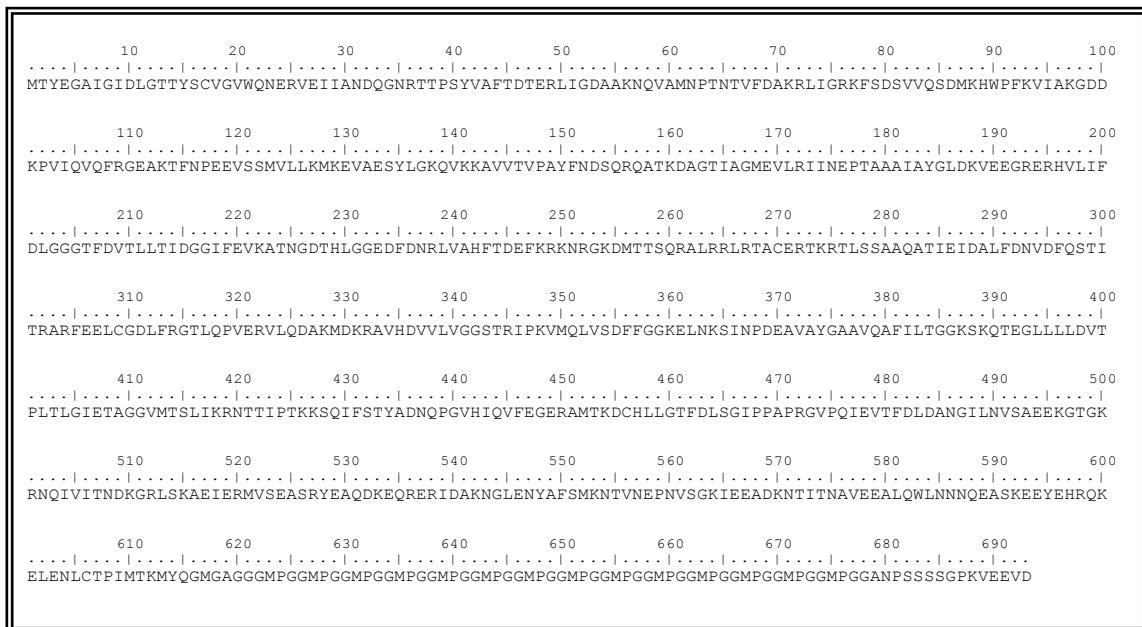


Figura 33. Secuencia de aminoácidos de la proteína HSP70 de la cepa Tre de *T. rangeli*. Secuencia deducida de aminoácidos a partir de la secuencia de nucleótidos del clon TREchS-3. Los números indican la posición de los aminoácidos en la secuencia. No. de acceso a GenBank: ABL74477.



Figura 34. Secuencia de aminoácidos de la proteína HSP70 de la cepa H14 de *T. rangeli*. Secuencia deducida de aminoácidos a partir de la secuencia de nucleótidos del clon cH70H-3. Los números indican la posición de los aminoácidos en la secuencia. No. de acceso a GenBank: ABL74478.

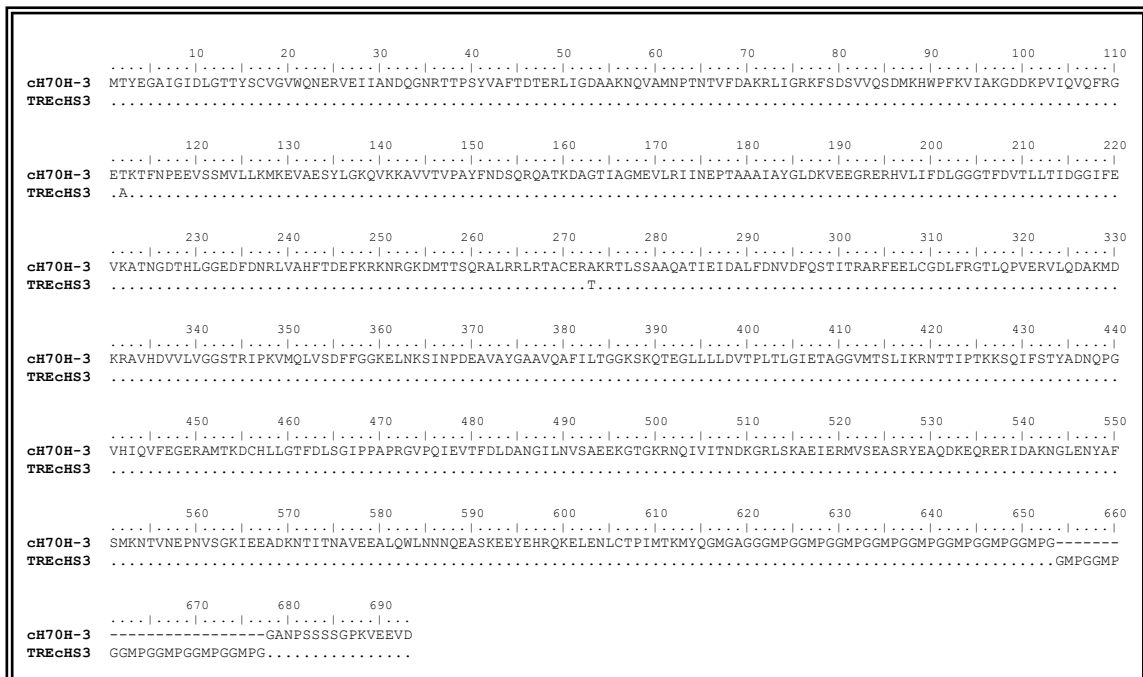


Figura 35. Alineamiento de las secuencia de aminoácidos de la proteína HSP70 de la cepa Tre y H14 de *T. rangeli*. Los números indican la posición de los nucleótidos en la secuencia, los puntos identidad y los guiones inserciones/delecciones.

Adicionalmente, análisis de la secuencia de nucleótidos del gen *hsp70* de ambas cepas de *T. rangeli* realizado con el programa CUSP de la base de datos EMBL-EBI (www.ebi.ac.uk), el cual genera una tabla de uso de codón preferente, mostró que la frecuencia de las tripletas de nucleótidos usadas para codificar los aminoácidos correspondientes de la proteína HSP70 entre los genes *hsp70* de las cepas H14 y Tre de *T. rangeli* son iguales, presentándose diferencias relacionadas únicamente con el número de aminoácidos presentes en ambas proteínas, debido a la inserción de las 6 repeticiones MPGG en la proteína HSP70 de la cepa Tre (Figura 35).

Estudios de BLASTP de la secuencia de aminoácidos de la proteína de *T. rangeli* mostró que presenta aproximadamente un 93 % de identidad con varias proteínas HSP70 reportadas para *T. cruzi* y *T. brucei*, lo que confirma el alto grado de conservación de dichas proteínas.

6.2.2 Amplificación, clonación y secuenciación de la unidad completa del gen *hsp70* de las cepas Tre, KP1(-) y H14, KP1(+) de *T. rangeli*

6.2.2.1 Región codificante

Con el objetivo de caracterizar completamente el gen *hsp70* de *T. rangeli* en las cepas evaluadas, se decidió amplificar, clonar y secuenciar la unidad completa del gen, región codificante con su respectiva región intergénica. Usando los oligonucleótidos 70TreATG y 70HP6R (Figura 6) se amplificó una banda de 2.500 pb, aproximadamente (Figura 36), la cual fue purificada y clonada.

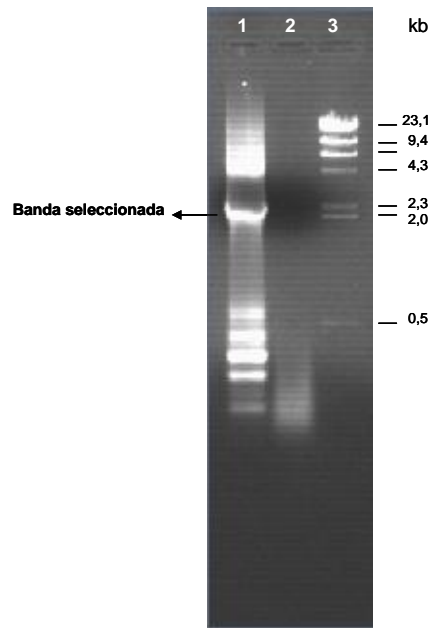


Figura 36. PCR del ADN de la cepa Tre usando los oligonucleótidos 70TreATG/70HP6R. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio conteniendo 10 μ l del producto de amplificación (1), control de la reacción (2). La banda seleccionada para los ensayos de clonación se indica a la izquierda, se utilizó λ -HindIII como marcador de peso molecular (3), cuyos pesos en kb se indican a la derecha.

Producto de la clonación se obtuvieron 4 clones, 2 de los cuales luego de digestión con la enzima *EcoRI* liberaron un fragmento del tamaño esperado (Figura 37), los denominados clones uHP5 (carril 2 y 3) y uHP6 (carril 8 y 9). Con este resultado ambos clones se enviaron a secuenciar.

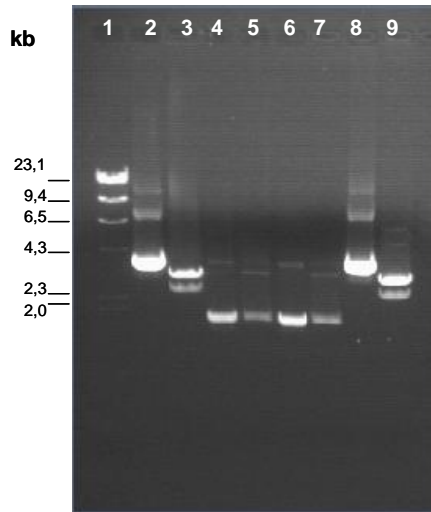


Figura 37. ADN plásmidico de los clones uHP. Electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1 % del ADN plásmidico de los clones obtenidos luego de la clonación de la unidad completa del gen *hsp70* de la cepa Tre. uHP5 sin digerir (2), uHP5/*EcoRI* (3), uHP4 sin digerir (4), uHP4/*EcoRI* (5), uHP3 sin digerir (6), uHP3/*EcoRI* (7), uHP6 sin digerir (8), uHP6/*EcoRI* (9). Se utilizó λ -HindIII como marcador de peso molecular (3), cuyos pesos indican a la izquierda.

Por otra parte y con el objetivo de completar la caracterización en la cepa H14, se procedió de igual forma. Las parejas de oligonucleótidos HSH14-Fw/HSP70GCF y 70TreATG/HSH14-Rv se usaron para la amplificación de la unidad completa en H14 (Figura 7), producto de la cual se obtuvo una banda de aproximadamente 2.500 pb en ambas PCR (Figura 38), las cuales fueron cortadas, purificadas y clonadas.

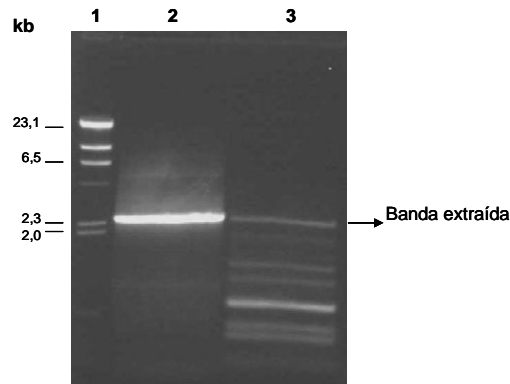


Figura 38. PCR del ADN de la cepa H14 usando los oligonucleótidos HSH14-Fw/HSP70GCF y 70TreATG/HSH14-Rv. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio conteniendo 10 μ l del producto de amplificación con los oligonucleótidos 70TreATG/HSH14-Rv (2) y con los oligonucleótidos HSH14-Fw/HSP70GCF (3). La banda seleccionada para los ensayos de clonación se indica a la derecha, se utilizó λ -HindIII como marcador de peso molecular (1), cuyos pesos en kb se indican a la izquierda.

Producto de la clonación se obtuvieron dos clones positivos, los clones denominados HSH14-A y HSH14-CF, los cuales liberaron una banda del tamaño esperado luego de digestión con la enzima *EcoRI* (Figura 39 A y B), con esta evidencia ambos clones se secuenciaron.

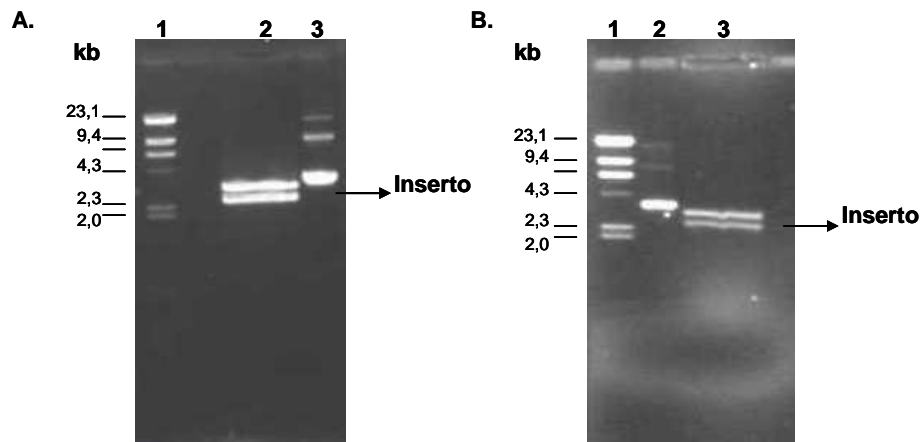


Figura 39. ADN plásmidico de los clones HSH14-A y HSH14-CF. Electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1 % del ADN plásmidico de los clones obtenidos luego de la clonación de la unidad completa del gen *hsp70* de la cepa H14. **A.** ADN plásmidico del clon HSH14-A digerido con *EcoRI* (2) y sin digerir (3). **B.** ADN plásmidico del clon HSH14-CF sin digerir (2) y digerido con *EcoRI*. Se utilizó λ -HindIII como marcador de peso molecular (1), cuyos pesos indican a la izquierda.

Ambas hebras del inserto de los clones seleccionados para las cepas Tre y H14 fueron secuenciadas. Las secuencias de los clones uHP5 (Figura 40) y uHP6 (Figura 41) de la cepa Tre, mostraron tener un tamaño de 2.474 pb y 2.504 pb, respectivamente. Ambas secuencias luego de ser depuradas fueron sometidas a la base de datos del GenBank, No. de acceso EF108419, para la secuencia del clon uHP5 y EF108420 para el clon uHP6.

```

1 ATGACGTACG AGGGAGCCAT TGGCATCGAT CTCGGCACGA CGTACTCGTG CGTTGGTGTG TGGCAGAACG AGCGCGTGGA
81 GATCATTGCG AACGATCAGG GCAACCCGAC GACGCCGTCG TATGTGGCGT TCACCGACAC GGAGCGTCTG ATCGGTAATG
161 CGGCGAAGAA CCAGGTGGCG ATGAACCCGA CGAACACCGT CTTCCGACGCG AAGCGCCTCA TTGGGCGGAA GTTCAGCGAC
241 TCCGTTGTGC AGTCGGACAT GAAGCACTGG CCCTTCAAGG TCATCGCGAA GGGCGACGAC AAGCCGGTGA TCCAGGTGCA
321 GTTCCGCGGC GAGACCAAGA CGTTCAACCC GGAGGAGGTG AGCTCGATGG TGCTGCTGAA GATGGAGGAG GTTGC GGAGT
401 CGTACCTGGG GAAGCAGGTG AAGAAGGCCG TGGTGACGGT GCCCGCTAC TTCAACGACT CGCAGCGGCA GCGCAGCAAG
481 GACGCCGCGA CGATCGCGGG GATGGAGGTG CTGCGCATCA TCAACGAGCC GACGCGCCGC GCCATTCGCT ACGGGCTGGA
561 CAAGGTGGAG GAAGGCAGGG AGCGCCACGT GCTGATCTTT GACCTTGGCG GCGGCACGTT TGACGTACC CTGCTGACGA
641 TCGACGGCGG CATCTTTGAG GTGAAGCGA CGAACGGCGA CACGCACCTG GCGGCGAGG ACTTCGACAA CCGCCTCGTG
721 GCGCACTCA CGGACGAGTT CAAGCGGAAG AACCGGGCA AGGACATGAC GACGAGCCAG CGGGCGTCC GCCGCCTCCG
801 CACCGCGTGC GAGCGCGCA AGCGGACGCT GTCGTCGCG GCGCAGGCGA CGATTGAGAT CGACGCGCTG TTCGACAACG
881 TGGACTTCCA GTCGACCATC ACCCGTGCCG GCTTCGAGGA GCTCTGCGGC GACCTCTTCC GCGGCACGCT GCAGCCGGTG
961 GAGCGTGTGC TGCAGGACGC CAAGATGGAC AAGCGCGCCG TGCACGACGT GGTGCTCGTT GCGGCTCCA CCCGCATCCC
1041 GAAGGTGATG CAGCTGGTGT CGGACTTCTT CCGCGGCAAG GAGCTGAACA AGAGCATCAA CCCCGATGAG GCCGTGGCGT
1121 ACGGCGCCG CGTGACGGCC TTCATCCTCA CCGGGGCAA GAGCAAGCAG ACGGAGGGCC TGCTGTGCT GCACGTGACG
1201 CCGTGACGC TTGGCATCGA GACGGCCGGT GCGTATGTA CGTCGCTGAT TAAGCGCAAC ACGACGATCC CAACCAAGAA
1281 GAGCCAGATC TTCTCGACGT ACGCGGACAA CCAGCCCGGC GTGCACATCC AGGTCTTCA GGGGAGCGT GCGATGACGA
1361 AGGACTACCA CCTGCTCGGT ACGTTTGACC TGTCCGGCAT TCCGCGGCG CCGCGCGGCG TGCCCCAGAT TGAGGTGACC
1441 TTCGACCTCG ACGCCAACGG CATCTGAAC GTGTCCGCG AGGAGAAGGG CACCGGCAAG CGCAACCAGA TCGTCATCAC
1521 GAACGACAAG GGCCGTCTGA GCAAGGCGGA GATTGAGCG ATGGTGTCCG AGGCGTCCAG GTACGAGGCG CAGGACAAGG
1601 AGCAGCGCGA GCGCATTGAT GCAAAGAAGC GCCTTGAGAA CTACGCCTTT TCGATGAAGA ACACCGTGAA CGAGCCGAAC
1681 GTGAGCGGCA AGATTGAGGA GGCCGACAAG AACACGATCA CGAATGCCGT GGAGGAGGCG CTGCAGTGGC TGAACAACAA
1761 CCAGGAGGCC AGCAAAGAGG AGTACGAGCA CCGCCAGAAG GAGCTGGAGA ACCTGTGCAC GCCCATCATG ACGAAGATGT
1841 ACCAGGGCAT GGGCGCGGCG GGTGGTATGC CCGGCGGCAT GCCTGGGGGT ATGCCCGGCG GAATGCCTGG GGGTATGCC
1921 GCGGCGATGC CTGGTGGGCG GGACCCGTCA TCGTCGTCG GCGCGAAGGT GGAGGAGGTT GACTGAgcgc gtggccccga
2001 gaacatttgc atggcgacc tgcctttgag tgaccggctc gttggctccc tgcttgctag aacgtgaagg gtccggcggg
2081 cctcgctccgc cattaactatt ttatctattg ttgtttttc ccattgttta ttttgggtccc ccctctcca ttattattat
2161 tattattatt gttgacgacg ttattattat tacgattggt attgttcgct tggccattgc ggtggtgctc gggctgttga
2241 gggttttctgc ggctgctgag gctgtcggag ccgcccgtgca gaagctgctg cctgctgtg tgcgtgtgtg tgtgtggctt
2321 tgacacacac tcacttttat tggcttctct tttctctctg gctgcccgtc gcgccagagc caacaaaagc tgatagttgt
2401 aagcgttccg cagtagaacc gaaaacaaac acaaacacaa acacaaacac acacaaacat acacagcgga aaca

```

Figura 40. Secuencia de nucleótidos de una unidad completa del gen *hsp70* de la cepa Tre, KP1(-) de *T. rangeli*. Secuencia de nucleótidos correspondiente al inserto del clon uHP5. En mayúscula la región codificante y en minúscula la región no codificante del gen; en rojo y subrayados se indican los codones de inicio y parada. Los números indican la posición de los nucleótidos en la secuencia. No. de acceso a GenBank: EF108419.

```

1  ATGACGTACG AGGGAGCCAT TGGCATCGAT CTCGGCACGA CGTACTCGTG CGTTGGTGTG TGGCAGAACG AGCGCGTGGA
81  GATCATTGCG AACGATCAGG GCAACCCGAC GACGCCGTCG TATGTGGCGT TCACCGACAC GGAGCGTCTG ATCGGTGATG
161 CGGCGAAGAA CCAGGTGGCG ATGAACCCGA CGAACACCGT CTTCGACGCG AAGCGCCTCA TTGGGCGGAA GTTCAGCGAC
241 TCCGTTGTGC AGTCGGACAT GAAGCACTGG CCCTTCAAGG TCATCGCGAA GGGCGACGAC AAGCCCGTGA TCCAGGTGCA
321 GTTCCGCGGC GAGACCAAGA CGTTCAACCC GGAGGAGGTG AGCTCGATGG TGCTGCTGAA GATGAAGGAG GTTGC GGAGT
401 CGTACCTGGG GAAGCAGGTG AAGAAGGCCG TGGTGACGGT GCCCGCGTAC TTCAACGACT CGCAGCGGCA GGCAGCAAG
481 GACGCCGGCA CGATCGCGGG GATGGAGGTG CTGCGCATCA TCAACGAGCC GACGGCCGCC GCCATTGCGT ACGGGCTGGA
561 CAAGGTGGAG GAAGGCAGGG AGCGCCACGT GCTGATCTTT GACCTTGGCG GCGGCACGTT TGACGTCAAC CTGCTGACGA
641 TCGACGGCGG CATCTTTGAG GTGAAGGCGA CGAACGGCGA CACGCACCTG GCGGCGGAGG ACTTCGACAA CCGCCTCGTG
721 GCGCACTTCA CGGACGAGTT CAAGCGGAAG AACCGGGGCA AGGACATGAC GACGAGCCAG CGGGCGCTCC GCCGCCTCCG
801 CACCGCGTGC GAGCGCGCCA AGCGGACGCT GTCGTCCCGG GCGCAGGCGA CGATTGAGAT CGACGCGCTG TTCGACAAACG
881 TGGACTTCCA GTCGACCATC ACCCGTGCCC GCTTCGAGGA GCTCTGCGGC GACCTCTTCC GCGGCACGCT GCAGCCGGTG
961 GAGCGTGTGC TGCAGGACGC CAAGATGGAC AAGCGCGCCG TGCACGACGT GGTGCTCGTT GCGGGCTCCA CCCGCATCCC
1041 GAAAGTGATG CAGCTGGTGT CGGACTTCTT CGGCGGCAAG GAGCTGAACA AGAGCATCAA CCCCAGTGTG GCCGTGGCGT
1121 ACGGCGCCGC CGTGCAGGCC TTCATCCTCA CCGGGGGCAA GAGCAAGCAG ACGGAGGGCC TGCTGCTGCT CGACGTGACG
1201 CCGCTGACGC TTGGCATCGA GACGGCCGGT GGCGTTATGA CGTCGCTGAT TAAGCGCAAC ACGACGATCC CAACCAAGAA
1281 GAGCCAGATC TTCTCGACGT ACGCGGACAA CCAGCCCGGC GTGCACATCC AGGTCTTCGA GGGGAGCGT GCGATGACGA
1361 AGGACTGCCA CCTGCTCGGT ACGTTTGACC TGTCCGGCAT TCCGCCGGCG CCGCGCGGCG TGCCCCAGAT TGAGGTGACC
1441 TTCGACCTCG ACGCCAACGG CATCCTGAAC GTGTCCGCGG AGGAGAAGGG CACCGGCAAG CGCAACCAGA TCGTCATCAC
1521 GAACGACAAG GGCCGTCTGA GCAAGGCGGA GATTGAGCGC ATGGTGTCCG AGGCGTCCAG GTACGAGGCG CAGGACAAGG
1601 AGCAGCGCGA GCGCATTGAT GCAAAGAATG GCCTTGAGAA CTACGCCTTT TCGATGAAGA ACACCGTGAA CGAGCCGAAC
1681 GTGAGCGGCA AGATTGAGGA GGCCGACAAG AACACGATCA CGAATGCCGT GGAGGAGGCG CTGCAAGTGGC TGAACAACAA
1761 CCAGGAGGCC AGCAAGGAGG AGTACGAGCA CCGCCAGAAG GAGCTGGAGA ACCTGTGCAC GCCCATCATG ACGAAGATGT
1841 ACCAGGGCAT GGGCGCGGGC GGTGGTATGC CCGCGGGCAT GCCTGGGGGT ATGCCCGGCG GAATGCCTGG GGGTATGCC
1921 GCGGGAATGC CTGGGGGTAT GCCCGCGGCG ATGCCTGGTG GCGCGGACCC GTCATCGTCG TCGGGGCCGA AGGTGGAGGA
2001 GGTGACTGA gcgcggtgcc ccgagaacat ttgcatggcg cacctgcctt tgagtgaccg gtctgttggc tccctgcttg
2081 ctagaacgtg aagggtccgg cgggcctcgt ccgccattac tattttatct attgtttgtt tttcccattg tttattttgg
2161 tccccctctc tccattatta ttattattat tattattatt gttgcgacgg ttattattat tacgattgtt attgttctgt
2241 tggccattgc ggtggtgctc gggctgttga gggtttctgc ggtgctgag gctgtcggag ccgcccgtga gaagctgctg
2321 cctgctgtgt tgctgtgtgt tgtgtggctt tgcacacacc tcacttttat tggcttctct tttctcctgc gctgccccgt
2401 gcgccagagc caacaaaagc tgatagttgt aagcgttcgg cagtagaac gaaaacgaac acaaacacaa acacaaaac
2481 acacaaaacat acacagcggg aaca

```

Figura 41. Secuencia de nucleótidos de una unidad completa del gen *hsp70* de la cepa Tre, KP1(-) de *T. rangeli*. Secuencia de nucleótidos correspondiente al inserto del clon uHP6. En mayúscula la región codificante y en minúscula la región no codificante del gen; en rojo y subrayados se indican los codones de inicio y parada. Los números indican la posición de los nucleótidos en la secuencia. No. de acceso a GenBank: EF108420.

Del mismo modo, la secuencia para el clon de H14, HSH14-A mostró un tamaño de 2.451 pb (No. de acceso a GenBank: EF442767) (Figura 42), mientras que la secuencia del clon HSH14-CF mostró tener un tamaño de 2.437 pb (No. de acceso a GenBank: EF442768) (Figura 43).

```

1  ATGACGTACG AGGGAGCCAT TGGCATCGAT CTCGGCACGA TGTACTCGTG CGTTGGTGTG TGGCAGAACG AGCGCGTGGA
81  GATCATTGCG AACGATCAGG GCAACCGGAC GACGCCGTCG TATGTGGCGT TTACCGACAC GGAGCGTCTG ATCGGTGACG
161 CGGCGAAGAA CCAGGTGGCG ATGAACCCGA CGAACACCGT CTTCGACGCG AAGCGCCTCA TTGGGCGGAA GTTCAGCGAC
241 FCCGTTGTGC AGTCGGACAT GAAGCACTGG CCCTTCAAGG TCATCGCGAA GGGCGACGAC AAGCCGGTGA TCCAGGTGCA
321 GTTCCGCGGC GAGACCAAGA CGTTCAACCC GGAGGAGGTG AGCTCGATGG TGCTGCTGAA GATGAAGGAG GTTGCGGAGT
401 CGTACCTGGG GAAGCAGGTG AAGAAGGCCG TGGTGACGGT GCCCGCGTAC TTCAACGACT CGCAGCGGCA GGGCAGCAAG
481 GACGCCGGCA CGATCGCGGG GATGGAGGTG CTGCGCATCA TCAACGAGCC GACGGCCGCC GCCATTGCGT ACGGGCTGGA
561 CAAGGTGGAG GAAGGCAGGG AGCGCCACGT GCTGATCTTT GACCTTGGCG GCGGCACGTT TGACGTCACC CTGCTGACGA
641 TCGACGGCGG CATCTTTGAG GTGAAGCGGA CGAACGGCGA CACGCACCTG GGGGCGGAGG ACTTCGACAA CCGCTCGTG
721 GCGCACTTCA CGGACGAGTT CAAGCGGAAG AACCGGGGCA AGGACATGAC GACGAGCCAG CGGGGCTCC GCCGCTCCG
801 CACCGCGTGC GAGCGCGCCA AGCGGACGCT GTCGTCCGCG GCGCAGGCGA CGATTGAGAT CGACGCGCTG TTCGACAACG
881 TGGACTTCCA GTCGACCATC ACCCGTGCCC GCTTCGAGGA GCTCTGCGGC GACCTCTTCC GCGGCACGCT GCAGCCGGTG
961 GAGCGTGTGC TGCAGGACGC CAAGATGGAC AAGCGCGCCG TGCACGACGT GGTGCTCGTT GGCGGCTCCA CCCGCATCCC
1041 GAAGGTGATG CAGCTGGTGT CGGACTTCTT CGGCGGCAAG GAGCTGAACA AGAGCATCAA CCCCATGAG GCCGTGGCGT
1121 ACGGCGCCGC CGTGCAGGCC TTCATCCTCA CCGGGGCAA GAGCAAGCAG ACGGAGGGCC TGCTGTCTGT CGACGTGACG
1201 CCGCTGACGC TTGGCATCGA GACGGCCGGT GCGGTTATGA CGTCGCTGAT TAAGCGCAAC ACGACGATCC CAACCAAGAA
1281 GAGCCAGATC TTCTCGAGCT ACGCCGACAA CCAGCCCGGC GTGCACATCC AGGTCTTCCA GGGGGAGCGT GCGATGACGA
1361 AGGACTGCCA CCTGCTCGGT ACGTTTGACC TGTCGGCAT TCCCGCGGCG CCGCGCGGCG TGCCCCAGAT TGAGGTGACC
1441 TTCGACCTCG ACGCCAACGG CATCTGAAC GTGTCCGCGG AGGAGAAGGG CACCGGCAAG CGCAACCAGA TCCTCATCAC
1521 GAACGACAAG GGCCGTCTGA GCAAGCGGGA GATTGAGCGC ATGGTGTCCG AGGCGTCCAG GTACGAGGCG CAGGACAAGG
1601 AGCAGCGCGA GCGCATTGAT GCAAAGAACG GCCTTGAGAA CTACGCCTTT TCGATGAAGA ACACCGTGAA CGAGCCGAAC
1681 GTGAGCGGCA AGATTGAGGA GGCCGACAAG AACACGATCA CGAATGCCGT GGAGGAGGCG CTGCAGTGGC TGAACAACAA
1761 CCAGGAGGCC AGCAAGGAGG AGTACGAGCA CCGCCAGAAG GAGCTGGAGA ACCTGTGCAC GCCCATCATG ACGAAGATGT
1841 ACCAGGGTAT GGGCGCGGGC GGTGGTATGC CCGCGGAAAT GCCTGGGGGT ATGCCCGGGG GAATGCCTGG GGGTATGCC
1921 GGGGTATGCT CTGGGGTAT GCCCGGGGGT ATGCCTGGTG GCGCGAACC GTCATCGTGC TCGGGGCCGA AGGTGGAGGA
2001 GGTGACTGA ggcggtggcc cagagaacat ttgcatggcg cagctgcctt tgagtgaccg gtctgctggc tcctgcttg
2081 ctagaacgtg aagggctcgg cgggcctcgt ccgccattac tattttatct attgtttgtc tttccattg ttttttttt
2161 atttggttcc cctcctcca ttattattat tattgttatt attattgttg ttgcgacggt tattattatt acgattgtta
2241 ttgttcgctt ggccattgcg gtggtgctcg ggctgttgag ggtttctgcg gctgcgagg ctgtcggagc cgccgtgcag
2321 aagctgctgc ctgcatgtgt gcgtgtgtgt gtggtttgac acacgctca ctttcttgg cttctcttt ctcctgcgct
2401 gcgggctgcy ccagagtcaa caaaagctga tagttgtaag cgttcggcag t

```

Figura 42. Secuencia de nucleótidos de una unidad completa del gen *hsp70* de la cepa H14, KP1(+) de *T. rangeli*. Secuencia de nucleótidos correspondiente al inserto del clon HSH14-A. En mayúscula la región codificante y en minúscula la región no codificante del gen; en azul y subrayados se indican los codones de inicio y parada. Los números indican la posición de los nucleótidos en la secuencia. No. de acceso a GenBank: EF442767.

```

1  GTACTCGTGC GTTGGTGTGT GGCAGAACGA GCGCGTGGAG ATCATTGCGA ACGATCAGGG CAACCGGACG ACGCCGTCGT
81  ATGTGGCGTT TACCGACACG GAGCGTCTGA TCGGTGACGC GGCGAAGAAC CAGGTGGCGA TGAACCCGAC GAACACCGTC
161  TTCGACGCGA AGCGCCTCAT TGGGCGGAAG TTCAGCGACT CCGTTGTGCA GTCGGACATG AAGCACTGGC CCTTCAAGGT
241  CATCGCGAAG GGCGACGACA AGCCGGTGAT CCAGGTGCAG TTCCGCGGCG AGACCAAGAC GTTCAACCCG GAGGAGGTGA
321  GCTCGATGGT GCTGCTGAAG ATGAAGGAGG TTGCGGAGTC GTACCTGGGG AAGCAGGTGA AGAAGCCGT GGTGACGGTG
401  CCCGCTACT TCAACGACTC GCAGCGGCAG GCGACGAAGG ACGCCGGCAC GATCGCGGGG ATGGAGGTGC TCGCATCAT
481  CAACGAGCCG ACGGCCCGG CCATTGCGTA CGGGCTGGAC AAGTGGAGG AAGGCAGGGA GCGCCACGTG CTGATCTTTG
561  ACCTGGCGG CGGCACGTTT GACGTCACCC TGCTGACGAT CGACGGCGGC ATCTTTGAGG TGAAGGCGAC GAACGGCGAC
641  ACGCACCTGG GCGGCGAGGA CTTGACAAAC CGCCTCGTGG CGCACTTAC GGACGAGTTC AAGCGGAAGA ACCGGGGCAA
721  GGACATGACG ACGAGCCAGC GGGCGCTCCG CCGCTCCCG ACCGCGTGG AGCGCGCCAA GCGGACGCTG TCGTCCGCGG
801  CGCAGCGCAC GATTGAGATC GACGCGCTGT TCGACAACGT GGACTTCCAG TCGACCATCA CCCGTGCCCG CTTCGAGGAG
881  CTCTCGCGG ACCTCTTCCG CGGCACGCTG CAGCCGTTGG AGCGTGTGCT GCAGGACGCC AAGATGGACA AGCGCGCCGT
961  GCACGACGTG GTGCTCGTTG GCGGCTCCAC CCGCATCCCG AAGTGTATGC AGCTGGTGTG GGACTTCTTC GCGGCAAGG
1041  AGCTGAACAA GAGCATCAAC CCCGATGAGG CCGTGGCGTA CCGGCGCGCC GTGCAGGCCT TCATCCTCAC CGGGGCAAG
1121  AGCAAGCAGA CGGAGGGCCT GCTGCTGCTC GACGTGACGC CGCTGACGCT TGGCATCGAG ACGGCCGGTG GCGTTATGAC
1201  GTCGCTGATT AAGCGCAACA CGACGATCCC AACCAAGAAG AGCCAGATCT TCTCGACGTA CCGGCAAC CAGCCCGCGG
1281  TGCACATCCA GGTCTTCGAG GGGGAGCGTG CGATGACGAA GGACTGCCAC CTGCTCGGTA CGTTTGACCT GTCCGGCATT
1361  CCGCCGCGC CGCGCGGCGT GCCCCAGATT GAGGTGACCT TCGACCTCGA CGCCAACGGC ATCCTGAACG TGTCCGCGGA
1441  GGAGAAGGGC ACCGGCAAGC GCAACCAGAT CGTCATCAG AACGACAAGG GCCGTCTGAG CAAGGCGGAG ATTGAGCGCA
1521  TGGTGTGCGA GCGTCCAGG TACGAGGCGC AGGACAAGGA GCAGCGCGAG CGCATTGATG CAAAGAACGG CCTTGAGAAC
1601  TACGCCCTTT CGATGAAGAA CACCGTGAAC GAGCCGAACG TGAGCGGCAA GATTGAGGAG GCCGACAAGA ACACGATCAC
1681  GAATGCCGTG GAGGAGGCGC TGCAGTGGCT GAACAACAAC CAGGAGGCCA GCAAGGAGGA GTACGAGCAC CGCCAGAAGG
1761  AGCTGGAGAA CCTGTGCACG CCCATCATGA CGAAGATGTA CCAGGTATG GCGCGGGCGG GTGGTATGCC CGGCGGAATG
1841  CCTGGGGGTA TGCTGGGGG TATGCCCGGG GGTATGCCTG GGGGTATGCC CCGGGGTATG CCTGTTGGCG CGAACCCGTC
1921  ATCGTCGTCG GGGCCGAAGG TGGAGGAGGT TGACTGAgcg cgtggccccg agaacatttg catggcgag ctgcctttga
2001  gtgaccggtc tgctggctcc ctgcttgcta gaacgtgaag ggtccggcgg gcctcgctcc ccattactat tttatctatt
2081  gtttgtcttt cccattgttt ttttttttat ttggttcccc ctctccatt attattatta ttgttattat tattgttgtt
2161  gcgacggtta ttattattac gattgttatt gtctgcttgg ccattgctgg ggtgctgggg ctggtgaggg tttctgctgc
2241  tgcgagggct gtcggagccg ccgtgcagaa gctgctgcct gcatgtgtgc gtgtgtgtgt ggctttgac acgcctcact
2321  tttcttggct tctcttttct cctgctgctg gggctgcgcc agagccaaca aaagctgata gttgtaagcg ttcggcagta
2401  gaaccgaaaa caaacacaaa catacacagc ggaaaca

```

Figura 43. Secuencia de nucleótidos de una unidad del gen *hsp70* de la cepa H14, KP1(+) de *T. rangeli*. Secuencia de nucleótidos correspondiente al inserto del clon HSH14-CF. En mayúscula la región codificante y en minúscula la región no codificante del gen; en azul y subrayado se indica el codón de parada. Los números indican la posición de los nucleótidos en la secuencia. No. de acceso a GenBank: EF442768.

Análisis de la secuencia de nucleótidos del gen *hsp70* para la cepa Tre de los nuevos clones obtenidos, mostró la presencia de dos nuevas regiones codificantes de 1.986 y 2.010 pb en los clones uHP5 y uHP6, respectivamente; con una identidad de 95,6 % con la secuencia del clon TREcHS-3 (Figura 30); y con una identidad de 98,5 % entre ellas (Tabla 2), observándose el principal polimorfismo entre estas nuevas secuencias en la región 3' terminal del gen, una inserción de 24 nucleótidos (posición 1.926 a 1.949) en la secuencia del clon uHP5, respecto a la secuencia del clon uHP6.

Un alineamiento múltiple de los ORF del gen *hsp70* encontrados para la cepa Tre permitió concluir que la proteína HSP70 en esta cepa está codificada por diferentes unidades que presentan polimorfismo respecto al tamaño de la región codificante, dicho polimorfismo está dado principalmente por la inserción de las secuencias ATGCCCGGCGGA y ATGCCCGGCGGA (Figura 44), las cuales originan diferente número de repeticiones MPGG en el extremo carboxilo terminal de la proteína HSP70 al ser traducida. Por lo tanto, y debido a las diferencias encontradas entre las secuencias del gen *hsp70* en la cepa Tre, se denominó de forma arbitraria la unidad codificante del clon TREcHS-3 como copia 1, la unidad codificante del clon uHP5 copia 2 y la unidad codificante del clon uHP6 copia 3 del gen *hsp70* de la cepa Tre de *T. rangeli* (Tabla 2).

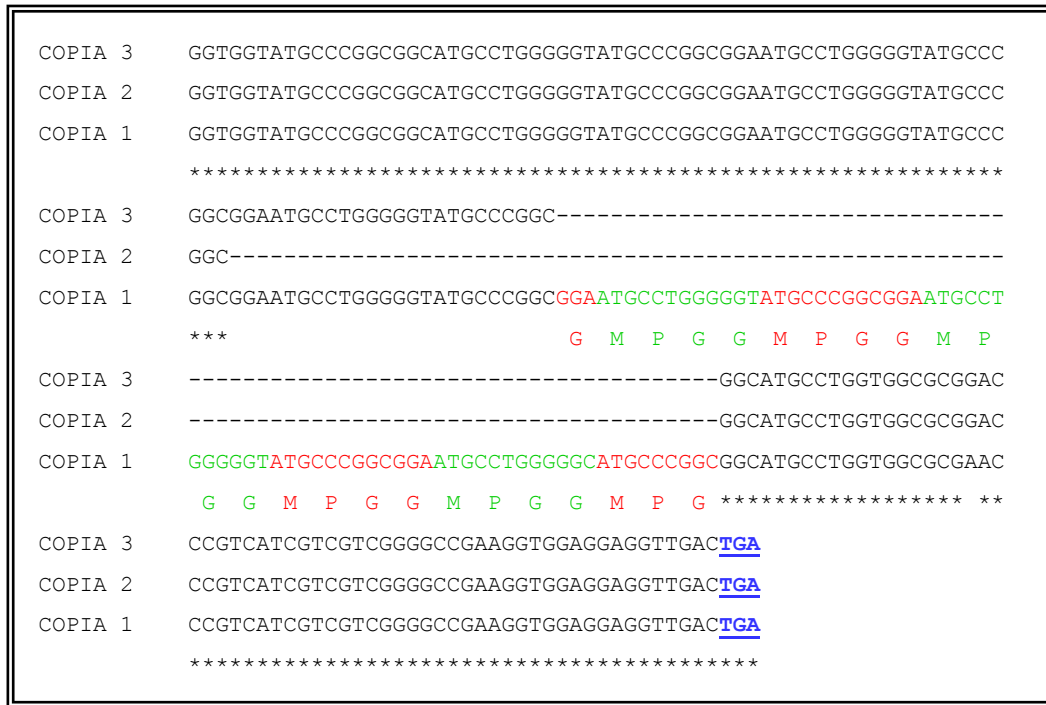


Figura 44. Alineamiento de la secuencia de nucleótidos de la región 3' del gen *hsp70* de la cepa Tre de *T. rangeli*. Secuencia de nucleótidos correspondiente al extremo carboxi-terminal de la proteína HSP70 de las copias 1, 2 y 3 de la cepa Tre del parásito. El asterisco significa identidad, en verde y rojo se indican las inserciones de nucleótidos y aminoácidos de la copia 3. Subrayado y en azul se indica el codón de parada.

Tabla 2. Porcentaje de identidad entre las regiones codificantes de las diferentes copias del gen *hsp70* de *T. rangeli*.

Clon	TREcHS-3	uHP5	uHP6	cH70H-3	HS14-CF
TREcHS-3	-				
uHP5 Tre	95%	-			
uHP6	96,3%	98,5%	-		
cH70H-3	96,1%	98,2%	99,4%	-	
HS14-CF H14	96%	98,2%	99,4%	99,3%	-
HS14-A	95,4%	98,6%	98,8%	100%	99,3%
Copia	Copia 1	Copia 2	Copia 3	Copia 1	Copia 2
Cepa		Tre			H14

El mismo análisis para las secuencias obtenidas para la cepa H14, mostró que el clon HSH14-A presenta una región codificante de 2.010 pb (Figura 42) mientras que el fragmento correspondiente a la región codificante del clon HSH14-CF tiene un tamaño de 1.957 pb (Figura 43). Teniendo en cuenta que el oligonucleótido usado en la amplificación del fragmento HSH14-CF se hibrida 41 nucleótidos corriente abajo del codón de inicio (Figura 7) y que estos primeros nucleótidos presentan un 100% de identidad en todas las secuencias analizadas, tanto para Tre como para H14, podemos decir que la secuencia completa de la región codificante del clon HSH14-CF tiene un tamaño de 1.998 pb.

Dichas regiones en ambos clones presentan un 99,3 % de identidad entre ellas y al compararlas con la secuencia del clon cH70H-3 (Figura 31) previamente analizada, observamos que la secuencia del clon HSH14-A presenta un 100 % de identidad respecto a la secuencia del clon cH70H-3, mientras que HSH14-CF presenta un 99,3 % de identidad respecto a la misma secuencia del clon cH70H-3 (Tabla 2). Por lo tanto, podemos afirmar que la proteína HSP70 para la cepa H14, al igual que lo encontrado para la cepa Tre, se encuentra codificada por diferentes ORF, de los cuales identificamos al menos 2 para la cepa H14, los cuales presentan polimorfismo en su secuencia de nucleótidos a nivel de la región 3' terminal, principalmente. La secuencia de la copia 1 (clon cH70H-3 y HSH14-A) presenta una inserción de 12 nucleótidos (CGGGGGAATGCC) (Figura 45), respecto a la secuencia de la copia 2 (clon HSH14-CF), en H14 (Tabla 2). Dicho polimorfismo se traduce en la inserción de una repetición MPGG en la secuencia de aminoácidos de la copia 1.

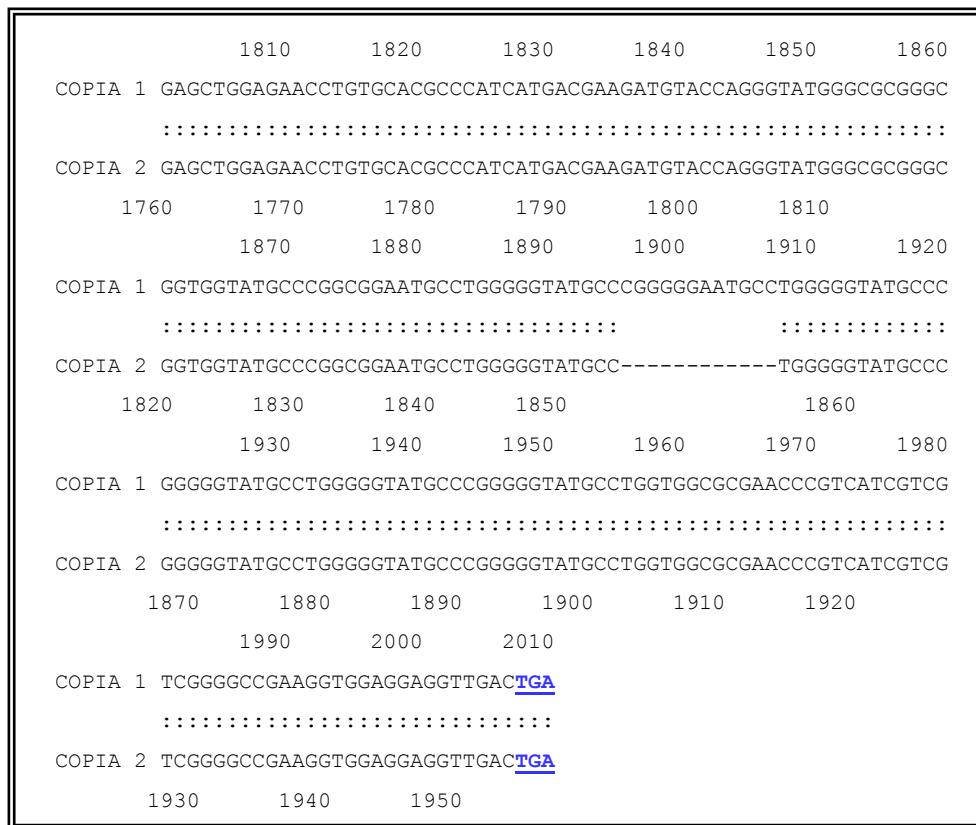


Figura 45. Alineamiento de la secuencia de nucleótidos de la región 3' del gen *hsp70* de la cepa H14 de *T. rangeli*. Secuencia de nucleótidos correspondiente al extremo carboxi-terminal de la proteína HSP70 de las copias 1 (cH70H-3 y HSH14-A) y 2 (HSH14-CF) de la cepa H14 del parásito. Los dos puntos significan identidad. Subrayado y en azul se indica el codón de parada.

Por otra parte, el análisis de la secuencia de nucleótidos de todas las copias para la cepa Tre y H14 realizado con el programa CUSP del EMBL-EBI confirmó los resultados previos observados para la copia 1 de ambas cepas del parásito, la frecuencia de las tripletas de nucleótidos usadas para codificar la secuencia de aminoácidos de la proteína HSP70 entre las copias de los genes *hsp70* de las cepas H14 y Tre de *T. rangeli* son iguales, presentándose diferencias relacionadas únicamente con el número de aminoácidos presentes en las proteínas, debido al número variable de

repeticiones MPGG. De igual forma, el análisis de codón preferente entre los genes *hsp70* de *T. rangeli* y *T. cruzi* (No. de acceso a GenBank X07083) no mostró diferencias a nivel de los codones sinónimos preferentemente usados para codificar los aminoácidos de la proteína HSP70, las diferencias encontradas entre estas dos especies están dadas por el uso adicional de los codones GCT (Alanina), CTA y TTA (Leucina), CAA (Glutamina), CGA (Arginina), AGT y TCT (Serina), ACA y ACT (Treonina) y GTA (Valina) en *T. cruzi* (Tabla 3).

Al extender el análisis a los genes *hsp70* reportados para *T. vivax* (No. de acceso a GenBank: tviv1321f07.q1k_3) y *T. brucei* (No. de acceso a GenBank: Tb11.01.3110) se encontró que los codones usados en *T. cruzi* y no en *T. rangeli*, también son usados para codificar la proteína HSP70 de *T. vivax* y *T. brucei*, además de los codones TGT (Cisteína), ATA (Isoleucina) y TTG (Leucina) (Tabla 3).

Adicionalmente, entre *T. rangeli* y *T. vivax* se observan diferencias en el aminoácido serina, el cual es preferentemente codificado por el codón AGC en *T. vivax*, mientras que en *T. rangeli* es el TCG. Así mismo, en *T. brucei* el codón preferente para codificar el aminoácido serina también es diferente al de *T. rangeli*, siendo el codón TCT el más usado en *T. brucei*. Diferencias adicionales entre *T. rangeli* y *T. brucei* fueron observadas para los aminoácidos alanina, glicina y prolina, los cuales son preferentemente codificados por las tripletas GCT, GGT y CCC en *T. brucei* y no en *T. rangeli*, en el cual se usan preferentemente las tripletas GCG, GGC y CCG, respectivamente (Tabla 3).

Finalmente, el análisis de uso de codón preferente entre las cepas pertenecientes al género *Trypanosoma* muestra que a pesar de existir algunas diferencias entre las especies evaluadas, es claramente importante el hecho de que al menos para la proteína HSP70 de *T. rangeli*, *T. cruzi*, *T. vivax* y *T. brucei* existe un sesgo del código genético, como se evidencia en el uso frecuente de algunos codones sinónimos (TGC (87 %) y TGT (13 %) para el a.a cisteína, GAC (80 %) y GAT (20%) para ácido aspártico, GAG (88 %) y GAA (12 %) para ácido glutámico, TTC (78 %) y TTT (22 %) para fenilalanina, CAC (94 %) y CAT (6 %) para histidina, ATC (65 %), ATT (33 %) y ATA (2 %) para isoleucina, AAG (95 %) y AAA (5 %) para la lisina, CAG (91 %) y CAA (9 %) para glutamina, CGC (64 %) el más frecuente de los 5 para arginina, ACG (59,5 %) el más frecuente de los 4 para treonina, GTG (64 %) el más frecuente de los 4 para valina y TAC (89,7 %) y TAT (10,3 %) para tirosina) lo que coincide con estudios previos realizados para genes altamente expresados en los tripanosomátidos (Horn, 2008). Vale la pena resaltar como en *T. rangeli* de los 61 posibles codones usados para codificar los 20 aminoácidos existentes, sólo se usan 45, este hecho extremo en la desviación del código genético ha sido igualmente reportado para la α -tubulina de *L. major*, en la cual de los 61 codones posibles sólo se usan 40 (Horn, 2008).

Adicionalmente, el alto contenido de G + C en la tercera posición del codón (sitio silente), se ha visto representa la principal fuente de variación en el uso de codones preferentes que se observa al interior de las especies (entre genes), como entre especies (Álvarez et al., 1994). A pesar de que no se encontró una desviación significativa en el uso de codones preferentes para los genes *hsp70* al interior de las cepas de *T. rangeli*, como entre las especies de *Trypanosomas* evaluadas, al observar el porcentaje de G + C en

la tercera posición del codón, se observa que para *T. rangeli* este porcentaje es bastante alto (90 %), respecto al encontrado para estos mismos genes en *T. cruzi* (80,9 %), *T. vivax* (84,2 %), y *T. brucei* (68,9 %).

Adicionalmente, el análisis de uso de codón preferente para los genes *hsp70* de tripanosomátidos, igualmente mostró que al menos para la proteína HSP70 de *T. rangeli*, *T. cruzi*, *T. vivax*, *T. brucei*, *L. major*, *L. braziliensis*, *L. infantum*, *L. donovani*, *L. tarentolae* y *L. amazonensis* existe un sesgo del código genético, evidente por el uso frecuente de algunos codones sinónimos como: TGC (cisteína), GAC (ácido aspártico), GAG (ácido glutámico), TTC (fenilalanina), CAC (histidina), ATC (isoleucina), AAG (lisina), CAG (glutamina), CGC (arginina), ACG (treonina), GTG (valina) y TAC (tirosina).

Tabla 3. Porcentaje de uso de codón preferente para la proteína HSP70

Codón	a.a	Copia 1 Tre	Copia 2 Tre	Copia 3 Tre	Copia 1 H14	Copia 2 H14	<i>T.</i> <i>cruzi</i>	<i>T</i> <i>vivax</i>	<i>T</i> <i>brucei</i>
GCA	A	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	10,9	11,9	19,4
GCC		38,5	38,5	38,5	38,5	38,5	36,4	30,5	22,6
GCG		59,6	59,6	59,6	59,6	59,6	43,6	47,5	21
GCT		0	0	0	0	0	9,1	10,2	37,1
TGC	C	100	100	100	100	100	100	80	71,4
TGT		0	0	0	0	0	0	20	28,6
GAC	D	87,5	90	87,8	90	90	82,9	84,4	67,4
GAT		12,5	10	12,2	10	10	17,1	15,6	32,6
GAA	E	2	1,9	2	2	2	7,7	6,7	30,4
GAG		98	98,1	98	98	98	92,3	93,3	69,6
TTC	F	80	80	80	76	79,2	64	84	85,7
TTT		20	20	20	24	20,8	36	16	14,3
GGA	G	8,6	3,1	4,3	4,3	3	12,5	8,5	8,2
GGC		61,7	69,2	66,7	58	59,7	56,9	54,9	37,7
GGG		14,8	13,8	14,5	18,8	17,9	5,6	19,7	6,6
GGT		14,8	13,8	14,5	18,8	19,4	25	16,9	47,5
CAC	H	100	100	100	100	100	100	100	77,8
CAT		0	0	0	0	0	0	0	22,2
ATA	I	0	0	0	0	0	0	2,9	2,7
ATC		69,4	69,4	69,4	69,4	69,4	63,9	62,9	64,9
ATT		30,6	30,6	30,6	30,6	30,6	36,1	34,3	32,4
AAA	K	0	2,3	2,3	0	0	4,3	0	10,9
AAG		100	97,7	97,7	100	100	95,7	100	89,1
CTA	L	0	0	0	0	0	2,1	0	5,6
CTC		27,3	27,3	27,3	27,3	26,7	31,9	17	18,5
CTG		65,9	65,9	65,9	65,9	64,4	57,4	68,1	31,5
CTT		6,8	6,8	6,8	6,8	8,9	6,4	8,5	25,9
TTA		0	0	0	0	0	2,1	0	1,9
TTG		0	0	0	0	0	0	6,4	16,7

Resultados

Codón	a.a	Copia 1 Tre	Copia 2 Tre	Copia 3 Tre	Copia 1 H14	Copia 2 H14	<i>T.</i> <i>cruzi</i>	<i>T</i> <i>vivax</i>	<i>T</i> <i>brucei</i>
AAC	N	97	93,9	93,8	97	97	90,6	96,4	77,4
AAT		3	6,1	6,2	3	3	9,4	3,6	22,6
CCA	P	2,9	3,7	3,4	3,4	3,6	5,9	7,4	16
CCC		37,1	33,3	34,5	34,5	32,1	23,5	25,9	48
CCG		40	51,9	48,3	48,3	50	38,2	44,4	24
CCT		20	11,1	13,8	13,8	14,3	32,4	22,2	12
CAA	Q	0	0	0	0	0	11,1	7,1	16
CAG		100	100	100	100	100	88,9	92,6	84
AGG	R	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	8,6	3,1	5
CGA		0	0	0	0	0	11,4	3,1	2,5
CGC		60	60	60	60	60	57,1	84,4	55
CGG		20	20	20	20	20	5,7	0	10
CGT		14,3	14,3	14,3	14,3	14,3	17,1	9,4	27,5
AGC		28,1	28,1	28,1	28,1	28,1	26,7	40,7	14,3
AGT	0	0	0	0	0	6,7	3,7	5,7	
TCA	S	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	6,7	3,7	11,4
TCC		18,8	18,8	18,8	18,8	18,8	16,7	11,1	20
TCG		50	50	50	50	50	40	29,6	20
TCT		0	0	0	0	0	3,3	11,1	28,6
ACA	T	0	0	0	0	0	12,8	13,7	16,3
ACC		26	26	26	26	26,5	14,9	21,6	32,7
ACG		74	74	74	74	73,5	66	54,9	42,9
ACT		0	0	0	0	0	6,4	9,8	8,2
GTA	V	0	0	0	0	0	2	0	14,3
GTC		10,2	10,2	10,2	10,2	10,2	22,4	18,4	21,4
GTG		77,6	77,6	77,6	77,6	77,6	61,2	65,3	53,6
GTT		12,2	12,2	12,2	12,2	12,2	14,3	16,3	10,7
TAC	Y	91,7	92,3	91,7	91,7	91,7	100	91,7	75
TAT		8,3	7,7	8,3	8,3	8,3	0	8,3	25

En negrita se denotan los codones preferentemente usados para cada aminoácido y en rojo las diferencias encontradas entre *T. rangeli*, *T. cruzi*, *T. vivax* y *T. brucei*.

De acuerdo a lo reportado por Horn, 2008, el índice de adaptación del codón (CAI), el cual es usado para medir la desviación del código genético respecto al uso de codones sinónimos se correlaciona con el nivel de expresión observado y predicho de algunos genes de tripanosomátidos y adicionalmente puede predecir si la selección a nivel traduccional opera sobre la expresión génica (Sharp & Li, 1987).

Un análisis del CAI realizado a los genes *hsp70* de *T. rangeli* mostró que dicho índice presenta un valor de 0,8692; para todas las copias del gen en la cepa Tre y H14, indicativo de una significativa desviación en el uso de codones sinónimos usados para codificar la proteína HSP70 de este parásito.

El mismo análisis realizado para los genes *hsp70* de *T. cruzi*, *T. brucei*, *T. vivax* y varias especies de *Leishmania*, arrojó resultados similares (Figura 46), de hecho, se puede observar que el índice CAI para los genes *hsp70* de los tripanosomátidos es superior al reportado (0,55 a 0,75) para los genes altamente expresados y organizados en tándem en el genoma de los tripanosomátidos (Horn, 2008).

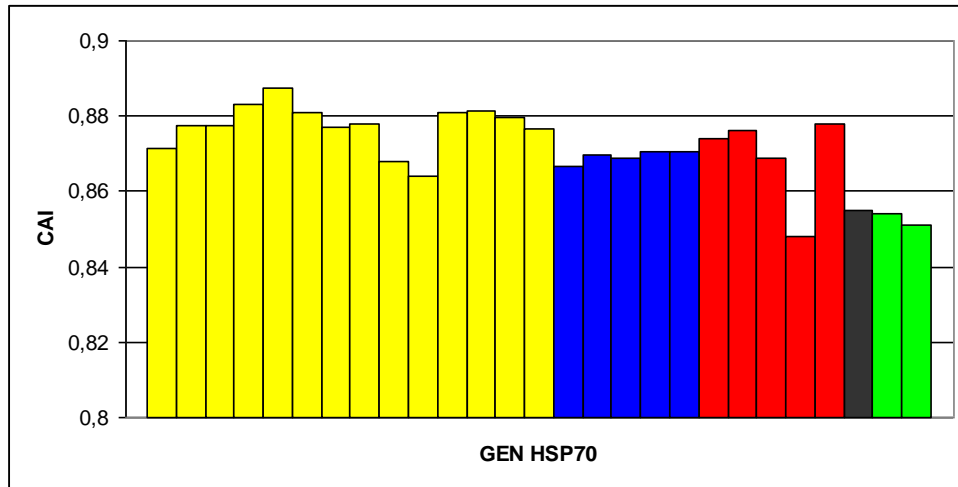


Figura 46. Índice de adaptación del codón de los genes *hsp70* de algunos tripanosomátidos. En amarillo los genes *hsp70* de algunas especies de *Leishmania*: *L. major* (M36675; LmjF28.2770; LmjF28.2780); *L. braziliensis* (LbrM28_V2.2990; AF291716); *L. infantum* (LinJ28.2920; Y08020; X85798; LinJ28_V3.2960; LinJ28_V3.3060; LinJ28_V3.2950; LinJ28_V3.3000); *L. donovanni* (X52314); *L. tarentolae* (AY423868) y *L. amazonensis* (L14605; L14604). En azul los genes *hsp70* de *T. rangeli*. En rojo algunos genes *hsp70* de *T. cruzi* (Tc00.1047053511211.170; Tc00.1047053511211.160; X67716; X07083; M26595). En negro *T. vivax* (tviv1321f07.q1k_3) y en verde *T. brucei gambiense* (Tbgamb.40006) y *T. brucei* (Tb11.01.3110).

Por otra parte, análisis de las 5 secuencias putativas de aminoácidos de la proteína HSP70 de *T. rangeli*, copias 1 (Figura 33), 2 (Figura 47) y 3 (Figura 48) de la cepa Tre y copias 1 (Figura 34) y 2 (Figura 49) de la cepa H14, mostró que la diferencia observada en la longitud de los ORF entre las copias del gen se traduce en diferente número de repeticiones MPGG en el extremo carboxilo terminal de la proteína (Figura 50), es así como, la copia 1 del gen *hsp70* en la cepa Tre presenta 14 repeticiones y las copias 2 y 3 presentan 6 y 8 repeticiones, respectivamente. Mientras que la copia 1 en la cepa H14 presenta 8 repeticiones y la copia 2, 7 repeticiones (Tabla 4).

Estas diferencias en el número de inserciones MPGG generan proteínas de 693 aminoácidos (copia 1), 661 aminoácidos (copia 2) y 669 aminoácidos (copia 3) en la cepa Tre, mientras que la copia 1 de la cepa H14 genera una proteína de 669 aminoácidos y la copia 2 una proteína de 665 aminoácidos, incluyendo los primeros 41 nucleótidos en la secuencia (Tabla 4).

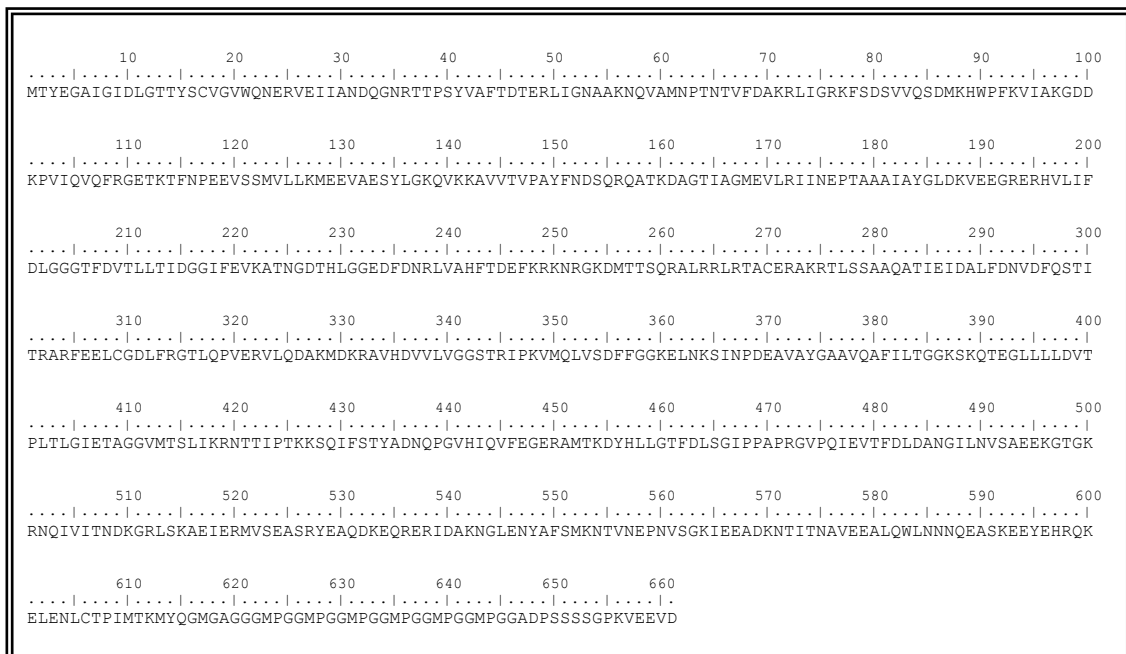


Figura 47. Secuencia de aminoácidos de la proteína HSP70 de la cepa Tre de *T. rangeli*. Secuencia deducida de aminoácidos a partir de la secuencia del clon uHP5. Secuencia correspondiente a la copia 2 del gen *hsp70* de la cepa Tre de *T. rangeli*. Los números indican la posición de los aminoácidos en la secuencia. No. de acceso a GenBank: ABL74475.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MTYEGAIGIDLGTTYSCVGVWQNERVEIIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQVAMNPTNTVFDARLIGRKFSDSVVQSDMKHWPFKVIAKGDD
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
KPVIVQVFRGETKTFNPEEVSSMVLKMKVEAESYLGKQVKAVVTVPAYFNDSQRQATKDAGTIAGMEVLRINEPTAAAIAYGLDKVEEGREHVLIF
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DLGGGTFDVTLLTIDGGIFEVKATNGDTHLGGEDFDNRLVAHFTDEFKRRNRGKDMTTSQRALRRLTACERAKRTLSSAAQATIEIDALFDNVDFQSTI
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TRARFEELCGDLFRGTLQPVVERVLQDAKMDKRAVHDVVLVGGSTRIPKVMQLVSDFFGGKELNKSINPDEAVAYGAAVQAFILTGKSKQTEGLLLDVT
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
PLTLGIETAGVMTSLIKRNTTIPTKKSQIFSTYADNQPGVHIQVFEGERAMTKDCHLLGTFDLGIPPA PRGVPQIEVTFDLDANGILNVSAAEEKGTGK
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
RNQIVITNDKGRLSKAEIERMVSEASRYEAQDKEQRERIDAKNGLENYAFSMKNTVNEPNVSGKIEEADKNTITNAVEEALQWLNNNQEASKEEYEHQK
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      610     620     630     640     650     660
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ELENLCTPIMTKMYQGMGAGGGMPGGMPGGMPGGMPGGMPGGMPGGMPGGADPSSSSGPKVEEVD
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

```

Figura 48. Secuencia de aminoácidos de la proteína HSP70 de la cepa Tre de *T. rangeli*. Secuencia deducida de aminoácidos a partir de la secuencia del clon uHP6. Secuencia correspondiente a la copia 3 del gen *hsp70* de la cepa Tre de *T. rangeli*. Los números indican la posición de los aminoácidos en la secuencia. No. de acceso a GenBank: ABL74476.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
YSCVGVWQNERVEI IANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQVAMNP TINTVFD AKRLIGRKFSDSVVQSDMKHWPFKVIAKGDDKPV IQVQFRGETKT

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
FNPEEVSSMVL LKMKVEAESYLGKQVKKAVVTVPAYFNDSQRQATKDAGTIAGMEVLR IINEPTAAA IAYGLDKVEEGRERHVLIFDLGGGTFDVTLLTI

      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DGGIFEVKATNGDTHLGGEDFDNRLVAHFTDEFKRNKRGKDMTTSQRALRRLRTACERAKRTLSSAAQATIEIDALFDNVDFQSTITRARFEELCGDLFR

      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GTLQPVERVLQDAKMDKRAVHDVVLVGGSTRIPKVMQLVSDFFGGKELNKSINPDEAVAYGA AVQAFIL TGGKSKQTEGLLLLDVTP LTLGIETAGGVMT

      410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SLIKRNTTIP TKKSQIFSTYADNQPGVHIQVFEGERAMTKDCHLLGTFDL SGI PPAPRGVPIEVTFDLDANGILNVS AEEKGTGKR NQIVITNDKGRLS

      510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
KAEIERMVSEASRYEAQDKEQRERIDAKNGLENYALSMKNTVNEPNVSGKIEEADKNTITNAVEEALQWLN NNQ EASKEEYEH RQKEL ENLCTPIMTKMY

      610     620     630     640     650
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
QGMGAGGGMPGGMPGGMPGGMPGGMPGGMPGGMPGGANPSSSSSGPKVEEVD

```

Figura 49. Secuencia de aminoácidos de la proteína HSP70 de la cepa H14 de *T. rangeli*. Secuencia deducida de aminoácidos a partir de la secuencia del clon HSH14-CF. Secuencia correspondiente a la copia 2 del gen *hsp70* de la cepa H14 de *T. rangeli*. Los números indican la posición de los aminoácidos en la secuencia. No. de acceso a GenBank: ABO36542.

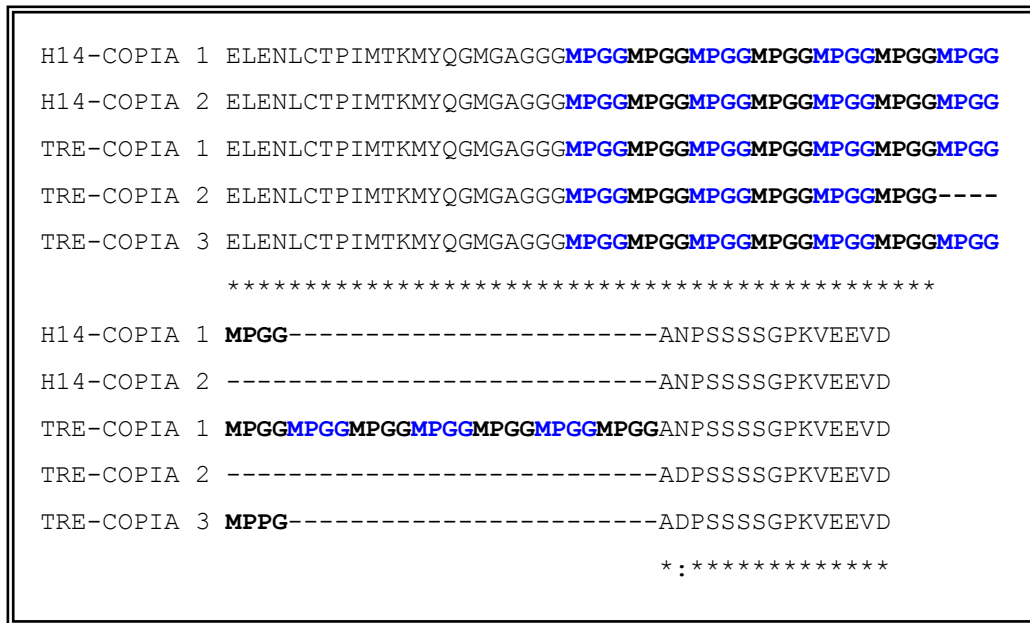


Figura 50. Alineamiento de la región carboxilo terminal de la proteína HSP70 de *T. rangeli*. Secuencia de aminoácidos de la proteína HSP70 de *T. rangeli* codificada por las diferentes copias del gen en las cepas Tre y H14. El asterisco significa identidad y los dos puntos cambio de un aminoácido conservado. En negrita se muestran las repeticiones MPGG.

Tabla 4. Resumen de las características de las copias encontradas para el gen y la proteína HSP70 de *T. rangeli*.

Cepa	Copia	Tamaño del ORF (pb)	Tamaño de la proteína (aminoácidos)	Número de repeticiones MPGG
Tre	1	2.082	693	14
	2	1.986	661	6
	3	2.010	669	8
H14	1	2.010	669	8
	2	1.998	665	7

Al realizar un análisis comparativo entre las secuencias de aminoácidos de las diferentes proteínas HSP70 reportadas en las bases de datos de NCBI y GeneDB a través de los kinetoplastidos, se observa que dicha repetición en el extremo carboxilo de la proteína es una característica de la denominada sub-familia HSP70-A, familia de genes parálogos de las proteínas HSP70 (Folgueira & Requena, 2007; Simpson et al., 2004) (Tabla 5).

Adicionalmente, en *T. cruzi* se observa que el número de repeticiones MPGG varía igualmente entre las copias del gen HSP70 para una misma cepa (cepa CL) (Tabla 5), sin embargo, vale la pena considerar el hecho de que la secuenciación del parásito se realizó con una cepa híbrida, por lo tanto no se puede afirmar que el polimorfismo sea entre las copias de una misma cepa o que se deba a diferencias entre las cepas del híbrido, como si ocurre entre las copias de una misma cepa en *T. rangeli*. Adicionalmente, al igual que en *T. rangeli* para las cepas H14 y Tre, en *T. cruzi* para las cepas Perú y Maracay se observan diferencias en el número de repeticiones MPGG (Engman et al., 1989) (Tabla 5).

Para las especies de *Leishmania* se observa que el número de repeticiones MPGG es menos variable entre las copias de una misma cepa, al menos entre las 2 copias reportadas para la cepa Friedlin de *L. major* y entre 4 de las 5 copias reportadas para la cepa JPCM5 de *L. infantum*; y entre cepas de una misma especie, como se observa para *L. infantum* (cepas JPCM5 y LEM75) y *L. braziliensis* (cepas M2904 y LQ-8). De hecho, para las especies del género *Leishmania* analizadas, se observa que el número de repeticiones MPGG es menor y menos variable (Tabla 5).

En general, se observa que el número de repeticiones MPGG en la proteína HSP70 es mayor y más variable en el género *Trypanosoma*, principalmente en los tripanosomas americanos (*T. cruzi* y *T. rangeli*). Además, que la presencia de la repetición MPGG se extiende a las especies analizadas pertenecientes a la familia *Bodonidae* (Tabla 5).

Tabla 5. Número de repeticiones MPGG de la proteína HSP70 de los kinetoplastidos.

Especie	Cepa	Secuencia – No. de acceso a GenBank	Número repeticiones MPGG
<i>T. cruzi</i>	CL	Tc00.1047053511211.170	10
		Tc00.1047053511211.160	4
	Brasil	X67716	4
	Maracay	X07083	11
	Perú	M26595	4
<i>T. brucei</i>	TREU927	Tb11.01.3110	1
<i>T. brucei gambiense</i>	nd	Tbgamb.40006	3
<i>T. vivax</i>	nd	tviv1321f07.q1k_3	6
<i>L. infantum</i>	JPCM5	LinJ28.2920	1
		LinJ28_V3.2960	1
		LinJ28_V3.3060	1
		LinJ28_V3.3000	1
		LinJ28_V3.2950	0
<i>L. major</i>	LEM75	X85798	1
		Friedlin	Lmjf28.2770
<i>L. braziliensis</i>	M2904	Lmjf28.2780	2
		LQ-8	LbrM28_V2.2990
<i>L. donovani</i>	HU3	AF291716	1
		X52314	1
<i>L. tarentolae</i>	nd	AY423868	1
<i>L. amazonensis</i>	C1S1	L14605	0
		L14604	0
<i>Cryptobia helicis</i>	nd	AY651255	5
<i>Cryptobia salmositica</i>	nd	AY651254	3
<i>Trypanoplasma borreli</i>	nd	AY288515	5
<i>Rhynchobodo</i>	ATCC50359	AY651253	1
<i>Rhynchomonas nasuta</i>	nd	AY288514	1
<i>Rhynchopus sp</i>	ATCC50230	AY288513	2

Nd: no disponible

Adicionalmente, la proteína HSP70 de *T. rangeli* presentó el motivo EEVD en la región carboxilo terminal, el cual ha sido igualmente reportado en la proteína de *P. falciparum* (Acharya et al., 2007) y el cual se ha visto es importante en la interacción proteína-proteína y en la formación de los complejos chaperona (Brinker et al., 2002) al ser reconocido por aminoácidos cargados positivamente en la co-chaperona Hop (Carrigan et al., 2006).

Por otra parte, la comparación de las secuencias de aminoácidos obtenidas de todas las copias de la proteína HSP70 de las cepas Tre, KP1(-) y H14 KP1(+) de *T. rangeli* (Figura 51), mostró una identidad 97,8 % entre ellas. La comparación realizada entre las copias de una misma cepa mostró que las copias de la cepa Tre presentan una identidad de 96,3 % entre ellas, mientras que las copias de la cepa H14 presentan una identidad de 99,2 % entre ellas, siendo la copia 1 de la cepa Tre la más divergente. Además, dicha proteína, respecto a otras especies presenta un 94 % de identidad con varias proteínas HSP70 reportadas para *T. cruzi*, de 91 % de identidad con la proteína HSP70 de *T. brucei*, de aproximadamente 86 % con varias especies de *Leishmania*, de 84 % con varias especies de la familia *Bodonidae*, de 74 % con la levadura *Schizosaccharomyces pombe* y de 73 % con la secuencia de humano y de ratón.

Como se esperaba, la mayor identidad encontrada entre las proteínas se presentó en su extremo amino terminal, dada la alta conservación de esta región por su función ATPasa (Fink, 1999). Igualmente, se confirma que esta proteína constituye uno de los grupos de proteínas más conservados, presentes en todos los organismos, debido a su papel en el funcionamiento normal de las células y a la propiedad de conferir resistencia a condiciones celulares adversas (Boorstein et al., 1994).

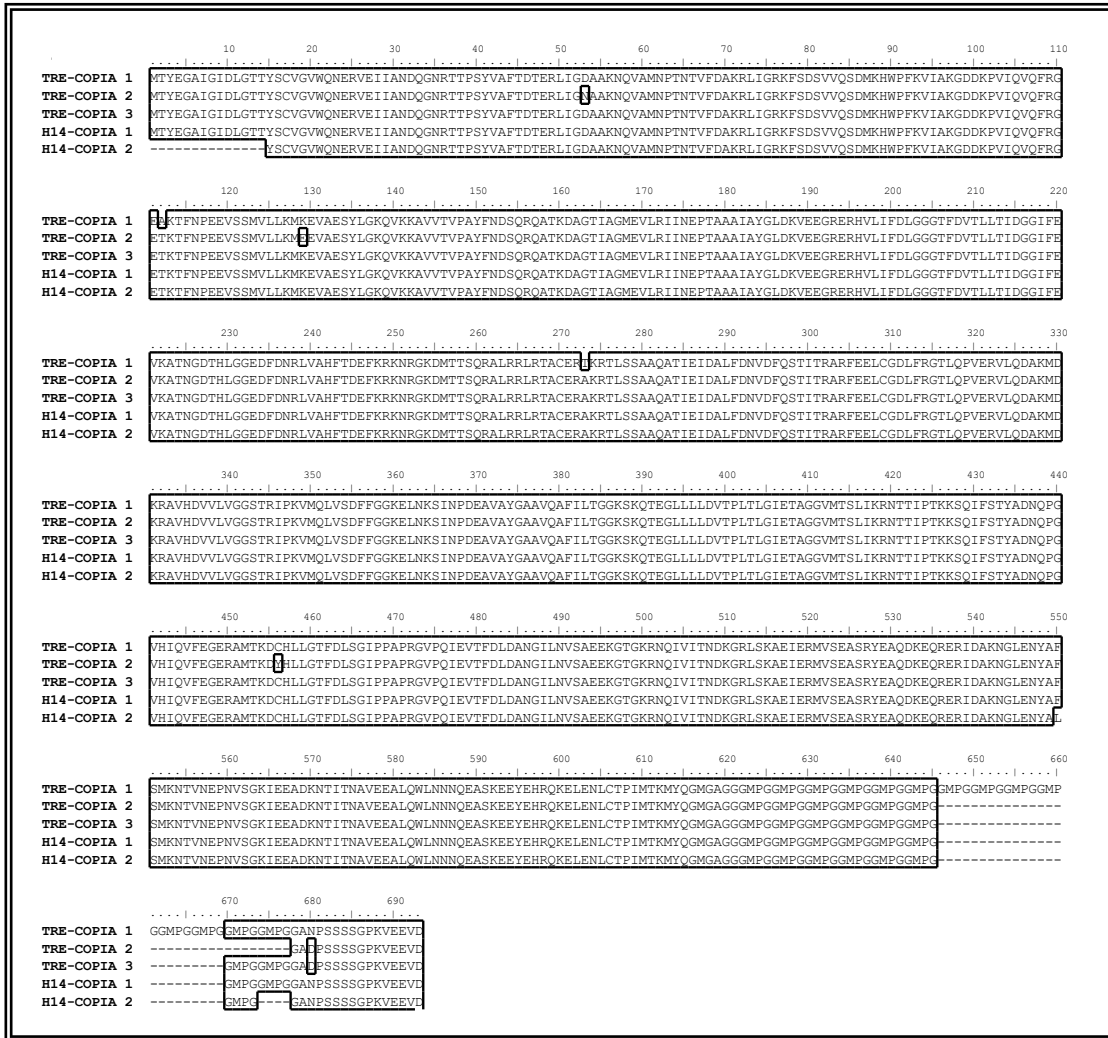


Figura 51. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína HSP70 de *T. rangeli*. Secuencia de aminoácidos de la proteína HSP70 de *T. rangeli* codificada por las diferentes copias del gen en las cepas Tre y H14. Los números indican la posición de los aminoácidos en la secuencia.

Un análisis computacional usando el programa PROSITE (www.expasy.org) para la búsqueda de dominios en las proteínas HSP70 putativas de *T. rangeli* mostró que estas presentan los 3 motivos característicos de las proteínas HSP70 en las posiciones 9-16: (IDLGTTYSC), 199-212 (DLGGGTFDVTLL) y 337-351 (VVLVGGSTRIPKVM). De igual forma, la base de datos Superfamily 1.69 del servidor HMM Library and genome assignments Server (Gough et al., 2001) identificó los 3 dominios en la proteína HSP70 de *T. rangeli* y adicionalmente encontró en la posición 6 a 189 un dominio de la superfamilia de las ATPasas, en la posición 388 a 546 un dominio de unión a péptidos de la superfamilia de las HSP70 y en la posición 540 a 623, un sub-dominio C-terminal de la superfamilia HSP70 (Figura 52).

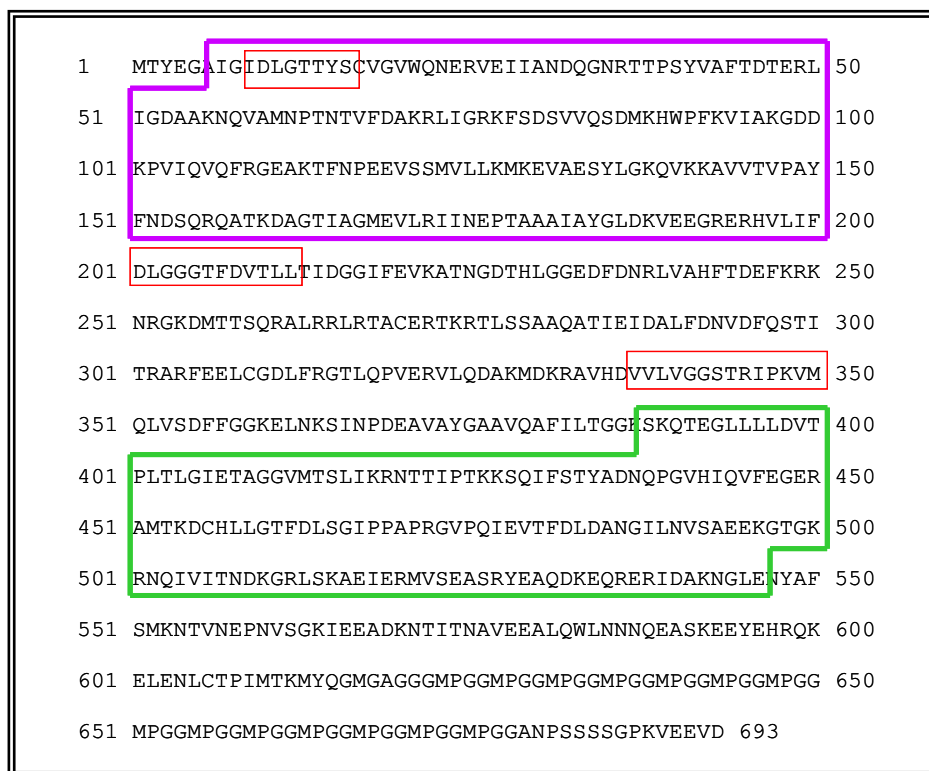


Figura 52. Motivos característicos de las proteínas HSP70 ubicados en la proteína HSP70 de *T. rangeli*. Los cuadros rojos indican los tres motivos característicos de las proteínas HSP70, la caja morada indica el dominio de la superfamilia ATPasa y la caja verde indica el sub-dominio C-terminal de la superfamilia HSP70.

Por otra parte, el análisis de las características físico-químicas de las proteínas HSP70 usando la herramienta ProtParam (www.expasy.org) mostró que cada proteína HSP70, codificada por cada una de las copias del gen presenta un peso molecular y punto isoeléctrico diferente (Tabla 6).

Tabla 6. Resumen de las características físico químicas de las isoformas de la proteína HSP70 de *T. rangeli*.

Cepa	Copia	Tamaño de la proteína (aminoácidos)	Peso Molecular (kDa)	Punto Isoeléctrico
Tre	1	693	74,8	5,48
	2	661	72,2	5,37
	3	669	72,8	5,42
H14	1	669	72,8	5,48
	2	665	72,4	5,48

La existencia de isoformas de la proteína HSP70 había sido previamente reportada en epimastigotes de la cepa CL y Maracay de *T. cruzi*, en la cual, mediante estudios de electroforesis en dos dimensiones se encontraron 8 y 9 isoformas de la proteína HSP70, respectivamente, las cuales fueron diferencialmente reguladas luego de choque térmico (Giambiagi et al., 1996; Requena et al., 1992). La existencia de diferentes isoformas de la proteína HSP70 puede ser explicada, de acuerdo a estos resultados, por la transcripción de genes *hsp70* polimorficos.

6.2.2.2 Región no codificante

Producto de la secuencia de los clones uHP5 (copia 2, Figura 40) y uHP6 (copia 3, Figura 41) de la cepa Tre y HSH14-CF (copia 2, Figura 43) de la cepa H14, se obtuvo la región intergénica completa del gen *hsp70* en ambas cepas del parásito, las cuales fueron comparadas con las previamente obtenidas en los clones HP5 (Tre) y HH1 (H14) (Figura 26) codificantes para las unidades completas.

Para la cepa Tre, entonces, se identificaron 3 secuencias diferentes para la región intergénica de los genes *hsp70* en una misma cepa del parásito (Figura 53), al igual que lo encontrado para la región codificante. Regiones de 488 pb (copia 2), 494 pb (copia 3) y 504 pb (secuencia del clon HP5), con una identidad de 96,8 % entre ellas, presentándose el principal polimorfismo debido a la inserción de dos repeticiones TTA (posición 179 a 185) en la región intergénica de la copia 3, respecto de las otras dos copias.

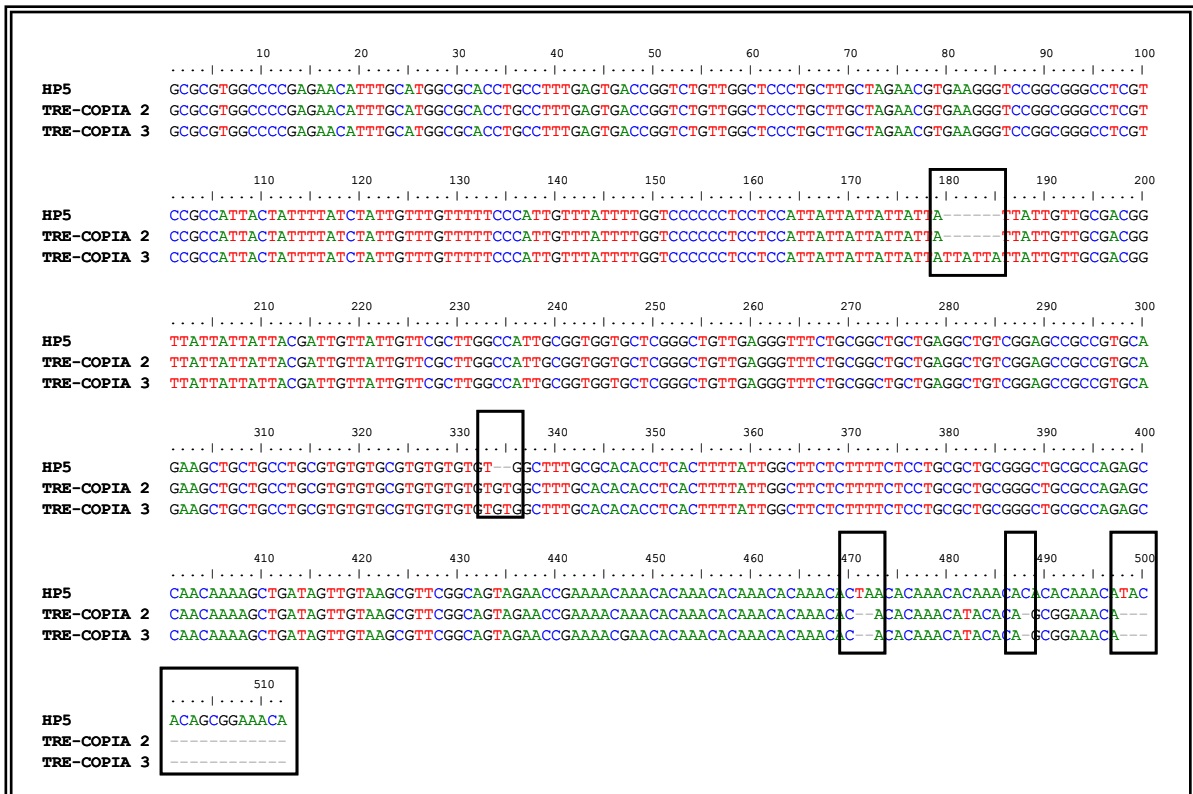


Figura 53. Alineamiento de la secuencia de nucleótidos de las regiones intergénicas del gen *hsp70* de la cepa Tre de *T. rangeli*. Secuencia de nucleótidos de la región intergénica correspondiente a los clones HP5, uHP5 (copia 2) y uHP6 (copia 3) de la cepa Tre del parásito. Los guiones significan inserciones/delecciones y los números indican la posición de los nucleótidos en la secuencia. Los cuadros resaltan las principales diferencias encontradas entre las secuencias.

El análisis de la región intergénica de los genes *hsp70* en la cepa H14, por otra parte, mostró dos regiones intergénicas de 480 pb (copia 2) y 479 pb (secuencia del clon HH1). Con una identidad de 99,4 % entre ellas, presentándose polimorfismo por dos cambios en la secuencia de nucleótidos (posición 151 y 480, Figura 54).

Para descartar el hecho de que las regiones intergénicas analizadas pertenezcan a la misma copia del gen y que los polimorfismos se deban a errores metodológicos en la obtención de la secuencia, se compararon los fragmentos de la región carboxilo terminal del gen correspondiente a las regiones intergénicas analizadas (Figura 55). De acuerdo a las diferencias observadas entre las regiones codificantes de dichas regiones intergénicas, se puede decir, que efectivamente son dos regiones intergénicas correspondientes a copias diferentes del gen. Por tanto, para la cepa H14 se puede decir que, al menos para las dos regiones analizadas, no existen diferencias significativas entre las regiones intergénicas de los genes *hsp70*, contrario a lo que ocurre en la cepa Tre del mismo parásito.

Un análisis de identidad entre las regiones intergénicas de las cepas Tre y H14 de *T. rangeli*, mostró una identidad de 89,2 %, aproximadamente. El mismo análisis con la región intergénica de *T. cruzi*, mostró una identidad de 54,7 % y con *T. brucei* de 48,9 %, siendo la secuencia de la cepa H14 la más parecida a *T. cruzi* y *T. brucei* (Figura 56).

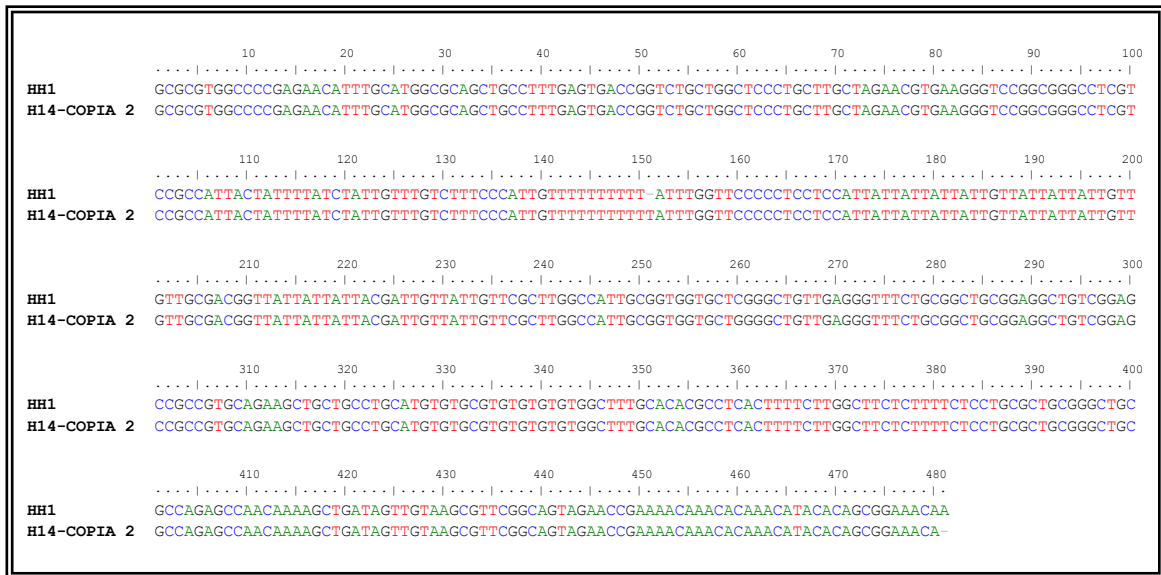


Figura 54. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de la región intergénica del gen *hsp70* de la cepa H14 de *T. rangeli*. Secuencia de nucleótidos de la región intergénica correspondiente a los clones HH1 y HSH14-CF (copia 2) de la cepa H14 del parásito. Los guiones significan inserciones/delecciones y los números indican la posición de los nucleótidos en la secuencia.

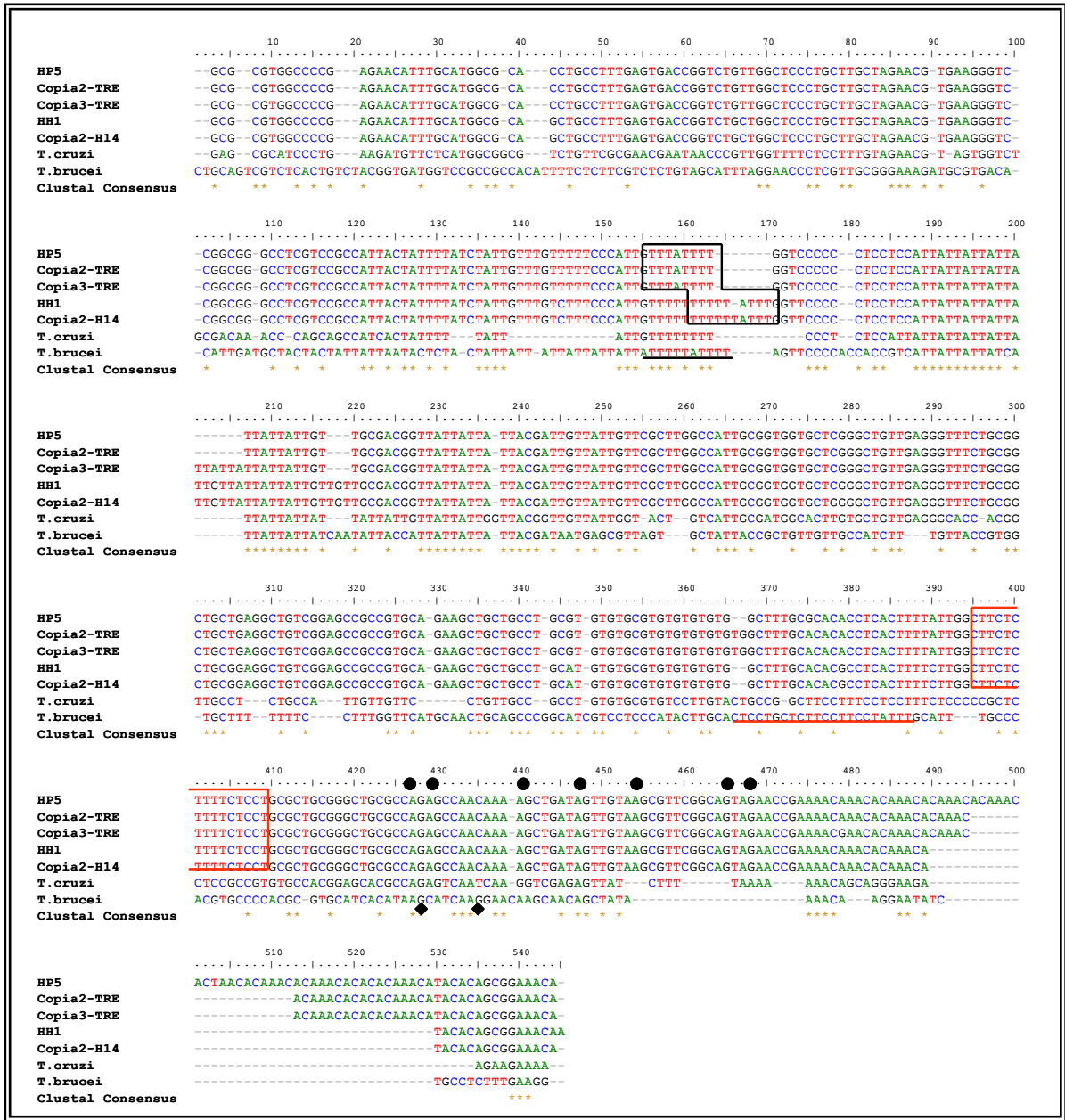


Figura 56. Alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos de las regiones intergénicas de los genes *hsp70*. Secuencia de nucleótidos de las regiones intergénicas identificadas en *T. rangeli*, *T. cruzi* y *T. brucei*. Los guiones significan inserciones/delecciones, el asterisco significa identidad y los números indican la posición de los nucleótidos en la secuencia. Subrayado y en negro se indica el sitio de poli-adenilación identificado en la secuencia de *T. brucei* y un cuadro señala los posibles sitio para *T. rangeli*. En rojo se indica el tracto de poli-pirimidinas que antecede al sitio aceptor del “trans-splicing”, un rombo negro indica los AG aceptores del “splice-leader” identificados en *T. brucei* y el círculo negro indica los posibles sitios adicionales en *T. rangeli*.

Dados los mecanismos de “trans-splicing” y poli-adenilación que sufre el ARN de los tripanosomátidos para su maduración, debido a la transcripción del ARN como un policistrón, se identificaron los posibles sitios de poli-adenilación y “trans-splicing” de los genes *hsp70* de *T. rangeli*, comparando con los previamente reportados para estos mismos genes en *T. brucei* (Hausler & Clayton, 1996; Lee & Van Der Ploeg, 1990; Glass et al., 1986) y con base en reportes de análisis realizados a las regiones intergénicas de varios genes en *T. brucei*, que permiten predecir los sitios mencionados (Benz et al., 2005).

Teniendo en cuenta que a diferencia de los eucariotes superiores, en los tripanosomátidos no existe la señal consenso de poli-adenilación (AAUAAA) en el ARN (Schurch et al., 1994; Glass et al., 1986) y que según lo reportado por Lee, 1998 y Glass et al., 1986, la secuencia TTTTTATTTT es el sitio de poli-adenilación de los genes *hsp70* en *T. brucei* y que este se encuentra entre 100 a 400 nucleótidos corriente arriba del tracto de poli-pirimidinas, señal del “trans-splicing” (Benz et al., 2005), se ubicó el posible sitio de poli-adenilación en la región intergénica de los genes *hsp70* de las cepas Tre y H14 de *T. rangeli*. Como se observa en la Figura 56, ambas cepas del parásito poseen un sitio muy conservado en secuencia, respecto al sitio reportado en *T. brucei*, el cual se ubica 200 nucleótidos arriba del tracto de poli-pirimidinas. Adicionalmente, dicho sitio en las diferentes secuencias encontradas para la región intergénica de Tre y H14, se observa que es altamente conservado entre las secuencias de una misma cepa, siendo TTTATTTT para la cepa Tre y TTTTTTTTTTATTT para la cepa H14, mientras que varía entre cepas del mismo parásito. Por otra parte, en la secuencia de *T. cruzi* no es muy claro el sitio de adición de la cola de poli-adeninas, respecto al alineamiento con las secuencias de *T. rangeli* y *T. brucei*, pero de acuerdo con las secuencias señal de poli-adenilación observadas en estos

parásitos, se puede decir que el posible sitio de adición de la cola de poliadeninas en *T. cruzi* es el tracto TTTTATTATT. Teniendo en cuenta lo anterior, la región 3'UTR de los genes *hsp70* de *T. rangeli* tendría un tamaño aproximado de 148 pb en la cepa Tre y de 155 pb en la cepa H14, mientras que la región 5'UTR para los genes *hsp70* de *T. rangeli* tiene un tamaño de aproximadamente 99 pb en la cepa Tre y de 77 pb en la cepa H14 (Figura 56).

De igual forma, y teniendo en cuenta que para *T. brucei* fueron reportados dos dinucleótidos AG (Lee & Van Der Ploeg, 1990; Glass et al., 1986), aceptores de la secuencia líder del “splicing” y que según lo reportado por Benz et al., 2005 el principal AG aceptor, es el dinucleótido que se encuentra inmediatamente después del tracto de poli-pirimidinas que lo antecede, además, que dicha región rica en pirimidinas se encuentra entre 50 y 100 nucleótidos arriba del sitio de inicio de la transcripción y en los genes *hsp70* de *T. brucei* se encuentra en la posición -37 a -55 arriba del AG (Lee & Van Der Ploeg, 1990), se ubicaron los sitios característicos del “trans-splicing” en la secuencia de *T. rangeli*. Como se observa en la Figura 56, en las secuencias de ambas cepas del parásito se identificó una secuencia rica en citosinas y timinas corriente arriba del sitio aceptor del “splice-leader” reportado para *T. brucei*, la cual es altamente conservada entre las cepas de *T. rangeli*. Así mismo, se observó que el dinucleótido AG, principal aceptor del trans-splicing reportado en *T. brucei* coincide con el primer AG inmediatamente después del tracto de poli-pirimidinas y es altamente conservado en las secuencias de *T. rangeli* y *T. cruzi*. Adicionalmente, en *T. rangeli* se observan otros 6 posibles sitios AG, aceptores del “splice-leader”, altamente conservados entre las cepas del parásito (Figura 56). Vale la pena resaltar que los principales polimorfismos (inserciones/delecciones)

observados entre las regiones intergénicas de los genes *hsp70* entre las cepas de *T. rangeli* se encuentran en esta región.

6.3. Diseño y estandarización de un ensayo de PCR-RFLP para diferenciar subpoblaciones KP1(+) y KP1(-) de *T. rangeli*.

Con base en las diferencias observadas en el patrón de restricción de los genes *hsp70* de las cepas Tre, KP1(-) y H14, KP1 (+) del parásito con la enzima *SphI* (Figura 15), la cual presenta diana de restricción dentro de los genes de la cepa Tre y no en los genes de la cepa H14, se desarrolló una prueba de PCR-RFLP con el objetivo de evaluar si este polimorfismo de restricción se extendía a los grupos descritos de *T. rangeli* (Vallejo et al., 2003).

Inicialmente y mediante PCR se amplificó un fragmento correspondiente a la región carboxilo terminal del gen, entre 650 pb y 750 pb, en ambas cepas del parásito, dado el alto grado de polimorfismo encontrado en esta región para los genes *hsp70* de las cepas Tre y H14 (Figura 57).

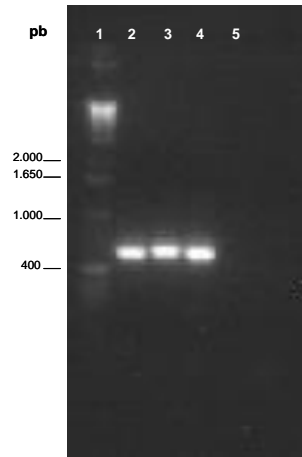


Figura 57. PCR del extremo carboxilo terminal del gen *hsp70*. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % teñido con bromuro de etidio conteniendo 10 μ l del producto de amplificación. ADN de la cepa Tre (2), ADN de la cepa H14 (3), ADN de la cepa Macias (4), control de la reacción (5). Se utilizó 1Kb como marcador de peso molecular (1), cuyos pesos en pb se indican a la izquierda.

Posteriormente, el fragmento de amplificación fue digerido con la endonucleasa de restricción *SphI* y como se observa en la figura 58, la enzima efectivamente corta el fragmento amplificado correspondiente a la región carboxilo terminal del gen *hsp70* en la cepa Tre y no en la cepa H14.

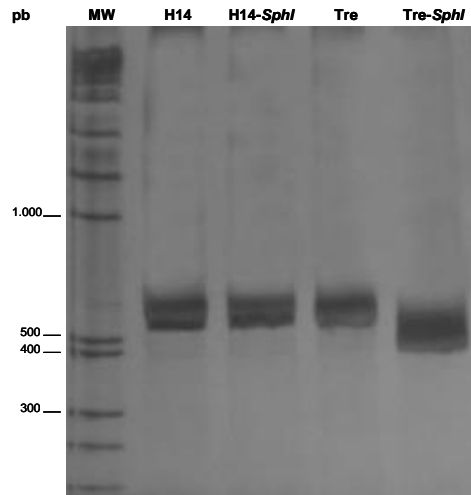


Figura 58. Digestión de la región carboxilo terminal del gen *hsp70* con la endonucleasa de restricción *SphI*. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% teñido con nitrato de plata conteniendo 10 μ l del producto de amplificación y 20 μ l de la reacción de digestión del fragmento amplificado de la cepa H14 y Tre de *T. rangeli*. Se utilizó marcador de peso molecular de 100 pb, cuyos pesos en pb se indican a la izquierda.

De acuerdo con estos resultados, se realizó el mismo ensayo para varias cepas del grupo 1, KP1 (-) y del grupo 2, KP1 (+) de *T. rangeli*, aisladas de diferentes huéspedes y procedentes de diversas regiones geográficas.

Como se observa en la figura 59, las cepas pertenecientes al grupo 1, KP1(-) del parásito *T. rangeli* poseen sitio de corte para la enzima *SphI* en el fragmento amplificado del gen *hsp70*, mientras que las cepas pertenecientes al grupo 2, KP1(+) del parásito no presentan sitio de corte para esta misma enzima.

Los resultados de todas las cepas evaluadas se resumen en la Tabla 7. Vale la pena resaltar que el polimorfismo de restricción evaluado es independiente del origen geográfico y del hospedero del cual fue aislada la cepa.

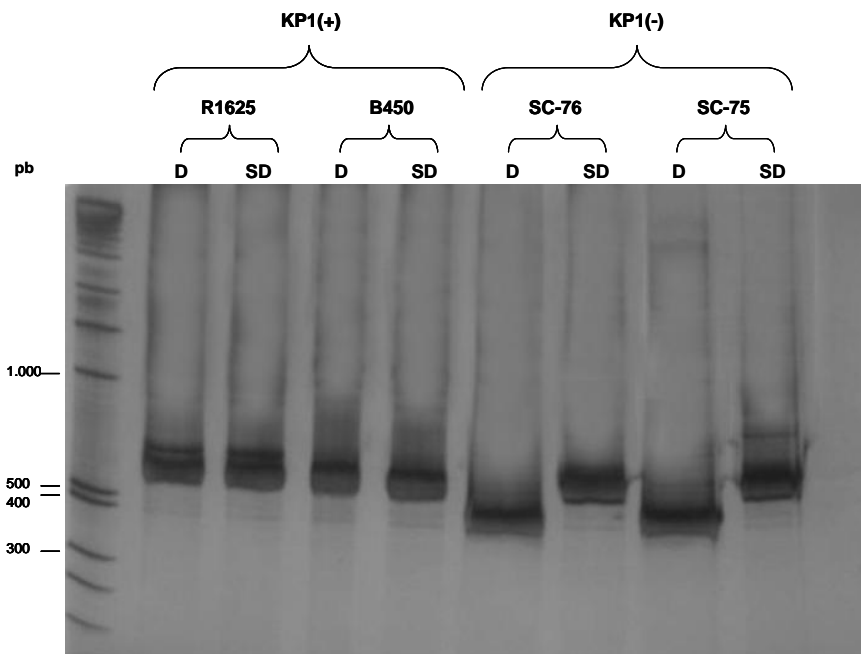


Figura 59. Digestión de la región carboxilo terminal del gen *hsp70* con la endonucleasa de restricción *SphI*. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% teñido con nitrato de plata conteniendo 10 μ l del producto de amplificación (SD) y 20 μ l de la reacción de digestión del fragmento amplificado (D) de las cepas KP1(+) R1625 y B450 y de las cepas KP1(-) SC76 y SC75 de *T. rangeli*. Se utilizó marcador de peso molecular de 100 pb, cuyos pesos en pb se indican a la izquierda.

Tabla 7. Características de las cepas evaluadas y patrón de restricción *SphI* de la región carboxilo terminal del gen *hsp70* de *T. rangeli*

Grupo	Cepa	Origen	Hospedero	Digestión <i>SphI</i>
KP1(+)	R1625	Salvador	Humano	
	H14	Honduras	Humano	
	H9	Honduras	Humano	
	H8GS	Honduras	Humano	
	Duran	Colombia	Humano	
	San Agustín	Colombia	Humano	
	1545	Colombia	<i>R. prolixus</i>	No corta
	Choachi	Colombia	<i>R. prolixus</i>	
	D3493	Colombia	<i>R. prolixus</i>	
	Palma 2	Venezuela	<i>R. prolixus</i>	
	Macias	Venezuela	Humano	
B450	Brasil	<i>Rhodnius pictipes</i>		
KP1 (-)	Pit-10	ND	ND	
	Tre	Colombia	ND	
	5048	Colombia	Humano	
	C23	Colombia	<i>Aotus sp.</i>	
	SC-58	Brasil	<i>Echimys dasythrix</i>	
	SC-61	Brasil	<i>Echimys dasythrix</i>	
	SC-66	Brasil	<i>Panstrongylus megistus</i>	Corta
	SC-68	Brasil	<i>P. megistus</i>	
	SC-70	Brasil	<i>P. megistus</i>	
	SC-74	Brasil	ND	
	SC-75	Brasil	<i>P. megistus</i>	
	SC-76	Brasil	<i>P. megistus</i>	
	SC-85	Brasil	ND	

ND: no disponible

6.4 Análisis filogenéticos de la proteína HSP70

Con el objetivo de realizar un análisis filogenético de la proteína HSP70, se realizó una búsqueda en la base de datos Genedb (www.genedb.org) y en la base de datos de GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) de todas las proteínas HSP70 reportadas para tripanosomátidos (Tabla 8). Para el análisis también se tuvieron en cuenta aquellas proteínas reportadas como putativas, relacionadas o parecidas a la HSP70.

Tabla 8. Genes *hsp70* reportados para varias especies de tripanosomátidos en las bases de datos Genedb y GenBank.

Espece	Código de la secuencia	Descripción de la secuencia y procedencia
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Tc00.1047053511211.170	
	Tc00.1047053511211.160	
	Tc00.1047053511211.220	heat shock protein 70
	Tc00.1047053507513.50	(HSP70), putative.
	Tc00.1047053511585.70	Cepa CL
	Tc00.1047053510155.70	
	X67716.1	mRNA for HSP70. Cepa Brasil
X07083.1	hsp70 gene. Cepa Maracay	
AY576621.1	heat shock protein 70 mRNA. Cepa Y	
M26595.1	heat shock protein (HSP70) gene. Cepa Peru	
<i>Trypanosoma brucei</i> Cepa TREU927/4 GUTat10.1	Tb11.01.3110 y/o M14697	heat shock protein 70
	Tb11.01.3080 y/o M32139	
	Tb927.7.710	heat shock 70 kDa protein, putative
	Tb927.7.1030	
	Tb09.160.3090	heat shock proteína

Espece	Código de la secuencia	Descripción de la secuencia y procedencia
<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>	Tbgamb.40006	heat shock protein 70
	Tbgamb.13266	heat shock 70 kDa protein,
	Tbgamb.13431	putative
	Tbgamb.39986	
	Tbgamb.32356 Tbgamb.22116	heat shock protein, putative
<i>Trypanosoma congolense</i>	congo261b05.p1k_0 congo893f08.p1k_3	heat shock 70 kDa protein, putative
	congo863a06.p1k_2	heat shock protein, putative
<i>Trypanosoma vivax</i>	tviv1321f07.q1k_3 tviv395b12.p1k_5 tviv28e10.q1k_13	heat shock 70 kDa protein, putative
	M36675	heat shock protein 70, gene 3. Cepa no disponible
	Lmfj26.1240 y/o X69825	hsp70.4 gene for heat shock protein 70-related protein. Cepa Friedlin
<i>Leishmania major</i>	Lmjf28.2770 Lmjf28.2780 Lmjf28.2820	heat-shock protein hsp70, putative. Cepa Friedlin
	Lmjf.26.0900 Lmjf01.0640	HSP70-like protein. Cepa Friedlin
	AF291716.1	heat shock protein 70 (hsp70) gene. Cepa LQ-8
	LbrM28_V2.3030 LbrM28_V2.2990	heat shock protein 70, putative. Clon M2904
	LbrM01_V2.0790 LbrM26_V2.0910	HSP70-like protein Clon M2904
<i>Leishmania braziliensis</i>	LbrM26_V2.1260	heat shock protein 70- related protein Clon M2904

Espece	Código de la secuencia	Descripción de la secuencia y procedencia
<i>Leishmania infantum</i>	Y08020.1	hsp70 gene.
	X85798.1	Cepa LEM75
	LinJ28.2970	heat-shock protein, hsp70.
	LinJ28.2920	Clon JPCM5
	LinJ28_V3.2960	heat-shock protein hsp70, putative. Clon JPCM5
	LinJ28_V3.2950	
	LinJ28_V3.3000	
LinJ28_V3.3060		
LinJ26_V3.1220	heat shock protein 70-related protein. Clon JPCM5	
LinJ01_V3.0660	HSP70-like protein. Clon JPCM5	
<i>Leishmania donovani</i>	X52314.1	heat shock protein 70. Cepa HU3
<i>Leishmania tarentolae</i>	AY423868.1	heat shock protein (hsp70) gene
	AY423867.1	heat shock cognate protein (hsc70) gene
<i>Leishmania amazonensis</i>	L14605.1	heat shock protein (hsp70)
	L14604.1	gene. Cepa C1S1

Haciendo uso de la herramienta ClustalX (Thompson et al., 1997) y ClustalW XXL de la base de datos EMBnet (www.ch.embnet.org), se realizó el alineamiento de las secuencias encontradas para la proteína HSP70 de varios tripanosomátidos (Tabla 8), más las secuencias reportadas en este trabajo para *T. rangeli*, obteniéndose un alineamiento de 1.287 sitios, de los cuales 151 fueron conservados, 1.096 variables y de éstos 927 informativos bajo el criterio de parsimonia.

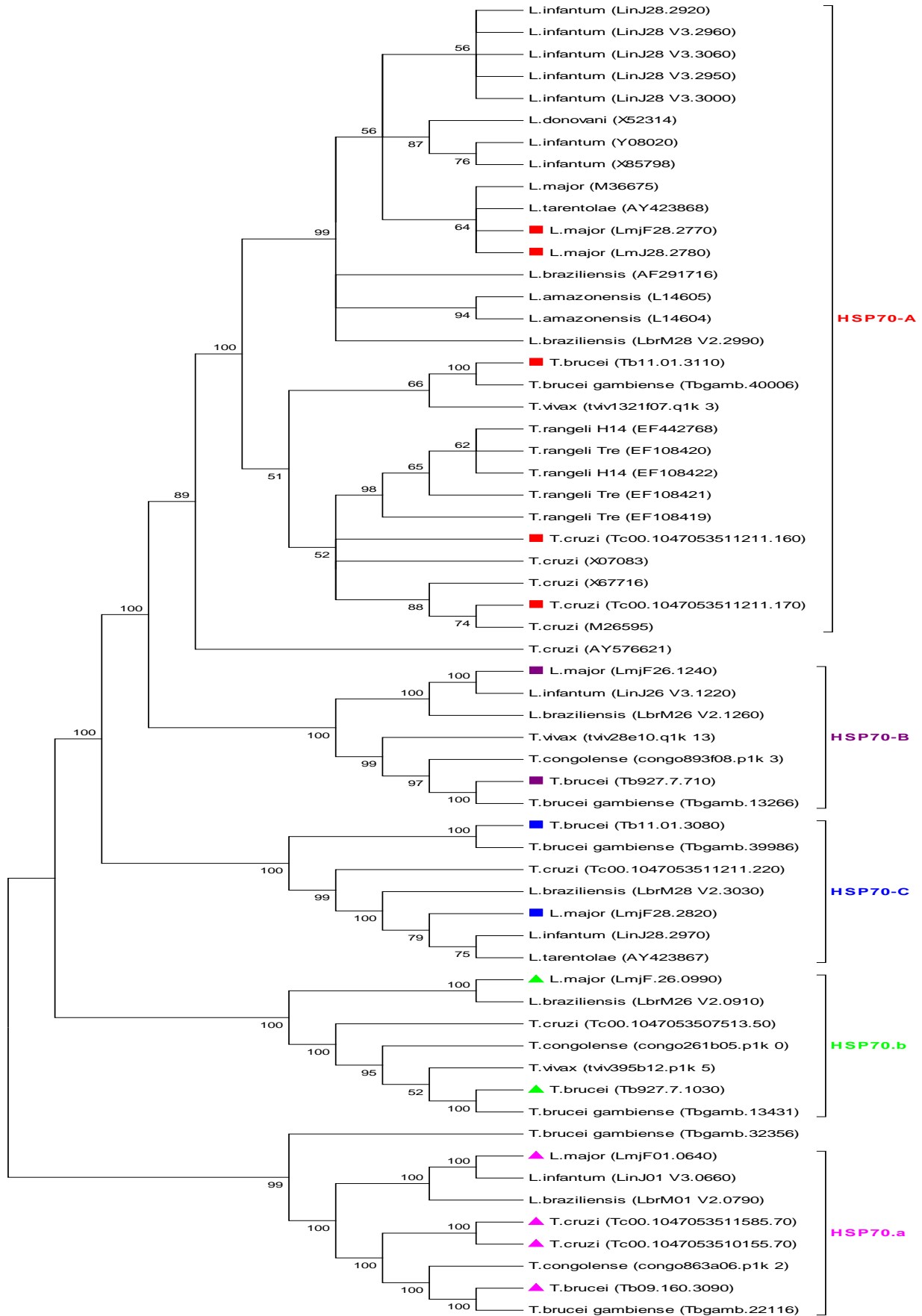
Las secuencias alineadas fueron editadas usando el programa BioEdit versión 7.0.4.1 (Hall, 1999) y los análisis filogenéticos realizados por los métodos de Neighbor-Joining (NJ) (Figura 60) y Mínima evolución (ME) (Figura 61) mediante el uso del programa MEGA versión 4 (Tamura et al., 2007). Todos los análisis fueron realizados usando como test de filogenia un bootstrap de 1.000 réplicas y como modelo de sustitución distancia-p (proporción de sitios en los cuales dos secuencias comparadas son diferentes, obtenido de dividir el número de aminoácidos diferentes entre el número de sitios comparados). Todas las posiciones que contenían gaps y pérdida de datos fueron eliminadas.

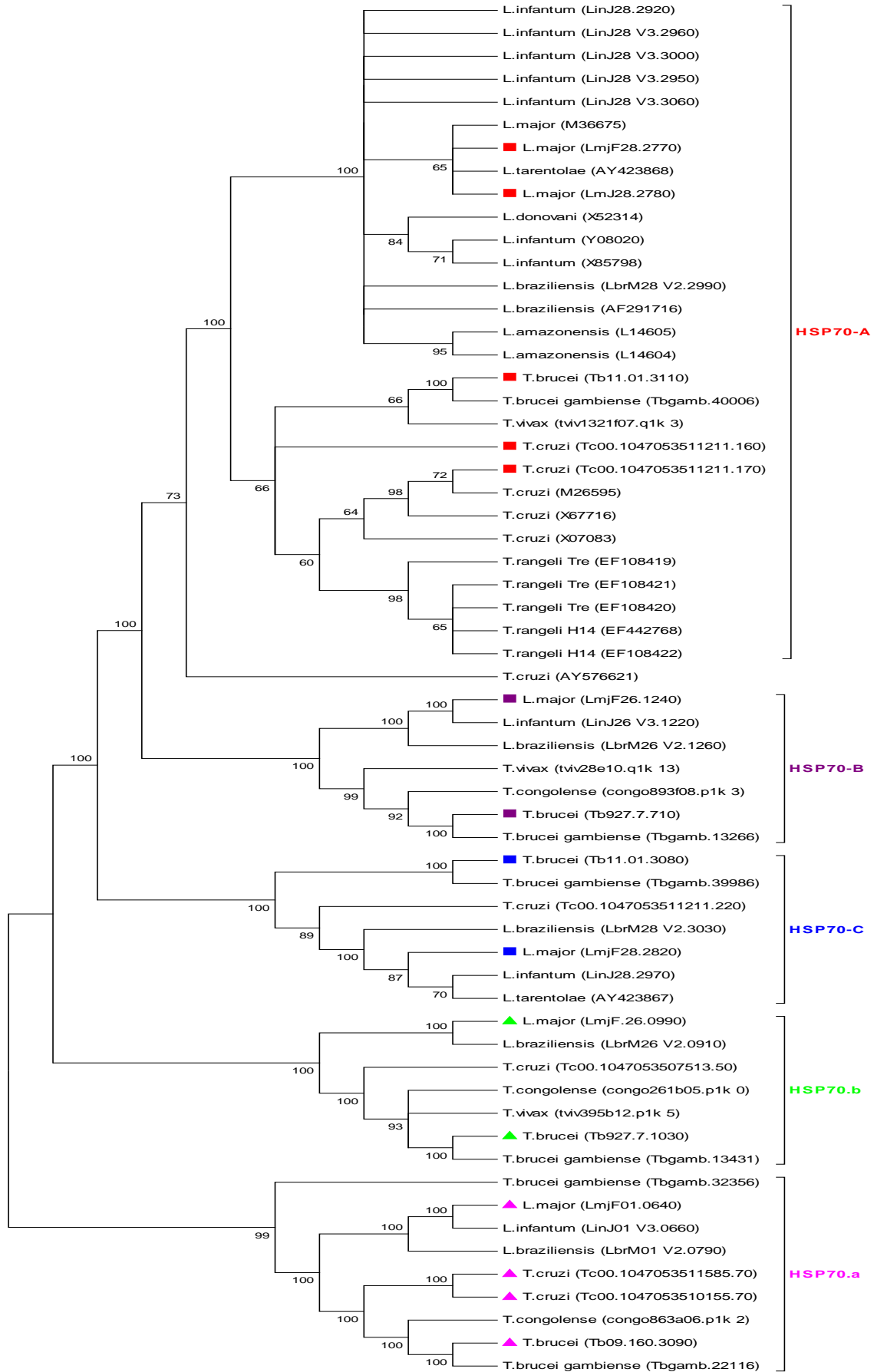
Como se observa en las figuras 60 y 61 ambas aproximaciones filogenéticas generaron árboles idénticos, en los cuales se soporta con altos valores de bootstrap cada uno de los grupos de proteínas HSP70 inicialmente propuestos (Folgueira & Requena, 2007; Simpson et al., 2004), siendo el grupo de proteínas HSP70.a el más divergente. Las proteínas HSP70 de *T. rangeli* se ubican dentro del grupo de proteínas HSP70-A.

Figura 60 (Pág. 133). Dendograma de similaridad usando el método de Neighbor-Joining. Se muestra el árbol consenso obtenido mediante un bootstrap de 1000 réplicas, los valores mayores a 60% son indicados en cada nodo. Los cuadros y rectángulos indican las secuencias previamente clasificadas como HSP70-A (rojo), HSP70-B (púrpura), HSP70-C (azul), HSP70.b (verde) y HSP70.a (rosado).

Figura 61 (Pág. 134). Dendograma de similaridad usando el método de Mínima Evolución. Se muestra el árbol consenso obtenido mediante un bootstrap de 1000 réplicas, los valores mayores a 60% son indicados en cada nodo. Los cuadros y rectángulos indican las secuencias previamente clasificadas como HSP70-A (rojo), HSP70-B (púrpura), HSP70-C (azul), HSP70.b (verde) y HSP70.a (rosado).

Resultados





Estudios adicionales realizados usando máxima parsimonia (MP) confirmaron los 5 grupos de proteínas HSP70 soportados por altos valores bootstrap (mayores 97%) (Figura 62). Un análisis más detallado del árbol generado mostró que los grupos HSP70-A y HSP70-B constituyen clados hermanos a diferencia de lo reportado por Simpson et al., 2004, quienes reportaron el grupo HSP70-B como un clado hermano del HSP70-C. Adicionalmente, y de forma similar a lo obtenido en los resultados de NJ y ME (Figuras 60 y 61) en cada uno de los grupos de proteínas HSP70 se soportó con altos valores de bootstrap el grupo constituido por las proteínas HSP70 de *Leishmania* (con valores bootstrap superiores a 86%). Este grupo de proteínas siempre se localizó en un clado diferente al constituido por las proteínas de tripanosomas (con valores de bootstrap superiores a 54%). Además, al interior del clado constituido por los tripanosomas, el grupo de proteínas de los tripanosomas africanos siempre constituyó un clado aparte (con valores bootstrap mayores a 63%) de las proteínas de *T. cruzi* y *T. rangeli* (Figura 62).

Es importante resaltar que el grupo de proteínas HSP70 de *T. rangeli*, en los 3 análisis realizados, conformaron un clado independiente y soportado con altos valores bootstrap (98% en NJ y ME y de 88% en MP), el cual siempre mostró ser filogenéticamente más cercano a las HSP70 de *T. cruzi*. Adicionalmente y respecto a las secuencias HSP70-A de las diferentes cepas de *T. cruzi* evaluadas, se observó una alta variabilidad, dado que estas en ninguno de los análisis realizados conformaron un clado bien constituido, siendo la secuencia reportada para la cepa Y (AY576621) la más divergente de todas, a tal punto que no pudo ser clasificada dentro de los grupos establecidos para las proteínas HSP70 (Figura 63).

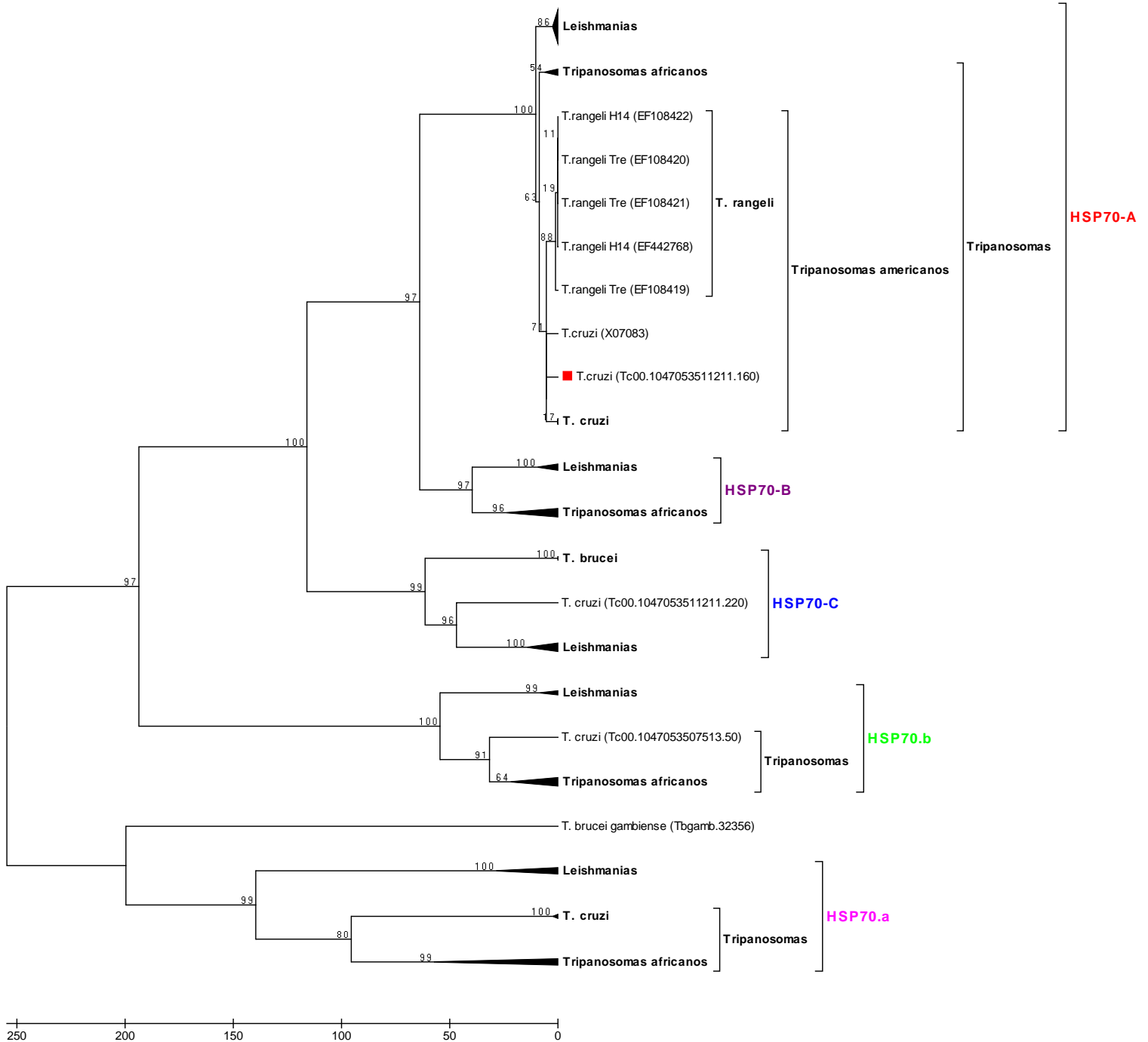


Figura 62. Análisis filogenético usando el método de Máxima Parsimonia. Se muestra el árbol consenso obtenido mediante un bootstrap de 1000 réplicas, los valores son indicados en cada nodo. El árbol esta dibujado a escala, las unidades indican el número de cambios sobre la secuencia completa y los clados representativos se encuentran condensados.

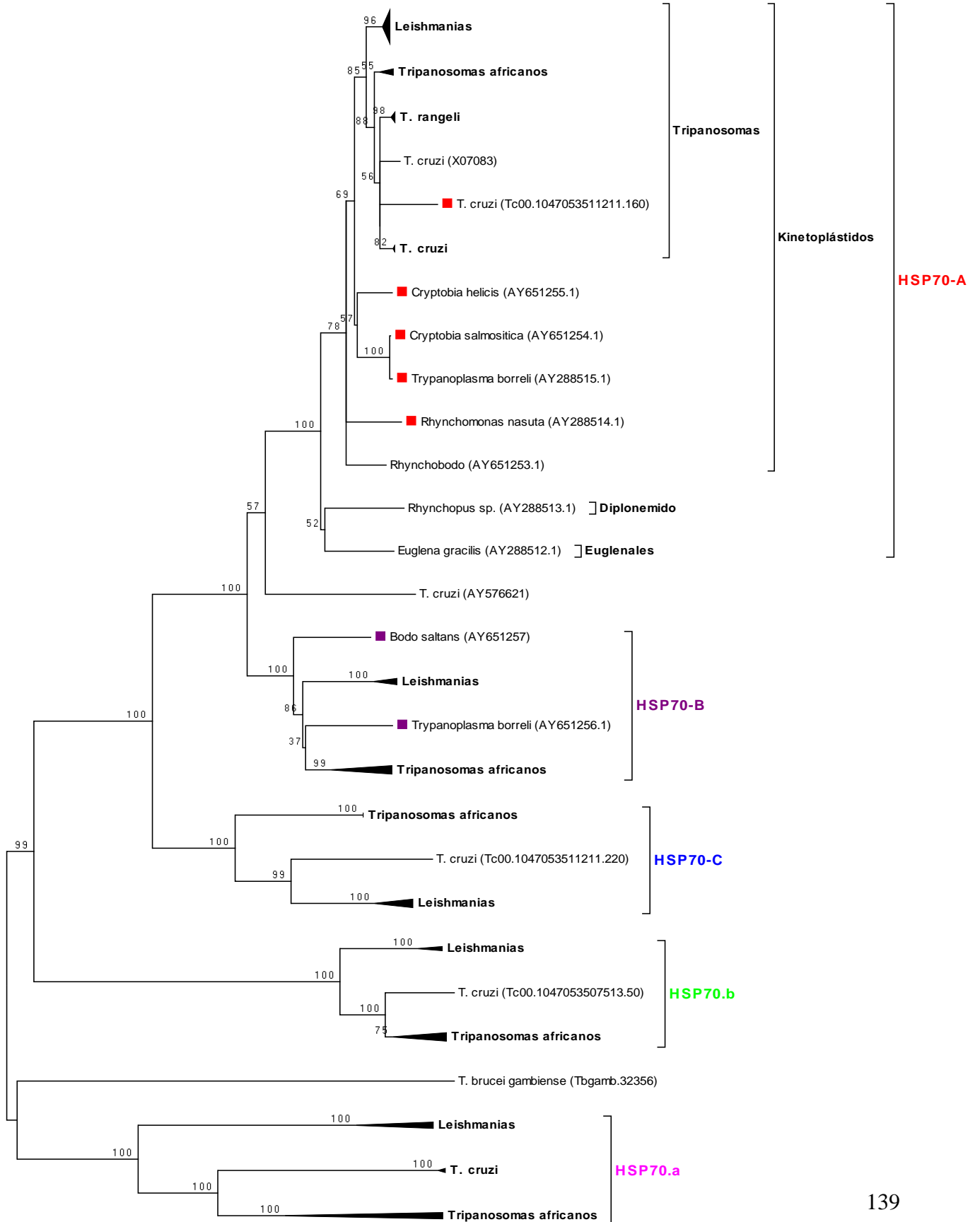
Con el objetivo de realizar un análisis filogenético de las proteínas HSP70 en los kinetoplástidos, se realizó una búsqueda de las proteínas HSP70 reportadas en la base de datos de GenBank para estos organismos (Tabla 9) y se realizaron las aproximaciones evolutivas mediante análisis por NJ, ME y MP. Se muestra el árbol de NJ como representante del análisis (Figura 63).

Tabla 9. Genes *hsp70* reportados para los kinetoplástidos en las bases de datos Genedb y GenBank.

Especie	Código de la secuencia	Descripción de la secuencia	Clasificación
<i>Bodo saltans</i>	AY651257	Heat shock protein 70-B cytosolic isoform gene	Familia: <i>Bodonidae</i>
<i>Cryptobia helicis</i>	AY651255	Heat shock protein 70 cytosolic isoform gene	
<i>Cryptobia salmositica</i>	AY651254	Heat shock protein 70 cytosolic isoform gene	
<i>Trypanoplasma borreli</i>	AY651256	Heat shock protein 70-B cytosolic isoform gene	
<i>Trypanoplasma borreli</i>	AY288515	Heat shock protein 70 gene	
<i>Rhynchobodo</i>	AY651253	Heat shock protein 70 cytosolic isoform gene	
<i>Rhynchomonas nasuta</i>	AY288514	Heat shock protein 70 gene	
<i>Rhynchopus sp.</i>	AY288513	Heat shock protein 70 gene	Orden: <i>Diplonemida</i>
<i>Euglena gracilis</i>	AY288512	Heat shock protein 70 mRNA	Orden: <i>Euglenales</i>

El alineamiento realizado haciendo uso de la herramienta Clustal-X (Thompson et al., 1997) generó un alineamiento de 1.288 sitios de los cuales 141 fueron conservados, 1.119 variables y de éstos 943 informativos bajo el criterio de parsimonia.

Figura 63 (Pág 139). Dendograma de similaridad usando el método de Neighbor-Joining. Se muestra el árbol consenso obtenido mediante un bootstrap de 1000 réplicas, los valores son indicados en cada nodo. Los cuadros y rectángulos indican las secuencias previamente clasificadas como HSP70-A (rojo), HSP70-B (púrpura), HSP70-C (azul), HSP70.b (verde) y HSP70.a (rosado). Los clados representativos se encuentran condensados.



Al aumentar el número de taxones, los grupos previamente establecidos de proteínas HSP70 se mantienen con valores de bootstrap de 100%. Es importante resaltar que el grupo de proteínas HSP70-B continua soportándose como un clado hermano del grupo HSP70-A, además de que el posible evento de duplicación HSP70-A/HSP70-B ocurrió antes de la divergencia entre los euglenozoa.

Teniendo en cuenta el alto número de secuencias reportadas para los genes HSP70-A y que las secuencias de *T. rangeli* se ubicaron en este grupo, se decidió realizar las aproximaciones filogenéticas de los kinetoplástidos usando únicamente este grupo de proteínas. En primer lugar, se encontró que *T. rangeli* forma un clado aparte dentro del grupo de los tripanosomas, separado por valores bootstrap de 99% (NJ), 99% (ME) y 97% (MP) (Figuras 64, 65 y 66) siempre más cercano a *T. cruzi* que a *T. brucei*.

Adicionalmente, los análisis filogenéticos de este grupo de proteínas soportaron con altos valores bootstrap el carácter monofilético de los tripanosomas (94% (NJ), 95% (ME) y 60% (MP)). Así mismo, al interior del clado, los tripanosomas americanos se ubican en un grupo soportado con altos valores bootstrap y aparte de los tripanosomas africanos.

Es importante anotar que las secuencias de *T. cruzi*, las cuales no agrupaban en un grupo bien constituido en los análisis que incluían todos los grupos de proteínas HSP70, agruparon en clados bien soportados al analizar sólo el grupo de proteínas HSP70-A (60% (NJ), 83% (ME) y 72% (MP)). Adicionalmente, la proteína HSP70 de *T. cruzi* (AY576621), reportada para la cepa Y, la cual parecía estar relacionada al grupo HSP70-A, no pertenece a este.

De igual forma, el grupo de proteínas HSP70-A soporta muy bien la división entre *Trypanosomas* y *Leishmanias* (bootstrap 96% (NJ), Figura 64; 95% (ME), Figura 65 y 75% (MP), Figura 66), además de la división entre tripanosomátidos y bodoninos (bootstrap 78% (NJ), Figura 64; 90% (ME), Figura 65 y 57% (MP), Figura 66). Es importante anotar que el clado conformado por los kinetoplástidos se soporta con buenos valores de bootstrap en los análisis de NJ (74%, Figura 64) y ME (66%, Figura 65), pero no es bien soportado en el análisis de MP (36%, Figura 66).

Es interesante resaltar como el grupo de proteínas HSP70-A también permite claramente la diferenciación, al interior del clado de las *Leishmanias*, de las especies del subgénero *Leishmania* y de las del *Viannia* (representado por las secuencias de *L. braziliensis*) con valores bootstrap de 86 % (NJ) y 73% (ME). Además, el polimorfismo de este grupo de proteínas permite diferenciar entre especies y aún entre cepas de una misma especie (*L. infantum* cepa JPCM5 y LEM75). Adicionalmente, los 3 tipos de análisis filogenéticos soportan con altos valores bootstrap el carácter monofilético de las *Leishmanias* (100% (NJ), 99% (ME) y 97% (MP). Un análisis adicional realizado únicamente con las secuencias HSP70-A de *Leishmania* confirma los resultados anteriores y permite soportar el clado del subgénero *Leishmania* con un alto valor de bootstrap (97%), a parte del subgénero *Viannia* (Figura 67).

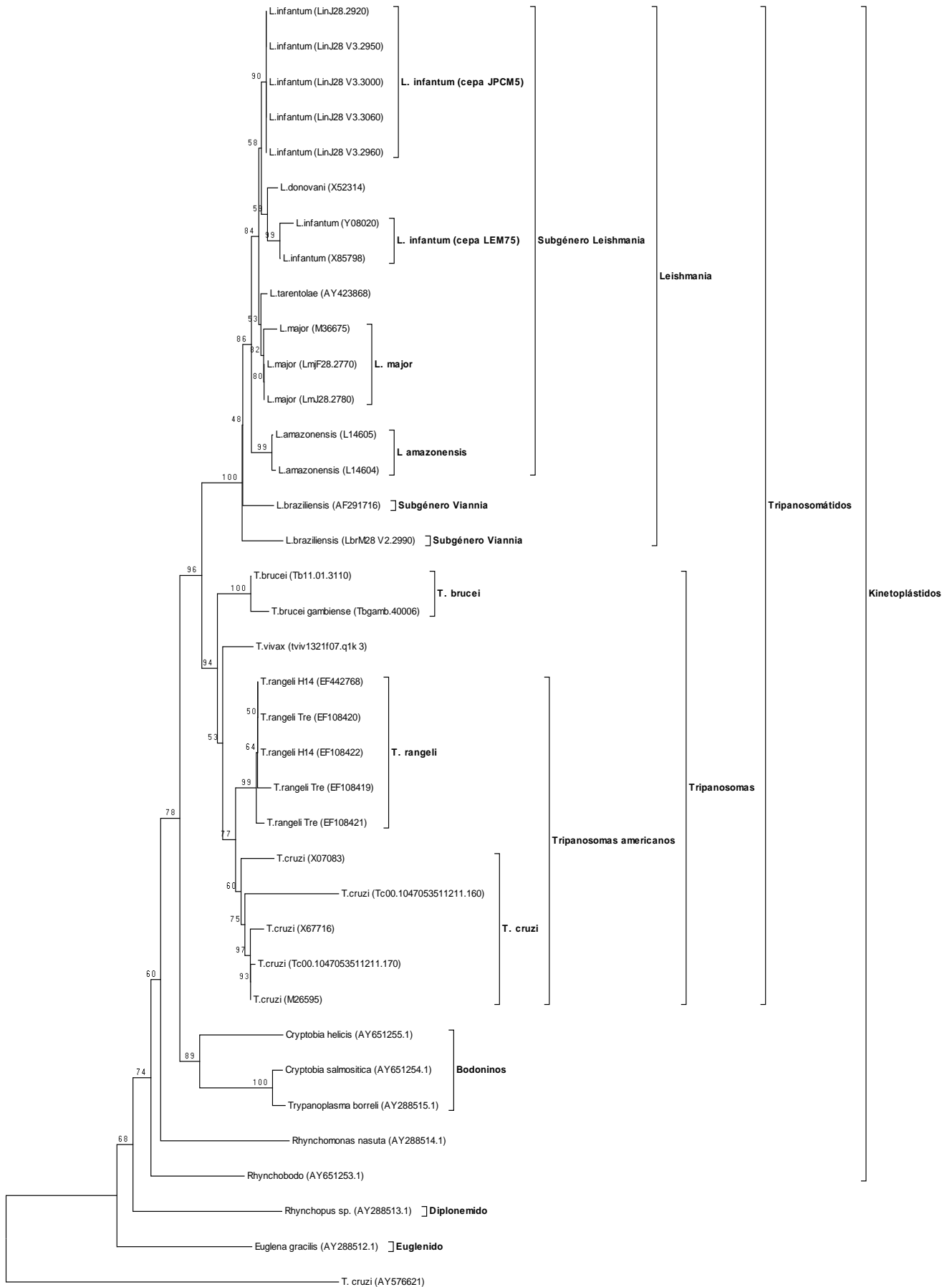
Figura 64 (Pág 143). Dendograma de similaridad usando el método de Neighbor-joining para las proteínas HSP70-A. Se muestra el árbol consenso obtenido mediante un bootstrap de 1000 réplicas, los valores son indicados en cada nodo.

Figura 65 (Pág 144). Dendograma de similaridad usando el método de Mínima Evolución para las proteínas HSP70-A. Se muestra el árbol consenso obtenido mediante un bootstrap de 1000 réplicas, los valores son indicados en cada nodo. Los clados representativos se encuentran condensados.

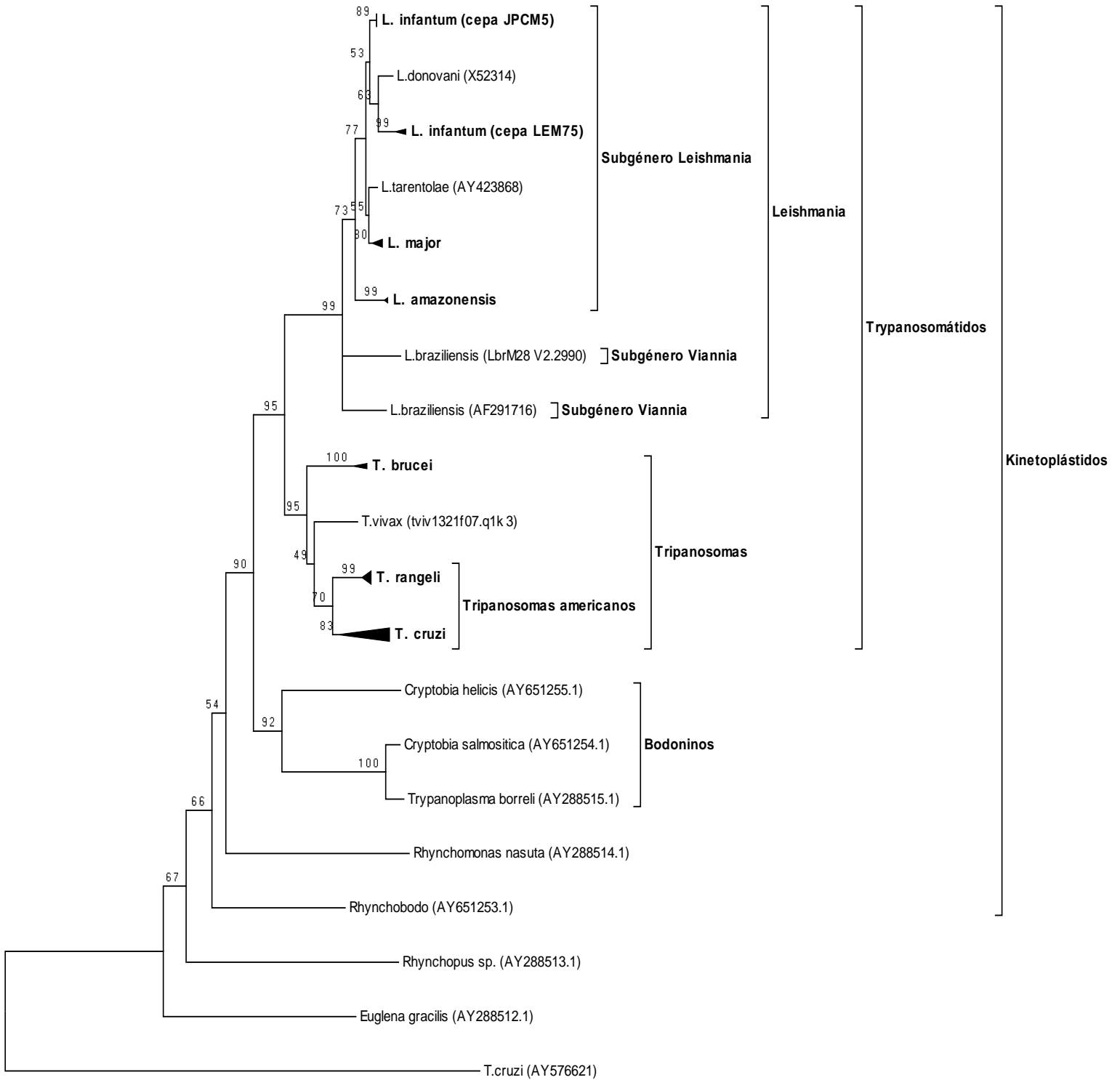
Figura 66 (Pág 145). Análisis filogenético usando el método de Máxima Parsimonia para las proteínas HSP70-A. Se muestra el árbol consenso obtenido mediante un bootstrap de 1000 réplicas, los valores son indicados en cada nodo. Los clados representativos se encuentran condensados.

Figura 67 (Pág 146). Dendograma de similaridad usando el método de Neighbor-joining para las proteínas HSP70-A de Leishmania. Se muestra el árbol consenso obtenido mediante un bootstrap de 1000 réplicas, los valores son indicados en cada nodo.

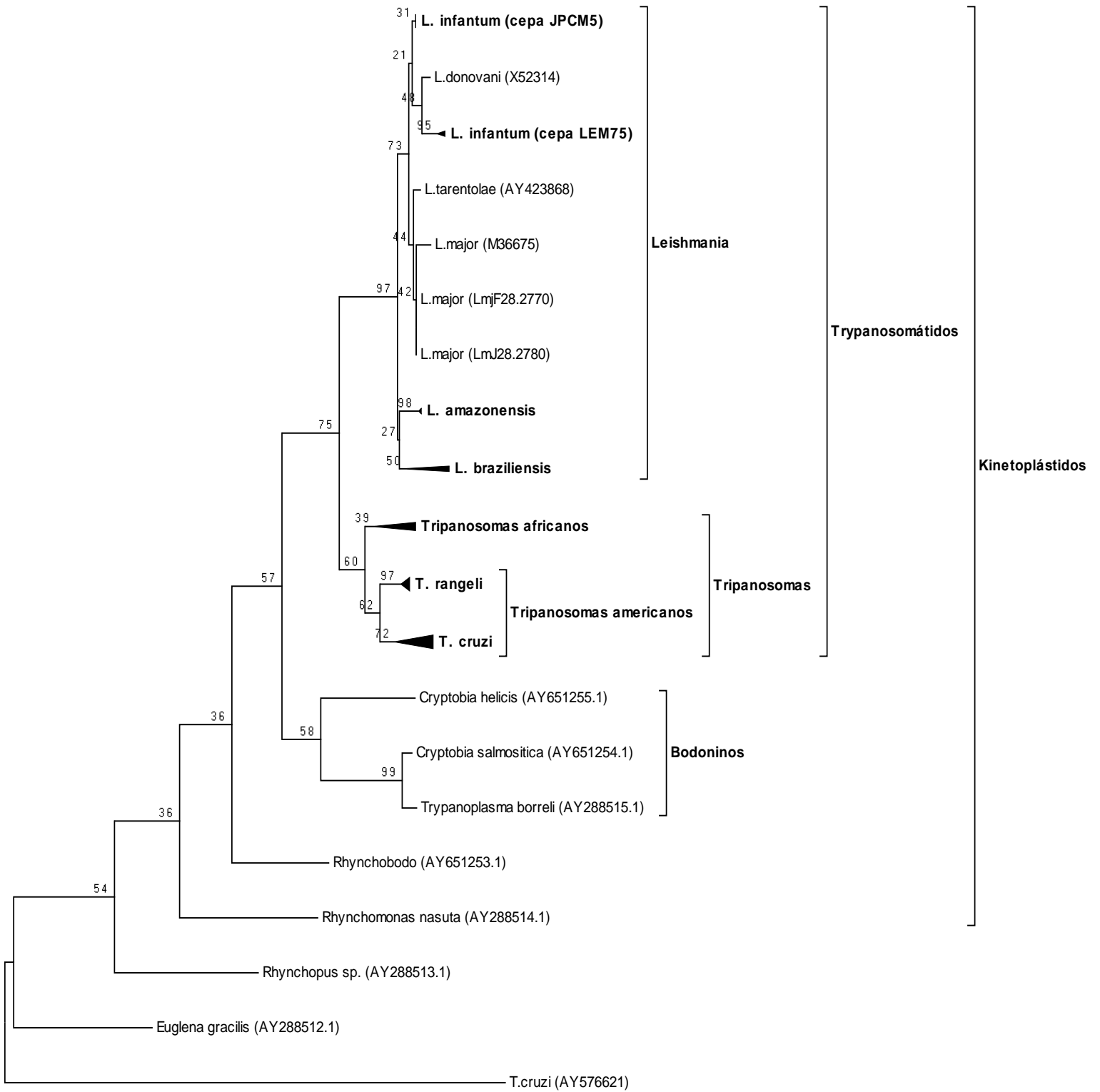
Resultados



Resultados

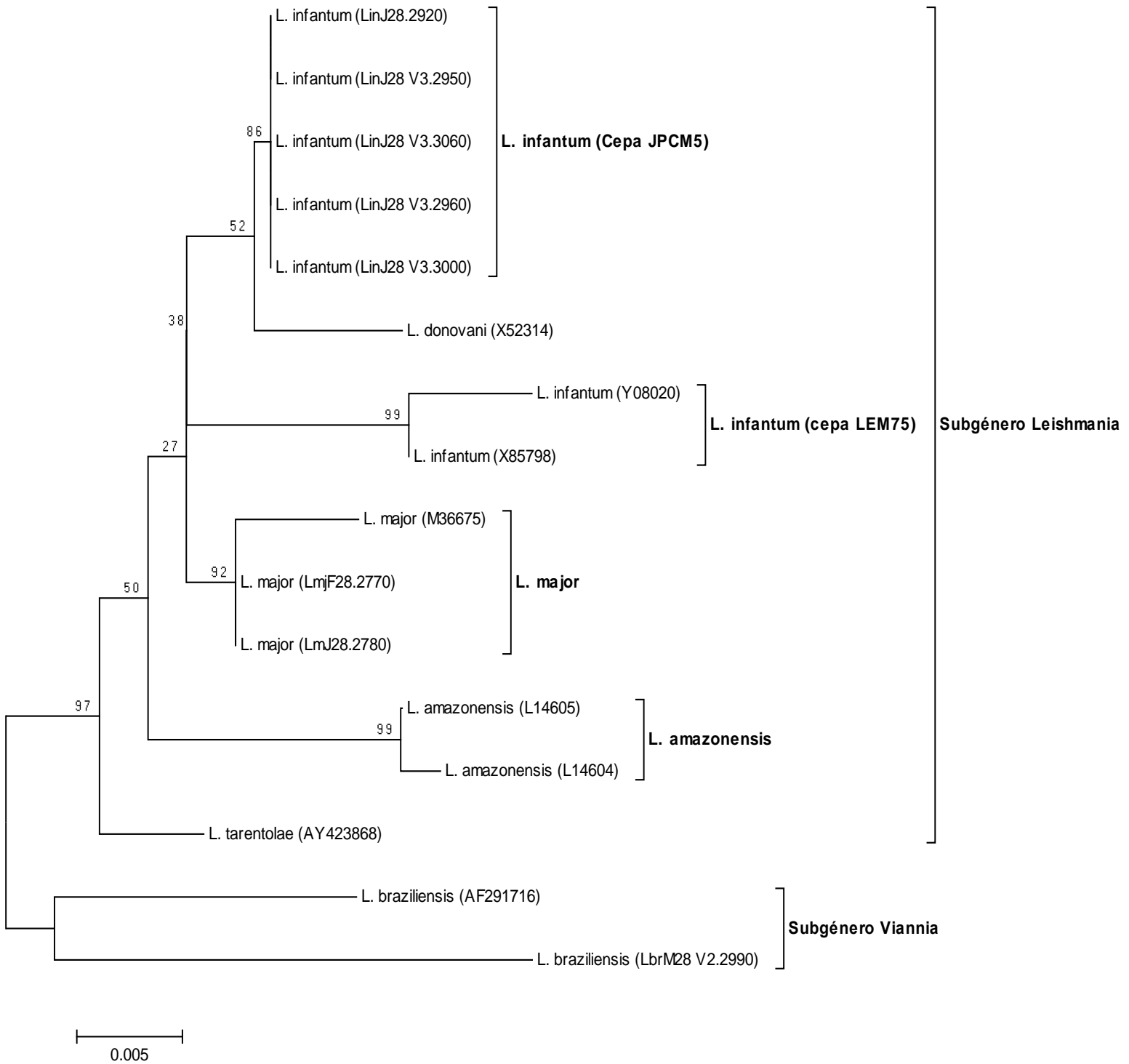


Resultados



20

Resultados



6.5. Producción de la proteína HSP70 recombinante de *T. rangeli*

Dada la relevancia inmunológica de la proteína HSP70 de *T. cruzi* (Marañon et al., 2001; 2000a; Planelles et al., 2002; 2001), se decidió obtener de manera recombinante la proteína HSP70 de *T. rangeli*, teniendo en cuenta que dicha proteína presenta epítomos humorales y celulares reportados en la proteína HSP70 de *T. cruzi* (Marañon et al., 2000a) (Figura 68).

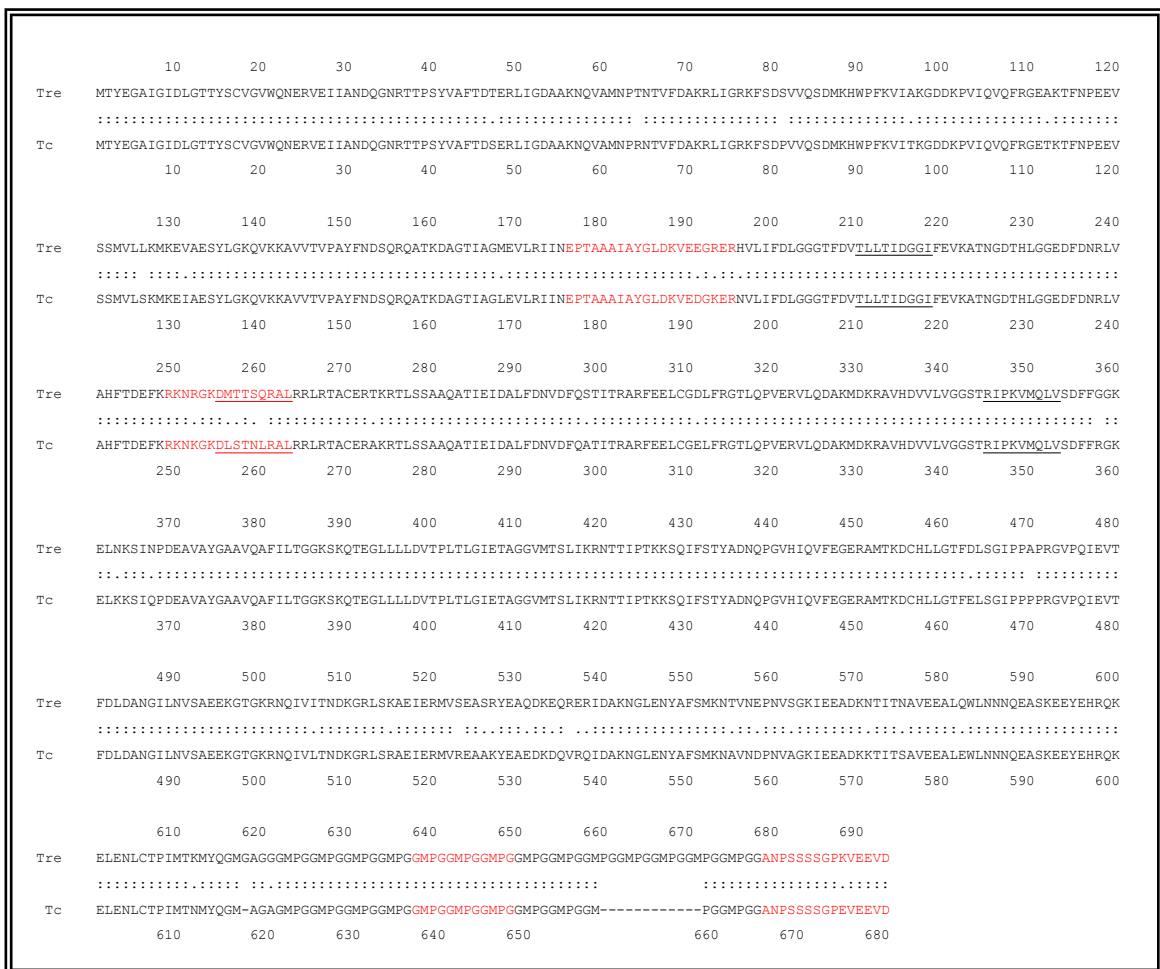


Figura 68. Alineamiento entre la HSP70 de *T. rangeli* y *T. cruzi* (X07083), en rojo se muestran los epítomos humorales P15, P22, P49 y P50; subrayado se denotan los epítomos citotóxicos A72, A73 y A79 evaluados en la proteína HSP70 de *T. cruzi*.

Como se observa en la figura 68 los epítomos humorales P15, P49 y P50 reportados en la HSP70 de *T. cruzi* están altamente conservados en la proteína de *T. rangeli*, y el epítomo P22 presenta el cambio de un aminoácido (L por Q). Así mismo, los epítomos reconocidos por los linfocitos T CD8+ A72 y A79 se encuentran conservados en la secuencia de *T. rangeli* mientras que el epítomo A73 presenta un cambio en uno de los aminoácidos, L por Q en *T. rangeli* con respecto a la secuencia en *T. cruzi*. Tanto los epítomos humorales como los celulares son iguales entre las HSP70 de H14 y Tre.

Teniendo en cuenta lo anterior se clonó, expresó y purificó la proteína HSP70 de la cepa Tre de *T. rangeli*, específicamente la isoforma codificada por la copia 1 del gen *hsp70* de dicha cepa (Figura 30 y Figura 33), con la finalidad de usarla en ensayos posteriores de reactividad inmunológica humoral y celular.

Como se indica en materiales y métodos, se re-amplificó el fragmento correspondiente a la región codificante del gen *hsp70* (2.082 pb) del clon TREchS-3 usando los oligonucleótidos 70TreATG-BamHI y 70TreTGA-HindIII (Figura 9). Tanto el fragmento amplificado como el vector de expresión pQE-30 (Qiagen) fueron sometidos a digestión con las endonucleasas *BamHI* y *HindIII*, para posteriormente ser sometidos a una reacción de ligación, transformación en células de *E. coli* competentes y selección de clones recombinantes.

Producto de la selección se obtuvo el clon denominado pQHPT-1, el cual mediante secuenciación se confirmó contenía la región codificante del gen *hsp70*, idéntica a la secuencia original.

Inicialmente, se realizaron ensayos para establecer la concentración apropiada del inductor IPTG (Figura 11). Como se observa en la figura 69, con todas las concentraciones de inductor usadas se logró la sobre-expresión de la proteína recombinante. Con estos resultados se decidió usar una concentración de 0,02 mM de IPTG durante 2 horas a 37 °C.

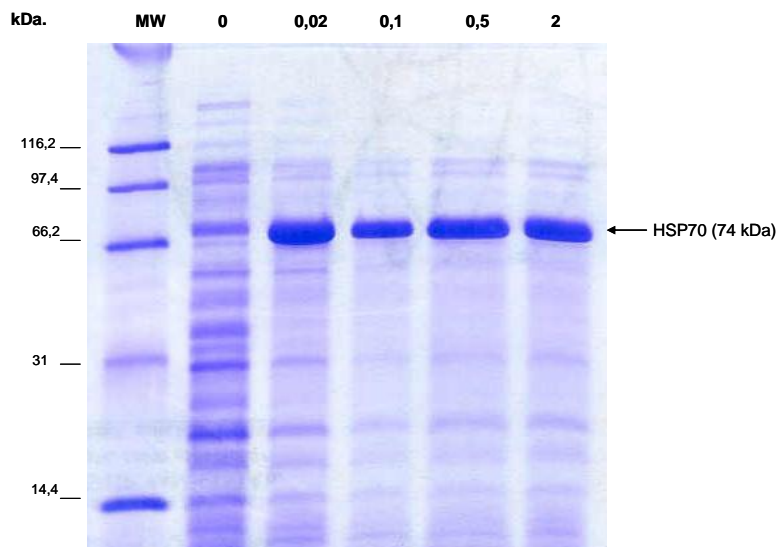


Figura 69. Ensayo de sobre-inducción de la proteína HSP70 de *T. rangeli*. Tinción con azul de Coomassie del SDS-PAGE del ensayo de sobre-inducción de la proteína HSP70 de *T. rangeli* inducida a diferentes concentraciones de IPTG. A la derecha se indica la proteína HSP70.

Es importante resaltar que la proteína obtenida presenta el tamaño molecular esperado y no se observa la sobre-inducción de proteínas de menor tamaño, como había sido previamente reportado para la expresión de la proteína HSP70 de *P. falciparum*, la cual fue expresada de manera truncada debido a la diferencia en el uso de codones entre *E. coli* y el parásito (Matambo et al., 2004).

Para los ensayos de solubilización, el cultivo inducido con 0,02 mM de IPTG se sonicó para favorecer la lisis celular y liberación de la proteína. Como se observa en la figura 70, la proteína HSP70 fue solubilizada únicamente cuando se adicionó SDS 0,025% a la solución de solubilización.

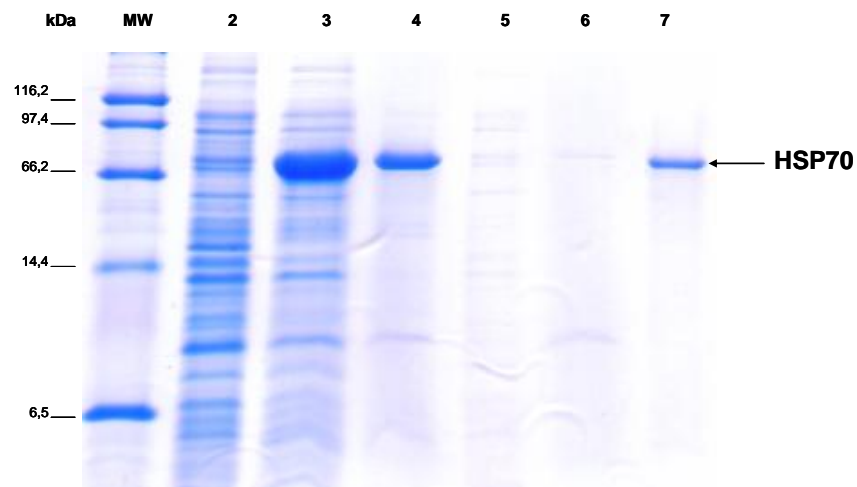


Figura 70. Ensayo de solubilización de la proteína HSP70 de *T. rangeli*. Tinción con azul de Coomassie del SDS-PAGE del ensayo de solubilización de la proteína HSP70 de *T. rangeli* inducida con 0,02 mM de IPTG. Cultivo sin inducir (2); cultivo inducido con 0,02 mM de IPTG (3); pellet (4) y sobrenadante (5) de la primera solubilización sin SDS; pellet (6) y sobrenadante (7) de la segunda solubilización con SDS 0,025%.

Gracias a la clonación en el vector de expresión pQE-30, el cual genera una cola de histidinas en la proteína recombinante, la proteína HSP70 de *T. rangeli* se purificó mediante unión a una resina de níquel (Ni^{2+} NTA (Qiagen)), la cual presenta alta afinidad por la cola de poli-histidinas presente en la proteína.

Para la elución de la proteína adherida a la resina se usó un gradiente de pH. Basados en el punto isoeléctrico (5,48) deducido de la proteína HSP70 de *T. rangeli*, la proteína recombinante debía ser eluida en un rango de pH entre 5 y 6.

Como se observa en la figura 71, la proteína HSP70 de *T. rangeli* fue obtenida y purificada con las soluciones a pH 6 y a pH 5 de acuerdo con lo esperado.

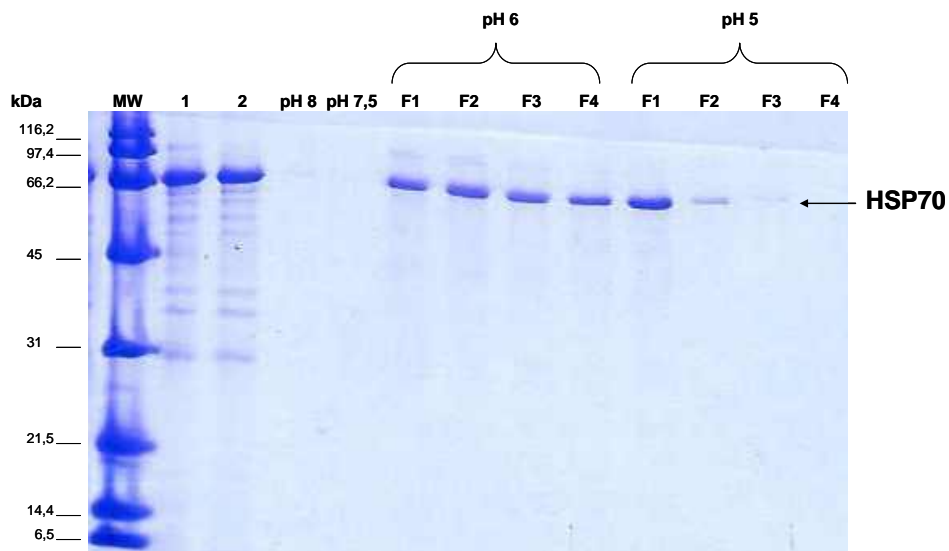


Figura 71. Ensayo de purificación de la proteína HSP70 de *T. rangeli*. Tinción con azul de Coomassie del SDS-PAGE del ensayo de purificación de la proteína HSP70 de *T. rangeli* con un gradiente de pH. Cultivo inducido con 0,02 mM de IPTG (1, 2) y fracciones recogidas de las soluciones a cada uno de los pHs indicados.

Contrario a lo reportado (Espejo et al., 2004; Matambo et al., 2004), en la obtención de la proteína HSP70 de *T. rangeli* no se usaron condiciones denaturantes, al igual que lo reportado para la proteína HSP70 de *T. cruzi* (Marañón et al., 2001); y como se observa en la figura 63 la pureza de la proteína obtenida fue muy buena.

6.6 Ensayos de linfoproliferación

Dada la propiedad que tiene la proteína HSP70 de *T. cruzi* de estimular esplenocitos de ratones vírgenes (Marañón et al., 2000a), se evaluó dicha capacidad para la proteína HSP70 de *T. rangeli*.

Para los ensayos 0,4; 2 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de la proteína HSP70 recombinante de *T. rangeli* y *T. cruzi* fueron usados para la estimulación de esplenocitos de ratones "naive". Un análisis realizado con el estuche comercial "Endotoxin Gel formation Assay Kit, E-TOXATE[®]" (Sigma) mostró que ambas proteínas recombinantes estaban libres de lipopolisacárido bacteriano contaminante o este se encontraba por debajo del límite de detección del método usado de 0,05 a 0,1 unidades de endotoxina por mililitro.

Como se observa en las figuras 72 y 73 a las 24 y 48 h, el índice de estimulación obtenido con la proteína HSP70 de *T. rangeli* fue inferior al observado con la proteína HSP70 de *T. cruzi*. Contrario a lo esperado, a las 72 h de incubación y a pesar de que el índice de estimulación de los esplenocitos disminuye para ambas proteínas, con la proteína HSP70 de *T. rangeli* se observa un efecto de estimulación mayor respecto al observado con la proteína de *T. cruzi* (Figura 74). Adicionalmente, se observó que el índice de estimulación de los esplenocitos fue dosis-dependiente para ambas proteínas, siendo similar para las concentraciones de 2 y 10 $\mu\text{g/ml}$, especialmente en el caso de la proteína HSP70 de *T. rangeli*. Además, el máximo de estimulación, al igual que lo observado para la proteína HSP70 de *T. cruzi* se logra a las 24 h.

Con el propósito de descartar efecto estimulante debido a la presencia de lipopolisacarido, los ensayos se realizaron en presencia de polimixina B la cual anula dicho efecto (Cuellar et al., 2004; Marañon et al., 2000a). En este sentido, en las Figuras 72, 73 y 74 se observa como no hay diferencias importantes en los índices de estimulación obtenidos en presencia o ausencia de polimixina B para la proteína HSP70 de ambos parásitos.

En resumen, para la proteína HSP70 de *T. rangeli* se observó que el índice de estimulación para los esplenocitos de ratones vírgenes es alto, pero de manera significativa inferior al obtenido con la proteína de *T. cruzi* a las 24 y 48 h de incubación. Es importante resaltar que los resultados obtenidos con la proteína HSP70 de *T. cruzi* coinciden con los previamente reportados por Marañon et al., 2000a.

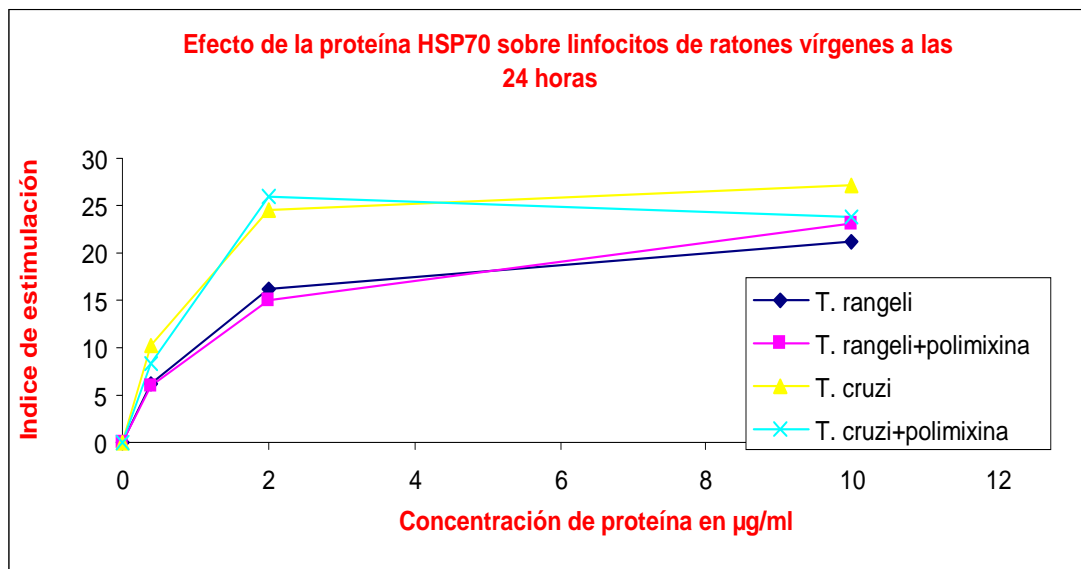


Figura 72. Ensayo de proliferación de los esplenocitos de ratón Balb/c vírgenes incubados con la proteína HSP70 de *T. rangeli* y *T. cruzi* durante 24 horas. El valor del índice de proliferación graficado corresponde a la media del triplicado.

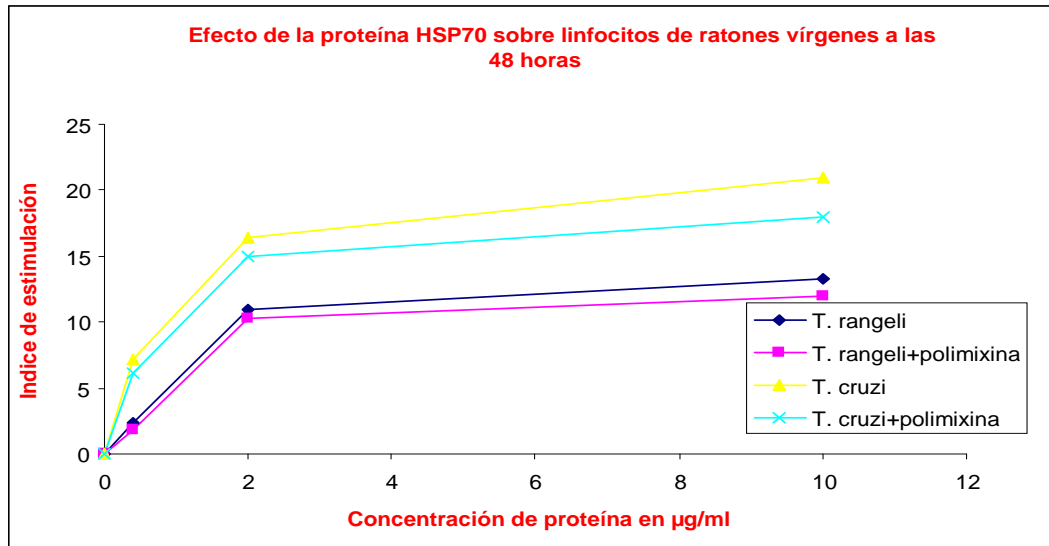


Figura 73. Ensayo de proliferación de los esplenocitos de ratón Balb/c vírgenes incubados con la proteína HSP70 de *T. rangeli* y *T. cruzi* durante 48 horas. El valor del índice de proliferación graficado corresponde a la media del triplicado.

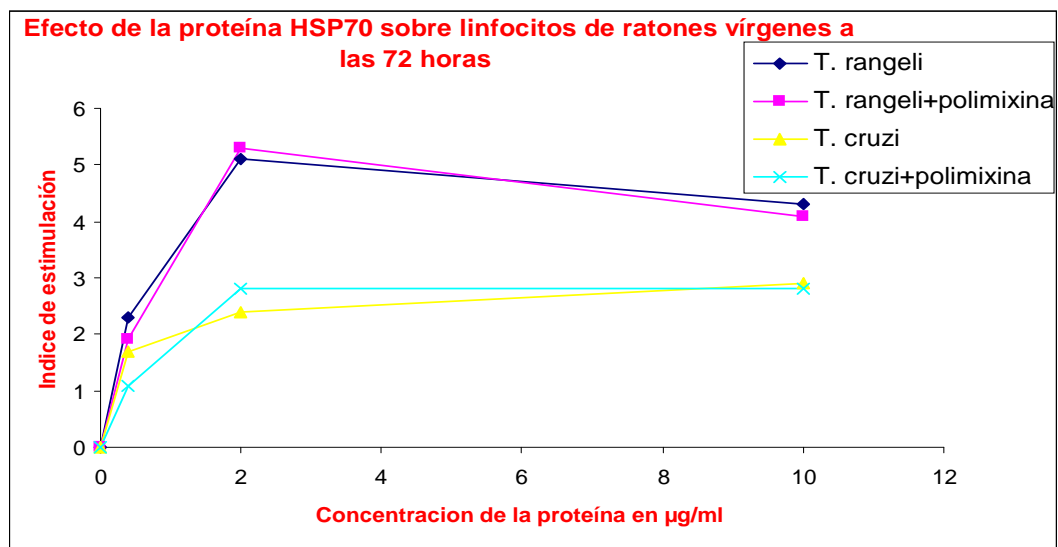


Figura 74. Ensayo de proliferación de los esplenocitos de ratón Balb/c vírgenes incubados con la proteína HSP70 de *T. rangeli* y *T. cruzi* durante 72 horas. El valor del índice de proliferación graficado corresponde a la media del triplicado.

Teniendo en cuenta los anteriores resultados se decidió evaluar el fenotipo de la población que prolifera en respuesta a la proteína HSP70 de *T. rangeli*, mediante marcación con los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD4 para linfocitos T CD4+ (“LT helper”) y anti-CD19 para linfocitos B.

Como se observa en la figura 75, la proteína HSP70 de *T.rangeli* indujo la proliferación de linfocitos T CD3+/CD4+ en una proporción ligeramente mayor (34,28%) que la proteína HSP70 de *T. cruzi* (30,32%). Contrario a lo observado para la población de linfocitos B (CD19+), la cual no proliferó producto de la estimulación con la proteína HSP70 de ambas especies del parásito.

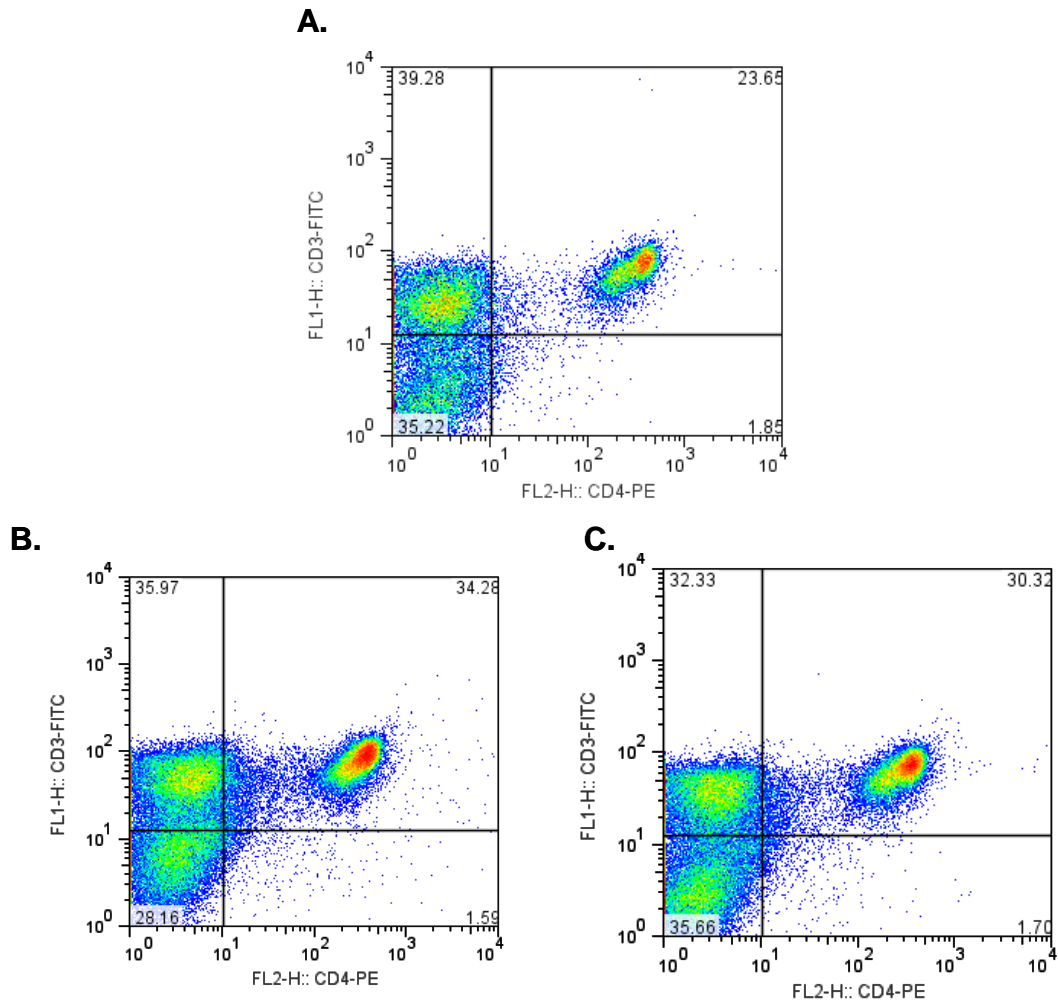


Figura 75. Dispersograma representativo de esplenocitos de ratones Balb/c vírgenes estimulados con la proteína HSP70 de *T. rangeli* y *T. cruzi* (2 μ g/ml) en presencia de polimixina B (5 U/ml) e incubados por un periodo de 48 h. **A:** Control con PBS. **B:** Proteína HSP70 de *T. rangeli* y **C:** Proteína HSP70 de *T. cruzi*. Análisis por citometría de flujo de los marcadores CD3 y CD4.

7. DISCUSIÓN

En la última década el conocimiento genómico de los tripanosomátidos ha tenido gran auge, encontrándose terminados y en curso los proyectos genoma de *T. brucei*, *T. vivax*, *T. cruzi*, *L. major*, *L. infantum* y *L. braziliensis*, entre otros (www.genedb.org). Aunque *T. rangeli* es un tripanosomátido no patógeno para el hospedador vertebrado, su estudio ha tomado gran importancia en los últimos años debida su estrecha relación con *T. cruzi*, en donde ambas especies comparten zonas geográficas, hospederos, reservorios, vectores y han sido reportadas en infecciones mixtas; todo lo cual complica el diagnóstico de la enfermedad de Chagas (Vallejo et al., 2009; Guhl & Vallejo, 2003; Cuba, 1998). Sin embargo, el conocimiento genómico de la especie aún es bastante limitado concentrándose en secuencias repetidas, blancos para el desarrollo de pruebas diagnósticas.

Así mismo, la proximidad filogenética entre ambos parásitos ha sido la base para el desarrollo de estrategias de inmunización con *T. rangeli*. Es así como, se ha visto que la inmunización de ratones y perros con epimastigotes de *T. rangeli* inducen una respuesta protectora frente al reto con cepas virulentas de *T. cruzi* (Basso et al., 2008; 2007; 2004; Paláu et al., 2003), por tanto se hace necesario el conocimiento de las moléculas implicadas en dicha respuesta.

Teniendo en cuenta la importancia de las proteínas de choque térmico en la respuesta inmune frente a patógenos, además de su participación en el funcionamiento normal de las células, en la protección celular frente al daño inducido por estrés y en la infección por organismos tripanosomátidos, en el presente trabajo se estudió la organización genómica y se caracterizó molecularmente el gen que codifica la proteína HSP70 de *T. rangeli* en dos

cepas pertenecientes a cada uno de los grupos reportados del parásito (Vallejo et al., 2003; 2002), la cepa Tre, KP1(-) y H14, KP1(+). Además, se obtuvo la proteína HSP70 recombinante de *T. rangeli*, la cual se utilizó para ensayos inmunológicos iniciales.

7.1 Organización genómica del gen *hsp70* de *T. rangeli*

Dichos genes en *T. rangeli* se encuentran codificados por una unidad de 2.500 pb, la cual se encuentra repetida en tándem cabeza-cola aproximadamente 7 veces en la cepa Tre y 6 veces en la cepa H14, muy similar a lo reportado para estos mismos genes en *T. cruzi* (Requena et al., 1988) y *T. brucei* (Glass et al., 1986), los cuales se encuentran codificados por una unidad de 2,5 kb y 2,4 kb y repetidos con 10 y 6 copias en sus genomas, respectivamente.

Otros genes repetidos han sido igualmente reportados en el genoma de *T. rangeli*, entre ellos varios genes nucleares como los codificantes para la proteína KMP-11 (Diez et al., 2005), la histona H2A (Cuervo et al., 2006; Puerta et al., 2000) y un ARN nucleolar pequeño Cl1 (Nocua et al., 2009; Morales et al., 2002), entre otros. Esta característica es común de varios genes reportados en tripanosomátidos, organismos que presentan uno de los genomas con mayor número de secuencias repetidas, representando aproximadamente el 50 % del genoma en *T. cruzi* (Arner et al., 2007; El sayed et al., 2005b). Aunque la funcionalidad de los genes repetidos arreglados en tándem de los tripanosomátidos aún no es del todo clara, se cree que estas duplicaciones génicas, las cuales son expresadas a través de transcritos policistrónicos, se generan con el propósito de incrementar la dosis génica en un ambiente donde los promotores génicos están ausentes (Jackson, 2007).

Adicionalmente y mediante ensayos de electroforesis en gel de campo pulsado, los genes *hsp70* se localizaron en un único cromosoma de aproximadamente 1.174 kb en la cepa H14, KP1(+) y 1.098 kb en las cepas Tre y C23, KP1(-). Diferencias en la localización cromosómica de otros genes entre los grupos de *T. rangeli* también han sido reportadas para los genes que codifican las proteínas histona H2A (Cuervo et al., 2006) y KMP-11 (Urueña et al., 2004). Toaldo et al., 2001, reportaron que el gen *hsp70* de *T. rangeli* en varias cepas KP1(+) evaluadas se ubica en dos cromosomas, localizados en un rango entre 950 kb y 1.200 kb diferentes para cada cepa. De igual forma, para las cepas KP1(-) evaluadas, todas de origen brasilero, el gen *hsp70* se ubicó en un cromosoma de 1.050 kb en la cepa SC-61 y en dos cromosomas de 1.020 y 1.100 kb aproximadamente, en la cepa SC-58. Vale la pena resaltar que las condiciones de corrido electroforéticas usadas por Toaldo et al., 2001 permitieron una mejor resolución de los cromosomas de tamaño intermedio.

En conjunto los anteriores resultados sugieren que la localización cromosómica del gen *hsp70* no es una característica diferencial entre los grupos KP1(-) y KP1(+) de *T. rangeli*.

A pesar de lo anterior, el análisis del cariotipo de varias cepas colombianas de *T. rangeli* mostró que el número y tamaño de los cromosomas en las cepas KP1(-) y KP1(+) permite diferenciar entre ambos grupos del parásito, encontrándose, bajo las condiciones electroforéticas ensayadas únicamente para las cepas KP1(+) cromosomas superiores a 1.600 kb (Figura 20), similar a lo observado por Toaldo et al., 2001 usando otras condiciones experimentales. Estos resultados señalan el interés en profundizar en estudios del cariotipo de los diferentes grupos de *T. rangeli* y su posible uso

como un potencial marcador diferencial entre los grupos KP1(-) y KP1(+) de este protozoo.

Por tanto y respecto a la organización del locus *hsp70* en *T. rangeli*, se puede decir, que es altamente conservado entre ambos grupos del parásito y no presenta diferencias significativas en cuanto tamaño, número de copias y localización cromosómica entre las cepas KP1(+) y KP1(-) evaluadas. Hallazgos similares a los reportados para otros genes altamente conservados como los codificantes de la proteína histona H2A (Cuervo et al., 2006), demostrando que a pesar de las diferencias moleculares existentes entre las cepas de *T. rangeli*, éstas presentan una organización genómica bastante homogénea para genes conservados en la escala evolutiva.

Así mismo, la organización genómica del gen *hsp70* se encuentra altamente conservada en *T. cruzi* y *T. brucei*. Datos de secuenciación del genoma de los tripanosomátidos revelaron la alta sintenia existente entre el genoma de *T. brucei* y *T. cruzi* (El sayed et al., 2005a), específicamente en los cromosomas 11 de *T. brucei* y el contig 8621 de *T. cruzi* que portan los genes *hsp70* (Figura 76).

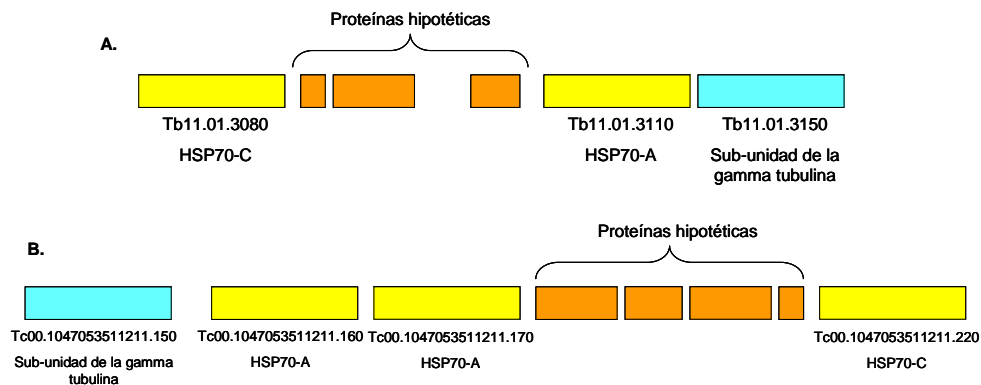


Figura 76. Organización génica de los genes *hsp70* de *T. brucei* (A) y *T. cruzi* (B) reportada en la base de datos Genedb (www.genedb.org).

Al igual que lo que sucede entre tripanosomas, una alta conservación en la organización del locus *hsp70* entre las especies del género *Leishmania* ha sido reportada (Folgueira et al., 2006). En leishmanias estos genes se encuentran repetidos en tándem, en una organización cabeza-cola y codificados por una unidad de 3,8 kb en las especies del viejo mundo y de 3,4 kb en las especies del nuevo mundo. De manera interesante en *L. infantum*, *L. major*, *L. tropica*, *L. mexicana* y *L. amazonensis* todas las copias génicas que conforman el tándem dentro de una misma especie han sido reportadas ser altamente conservadas para las regiones codificante y 5'UTR. Por su parte, la región 3'UTR de todas las copias también se encuentra altamente conservada, excepto para la última copia del tándem, la cual presenta una región altamente divergente, denominada 3'UTR-II (Folgueira et al., 2006). En general entre tripanosomas y leishmanias la organización genómica del gen *hsp70* también se encuentra conservada, divergiendo en el tamaño de la unidad génica y en la presencia de regiones 3'UTR divergentes. Hecho que sugiere la importancia de estos genes en el funcionamiento celular y en la supervivencia del parásito, teniendo en cuenta que estos organismos digenéticos, al cambiar de hospedero (Invertebrado a vertebrado) se enfrentan a condiciones celulares desfavorables y estresantes para ellos.

En conclusión la organización genómica del gen *hsp70* de *T. rangeli* no presenta diferencias significativas entre las cepas KP1(-) y KP1(+) analizadas y es, además altamente conservada entre tripanosomátidos.

7.2 Genes *hsp70* y diferencia entre cepas KP1(-) y KP1(+) de *T. rangeli*

A pesar del alto grado de conservación de los genes *hsp70* entre las especies del género *Leishmania*, un polimorfismo de restricción para la enzima *BamHI* en los genes *hsp70*, visualizado mediante ensayos de “Southern blot” permitió diferenciar entre las especies de leishmania del viejo y del nuevo mundo (Folgueira et al., 2006). De igual forma, y mediante estudios de “Southern blot” para las cepas Tre y H14 de *T. rangeli* se observó polimorfismo de restricción en el gen *hsp70*. Es así como, la enzima de restricción *SphI* corta dentro de los genes *hsp70* de la cepa Tre y no en los de la cepa H14.

Un análisis “*in silico*” del patrón de restricción realizado a las secuencias de los genes *hsp70* de varias cepas de *T. cruzi*, mostró que el sitio de corte para la enzima *SphI* se encuentra presente en los genes *hsp70* de todas las cepas hasta ahora reportadas y que la enzima, igualmente corta en la región 3’ del gen. Mediante PCR-RFLP de las cepas M. Rangel (Tcruzi I) y Y (Tcruzi II) se confirmó la presencia del sitio de corte para esta enzima en la región 3’ del gen *hsp70*, el cual estuvo presente independientemente del grupo de *T. cruzi* evaluado. Estos resultados indican que el polimorfismo revelado para la endonucleasa *SphI* es exclusivo de la especie y no se extiende a otros tripanosomas cercanos como *T. cruzi*. Así mismo, el análisis “*in silico*” realizado a los genes de *T. brucei* y *T. vivax* mostró que dicha enzima no posee diana de restricción en los genes *hsp70* de estas especies.

Vallejo et al., 2003; 2002 dividieron a *T. rangeli* en dos grupos epidemiológicamente importantes basados en el perfil de amplificación del gen mini-exón y en la ausencia/presencia del minicírculo KP1. El grupo constituido por las cepas KP1(-) y el constituido por las cepas KP1(+),

asociados a los grupos Pallescens y Prolixus respectivamente, del vector *Rhodnius* (Vallejo et al., 2009; Vallejo et al., 2007; Urrea et al., 2005; Vallejo et al., 2004). Varios marcadores moleculares adicionales han reforzado la hipótesis de los dos linajes filogenéticos del parásito (Puerta et al., 2009; Márquez et al., 2007;). Sin embargo, estudios realizados usando ITS ribosomales, SSU rRNA y polimorfismos en la secuencia del gen mini-exón amplían la variabilidad de los aislados de *T. rangeli* a al menos 4 linajes filogenéticos asociados con los diferentes grupos del vector *Rhodnius* y a su origen geográfico (Maia da Silva et al., 2007; 2004; Da Silva et al., 2004). Basados en lo anterior y teniendo en cuenta el polimorfismo encontrado para la enzima de restricción *SphI* entre las cepas Tre y H14, se exploró dicho polimorfismo como un marcador diferencial entre los grupos propuestos del parásito. Para esto se evaluaron 25 cepas procedentes de diversos orígenes geográficos y aisladas de diferentes hospederos, encontrando que todas las cepas KP1(-) evaluadas presentan diana de restricción para la enzima *SphI*, mientras que las cepas KP1(+) no, constituyéndose el polimorfismo de restricción *SphI* de los genes *hsp70* de *T. rangeli* en un marcador diferencial de las dos poblaciones inicialmente propuestas del parásito.

En dicho análisis, el grupo KP1(-) estuvo constituido por cepas procedentes de Colombia y Brasil, dentro de las cuales se encuentra la cepa SC-58 previamente clasificada como linaje D (Maia da Silva et al., 2007; 2004; Da Silva et al., 2004). Y el grupo KP1(+) constituido por las cepas procedentes de El Salvador, Honduras, Colombia, Venezuela y Brasil, dentro del cual se ubican las cepas previamente clasificadas como linaje A (H8GS, Choachi, Palma 2 y Macias, grupo Prolixus) (Maia da Silva et al., 2007; 2004; Da Silva et al., 2004). Adicionalmente, dentro de este grupo se ubicó la cepa B450, aislada de glándulas salivales del vector *R. pictipes* en selvas del amazonas del estado de Pará, al norte de Brasil (grupo Brethesi de Brasil), asociado al

linaje B (Maia da Silva et al., 2007; 2004; Da Silva et al., 2004) (Tabla 7). Resultado similar a lo reportado por Puerta et al., 2009 usando los genes 24S α del ARN ribosomal y mini-exón. Estos resultados en conjunto sugieren que la clasificación dependiente de la presencia/ausencia del minicírculo es una supra-agrupación, en donde las cepas KP1(-) incluirían los linajes C y D descritos por Maia da Silva et al., 2004; Da Silva et al., 2004 y las cepas KP1(+) los linajes A y B. Por tanto, las cepas KP1(+) podrían estar asociadas también a los insectos del género *Rhodnius* de la línea evolutiva Brethesi. Resultado que estaría de acuerdo con el origen radial de las líneas evolutivas del vector *Rhodnius* en la selva Orinoco-amazónica, en tres líneas evolutivas (grupo Brethesi, grupo Prolixus y grupo Pallescens) (Dujardin et al., 1999), en donde la especie ancestral portaría el minicírculo KP1, el cual se perdió en las cepas de *T. rangeli* asociadas a la línea evolutiva Pallescens durante el proceso de especiación, contrario a lo ocurrido con las cepas de *T. rangeli* asociadas a las líneas evolutivas Brethesi y Prolixus. Es importante mencionar la ausencia del minicírculo KP1 en las cepas aisladas de Santa Catarina al sur de Brasil, las cuales al estar circulando en un ambiente confinado a la isla, podrían haber perdido el minicírculo KP1 en un evento independiente no relacionado al sucedido con las cepas de la línea Pallescens. Por tanto, estas cepas de *T. rangeli* aisladas geográficamente, co-evolucionaron con especies simpátricas presentes en la isla, evidenciado por el hecho de que la cepa SC-58 (KP1(-)) aislada de Santa Catarina es capaz de invadir glándulas salivales del vector *Rhodnius domesticus* (línea Prolixus) (Machado et al., 2001).

Los hallazgos reportados para el gen *hsp70* apoyan también la hipótesis de evolución clonal o especiación de las cepas de *T. rangeli* en los dos grupos filogenéticos bien constituidos, KP1(-) y KP1(+) (Vallejo et al., 2003), los

cuales se encuentran estrechamente relacionados y en un largo proceso de co-evolución con las líneas evolutivas del vector *Rhodnius* (*Prolixus*, *Pallescens* y *Brethesi*) (Vallejo et al., 2009; Maia da Silva et al., 2007; Urrea et al., 2005), consolidado con la reciente evidencia del descubrimiento de un factor tripanolítico presente en la hemolinfa de *R. prolixus*, el cual actúa contra las cepas KP1(-) y determina la actividad vectorial del insecto (Pulido et al., 2008). Es de anotar que Vallejo et al., 2007 reportaron que la distancia genética entre ambos grupos de *T. rangeli* es similar a la existente entre especies diferentes.

Por otra parte, la asociación encontrada de los grupos reportados del parásito con los diferentes marcadores moleculares evaluados (ausencia/presencia del minicírculo KP1, gen mini-exón, gen del ARN ribosomal 24S α y polimorfismo *SphI* del gen *hsp70*, entre otros) confirman la ausencia de flujo génico entre los grupos de *T. rangeli*, así como un fuerte desequilibrio de ligamiento entre ellos (Maia da Silva et al., 2007).

Dado el hecho de que cada especie de *Rhodnius* ejerce una selección sobre las cepas de *T. rangeli* que transmite, generando sub-poblaciones del parásito con claras diferencias genotípicas al interior de los dos grandes grupos de *T. rangeli* (Vallejo et al., 2009; Márquez et al., 2007; Vallejo et al., 2007), se hace necesario evaluar un mayor número de cepas pertenecientes a ambos grupos del parásito procedentes de diferentes vectores y orígenes geográficos, así como también buscar marcadores adicionales que permitan una mayor resolución al interior de los grupos establecidos del parásito.

En conclusión, el polimorfismo de restricción en la región carboxilo-terminal del gen *hsp70* entre las cepas KP1(-) y KP1(+) de *T. rangeli* permitió

diferenciar éstas sub-poblaciones del parásito, constituyendo así el primer marcador diferencial proteico de estas poblaciones.

7.3 Análisis de la variabilidad de la región codificante de los genes *hsp70* de *T. rangeli*

Adicional a los polimorfismos observados entre los grupos de *T. rangeli* en el gen *hsp70*, en cuanto al tamaño de la región codificante y patrón de restricción, se observaron igualmente polimorfismos de restricción en la región codificante entre las copias de una misma cepa de este parásito. Es así como para la cepa Tre se encontraron 3 copias diferentes siendo la copia 1 la más divergente de todas. Para la cepa H14 se encontraron 2 copias que aún cuando son diferentes mostraron mayor identidad entre ellas, respecto a las copias de la cepa Tre. Variabilidad entre los genes *hsp70* de una misma cepa había sido reportada en *T. cruzi*, cepa Maracay para la enzima *PvuII* (Requena et al., 1988). Es de resaltar que estos polimorfismos en la mayoría de los casos no generan cambios en la secuencia de aminoácidos, debido a la degeneración del código genético.

Diferencias entre las copias de un mismo gen en *T. rangeli* han sido reportadas también para los genes que codifican la proteína KMP-11 (Diez et al., 2005), en los cuales de manera similar a lo ocurrido en la cepa Tre, se encontró una copia del gen *kmp-11* altamente divergente de las otras copias génicas (Diez et al., 2005). A pesar de lo anterior, la copia 1 del gen *hsp70* en la cepa Tre conserva el patrón de restricción *SphI* del grupo KP1(-) de *T. rangeli*.

En conclusión, a pesar del alto grado de conservación observado en la organización genómica de los genes *hsp70* entre las cepas Tre y H14 de *T.*

rangeli y aún entre los tripanosomas, estos genes presentan un grado de variabilidad a nivel de la secuencia de nucleótidos, entre cepas de una misma especie y aún entre copias de una misma cepa, como lo evidencian los análisis de restricción. Divergencias genotípicas también observadas en los genes altamente conservados, codificantes para la proteína histona H2A (Suárez et al., 2007; Cuervo et al., 2006) y la KMP-11 (Diez et al., 2005). Sin embargo, gran parte de dicha variabilidad en la secuencia de nucleótidos, tanto en la región amino-terminal (dominio ATPasa) como en la región carboxilo-terminal (dominio chaperona) de la proteína HSP70 no se traduce a la secuencia de aminoácidos, confirmando el hecho de que es una proteína altamente conservada y se considera constituye una de las familias de genes más conservados a lo largo de la escala evolutiva.

7.4 Análisis de la región intergénica de los genes *hsp70* de *T. rangeli*

En tripanosomátidos, dadas las características de maduración del transcrito policistrónico y de regulación post-transcripcional de la expresión génica, las regiones intergénicas constituyen un blanco interesante de estudio. El análisis de la región intergénica secuenciada para los genes *hsp70* de las cepas Tre y H14 mostró que dicha región se encuentra bastante conservada entre las copias de la cepa H14, mientras que en la cepa Tre presenta un mayor grado de variabilidad observándose varias inserciones/delecciones entre las copias, entre ellas la inserción/delección del trinucleótido TAA (Figuras 53 y 54). Un polimorfismo similar, la inserción de 34 pb de una repetición TAA, fue observado entre las regiones intergénicas de los genes *hsp70* organizados en tándem de *T. brucei* (Glass et al., 1986); así mismo, este polimorfismo había sido reportado para la región intergénica de los genes *hsp70*, entre las cepas Perú y Maracay de *T. cruzi* (Engman et al., 1989). En *T. cruzi*, esta repetición TAA, también ha sido reportada en la

región intergénica de los genes *hsp60* y *hsp83* (Lee, 1998), sin embargo, si esta repetición tiene alguna función dentro de las regiones intergénicas de los genes *hsp*, aún no ha sido reportado.

Similar a lo encontrado para la región intergénica de la cepa H14; en *T. brucei*, se ha reportado que a pesar de la inserción del trinucleótido TAA en una de sus regiones intergénicas, estas se consideran altamente conservadas entre ellas (Glass et al., 1986). Así mismo, en *L. infantum* la región intergénica, entre las copias del gen *hsp70* difieren sólo a nivel de la región 3'UTR del gen 6 (3'UTR-II), el último del tándem (Folgueira et al., 2005; Quijada et al., 1997).

En síntesis, las regiones intergenicas de los genes *hsp70* de *T. rangeli* analizadas, sugieren que al igual que los otros tripanosomas, este parásito conserva un sólo tipo de región tanto 5' como 3' UTR, indicativo de la presencia de un mecanismo de regulación génica común para todas las copias de la agrupación.

Por otra parte, y al hacer un análisis de la secuencia encontrada entre las copias del gen *hsp70* de *T. cruzi* (Tc00.1047053511211.160 y Tc00.1047053511211.170), reportadas en la base de datos de su genoma (www.genedb.org), se encuentra que la región intergénica de dichos genes tiene un tamaño de 412 pb. Así mismo, la región intergénica en *T. brucei* posee un tamaño de 476 pb (Hausler & Clayton, 1996; Lee & Van Der Ploeg, 1990), muy similar a lo encontrado para los genes de *T. rangeli*. Pero contrario, a lo reportado para estos genes en varias especies de *Leishmania*, en las cuales la región intergénica posee un tamaño mayor, siendo de 1.415 pb en *L. major* (Dresel & Clos, 1997), de 1.653 pb en *L. infantum* (Quijada et al., 1997) y 1.367 pb en *L. braziliensis* (tamaño deducido del análisis de su

genoma, www.genedb.org). Dicha diferencia en los tamaños de la región intergénica de los genes de tripanosomas y leishmanias ha sido igualmente observada para los genes KMP-11 (Diez et al., 2005), sugestivo de diferentes mecanismos de regulación de la expresión de los genes *hsp70* entre estos tripanosomátidos.

De acuerdo con el tamaño de las regiones codificantes (aproximadamente 2.000 pb) e intergénica (aproximadamente 480 pb) y mediante ensayos de “Northern blot”, en este estudio se observó que los genes *hsp70* en ambas cepas del parásito *T. rangeli* originan un único transcrito de 2.300 nucleótidos, similar a lo reportado para estos genes en *T. cruzi* y *T. brucei* (Klein et al., 1995).

Vale la pena resaltar que en la región intergénica de los genes *hsp70* de *T. rangeli* fueron identificadas, de manera hipotética, todas las secuencias necesarias para el correcto procesamiento post-transcripcional del transcrito *hsp70*, consistentes en 7 sitios aceptores del “splice-leader”, el tracto de polipirimidinas que los precede y un sitio señal de poli-adenilación (Figura 56), resultados que concuerdan con los hallazgos antes mencionados.

Por su parte, las regiones 5´UTR y 3´UTR hipotéticas de los genes *hsp70* de *T. rangeli* mostraron un tamaño similar al reportado para estas mismas regiones en *T. brucei* (Hausler & Clayton, 1996; Lee & Van Der Ploeg, 1990) y *T. cruzi* (X07083), pero divergentes de los reportados en varias especies de *Leishmania*, en donde han sido reportadas regiones 5´UTR más grandes y como se mencionó anteriormente dos tipos de regiones 3´UTR, diferencialmente reguladas bajo condiciones de choque térmico (Quijada et al., 1997).

Es interesante la diferencia observada respecto al tamaño de la región 3'UTR, 5'UTR y región intergénica entre los genes *hsp70* repetidos en tándem de tripanosomas y leishmanias, dado el papel que cumplen dichas regiones en la regulación de la expresión a nivel post-transcripcional de los genes *hsp70*. En *Leishmania* se ha postulado que proteínas muy conservadas han adquirido diversos perfiles de expresión gracias a la reestructuración de las regiones flanqueantes de los genes, reforzando la idea de la importancia de la región 3'UTR para la regulación de la expresión de cualquier gen a través de mecanismos post-transcripcionales (Jackson et al., 2006; Bartholomeu et al., 2002). En *L. infantum*, *L. major*, *L. tropica*, *L. mexicana* y *L. amazonensis* ha sido reportada la presencia de una región 3'UTR-II, presente en el último gen del tándem del locus *hsp70*, divergente en secuencia respecto a la región 3'UTR-I de los otros genes. Esta región 3'UTR-II, se encuentra involucrada en la acumulación del ARNm *hsp70* bajo condiciones normales y de estrés térmico y en la traducción del mismo bajo condiciones de estrés térmico (Folgueira et al., 2006; 2005). Mientras que en tripanosomas, hasta ahora, una región 3'UTR divergente entre las copias del locus *hsp70* no ha sido reportada; a pesar que en *T. brucei* se sabe que la región 3'UTR de los genes *hsp70* se encuentra asociada con un aumento en la estabilidad del ARNm (Lee, 1998).

Es importante anotar que la expresión diferencial de los genes *hsp70* constitutivos e inducibles en tripanosomas, parece estar dada por la transcripción de genes diferentes. En *T. brucei* se ha visto que el ARNm del gen *hsp70-1* (divergente en su secuencia de aminoácidos y región 5'UTR respecto a los genes arreglados en tándem), el cual es constitutivamente expresado, no se afecta por estrés térmico, mientras que el ARNm de los genes *hsp70* 2 a 6, el cual además de ser más abundante y estable a condiciones normales, es sensible a la temperatura (Lee, 1995; Lee & Van

Der Ploeg, 1990; Lee et al., 1990). De igual forma, en *T. cruzi*, se han observado diferentes isoformas de la proteína HSP70, las cuales son diferencialmente expresadas bajo condiciones normales y de estrés térmico, dichas isoformas han sido asociadas con la transcripción de genes *hsp70* similares (Giambiagi et al., 1996; Requena et al., 1992). Evidencia de isoformas constitutivas e inducibles de la proteína HSP70 codificadas por genes diferentes pero homólogos han sido reportadas en *Drosophila* y *S. cerevisiae* (Lindquist & Craig, 1988).

Por otra parte, en eucariotes superiores se ha visto que la inducción de la expresión de los genes *hsp70* bajo condiciones de estrés celular, es regulada a nivel transcripcional y resulta de la unión de factores de transcripción asociados a choque térmico (HSF) a secuencias específicas dentro de la región promotora de dichos genes (Lindquist & Crag, 1988). En *T. brucei*, a pesar de que el locus *hsp70* está permanente activo y que el choque térmico no estimula la transcripción de dichos genes en las formas procíclicas del parásito, y que por tanto la expresión de dicho gen bajo condiciones de estrés debe ser regulada a nivel post-transcripcional (Lee, 1998; Lee, 1995); se ha visto la presencia de dos secuencias relacionadas con las secuencias de unión de HSF de eucariotes superiores ubicadas corriente arriba del sitio aceptor del “trans-splicing” de los genes *hsp70* (Glass et al., 1986). Igualmente, dos secuencias probables de unión a HSF también han sido reportadas en los genes *hsp70* de *L. major* (Lee et al., 1988) y una en la región intergénica del gen *hsp70* de *T. cruzi* (X07083). Sin embargo, aún no existe evidencia de la posible función de estas regiones.

Al realizar una búsqueda de dichas secuencias en la región espaciadora de la región intergénica (ubicada entre las regiones 3'UTR y 5'UTR del gen) de los genes *hsp70* de *T. rangeli*, se observó la presencia de una región, que

presenta un alto grado de conservación respecto a la secuencia consenso de unión de los HSF (CNNGAANNTTCNNG), requerida para la activación transcripcional de los genes *hsp70* de *Drosophila* (Topol et al., 1985). Al igual que en *T. brucei* (Glass et al., 1986), la secuencia de unión de *T. rangeli* presenta 5 nucleótidos conservados respecto a los 8 nucleótidos conservados de la secuencia consenso, además es altamente conservada entre las cepas Tre y H14 y es capaz de formar la estructura palíndromica requerida (Figura 77). Todos estos hallazgos plantean preguntas interesantes sobre los mecanismos de regulación involucrados en la expresión de los genes *hsp70* de tripanosomátidos, dado que ha sido reportado que la regulación de la expresión de dichos genes ocurre a nivel post-transcripcional, por lo cual se hace interesante la búsqueda de factores que puedan estar asociados a la expresión de los genes *hsp70*, tanto a nivel del ADN como de las regiones 5'UTR y 3'UTR, además, explorar la pérdida o ganancia de mecanismos de regulación y expresión génica en tripanosomátidos que sean potencialmente diferentes a los de eucariotas superiores.

Finalmente, se puede decir que la región intergénica de los genes *hsp70* de *T. rangeli* presentó todas las secuencias necesarias para su correcto procesamiento. Además, mostró ser bastante conservada en cuanto a su tamaño entre tripanosomas pero bastante divergente respecto a las reportadas en varias especies de leishmanias, lo cual podría ser un indicativo de procesos diferentes en la regulación de la expresión entre estos tripanosomátidos.

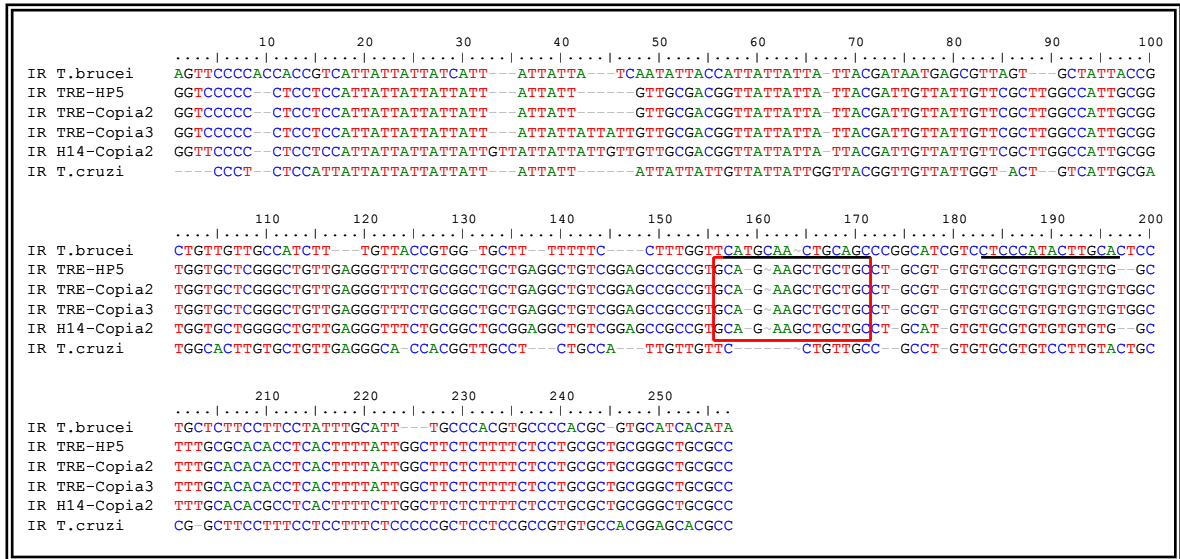


Figura 77. Alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos de la región intergénica de los genes *hsp70*. Secuencia de nucleótidos de las regiones espaciadoras de la región intergénica, (sin incluir región 3'UTR y 5'UTR) de los genes *hsp70* de *T. rangeli*, *T. cruzi* y *T. brucei*. Los guiones significan inserciones/delecciones y los números indican la posición de los nucleótidos en la secuencia. Subrayado y en negro se indica los posibles sitios de unión de HSF identificados en el gen *hsp70* de *T. brucei* (Glass et al., 1986) y un cuadro rojo indica los hallados en la secuencia de *T. rangeli*.

7.5 Proteína HSP70 de *T. rangeli*

Al realizar el análisis de la secuencia de aminoácidos predicha de la proteína HSP70 para todas las copias génicas de la cepa Tre y H14, se encontró que algunos de los polimorfismos en la secuencia de nucleótidos del gen, tanto en su patrón de restricción como en el tamaño de la región codificante, se traducen a la secuencia de aminoácidos, encontrándose la principal diferencia a nivel del extremo carboxilo-terminal de la proteína HSP70. Una repetición MPGG, la cual varía en número entre las copias génicas de una misma cepa, encontrándose 14, 6 y 8 repeticiones MPGG en las copias 1, 2 y 3 de la cepa Tre, respectivamente y 8 y 7 repeticiones en las copias 1 y 2 de la cepa H14 (Tabla 4). Dicha diferencia en el número de repeticiones MPGG en la copia 1 de la cepa Tre respecto al resto de copias génicas del

gen *hsp70* de Tre y H14 es la responsable de la alta divergencia encontrada para esta copia en particular.

Esta repetición MPGG en el dominio carboxilo terminal de la proteína HSP70 también ha sido reportada en la proteína PfHsp70-I, la principal chaperona citosólica del estadio eritrocítico de *Plasmodium falciparum* (Acharya et al., 2007; Matambo et al., 2004), la cual se ha visto es un epítipo timo independiente en la proteína HSP70 del parásito (Kumar & Zheng, 1998) y es reconocida por sueros de pacientes infectados (Krautz et al., 1998). Así mismo, esta repetición ha sido reportada en la HSP70 de varios nematodos, entre ellos, *Wuchereria bancrofti* (Ravi et al., 2004), *Brugia malayi* (Rothstein & Rajan, 1991), *Schistosoma japonicum* y *Schistosoma mansoni* (Hedstrom et al., 1988), donde se ha visto es igualmente antigénica. Por otra parte, un dominio similar GGXP (X, cualquier aminoácido alifático) ha sido reportado en la isoforma constitutiva Hsc70 a través de los vertebrados (Wu et al., 2001). Sin embargo, la importancia de estos motivos en la proteína HSP70 aún no es clara (Acharya et al., 2007). Adicionalmente, se encontró que la repetición es exclusiva de la familia de genes parálogos HSP70-A (Folgueira & Requena, 2007; Simpson et al., 2004), la cual se extiende a la familia de proteínas HSP70 de la familia *Bodonidae*.

Por otra parte, la proteína HSP70 de *T. rangeli* presentó todos los motivos característicos de las proteínas HSP70, un dominio de la superfamilia de las ATPasas, el cual mostró ser altamente conservado con sus ortólogos de otros tripanosomas (95,9 %) y un dominio de unión a péptidos menos conservado (91,5 %). Como se esperaba, la mayor identidad se presentó en su extremo amino terminal, dada la alta conservación de esta región por su función ATPasa (Fink, 1999).

Así mismo, el motivo EEVD en la región carboxilo-terminal, el cual es altamente conservado en las HSP70 y HSP90 citosólicas de los eucariotas fue identificado en la proteína HSP70 de *T. rangeli*. Se sabe que la interacción HSP70/90 es requerida para la correcta regulación del plegamiento y conformación de una variedad de proteínas involucradas en los procesos de transducción de señal y regulación del ciclo celular (Young et al., 2001). Para lograr el correcto plegamiento el complejo HSP70/90 interactúa con una variedad de co-factores, los cuales contienen una repetición denominada TRP (tetratricopéptido) que interactúa con el complejo HSP70/90 a través del motivo EEVD (Brinker et al., 2002; Wu et al., 2001).

Por otra parte, el análisis de las características físico-químicas de las proteínas HSP70 de *T. rangeli* mostró que cada una de las copias del gen codifica una proteína con peso molecular (entre 72,2 y 74,2 kDa) y punto isoeléctrico (entre 5,32 y 5,48) diferente. La existencia de isoformas de la proteína HSP70 había sido previamente reportada en epimastigotes de la cepa CL y Maracay de *T. cruzi*, en la cual, mediante estudios de electroforesis en dos dimensiones se encontraron 8 y 9 isoformas de la proteína HSP70, respectivamente, las cuales fueron diferencialmente reguladas luego de choque térmico (Giambiagi et al., 1996; Requena et al., 1992). En consecuencia es posible que en *T. cruzi* la existencia de diferentes isoformas de la proteína HSP70 se deba a la transcripción de genes *hsp70* polimórficos (Giambiagi et al., 1996).

En conclusión, la proteína HSP70 de *T. rangeli* presenta todos los motivos característicos de esta familia de proteínas y se encontró es altamente conservada entre los grupos KP1(-) y KP1(+) del parásito, a pesar de estar codificada por varias unidades génicas, las cuales presentan polimorfismos

en el tamaño de la región codificante y patrón de restricción entre cepas y aún entre copias de una misma cepa.

7.6 Relaciones filogenéticas entre tripanosomátidos mediante el uso de la proteína HSP70

Análisis filogenéticos realizados con las secuencias de la proteína HSP70 de *T. rangeli* y todas las reportadas, hasta hoy en la base de datos de GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) y GeneDB (www.genedb.org) soportaron los 5 grupos de proteínas HSP70 inicialmente propuestos (Folgueira & Requena, 2007; Simpson et al., 2004) y ubicaron las proteínas HSP70 de *T. rangeli* en el grupo de proteínas HSP70-A, las cuales son de localización citoplasmática (Figura 60). Es importante anotar que al aumentar el número de secuencias incluidas en el análisis se evidenció que el grupo de genes HSP70-A constituye un grupo hermano del grupo HSP70-B, a diferencia de lo reportado por Simpson et al., 2004. Además, se sugiere que el evento de duplicación génica HSP70-A/B ocurrió antes de la divergencia entre los euglenozoa.

Por otra parte, es interesante que al interior de cada uno de los grupos de proteínas HSP70, se observó una clara diferencia entre los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania*. Un análisis detallado del grupo de proteínas HSP70-A de leishmanias mostró que dichas secuencias agrupan en dos clados diferentes las especies del sub-género *Viannia* y del sub-género *Leishmania*, además de diferenciar entre especies y aún entre cepas de una misma especie (Figura 67). Para los tripanosomas dicho grupo de proteínas igualmente permitió diferenciar entre tripanosomas americanos y tripanosomas africanos. Es de resaltar que *T. rangeli* en todos los análisis se ubica en el grupo de los tripanosomas americanos, más cercano a *T. cruzi*

que a *T. brucei*. Adicionalmente, se observa una clara diferencia entre tripanosomátidos y bodoninos. Es importante el hecho de que al interior de los grupos de proteínas HSP70 se observan posibles procesos de duplicación génica, indicativos de que el grupo de genes *hsp70* de tripanosomátidos, al igual que lo reportado para esta familia en humanos (Brocchieri et al., 2008), está caracterizado por una marcada diversidad evolutiva producto de múltiples eventos de duplicación génica. Finalmente, el grupo de proteínas HSP70 evidenció el carácter monofilético de tripanosomas y leishmanias, además del carácter monofilético de los tripanosomátidos.

Análisis filogenéticos han identificado 4 grupos monofiléticos de proteínas HSP70 en eucariotas, cada uno con una localización intracelular común (Gupta et al., 1994). En eucariotas superiores, el grupo de proteínas citoplasmáticas se encuentra constituido por múltiples miembros, cada uno con una función celular especializada, el constituido por las proteínas HSP70 de expresión constitutiva y el constituido por las formas inducibles, los cuales presentan alta identidad en su secuencia de aminoácidos (Dworniczak & Mirault, 1987). Teniendo en cuenta que en tripanosomas la expresión diferencial de los genes *hsp70* constitutivos e inducibles parece estar dada por la transcripción de genes diferentes (Giambiagi et al., 1996; Lee, 1995; Requena et al., 1992) y que se han identificado 3 grupos de proteínas HSP70 citoplasmáticas (HSP70-A, B y C) (Simpson et al., 2004), se revisó en la literatura sí los grupos de proteínas HSP70 de tripanosomas se encuentran asociados con proteínas diferencialmente expresadas bajo condiciones normales y de estrés térmico. En *T. brucei* el gen HSP70-1 (Tb11.01.3080), el cual se encuentra retirado del cluster HSP70 por aproximadamente 6 kb y que ha sido reportado ser constitutivamente expresado y que no se afecta por estrés térmico (Lee, 1995; Lee & Van Der Ploeg, 1990; Lee et al., 1990),

pertenece al grupo de proteínas HSP70-C, mientras que el gen HSP70-4 (Tb11.01.3110), el cual pertenece a el grupo de genes *hsp70* arreglados en tándem y sensible a la temperatura (Lee, 1995; Lee & Van Der Ploeg, 1990; Lee et al., 1990), pertenece al grupo de proteínas HSP70-A. De manera interesante el análisis de la organización de dichos genes en el genoma de *T. cruzi* (www.genedb.org) mostró que de las 3 copias del gen *hsp70* localizadas en el mismo contig, dos pertenecen a la familia de proteínas HSP70-A (Tc00.1047053511211.170 y Tc00.1047053511211.160) y se encuentran unidas, una detrás de otra, mientras que la tercera copia perteneciente a la familia HSP70-C (Tc00.1047053511211.220), se encuentra alejada por aproximadamente 10.000 pb (Figura 76). Adicionalmente, un análisis comparativo entre las regiones 5'UTR y 3'UTR de los genes codificantes de las proteínas de la familia HSP70-A de *T. cruzi* (Tc00.1047053511211.170 y Tc00.1047053511211.160) y *T. brucei* (Tb11.01.3110) respecto a éstas mismas regiones de los genes codificantes de las proteínas de la familia HSP70-C de *T. cruzi* (Tc00.1047053511211.220) y *T. brucei* (Tb11.01.3080) mostraron una alta divergencia entre sus secuencias. Con lo anterior, sumado a la importancia que tienen las proteínas HSP70 para los organismos digenéticos en la adaptación del parásito al nuevo ambiente (Paba et al., 2004; Bente et al., 2003; Maresca & Kobayashi, 1994; Shapira et al., 1988) y al poco conocimiento existente de los mecanismos involucrados en la regulación de la expresión de los genes *hsp70* bajo condiciones normales y de choque térmico en tripanosomas, vale la pena ahondar en estudios que lleven a dilucidar el papel de las regiones UTR en la expresión diferencial en tripanosomas, igual a lo reportado para otros eucariotas como *Drosophila* y *S. cerevisiae* (Lindquist & Craig, 1988).

En síntesis, en tripanosomas, al igual que lo ocurrido en eucariotas superiores el grupo de proteínas citoplasmáticas se encuentra constituido por múltiples miembros, cada uno con una función celular especializada. Las proteínas HSP70-C parecen constituir el grupo de proteínas de expresión constitutiva, mientras que las proteínas HSP70-A constituirían el grupo de proteínas sensibles a temperatura, continuando la función del grupo de proteínas HSP70-B aún sin dilucidar.

Por otra parte, la posición taxonómica de *T. rangeli* y su relación evolutiva se mantiene controversial. *T. rangeli* fue ubicado dentro del sub-género *Herpetosoma*, con los tripanosomas pertenecientes a la sección Estercoraria, debido a la similitud de sus formas sanguíneas con las de otros miembros del grupo (Hoare, 1972); pero *T. rangeli* a diferencia de los miembros de esta sección, entre los cuales se encuentra *T. cruzi*, se transmite principalmente mediante la picadura del vector, como se observa en las especies típicas de la sección Salivaria. Sin embargo, *T. rangeli* presenta características biológicas que no son compatibles con la descripción de los Salivaria (Grisard, 2002).

Adicionalmente, análisis basados en datos moleculares, ITS ribosomales, SSU rRNA (Da Silva et al., 2004), la secuencia completa del ARNr 5,8S (Beltrame et al., 2005), genes codificantes para la proteína KMP-11 (Diez et al., 2005) y la región intergénica del gen *h2a* (Puerta et al., 2009; Suárez et al., 2007; Cuervo et al., 2006), así como los observados con la proteína HSP70 muestran que *T. rangeli* constituye siempre un clado bien soportado, el cual se encuentra más próximo filogenéticamente a las especies de la sección Estercoraria (*T. cruzi*) que a las de la sección Salivaria (*T. brucei* y *T. vivax*).

La nueva evidencia molecular soporta a *T. rangeli* como una especie relacionada a la sección Estercoraria, pero dadas las características biológicas únicas de la especie y teniendo en cuenta que existe evidencia que soporta una evolución diferente entre las especies pertenecientes a ambas secciones (Stevens et al., 1998) se propone considerar la re-clasificación de *T. rangeli* dentro de un nuevo sub-género, el *Tejeraia*, como había sido inicialmente propuesto por Añez, 1982.

En conclusión, las aproximaciones filogenéticas realizadas confirman por una parte, el carácter monofilético de los tripanosomas y las leishmanias, además, de la cercana relación evolutiva existente entre *T. rangeli* y *T. cruzi*. Ubicando a *T. rangeli* siempre en un clado independiente y altamente soportado.

El correcto entendimiento de las relaciones evolutivas entre los eucariotas y en particular entre los organismos parásitos permitirá predecir mecanismos de virulencia, reconstruir vías metabólicas, identificar blancos potenciales de fármacos, elucidar procesos celulares específicos del parásito y entender la interacción con el hospedero y el vector (Dacks et al., 2008). En este sentido *T. rangeli* constituye un modelo biológico atractivo para el estudio de la biología y patogenicidad de *T. cruzi*.

7.7 Respuesta inmune y HSP70

Adicional a su función como chaperonas celulares, las proteínas de choque térmico han sido implicadas en procesos de reconocimiento y presentación antigénica e inmunidad a tumores. También se ha visto que estas proteínas por si mismas son capaces de estimular la producción de citocinas y activar células presentadoras de antígenos (Asea et al., 2000; Tsan & Gao, 2004).

De tal forma que diversas evidencias apuntan hacia la participación de las proteínas HSP70 en la respuesta inmune frente a patógenos, tanto en inmunidad innata y adquirida (Tsan & Gao, 2004; Srivastava, 2002), como en el desarrollo de procesos autoinmunes.

En relación a presentación antigénica, las HSP del citosol, tales como la HSP70 y HSP90 unen péptidos antigénicos generados dentro de la célula a través de su dominio de unión a péptidos, los cuales entran a hacer parte de la vía endógena de presentación antigénica al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I a través del proceso de “cross-presentation” (Li et al., 2002). Los péptidos que son tomados por las HSP y liberados extracelularmente o el complejo péptido-HSP constituido *in vitro* son tomados por las células presentadoras de antígenos vía receptores CD91, LOX1, CD36 y CD40, lo que resulta en una nueva presentación por moléculas MHC (Delneste et al., 2002; Panjwani et al., 2002; Basu et al., 2001; Wang et al., 2001). Esta capacidad de las HSP para unir péptidos antigénicos y entregárselos a las células presentadoras de antígenos (APC) es la base de su función en la generación de una respuesta de linfocitos T específicos del péptido. Sin embargo, el rol fisiológico de las HSP en la presentación antigénica, particularmente la “cross-presentation” se mantiene controversial (Javid et al., 2007).

A pesar que el papel que cumplen las HSP en inmunidad a patógenos no está completamente entendido, se cree que estas proteínas sirven como un importante mecanismo de defensa contra agentes infecciosos. De hecho, la respuesta inmune a HSP ha sido observada en enfermedades infecciosas causadas por bacterias, protozoos, hongos y nematodos. Estas proteínas inducen una fuerte respuesta humoral y celular en numerosas infecciones. Al menos dos factores se ha visto contribuyen al hecho de que las HSP

representen antígenos inmunodominantes en un amplio espectro de infecciones. Primero, estas proteínas son muy abundantes en los patógenos, especialmente bajo condiciones de estrés y segundo, la memoria inmunológica generada contra los determinantes antigénicos conservados entre las HSP de distintos organismos generan reactividad cruzada. La constante re-estimulación por encuentros subsecuentes con organismos de diferente grado de virulencia hace que el individuo luego de la infección con un patógeno más virulento alerte el sistema inmune rápidamente para que reaccione contra la infección, antes de que se de la respuesta inmune específica frente al patógeno (Zugel & Kaufmann, 1999).

Por otra parte, Asea et al., 2000 demostraron una nueva función para la proteína HSP70, como chaperona y citocina, acuñando el término “chaperoquina” para referirse a la función doble de esta proteína. Este efecto citocina de las HSP se ha visto es único y no requiere la asociación a péptido, hidrólisis de ATP, co-factores ni el ensamblaje de un complejo proteico (Tsan & Gao, 2004b). Estas “chaperoquinas” funcionan como potentes inductores del sistema inmune innato al inducir la producción de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12 y óxido nítrico) y quimoquinas por parte de los monocitos, macrófagos y células dendríticas, adicionalmente son capaces de inducir la maduración de células dendríticas (Tsan & Gao, 2004). Recientemente ha sido reportado que el efecto citocina de las HSP es mediado por receptores tipo Toll (TLR4) (Vabulas et al., 2002) y que la activación de las células dendríticas depende principalmente de la presencia de TLR4 y TLR2 funcionales (Asea et al., 2002). Teniendo en cuenta lo anterior, Tsan & Gao et al., 2004 recientemente han controvertido el papel de las HSP como inductores de la respuesta inmune innata, sugiriendo que la activación de las APC es generado por otras moléculas no

HSP o por lipopolisacaridos contaminantes. Adicionalmente, Wanger et al., 2006 reportaron que las HSP potencian la actividad biológica del LPS y sugieren que la unión HSP-LPS es un mecanismo naturalmente presentado en los organismos, por lo cual las HSP siguen siendo un mecanismo importante en la generación de una respuesta inmune innata y adaptativa contra diferentes patógenos.

En procesos autoinmunes, se ha visto que la HSP70 bacteriana es altamente inmunogénica, capaz de inducir la producción de anticuerpos y activar células T (Zugel & Kaufmann, 1999). Se ha visto que estos anticuerpos y las células T generadas contra la HSP70 bacteriana son capaces de reconocer la HSP70 de mamíferos como resultado de reactividad cruzada, generando daño a tejidos y causando reacción inflamatoria, estando así la HSP70 implicada en la patogénesis de varias enfermedades autoinmunes y condiciones inflamatorias (Tsan & Gao, 2004).

Adicionalmente algunos reportes indican que algunas HSP de patógenos poseen propiedades modulatorias cuando se usan como “carriers” en protocolos de inmunización (Rico et al. 1999), por lo que se han adelantado estudios sobre el uso de la proteína quimérica conformada por la HSP70 fusionada a la proteína KMP-11, ambas de *T. cruzi*, los cuales han mostrado que la proteína de fusión induce tanto inmunidad humoral como celular en ratones; así como también que es capaz de proteger los animales frente al reto posterior con los parásitos luego de haber sido estos inmunizados con la proteína quimérica (Planelles et al. 2002; 2001; Marañón et al. 2001).

Teniendo en cuenta las propiedades inmunológicas de las proteínas HSP, se compararon las proteína HSP70 de *T. cruzi* y *T. rangeli* con el objetivo de identificar la conservación o no de los epítomos humorales y celulares

reportados en la proteína de *T. cruzi*, como un primer paso para evaluar su posible utilidad en protocolos de inmunización.

Este análisis mostró una alta conservación en los epítomos, tanto humorales como celulares, entre las proteínas de ambas especies, además de que éstos son iguales entre las HSP70 de las cepas H14 y Tre. Estudios recientes han confirmado la existencia de reactividad serológica cruzada entre las formas epimastigotas de *T. cruzi* y *T. rangeli*, señalando que dicha reactividad cruzada es debida a la gran cantidad de antígenos solubles mostrados por ambos parásitos, sin embargo, esta reactividad serológica cruzada disminuye cuando formas tripomastigotas de *T. rangeli* son usadas en ensayos de inmunofluorescencia (IFA) frente a sueros de pacientes chagásicos (De Moraes et al., 2008). Teniendo en cuenta que las proteínas de choque térmico se expresan de forma constitutiva en todos los estadios del parásito y de manera más abundante en el momento de la infección al hospedero mamífero, los hallazgos de este estudio indican que la proteína HSP70 se encuentra involucrada en la reactividad inmunológica cruzada entre estas dos especies de parásitos. La existencia de reactividad inmunológica cruzada entre *T. rangeli* y *T. cruzi* debido a su similitud antigénica constituye un problema para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, sin embargo, puede ser una herramienta a explorar en la inducción de protección frente a la infección por *T. cruzi*.

Teniendo en cuenta lo anterior y la capacidad demostrada de la proteína HSP70 de *T. cruzi* de inducir proliferación de esplenocitos de ratones vírgenes (Marañón et al., 2000a), se exploró dicha capacidad para la proteína HSP70 de *T. rangeli*, observando que la proteína de *T. rangeli* al igual que lo observado con la proteína de *T. cruzi* induce una rápida y fuerte proliferación de los esplenocitos de ratones vírgenes, además de manera interesante se

observó que la población estimulada es del fenotipo de linfocitos T (LT) CD4+.

Adicional a lo anterior, varios estudios han demostrado que la inmunización de ratones y perros con epimastigotes de *T. rangeli* inducen una respuesta protectora frente al reto con cepas virulentas de *T. cruzi* (Basso et al., 2008; 2007; 2004; Paláu et al., 2003), concluyendo que el efecto protector está basado en la alta similitud antigénica entre estas dos especies (Basso et al., 2007), por tanto, *T. rangeli* se constituye como un buen modelo para direccionar el desarrollo de vacunas terapéuticas o profilácticas (De Moraes et al., 2008). Sin embargo, la variabilidad antigénica entre las distintas especies, sub-grupos del parásito, cepas y estadios de desarrollo debe ser considerada (De Moraes et al., 2008), por lo cual se hace importante continuar con la caracterización biológica y molecular de los aislados de *T. rangeli*.

Por todo lo anterior y a pesar de que muchos antígenos evaluados en *T. rangeli* (entre ellos la HSP70) se comportan de manera muy similar a los de *T. cruzi*, de hecho mostrando epítomos celulares y humorales altamente conservados entre las dos especies, es interesante seguir evaluando proteínas de *T. rangeli* que puedan estar relacionadas con la generación de una respuesta inmune protectora mejor que la generada por los propios antígenos de *T. cruzi*. En este sentido, es importante resaltar el hecho de que sueros de pacientes chagásicos crónicos reconocen una proteína de aproximadamente 35 kDa de *T. rangeli*, la cual no se encuentra presente en *T. cruzi* (De Moraes et al., 2008).

En conjunto los resultados de este trabajo, confirman la importancia de *T. rangeli* como un modelo de aproximación al estudio de *T. cruzi* y a la

comprensión de los mecanismos involucrados en el desarrollo de patogenicidad de *T. cruzi* con miras a entender la relación existente entre estas dos especies que permitan el desarrollo de estrategias de inmunización eficientes.

8. CONCLUSIONES

- ❖ La organización genómica del gen *hsp70* de *T. rangeli* no presenta diferencias significativas entre las cepas KP1(-) y KP1(+) analizadas y es, además altamente conservada entre tripanosomas.
- ❖ El polimorfismo de restricción en la región 3' del gen *hsp70* entre las cepas KP1(-) y KP1(+) de *T. rangeli* permitió diferenciar éstas sub-poblaciones del parásito, constituyendo así el primer marcador diferencial proteico de las dos grandes sub-poblaciones del parásito.
- ❖ La región intergénica de los genes *hsp70* de *T. rangeli* presentó todas las secuencias necesarias para su correcto procesamiento. Además, mostró ser bastante conservada en cuanto a su tamaño, entre tripanosomas pero bastante divergente respecto de las reportadas en varias especies de leishmanias.
- ❖ La proteína HSP70 de *T. rangeli* es altamente conservada entre los grupos KP1(-) y KP1(+) de *T. rangeli*, a pesar de estar codificada por varias unidades génicas, las cuales presentan polimorfismos en el tamaño de la región codificante y patrón de restricción entre cepas y aun entre copias de una misma cepa.
- ❖ Aproximaciones filogenéticas realizadas usando la proteína HSP70 confirman la cercana relación evolutiva existente entre *T. rangeli* y *T. cruzi*. Además, ubican a *T. rangeli* en un clado independiente y altamente soportado con altos valores bootstrap.

- ❖ Las proteínas HSP70 soportan el carácter monofilético de tripanosomas y leishmanias.
- ❖ La proteína HSP70 de *T. rangeli*, al igual que lo previamente reportado para la proteína de *T. cruzi*, indujo la proliferación de esplenocitos de ratones vírgenes, entre los cuales indujo la proliferación de la población de linfocitos T CD4+.

9. RECOMENDACIONES

1. Profundizar en ensayos que lleven a dilucidar los mecanismos involucrados en la regulación de la expresión de las proteínas HSP70 de tripanosomátidos bajo condiciones normales y de estrés celular.
2. Realizar ensayos inmunológicos comparando las proteínas HSP70 de *T. cruzi* y *T. rangeli* tendientes a dilucidar su participación en la infección generada por estos tripanosomas y su posible utilización en protocolos de inmunización.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abderrazack S.B., Gerrini F., Mathieu-Daudé F., Truc P., Neubauer K., Lewicka K., Barnabe C., Tibayrenc M. 1993. Isoenzyme electrophoresis for parasite characterization. En: Methods in Molecular Biology. V 21: Protocols in Molecular Parasitology. De. E. Hyde Copyrigh. Human Press Inc., Totowa, N.J. Capitulo 27.

Acharya P., Kumar R., Tatu U. 2007. Chaperoning a cellular upheaval in malaria: Heat shock protein in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* **153**: 85-94.

Aksoy S., Shay G.L., Villanueva M.S., Beard C.B., Richards F.F. 1992. Spliced leader RNA sequences of *Trypanosoma rangeli* are organized within the 5S rRNA-encoding genes. *Gene.* **113**: 239-243.

Altschul S.F., Boguski M.S., Gish W., Wootton J.C. 1994. Issues in searching molecular sequence databases. *Nat Genet.* **6**: 119-129.

Alvarez F., Robello C., Vignali M. 1994. Evolution of codon usage and base contents in kinetoplastid protozoans. *Mol Biol Evol.* **11**: 790-802.

Amorim M.I., Momen H., Traub-Cseko Y.M. 1993. *Trypanosoma rangeli*: sequence analysis of β -tubulin gene suggest closer relationship to *Trypanosoma brucei* than to *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* **53**: 99-105.

Añez N. 1982. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. IV. A reconsideration of its systematic position. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. **77**: 405-415.

Arner A., Kindlund E., Nilsson D., Farzana F., Ferella M., Tammi M.T., Andersson B. 2007. Database of *Trypanosoma cruzi* repeated genes: 20 000 additional gene variants. *BMC Genomics*. **8**: 391-405.

Asea A., Rehli M., Kabingu E., Boch J.A., Bare O., Auron P.E., Stevenson M.A., Calderwood S.K. 2002. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem*. **277**: 15028-15034.

Asea A., Kabingu E., Stevenson M.A., Calderwood S.K. 2000. HSP70 peptidembearing and peptide-negative preparations act as chaperokines. *Cell Stress Chaperones*. **5**: 425-231.

Aya C., Arevalo A., Urrea D., García J., Yara D., Lozano L., Carranza J., Vallejo G. 2001. Caracterización antigénica de cepas de *Trypanosoma rangeli* aisladas en ciclos de transmisión domestica y silvestre en áreas endémicas de Colombia. Memorias del XXXVI Congreso Nacional de Ciencias Biológicas.

Bartholomeu D.C., Silva R.A., Galvão L.M., el-Sayed N.M., Donelson J.E., Teixeira S.M. 2002. *Trypanosoma cruzi*: RNA structure and post-transcriptional control of tubulin gene expression. *Exp Parasitol*. **102**: 123-133.

Basso B., Moretti E., Fretes R. 2008. Vaccination with epimastigotes of different strains of *Trypanosoma rangeli* protects mice against *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **103**: 370-374.

Basso B., Castro I., Introini V., Gil P., Truyens C., Moretti E. 2007. Vaccination with *Trypanosoma rangeli* reduces the infectiousness of dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Vaccine.* **25**: 3855-3858.

Basso B., Cervetta L., Moretti E., Carlier Y., Truyens C. 2004. Acute *Trypanosoma cruzi* infection: IL-12, IL-18, TNF, sTNFR and NO in *T. rangeli*-vaccinated mice. *Vaccine.* **22**: 1868-1872.

Basu S., Binder R.J., Ramalingam T., Srivastava P.K. 2001. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity.* **14**: 303-313.

Beltrame-Botelho I.T., Gaspar-Silva D., Steindel M., Dávila A.M., Grisard E.C. 2005. Internal transcribed spacers (ITS) of *Trypanosoma rangeli* ribosomal DNA (rDNA): a useful for inter-specific differentiation. *Infect Genet Evol.* **5**: 17-28.

Bente M., Harder S., Wiesgigl M., Heukeshoven J., Gelhaus C., Krause E., Clos J., Bruchhaus I. 2003. Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Proteomics.* **3**: 1811-1829.

Benz C., Nilsson D., Andersson B., Clayton C., Guilbride L. 2005. Messenger RNA processing sites in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* **143**: 125-134.

Bernal M., Vallejo G., Guhl F., Cornelis J.M. 2001. Afinidad por lectinas, sensibilidad a lisis mediada por el complemento y producción de neuraminidasa en cepas domesticas y silvestres de *Trypanosoma rangeli* aisladas en Colombia. Memorias del XXXVI Congreso Nacional de Ciencias Biológicas.

Bock J.H. & Langer P.J. 1993. Sequence and genomic organization of the hsp70 genes of *Leishmania amazonensis*. *Mol Biochem Parasitol.* **62**: 187-197.

Boorstein W.R., Ziegelhoffer T., Craig E.A. 1994. Molecular Evolution of the HSP70 multigene family. *J Mol Evol.* **38**: 1-17.

Bontempi E.J., Garcia G.A., Buschiazzo A., Henriksson J., Pravia C.A., Ruiz A.M., Pettersson U., Pszeny, V. 2000. The tyrosine aminotransferase from *Trypanosoma rangeli*: sequence and genomic characterization. *FEMS Microbiol Lett.* **189**: 253-257.

Brinker A., Scheufler C., Mulbe F., Fleckenstein B., Herrmann C., Jung G., Moarefi I., Hartl F. 2002. Ligand Discrimination by TPR Domains. relevance and selectivity of EEVD-recognition in hsp70 hop hsp90 complexes. *J Biol Chem.* **277**: 19265-19275.

Brocchieri L., Conway de Macario E., Macario A.J.L. 2008. hsp70 genes in the human genome: conservation and differentiation patterns predict a wide array of overlapping and specialized functions. *BMC Evol Biol.* **8**: 19.

Brochu C., Haimeur A., Ouellette M. 2004. The heat shock protein HSP70 and heat shock cognate protein HSC70 contribute to antimony tolerance in the protozoan parasite *Leishmania*. *Cell Stress Chaperones*. **9**: 294-303.

Buschiazzo A., Campetella O., Frasch A. 1997. *Trypanosoma rangeli* sialidase: cloning, expression and similarity to *T. cruzi* trans-sialidase. *Glycobiology*. **7**: 1167-1173.

Carranza J.C., Vallejo G., García J., Yara D., Urrea D., Arevalo A., Aya C., Guhl F. 2001. Variabilidad poblacional de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli* en Colombia revelada por amplificación de espaciadores intergénicos del gen miniexon. Memorias del XXXVI Congreso Nacional de Ciencias Biológicas.

Carrigan P., Sikkink L., Smith D., Ramirez M. 2006. Domain:domain interactions within Hop, the Hsp70/Hsp90 organizing protein, are required for protein stability and structure. *Protein Sci*. **15**: 522-532.

Cuba C.A. 1998. Revisión de los aspectos biológicos y diagnósticos del *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. *Rev Soc Bras Med Trop*. **31**: 207-220.

Cuellar A., Fonseca A., Gómez A. 2004. Efecto del lipopolisacárido en cultivos de células dendríticas humanas y su inhibición por la polimixina B. *Biomédica*. **24**: 413-422.

Cuervo C., López M.C., Puerta C. 2006. The *Trypanosoma rangeli* histone H2A gene sequence serves as a differential marker for KP1 strain. *Infect Genet Evol*. **6**: 401-409.

Cuervo C., Mayorga D., Pavía P., López M.C., Puerta C. 2004. Caracterización parcial de los genes codificantes para la proteína de choque térmico HSP70 de *Trypanosoma rangeli*. *Infectio*. **8**: 268-278.

D' Alessandro A. & Saravia N. 1999. *T. rangeli* in Protozoal Diseases, Gilles Herbert M. (Edit). Oxford University Press. 398-412.

Da Silva F., Noyes H., Campaner M., Junqueira A.C.V., Coura J.R., Añez N., Shaw J.J., Stevens J.R., Teixeira M.M.G. 2004. Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology*. **129**: 549-561.

Dacks J.B., Walker G., Field MC. 2008. Implications of the new eukaryotic systematics for parasitologists. *Parasitol Int*. **57**: 97-104.

De Moraes M.H., Guarneri A.A., Girardi F.P., Rodrigues J.B., Eger I., Tyler K.M., Steindel M., Grisard E.C. 2008. Different serological cross-reactivity of *Trypanosoma rangeli* forms in *Trypanosoma cruzi*-infected patients sera. *Parasit Vectors*. **1**: 20.

Delneste Y., Magistrelli G., Gauchat J., Haeuw J., Aubry J., Nakamura K., Kawakami-Honda N., Goetsch L., Sawamura T., Bonnefoy J., Jeannin P. 2002. Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation. *Immunity*. **17**: 353-362.

Demand J., Luders J., Hohfeld J. 1998 The carboxy-terminal domain of Hsc70 provides binding sites for a distinct set of chaperone cofactors. *Mol Cell Biol*. **18**: 2023-2028.

Diez H., Thomas M.C., Urueña C., Santander P., Cuervo C., López M.C., Puerta C. 2005. Molecular characterization of the kinetoplastid membrana protein – 11 genes from the parasite *Trypanosoma rangeli*. *Parasitology*. **130**: 1-10.

Dresel A. & Clos J. 1997. Transcription of the *Leishmania major* Hsp70-l Gene Locus Does Not Proceed through the Noncoding Region. *Exp Parasitol*. **86**: 206-212.

Dujardin J.P., Chavez T., Moreno J.M., Chachane M., Noireau F., Schofield C.J. 1999. Comparison of isoenzyme electrophoresis and morphometric analysis for phylogenetic reconstruction of the *Rhodniini* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *J Med Entomol*. **36**: 653-659.

Dworniczak B. & Mirault M.E. 1987. Structure and expression of a human gene coding for a 71 kd heat shock 'cognate' protein. *Nucleic Acids Res*. **15**: 5181-5197.

Eck RV & Dayhoff MO. 1966. Atlas of Protein Sequence and Structure. National Biomedical Research Foundation, Silver Springs, Maryland.

El-Sayed N.M., Myler P.J., Blandin G., Berriman M., Crabtree J., Aggarwal G., Caler E., Renauld H., Worthey E.A., Hertz-Fowler C., Ghedin E., Peacock C., Bartholomeu D.C., Haas B.J., Tran A.N., Wortman J.R., Alsmark U.C., Angiuoli S., Anupama A., Badger J., Bringaud F., Cadag E., Carlton J.M., Cerqueira G.C., Creasy T., Delcher A.L., Djikeng A., Embley T.M., Hauser C., Ivens A.C., Kummerfeld S.K., Pereira-Leal J.B., Nilsson D., Peterson J., Salzberg S.L., Shallom J., Silva J.C., Sundaram J., Westenberger S., White O., Melville S.E., Donelson J.E., Andersson B., Stuart K.D., Hall N. 2005a. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science*. **309**: 404-409.

El-Sayed N.M., Myler P.J., Bartholomeu D.C., Nilsson D., Aggarwal G., Tran A.N., Ghedin E., Worthey E.A., Delcher A.L., Blandin G., Westenberger S.J., Caler E., Cerqueira G.C., Branche C., Haas B., Anupama A., Arner E., Aslund L., Attipoe P., Bontempi E., Bringaud F., Burton P., Cadag E., Campbell D.A., Carrington M., Crabtree J., Darban H., da Silveira J.F., de Jong P., Edwards K., Englund P.T., Fazelina G., Feldblyum T., Ferella M., Frasch A.C., Gull K., Horn D., Hou L., Huang Y., Kindlund E., Klingbeil M., Kluge S., Koo H., Lacerda D., Levin M.J., Lorenzi H., Louie T., Machado C.R., McCulloch R., McKenna A., Mizuno Y., Mottram J.C., Nelson S., Ochaya S., Osoegawa K., Pai G., Parsons M., Pentony M., Pettersson U., Pop M., Ramirez J.L., Rinta J., Robertson L., Salzberg S.L., Sanchez D.O., Seyler A., Sharma R., Shetty J., Simpson A.J., Sisk E., Tammi M.T., Tarleton R., Teixeira S., Van Aken S., Vogt C., Ward P.N., Wickstead B., Wortman J., White O., Fraser C.M., Stuart K.D., Andersson B. 2005b. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. **309**: 409-415.

Engman D.M., Henkle-Duhrsen K., Kirchhoff L.V., Donelson J.E. 1995. *Trypanosoma cruzi*: Accumulation of polycistronic hsp70 RNAs during severe heat shock. *Exp Parasitol.* **80**: 575-577.

Engman D.M., Sias S.R., Gabe J., Donelson J., Dragon E. 1989. Comparison of HSP70 genes from two strains of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* **37**: 285-288.

Espejo J., Sosa A., Carrascal A.K., Cifuentes C., Barreto A. 2004. Producción de la proteína recombinante humana HSC70 y su aplicación en el desarrollo de un sistema de detección por ELISA. *Univ Sci.* **9**: 69-80.

Esquenazi D., Morel C.M., Traub-Cseko Y.M. 1989. Characterization of tubulin genes in *Trypanosoma rangeli*. *Mol Biochem Parasitol.* **34**: 253-260.

Feige U. & Polla B.S. 1994. Hsp70 a multi-gene, multi-structure, multi-function family with potential clinical applications. *Experientia.* **50**: 979-986.

Fink A.L. 1999. Chaperone mediated protein folding. *Physiol Rev.* **79**: 425-449.

Folgueira C., Carrion J., Moreno J., Saugar J.M., Cañavate C., Requena J.M. 2008. Effects of the disruption of the HSP70-II gene on the growth, morphology and virulence of *Leishmania infantum* promastigotes. *Int Microbiol.* **11**: 81-89.

Folgueira C. & Requena J.M. 2007. A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. *FEMS Microbiol Rev.* **31**: 359-377.

Folgueira C., Cañavate C., Chincharro C., Requena J.M. 2006. Genomic organization and expression of the HSP70 locus in new and old World *Leishmania* species. *Parasitology*. **134**: 1-9.

Folgueira C., Quijada L., Soto M., Abanades D.R., Alonso C., Requena J.M. 2005. The translational efficiencies of the two *Leishmania infantum* HSP70 mRNAs, differing in their 3' untranslated regions, are affected by shifts in the temperature of growth through different mechanisms. *J Biol Chem*. **280**: 35172-35183.

Freeman B.C., Myers M.P., Schumacher R., Morimoto R.I. 1995. Identification of a regulatory motif in Hsp70 that affects ATPase activity, substrate binding and interaction with HDJ-1. *EMBO J*. **14**: 2281-2292.

Gao H., Wang Y., Liu X., Yan T., Wu L., Alm E., Arkin A., Thompson D.K., Zhou J. 2004. Global transcriptome analysis of the heat shock response of *Shewanella oneidensis*. *J Bacteriol*. **186**: 7796-7803.

Gasteiger E., Gattiker A., Hoogland C., Ivanyi I., Appel R.D., Bairoch A. 2003. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res*. **31**: 3784-3788.

Germot A. & Philippe H. 1999. Critical analysis of eukaryotic phylogeny: a case study based on the HSP70 family. *J Eukaryot Microbiol*. **46**: 116-124.

Giambiagi De Marval M., Souto T., Rondinelli E. 1996. Characterization and cellular distribution of heat shock proteins HSP70 and HSP60 in *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol*. **83**: 335-345.

Giambiagi De Marval M., Gottesdiener K., Rondinelli E., Van der Ploeg L.H. 1993. Predicted amino acid sequence and genome organization of *Trypanosoma cruzi* hsp60 genes. *Mol Biochem Parasitol.* **58**: 25-31.

Glass D.J., Polvere R.I., Van der Ploeg L.H. 1986. Conserved sequences and transcription of the hsp70 gene family in *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol.* **6**: 4657-4666.

Gough J., Karplus K., Hughey R., Chothia C. 2001. Assignment of homology to genome sequences using a library of hidden Markov models that represent all proteins of known structure. *J. Mol. Biol.* **313**: 903-919.

Grisard EC. 2002. Salivaria or Stercoraria? The *Trypanosoma rangeli* dilemma. *Kinetoplastid Biol Dis.* **1**: 5-6.

Grisard E.C., Campbell D.A., Romanha A.J. 1999. Mini-exon gene sequence polymorphism among *Trypanosoma rangeli* strains isolated from distinct geographical regions. *Parasitology.* **118**: 375-382.

Guhl F. & Vallejo G. 2003. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920 – An updated review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **98**: 435-442.

Gupta R.S., Golding G.B., Singh B. 1994. HSP70 phylogeny and the relationship between archaeobacteria, eubacteria and eukaryotes. *J Mol Evol.* **39**: 537-540.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser.* **41**: 95-98.

Hamilton P.B., Stevens J.R., Gaunt M.W., Gidley J., Gibson W. 2004. *Trypanosomes* are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. *Int J Parasitol.* **34**: 1393-1404.

Hartl F.U. & Hayer-Hartl M. 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science.* **295**: 1852-1858.

Hartl F.U. 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature.* **381**: 571-579.

Hausler T. & Clayton C. 1996. Post-transcriptional control of hsp70 mRNA in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* **76**: 57-71.

Hedstrom R., Culpepper J., Schinski V., Agabian N., Newport G. 1988. *Schistosome* heat-shock proteins are immunologically distinct host-like antigens. *Mol Biochem Parasitol.* **29**: 275-282.

Henriksson J., Solari A., Rydaker M., Sousa O.E., Pettersson U. 1996. Karyotype variability in *Trypanosoma rangeli*. *Parasitology.* **112**: 385-391.

Hoare C. 1972. The trypanosomes of mammals: A zoological monograph. Oxford: Blackwell Scientific Publication. p.p 288-323.

Horn D. 2008. Codon usage suggests that translational selection has a major impact on protein expression in trypanosomatids. *BMC Genomics.* **9**: 1-11.

Jackson A.P. 2007. Tandem gene arrays in *Trypanosoma brucei*: comparative phylogenomic analysis of duplicate sequence variation. *BMC Evol Biol.* **4**: 54-73.

Jackson A.P., Vaughan S., Gull K. 2006. Comparative genomics and concerted evolution of beta-tubulin paralogs in *Leishmania* spp. *BMC Genomics.* **7**: 137.

Javid B., MacAry P.A., Lehner P.J. 2007. Structure and function: heat shock proteins and adaptive immunity. *J Immunol.* **179**: 2035-2040.

Klein K.G., Olson C.L., Donelson J.E., Egman D.M. 1995. Molecular comparison of the mitochondrial and cytoplasmic hsp70 of *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* and *Leishmania major*. *J Euk Microbiol.* **42**: 473-476.

Krautz G., Peterson J.D., Godsel L.M., Krettli A., Engman D. 1998. Human antibody responses to *Trypanosoma cruzi* 70 kD heat shock proteins. *Am J Trop Med Hyg.* **58**: 137-143.

Kumar N. & Zheng H. 1998. Evidence for epitope-specific thymus-independent response against a repeat sequence in a protein antigen. *Immunology.* **94**: 28-34.

Lee M.G. 1998. The 3'untranslated region of the hsp70 genes maintains the level of steady state mRNA in *Trypanosoma brucei* upon heat shock. *Nucleic Acids Res.* **26**: 4025-4033.

Lee M.G. 1995. Heat shock does not increase the transcriptional efficiency of the Hsp 70 genes of *Trypanosoma brucei*. *Exp Parasitol.* **81**: 608-613.

Lee M.G., Polvere R.I., Van der Ploeg L.H.T. 1990. Evidence for segmental gene conversion between a cognate *hsp70* gene and the temperature-sensitively transcribed *hsp70* genes of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* **41**: 213-220.

Lee M.G. & Van der Ploeg L.H.T. 1990. Transcription of the heat shock 70 locus in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* **41**: 221-232.

Lee M.G., Atkinson B.L., Holmes S., Van der Ploeg. 1988. Structure and expression of the *hsp70* gene family of *Leishmania major*. *Nucleic Acids Res.* **20**: 9567-9585.

Lehner T., Wang Y., Whittall T., McGowan E., Kelly C.G., Singh M. 2004. Functional domains of HSP70 stimulate generation of cytokines and chemokines, maturation of dendritic cells and adjuvanticity. *Biochem Soc Trans.* **32**: 629-632.

Li Z., Menoret A., Srivastava P. 2002. Roles of heat-shock proteins in antigen presentation and cross-presentation. *Curr Opin Immunol.* **14**: 45-51.

Lindquist S. & Craig E.A. 1988. The heat shock proteins. *Annu Rev Genet.* **22**: 631-677.

Liu B., Liu Y., Motyka S.A., Agbo E.E.C., Englund P.T. 2005. Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. *Trends Parasitol.* **21**: 363-369.

Lukes J., Guilbride D.L., Votypka J., Zikova A., Benne R., Englund P.T. 2002. Kinetoplast DNA network: Evolution of an improbable structure. *Eukaryot Cell*. **1**: 495-502.

Luque I., Leavitt S.A., Freire E. 2002. The linkage between protein folding and functional cooperativity: two sides of the same coin?. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. **31**: 235-256.

Macario A.J. & Conway de Macario E. 2005. Sick chaperones, cellular stress, and disease. *N Engl J Med*. **353**: 1489-1501.

Macedo A.M., Vallejo G.A., Chiari E., Peña S.D.J. 1993. ADN fingerprinting reveals relationships between strains of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*. *Exs*. **67**: 321-329.

MacFarlane J., Blaxter M.L., Bishop R.P., Kelly J.M. 1990. Identification and characterisation of a *Leishmania donovani* antigen belonging to the 70 kDa heat shock protein family. *Eur J Biochem*. **190**: 377-384.

Machado P.E., Eger-Mangrich I., Rosa G., Koerich L.B., Grisard E.C., Steindel M. 2001. Differential susceptibility of triatomines of the genus *Rhodnius* to *Trypanosoma rangeli* strains from different geographical origins. *Int J Parasitol*. **31**: 632-634.

Maia da Silva F., Marcili A., Lima L., Cavazzana M. Jr., Ortiz P.A., Campaner M., Takeda G.F., Paiva F., Nunes V.L., Camargo E.P., Teixeira M.M. 2009. *Trypanosoma rangeli* isolates of bats from Central Brazil: genotyping and phylogenetic analysis enable description of a new lineage using spliced-leader gene sequences. *Acta Trop*. **109**: 199-207.

Maia da Silva F., Junqueira A.C.V., Campaner M., Rodriguez A.C., Crisante G., Ramirez L.E., Caballero C.E., Monteiro A., Coura J.R., Añez N., Teixeira M.M.G. 2007. Comparative phylogeography of *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vectors. *Mol Ecol.* **16**: 3361-3373.

Maia da Silva F., Rodrigues A.C., Campaner M., Takata C.S.A., Brigido M.C., Junqueira A.C.V., Coura J.R., Takeda G.F., Shaw J.J., Teixeira M.M.G. 2004. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma rangeli* and allied species from human, monkeys and other sylvatic mammals of the Brazilian Amazon disclosed a new group and a species-specific marker. *Parasitology.* **128**: 283-294.

Marande W., Lukes J., Burger G. 2005. Unique mitochondrial genome structure in *Diplonemids*, the sister group of *Kinetoplastids*. *Eukaryot Cell.* **4**: 1137-1146.

Marañón C., Thomas M.C., Guzman F., Patarroyo M.E., López M. 2001. Identificación de epítopes T citotóxicos restringidos a la molécula HLA-A2.1 en la proteína HSP70 de *T. cruzi*. *Ars Pharmaceutica.* **42**: 67-80.

Marañón C., Planelles L., Alonso C., López M.C. 2000a. HSP70 from *Trypanosoma cruzi* is endowed with specific cell proliferation potential leading to apoptosis. *Int Immunol.* **12**: 2685-1693.

Marañón C., Thomas M.C., Puerta C., Alonso C., López M.C. 2000b. The stability and maturation of the H2A histone mRNA from *Trypanosoma cruzi* are implicated in their post-transcriptional regulation. *Biochim Biophys Acta.* **1490**: 1-10.

Maresca B. & Kobayashi G.S. 1994. Hsp 70 in parasites: As an inducible protective protein and as an antigen. *Experientia*. **50**: 1067-1074.

Márquez D.S., Ramírez L.E., Moreno J., Pedroza A.L., Lages-Silva E. 2007. *Trypanosoma rangeli*: RAPD-PCR and LSSP-PCR analyses of isolates from southeast Brazil and Colombia and their relation with KP1 minicircles. *Exp Parasitol*. **117**: 35-42.

Martín F., Requena J.M., Martín J., Alonso C., López, M.C. 1993. Cytoplasmic-nuclear translocation of the HSP70 protein during environmental stress in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun*. **196**: 1155-1162.

Martínez J., Henriksson J., Rydaker M., Cazzulo J.J., Pettersson U. 1995. Genes for cysteine proteinases from *Trypanosoma rangeli*. *FEMS Microbiol Lett*. **129**: 135-142.

Matambo T.S., Odunuga O.O., Boshoff A., Blatch G.L. 2004. Overproduction, purification, and characterization of the *Plasmodium falciparum* heat shock protein 70. *Protein Expr Purif*. **33**: 214-222.

McGhee R.B. & Cosgrove W.B. 1980. Biology and physiology of the lower *Trypanosomatidae*. *Microbiol Rev*. **44**:140-173.

Miletti L.C., Koerich L.B., Pachecho L.K., Steindel M., Stambuk B.U. 2006. Characterization of D-glucose transport in *Trypanosoma rangeli*. *Parasitology*. **133**: 721-727.

Miller M.A., McGowan S.E., Gantt K.R., Champion M., Novick S.L., Andersen K.A., Bacchi C.J., Yarlett N., Britigan B.E., Wilson M.E. 2000. Inducible resistente to oxidant stress in the protozoan *Leishmania chagasi*. *J Biol Chem.* **275**: 33883-33889.

Montilla M., Guhl F., Nicholls R.S., Breniere F.B. 1997. Caracterización enzimática y por la reacción en cadena de la polimerasa de cepas de *Trypanosoma cruzi*. *Biomédica.* **17**: 125-126.

Morales L., Romero I., Diez H., Del Portillo P., Montilla M., Nicholls S., Puerta, C. 2002. Characterization of a candidate *Trypanosoma rangeli* small nucleolar RNA gene and its application in a PCR-based parasite detection. *Exp parasitol.* **102**: 72-80.

Moreira D., López-García P., Vickerman K. 2004. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class kinetoplastea. *Int J Syst Evol Microbiol.* **54**: 1861-1875.

Mosser D.D., Caron A.W., Bourget L., Merrin A.B., Sherman M.Y., Morimoto R.I., Massie B. 2000. The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress induced apoptosis. *Mol Cell Biol.* **20**: 7146-7159.

Nei M & Kumar S. 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York.

Nocua P., Gómez C., Cuervo C., Puerta C. 2009. Cl gene cluster encoding several small nucleolar RNAs: a comparison amongst *trypanosomatids*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **104**: 473-480.

Olson C.L., Nadeau K.C., Sullivan M.A., Winquist A.G., Donelson J.E., Walsh C.T., Engman D.M. 1994. Molecular and biochemical comparison of the 70-kDa heat shock proteins of *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem.* **269**: 3868-3874.

Ortiz P.A., Maia da Silva F., Cortez A.P., Lima L., Campaner M., Pral E.M., Alfieri S.C., Teixeira M.M. 2009. Genes of cathepsin L-like proteases in *Trypanosoma rangeli* isolates: markers for diagnosis, genotyping and phylogenetic relationships. *Acta Trop.* **112**: 249-259.

Paba J., Santana J.M., Teixeira A.R.L., Fontes W., Souza M.V., Ricart C.A.O. 2004. Proteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Proteomics.* **4**: 1052-1059.

Paláu M.T., Mejia A.J., Vergara U., Zuñiga C.A. 2003. Action of *Trypanosoma rangeli* in infections with virulent *Trypanosoma cruzi* populations. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **98**: 543-548.

Panjwani N.N., Popova L., Srivastava P.K. 2002. Heat shock proteins gp96 and hsp70 activate the release of nitric oxide by APCs. *J Immunol.* **168**: 2997-3003.

Pearson W.R. & Lipman D.J. 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **85**: 2444-2448.

Planelles L., Thomas M., Pulgar M., Marañón C., Grabbe S., López M.C. 2002. *Trypanosoma cruzi* heat shock protein 70 kDa, alone or fused to the parasite KMP11 antigen, induces functional maturation of murine dendritic cells. *Immunol Cell Biol.* **80**: 241-247.

Planelles L., Thomas M.C., Alonso C., López M.C. 2001. DNA immunization with *Trypanosoma cruzi* HSP70 fused to the KMP11 protein elicits a cytotoxic and humoral immune response against the antigen and leads to protection. *Infect Immun.* **69**: 6558-6563.

Porcel B.M., Bontempi E.J., Henriksson J., Rydaker M., Aslund L., Segura E., Pettersson U., Ruiz A. 1996. *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*: Molecular characterization of genes encoding putative calcium-binding proteins, highly conserved in *Trypanosomatids*. *Exp Parasitol.* **84**: 387-399.

Puerta C., Sincero T.C.M., Stoco P.H., Cuervo C., Grisard E.C. 2009. Comparative analysis of *Trypanosoma rangeli* histone H2A gene intergenic region with distinct intra-specific lineage markers. *Vector Born and Zoonotic Disease*. In press.

Puerta C. & Urueña C. P. 2005. *Practicas de Biología Molecular*. Primera edición, Editorial Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

Puerta C., Cuervo P., Thomas M.C., López, M.C. 2000. Molecular characterization of the histone H2A gene from the parasite *Trypanosoma rangeli*. *Parasitol Research.* **86**: 916-922.

Pulido X.C., Pérez G., Vallejo G.A. 2008. Preliminary characterization of a *Rhodnius prolixus* hemolymph trypanolytic protein, this being a determinant of *Trypanosoma rangeli* KP1(+) and KP1(-) subpopulations vectorial ability. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **103**: 172-179.

Quijada L., Soto M., Alonso C., Requena J.M. 1997. Analysis of post-transcriptional regulation operating on transcription products of the tandemly linked *Leishmania infantum* hsp70 genes. *J Biol Chem.* **272**: 4493-4499.

Quimelli C., Picchi G.F., Dambrós B.P., Steindel M., Goldenberg S., Perdigao S., Macedo D., Grisard E.C. 2004. *Trypanosoma rangeli* Transcriptome Project: Generation and analysis of expressed sequence tags. *Kinetoplastid Biol Dis.* **3**: 1-4.

Ravi V., Kubofcik J., Bandopathyaya S., Geetha M., Narayanan R.B., Nutman T.B., Kaliraj P. 2004. *Wuchereria bancrofti*: cloning and characterization of heat shock protein 70 from the human lymphatic filarial parasite. *Exp Parasitol.* **106**: 1-10.

Recinos R.F., Kirchhoff L.V., Donelson J.E. 1994. Characterization of kinetoplast DNA minicircles in *Trypanosoma rangeli*. *Mol Biochem Parasitol.* **63**: 59-67.

Requena J.M., Soto M., Quijada L., Alonso C. 1997. Antigenicidad e inmunogenicidad de las proteínas de choque térmico. *Ars Pharmacia.* **38**: 191-208.

Requena J.M., Jimenez-Ruiz A., Soto M., Assiego R., Santarén J.F., Lopez M.C., Patarroyo M.E., Alonso C. 1992. Regulation of hsp70 expression in *Trypanosoma cruzi* by temperature and growth phase. *Mol Biochem Parasitol.* **53**: 201-211.

Requena J.M., Lopez M.C., Jimenez-Ruiz A., de la Torre J.C., Alonso C. 1988. A head-to tail tandem organization of HSP70 genes in *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic Acids Res.* **16**: 1393-1406.

Rico A.I., Angel S.O., Alonso C., Requena J.M. 1999. Immunostimulatory properties of the *Leishmania infantum* heat shock proteins HSP70 and HSP83. *Mol Immunol.* **36**: 1131-1139.

Rifaieh R., Unwin R., Carver J., Miller M.A. 2007. "SWAMI: Integrating Biological Databases and Analysis Tools Within User Friendly Environment". 4th International Workshop, DILS Data Integration in the Life Sciences. Philadelphia, USA. pp.48-58.

Ritossa F. 1962. A new puffing pattern induced by temperatura shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia.* **18**: 571-573.

Robert J. 2003. Evolution of heat shock protein and immunity. *Dev Comp Immunol.* **27**: 449-464.

Rothstein N. & Rajan T.V. 1991. Characterization of an hsp70 gene from the human filarial parasite, *Brugia malayi* (Nematoda). *Mol Biochem Parasitol.* **49**: 229-237.

Rozen S. & Skaletsky H.J. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 365-386.

Rzhetsky A. & Nei M. 1992. A simple method for estimating and testing minimum evolution trees. *Mol Biol Evol.* **9**: 945-967.

Saitou N. & Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* **4**: 406-425.

Sambrook J.F. & Russell D.W. 2001. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. USA.

Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **74**: 5463-5467.

Santa-Izabel A., Vermelho A., Branquinha M. 2004. Proteolytic activities in *Trypanosoma rangeli* and stercorarian trypanosomes: taxonomic implications. *Parasitol Res.* **94**: 342-348.

Schürch N., Hehl A., Vassella E., Braun R., Roditi I. 1994. Accurate polyadenylation of procyclin mRNAs in *Trypanosoma brucei* is determined by pyrimidine-rich elements in the intergenic regions. *Mol Cell Biol.* **14**: 3668-3675.

Schwartz D.C. & Cantor C.R. 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell.* **37**: 67-75.

Sghaier H., Le Ai T.H., Horiike T., Shinozawa T. 2004. Molecular chaperones: proposal of a systematic computer oriented nomenclature and construction of a centralized database. *In Silico Biol.* **4**: 311-322.

Shapira M., MacEwen J.G., Jaffe C.L. 1988. Temperature effects on molecular processes which lead to stage differentiation in *Leishmania*. *EMBO J.* **7**: 2895-2901.

Sharp P.M. & Li W.H. 1987. The codon adaptation index – a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Res.* **15**: 1281-1295.

Simpson A.G.B., Stevens J.R., Lukes J. 2006. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol.* **22**: 168-174.

Simpson A.G.B., Gill E.E., Callahan H.A., Litaker W., Roger A.J. 2004. Early Evolution within kinetoplastids (Euglenozoa), and the late emergence of *trypanosomatids*. *Protist.* **155**: 407-422.

Simpson A.G.B., Lukes J., Roger A.J. 2002. The evolutionary history of kinetoplastids and their kinetoplast. *Mol Biol Evol.* **19**: 2071-2083.

Sogin M.L., Elwood H.J., Gunderson J.H. 1986. Evolutionary diversity of eukaryotic small-subunit rRNA genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **83**: 1383-1387.

Solari A.J. 1980. The 3-dimensional fine structure of the mitotic spindle in *Trypanosoma cruzi*. *Chromosoma.* **78**: 239-255.

Souza O.E. & Dawson G.A. 1976. *Trypanosome* infections in the marmoset *Sanguinus geoffroyi* from Panama Canal zone. *Am J Trop Med Hyg.* **25**: 407-409.

Srivastava P. 2002. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* **2**: 185-194.

Stevens J.R., Noyes H.A., Schofield C.J., Gibson W. 2001. The molecular evolution of *Trypanosomatidae*. *Adv Parasitol.* **48**: 1-56.

Stevens J.R., Teixeira M.M.G., Bingle L.E.H., Gibson W.C. 1999. The taxonomic position and evolutionary relationship of *Trypanosoma rangeli*. *Int J Parasitol.* **29**: 749-757.

Stevens J., Noyes H., Gibson W. 1998. The Evolution of Trypanosomes infecting human and primates. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **93**: 669-676.

Steindel M., Dias E., Carvalho C., Grisard E., Menezes C., Murta S., Simpson A., Romanha A. 1994. Randomly Amplified polymorphic DNA (RAPD) and Isoenzyme analysis of *Trypanosoma rangeli* strains. *J Euk Microbiol.* **41**: 261-267.

Suárez B.A., Cuervo C.L., Puerta C. 2007. La región intergénica del gen H2A apoya las subpoblaciones KP1(-) y KP1(+) de *Trypanosoma rangeli*. *Biomédica.* **27**:410-418.

Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2007. *MEGA4*: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* **24**: 1596-1599.

Tanaka T., Kaneda Y., Lida A., Tanaka M. 1994. Homologous cysteine proteinase genes located on two different chromosomes from *Trypanosoma rangeli*. *Int J Parasitol.* **24**: 179-188.

Tejera E. 1920. Un nouveau flagelle de *Rhodnius prolixus*, *Trypanosoma* (ou *Crithidia*) *rangeli* n. sp. *Bull Soc Pathol Exot.***13**: 527-530.

Thomas M.C., Fernández A., Moro A., García J.A., González A. 1993. Biología molecular de tripanosomátidos. Nuevas tendencias, *Parasitología Molecular*. 135-143.

Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **24**: 4876-4882.

Tissieres A., Mitchell H.K., Tracy U.M. 1974. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol.* **84**: 389-398.

Toaldo C.B., Steindel M., Sousa M.A., Tavares C.C. 2001. Molecular karyotype and chromosomal localization of genes encoding β -tubulin, cysteine proteinase, hsp-70 and actin in *Trypanosoma rangeli*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **96**: 113-121.

Topol J., Ruden D.M., Parker C.S. 1985. Sequences required for in vitro transcriptional activation of a *Drosophila* hsp 70 gene. *Cell.* **42**: 527-537.

Tsan M.F. & Gao B. 2004. Heat shock protein and innate immunity. *Cell Mol Immunol.* **4**: 274-279.

Tsan M.F. & Gao B. 2004b. Cytokine function of heat shock proteins. *Am J Physiol Cell Physiol.* **286**: 739-744.

Urrea D.A., Carranza J.C., Cuba-Cuba C.A., Gurgel-Goncalves R., Guhl F., Schofield C.J., Triana G.A., Vallejo G.A. 2005. Molecular characterisation of *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius ecuadoriensis* in Peru, *R. colombiensis* in Colombia and *R. pallescens* in Panama, supports a co-evolutionary association between parasites and vectors. *Infec Gen Evol.* **5**: 123-129.

Urueña C., Santander P., Díez H., Montilla M., Zarate I., Thomas M.C., López M.C., Puerta C. 2004. Localización cromosómica de los genes KMP11 en cepas KP1(+) y KP1(-) de *Trypanosoma rangeli*. *Biomédica.* **24**: 200-203.

Vabulas R.M., Wagner H., Schild H. 2002. Heat shock proteins as ligands of toll-like receptors. *Curr Top Microbiol Immunol.* **270**: 169-84.

Vallejo G.A., Guhl F., Schaub G.A. 2009. Triatominae-*Trypanosoma cruzi*/*T. rangeli*: Vector-parasite interactions. *Acta Trop.* **110**: 137-147.

Vallejo G.A., Guhl F., Carranza J.C., Triana O., Pérez G., Ortiz P.A., Marin D.H., Villa L.M., Suarez J., Sanchez I.P., Pulido X., Rodriguez I.B., Lozano L.E., Urrea D.A., Rivera F.A., Cuba C., Clavijo J.A. 2007. Interacción tripanosoma-vector-vertebrado y su relación con la sistemática y la epidemiología de la tripanosomiasis americana. *Biomédica.* **27**: 110-118.

Vallejo G.A., Guhl F., Carranza J.C., Cuba-Cuba C.A., Schofield C.J., Triana O. 2004. Interaction between *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius* spp: a model for molecular epidemiology in American Trypanosomiasis. IX European Multicolloquium of Parasitology: 121-128.

Vallejo G., Guhl F., Carranza J.C., Moreno J., Triana O., Grisard E.C. 2003. Parity between kinetoplast DNA and mini-exon gene sequences supports either clonal evolution or speciation in *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius colombiensis*, *R. pallescens* and *R. prolixus* in Colombia. *Infect Gen Evol.* **3**: 39-45.

Vallejo G.A., Guhl F., Carranza J.C., Lozano L.E., Sanchez J.L., Jaramillo J.C., Gualtero D., Castañeda N., Silva J.C., Steindel M. 2002. kDNA markers define two major *Trypanosoma rangeli* lineages in Latin-America. *Acta Trop.* **81**: 77-82.

Vallejo G.A., Guayara F., Clavijo L.M., Lozano L.E., Carranza J.C., Jaramillo J.C., Gualtero D., Guhl F., Bernal C., Marinkelle C.J. 2000. Caracterización biológica y molecular de cepas de *Trypanosoma rangeli* aisladas de *Rhodnius prolixus* y *Rhodnius colombiensis*. Biología, Epidemiología y Control de la Tripanosomosis Americana y Leishmaniosis. Curso-Taller internacional. 44-47.

Vallejo G. 1998. Estudios comparativos entre las secuencias de kADN de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli* y su aplicación en el diagnóstico molecular de la tripanosomiasis americana. *Actual Biol.* **20**: 43-56.

Vallejo G., Macedo A.M., Chiari E., Peña S.D. 1994. Kinetoplast DNA from *Trypanosoma rangeli* contains two distinct classes of minicircles with different size and molecular organization. *Mol Biochem Parasitol.* **67**: 245-253.

Van der Ploeg L.T.H., Schwartz D.C., Cantor C.R., Borst P. 1984. Antigenic variation in *Trypanosoma brucei* analyzed by electrophoretic separation of chromosome-sized DNA molecules. *Cell.* **37**: 77-84.

Verbeke P., Fonager J., Clark B.F., Rattan S.I. 2001. Heat shock response and ageing: mechanisms and applications. *Cell Biol Int.* **25**: 845-857.

Wang Y., Kelly C.G., Karttunen J.T., Whittall T., Lehner P.J., Duncan L., MacAry P., Younson J.S., Singh M., Oehlmann W., Cheng G., Bergmeier L., Lehner T. 2001. CD40 is a cellular receptor mediating mycobacterial heat shock protein 70 stimulation of CC-chemokines. *Immunity.* **15**: 971-983.

Warger T., Hilf N., Rechtsteiner G., Haselmayer P., Carrick D.M., Jonuleit H., von Landenberg P., Rammensee H.G., Nicchitta C.V., Radsak M.P., Schild H. 2006. Interaction of TLR2 and TLR4 ligands with the N-terminal domain of Gp96 amplifies innate and adaptive immune responses. *J Biol Chem.* **281**: 22545-22553.

Wu S.J., Liu F.H., Hu S.M., Wang C. 2001. Different combinations of the heat-shock cognate protein 70 (hsc70) C-terminal functional groups are utilized to interact with distinct tetratricopeptide repeat-containing proteins. *Biochem J.* **359**: 419-426.

Young C.L., Moarefi I., Hartl U. 2001. Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *J Cell Biol.* **154**: 267-273.

Zeledón R. 1965. *Trypanosoma rangeli* en glandulas salivales de *Rhodnius pallescens* de Panamá. *Rev Biol Trop.* **13**: 157-159.

Zügel U., Kaufmann SH. 1999. Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.* **12**: 19-39.

11. ANEXOS

Entidades Financiadoras

COLCIENCIAS

Financiación Claudia L. Cuervo P. a través del programa de apoyo a Doctorados Nacionales.

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

Proyecto financiado por la Vicerrectoría Académica de la Pontificia Universidad Javeriana, proyecto No. 1060.

PRODUCTIVIDAD INTELECTUAL

Los resultados presentados en este trabajo han sido publicados y presentados parcialmente en congresos nacionales e internacionales.

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Cuervo C, Mayorga D, Pavía P, López M, Puerta C. 2004. Caracterización parcial de los genes codificantes para la proteína de choque térmico HSP70 de *Trypanosoma rangeli*. Infectio. 8: 268-278.

Cuervo Claudia, Thomas María del Carmen, López Manuel C, Puerta Concepción J. Molecular polymorphism at nucleotide level of *Trypanosoma rangeli* hsp70 genes is associated to different phylogenetic groups. Manuscrito en preparación.

CAPITULO DE LIBRO

Cuervo C, Mayorga D, López M, Puerta C. Genes codificantes para la proteína de choque térmico de 70 kilodaltons. 2007. Parásito, genoma y biología. Aproximación molecular al estudio del *Trypanosoma rangeli* y su relación con el *Trypanosoma cruzi*. 1ª ed. Editorial Pontificia Universidad Javeriana. Capítulo 8. pag 151-171.

PONENCIAS EN EVENTOS CIENTÍFICOS

Cuervo CL, Thomas M, López MC, Puerta C. Caracterización Molecular del gen *hsp70* y su uso en una prueba de PCR-RFLP en la diferenciación de las poblaciones KP1(-) y KP1(+) de *Trypanosoma rangeli*. VI Encuentro Nacional de Investigación en Enfermedades Infecciosas. Santa Marta, 2008.

Cuervo CL, Thomas M, López MC, Puerta C. Comparación de la Organización Genómica del Gen que Codifica para la Proteína HSP70 en Cepas de los Grupos 1 y 2 de *Trypanosoma rangeli*. XIII Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical. Ibagué, 2007.

Puerta B, Cuervo CL, López MC, Thomas MC. Caracterización Molecular del Gen que Codifica para la Proteína HSP70 en la cepa H14 KP1(+) de *Trypanosoma rangeli*. XVIII Congreso de la Federación Latinoamericana de Parasitología. Isla de Margarita, Venezuela, 2007.

Diez Hugo, Sarmiento Ladys, Caldas Maria Leonor, Montilla Marleny, Thomas Maria del Carmen, López Manuel Carlos, Cuervo Claudia, Puerta Concepción. Inmunolocalización Celular de la Proteína HSP70 en *Trypanosoma rangeli*. 8° Congreso Internacional del Colegio Nacional de Bacteriología. Bogotá, 2007.

Cuervo Claudia, Puerta Concepción, Diez Hugo. Obtención y Purificación de la Proteína de Choque Térmico de 70 kDa de *Trypanosoma rangeli*. IX Congreso La Investigación en la Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, 2007.

Claudia Cuervo, Camila Calderón, Manuel C. López, María del Carmen Thomas, Concepción Puerta. Caracterización Molecular del gen que codifica para la proteína HSP70 en la cepa Tre KP1(-) de *Trypanosoma rangeli*. XII Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical. Bogotá, 2005.

Claudia Cuervo, Hugo Diez, Manuel C. López, Concepción Puerta. Estudio de genes conservados en cepas KP1(+) y KP1(-) de *Trypanosoma rangeli* y su comparación con *Trypanosoma cruzi*. XII Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical. Bogotá, 2005.

Claudia Cuervo, Manuel C. López, María del Carmen Thomas, Concepción Puerta. Capacidad estimuladora de esplenocitos de ratones *naive* de la proteína HSP70 de *Trypanosoma rangeli*. 6 Congreso Internacional del Colegio Nacional de Bacteriólogos. Cartagena, 2005.

Cuervo C, Mayorga D, Pavía P, López MC, Puerta C. Caracterización parcial de los genes codificantes para la proteína de choque térmico HSP70 de *Trypanosoma rangeli*.
Cuarto Encuentro de Investigación en Enfermedades Infecciosas.
Paipa, 2004.

Mayorga DC, Cuervo CL, Pavía PX, Puerta CJ, López MC. Detección y amplificación de los genes codificantes para la proteína HSP70 de *Trypanosoma rangeli*.
XI Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical.
Cali, 2003.

Hugo Diez, Claudia L. Cuervo, Claudia P. Urueña, Sandra P. Santander, Diana C. Mayorga, Paula X. Pavía, Maricarmen Thomas, Manuel C. López, Puerta J. Concepción. Detection of genes encoding HSP70 and KMP11 proteins in *Trypanosoma rangeli*.
MPMXIV Molecular Parasitology Meeting.
Boston (USA), 2003.

RESUMENES

Cuervo C, Thomas M, López MC, Puerta C. 2008. Caracterización molecular del gen *hsp70* y su uso en la diferenciación de las poblaciones KP1(-) y KP1(+) de *Trypanosoma rangeli*. *Infectio* **12**, Supl 1, 107.

Cuervo CL, Thomas M, López MC, Puerta C. 2007. Comparación de la Organización Genómica del Gen que Codifica para la Proteína HSP70 en Cepas de los Grupos 1 y 2 de *Trypanosoma rangeli*. *Biomédica* **27**, Supl 2, 242.

Puerta B, Cuervo CL, López MC, Thomas MC. 2007. Caracterización Molecular del Gen que Codifica para la Proteína HSP70 en la cepa H14 KP1(+) de *Trypanosoma rangeli*. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental XLVII*, Supl 1, 144-145.

Diez Hugo, Sarmiento Ladys, Caldas Maria Leonor, Montilla Marleny, Thomas Maria del Carmen, López Manuel Carlos, Cuervo Claudia, Puerta Concepción. 2007. Inmunolocalización Celular de la Proteína HSP70 en *Trypanosoma rangeli*. *Laboratorio Actual* **40**, 80.

Cuervo C, Diez H, López MC, Puerta C. 2005. Estudio de genes conservados en cepas KP1(+) y KP1(-) de *Trypanosoma rangeli* y su comparación con *Trypanosoma cruzi*. *Biomédica* **25**, 88-92.

Cuervo C, Calderón C, López MC, Thomas MC, Puerta C. 2005. Caracterización Molecular del gen que codifica para la proteína HSP70 en la cepa Tre KP1(-) de *Trypanosoma rangeli*. *Biomédica* **25**, 141-142.

Cuervo C, López MC, Thomas MC, Puerta C. 2005. Capacidad estimuladora de esplenocitos de ratones *naive* de la proteína HSP70 de *Trypanosoma rangeli*. *Laboratorio Actual* **38**, 86-87.

Mayorga DC, Cuervo CL, Pavía PX, Puerta CJ, López MC. 2003. Detección y amplificación de los genes codificantes para la proteína HSP70 de *Trypanosoma rangeli*. *Biomédica* **23**, 110.

SECUENCIAS DE GENES REPORTADAS EN LAS BASES DE DATOS

SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS

Cuervo CL, Thomas MC, López M, Puerta CJ. 2007. *Trypanosoma rangeli* isolate H14 clone CF 70 kDa heat shock protein gene, partial cds. EF442768.

Cuervo CL, Thomas MC, López M, Puerta CJ. 2007. *Trypanosoma rangeli* isolate H14 clone A 70 kDa heat shock protein gene, complete cds. EF442767.

Cuervo CL, Thomas MC, López MC, Puerta CJ. 2006. *Trypanosoma rangeli* isolate Tre 70 kDa heat shock protein (hsp70) gene, complete cds. EF108419.

Cuervo CL, Thomas MC, López MC, Puerta CJ. 2006. *Trypanosoma rangeli* isolate Tre 70 kDa heat shock protein (hsp70) gene, complete cds. EF108420.

Cuervo CL, Thomas MC, López MC, Puerta CJ. 2006. *Trypanosoma rangeli* isolate Tre 70 kDa heat shock protein (hsp70) gene, complete cds. EF108421.

Cuervo CL, Thomas MC, López MC, Puerta CJ. 2006. *Trypanosoma rangeli* isolate H14 70 kDa heat shock protein (hsp70) gene, complete cds. EF108422.

Cuervo CL, Mayorga DC, López MC, Puerta CJ. 2003. *Trypanosoma rangeli* isolate Tre heat shock protein 70 gene, partial cds. AY495382.

Cuervo CL, Mayorga DC, López MC, Puerta CJ. 2003. *Trypanosoma rangeli* isolate H14 heat shock protein 70 gene, partial cds. AY495381.

SECUENCIAS DE AMINOACIDOS

Cuervo CL, Thomas MC, López M, Puerta CJ. 2007. 70 kDa heat shock protein [*Trypanosoma rangeli*]. ABO36542

Cuervo CL, Thomas MC, López M, Puerta CJ. 2007. 70 kDa heat shock protein [*Trypanosoma rangeli*]. ABO36541

Cuervo CL, Thomas MC, López MC, Puerta CJ. 2006. 70 kDa heat shock protein [*Trypanosoma rangeli*]. ABL74475.

Cuervo CL, Thomas MC, López MC, Puerta CJ. 2006. 70 kDa heat shock protein [*Trypanosoma rangeli*]. ABL74476.

Cuervo CL, Thomas MC, López MC, Puerta CJ. 2006. 70 kDa heat shock protein [*Trypanosoma rangeli*]. ABL74477.

Cuervo CL, Thomas MC, López MC, Puerta CJ. 2006. 70 kDa heat shock protein [*Trypanosoma rangeli*]. ABL74478.

Cuervo CL, Mayorga DC, López MC, Puerta CJ. 2003. heat shock protein 70 [*Trypanosoma rangeli*]. AAR87495.

Cuervo CL, Mayorga DC, López MC, Puerta CJ. 2003. heat shock protein 70 [*Trypanosoma rangeli*]. AAR87494.



FACULTAD DE CIENCIAS

Anexo No. 4

Doctor

MANUEL A. FRANCO CORTÉS, M.D., Ph. D.

Director de Posgrado

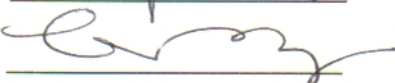
Facultad de Ciencias

Respetado(a) Doctor(a):

Con la presente comunicación, hacemos constar que la tesis doctoral titulado: Caracterización Molecular de los genes codificantes de la proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70) de *Trypanosoma rangeli*, ha sido revisado y corregido de acuerdo con las observaciones sugeridas por los jurados en la sustentación.

En constancia se firma, a los 30 días del mes de NOVIEMBRE del año 2009.

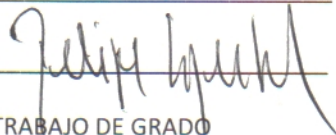
Cordialmente,

NOMBRE Concepción Puerto
FIRMA 

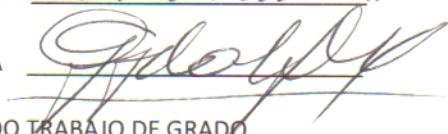
DIRECTOR TRABAJO DE GRADO

NOMBRE LUIS F. GARCIA
FIRMA Luis F. Garcia

JURADO TRABAJO DE GRADO


NOMBRE FELIPE GUHL
FIRMA 

JURADO TRABAJO DE GRADO

NOMBRE GUSTAVO ADOLFO VALLEJO
FIRMA 

JURADO TRABAJO DE GRADO

NOMBRE Dymar Triana Chaves
FIRMA Dymar Triana Chaves
JURADO TRABAJO DE GRADO

NOMBRE Wilson TERRAZO PEREZ
FIRMA 
JURADO TRABAJO DE GRADO