

**COMPARACIÓN DE LA SECUENCIA INTERGÉNICA DEL GEN  
HISTONA H2A ENTRE CEPAS KP1 (+) y KP1 (-) de *Trypanosoma rangeli***



**BRIAN ALEJANDRO SUÁREZ MANTILLA**

**TRABAJO DE GRADO**  
Presentado como requisito parcial  
Para optar el título de

**MICROBIOLOGO INDUSTRIAL**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL**  
Bogotá D.C.  
Enero de 2007

## 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. Solo 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”.



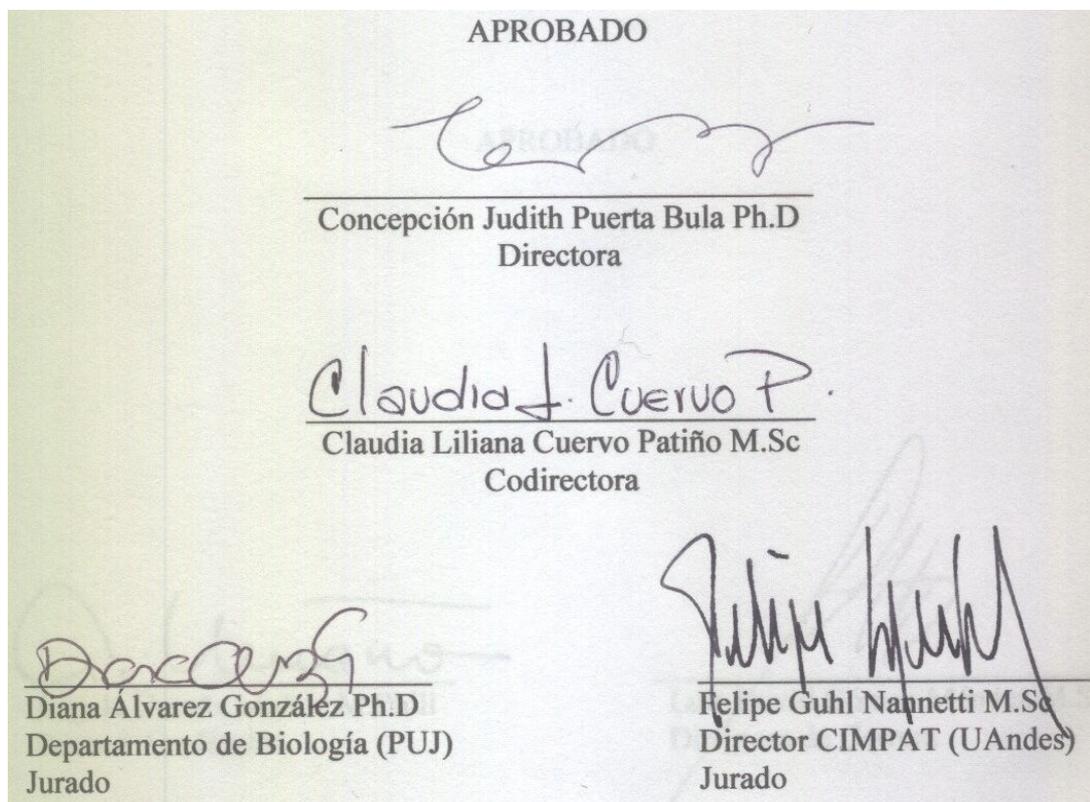
Los resultados presentados en este trabajo han sido publicados y presentados parcialmente en un congresos nacional y sus hallazgos se resumen en el artículo “La región intergénica del gen *histona* H2A soporta las dos principales subpoblaciones de *Trypanosoma rangeli*” que será sometido a publicación en la revista Biomédica.



**COMPARACIÓN DE LA SECUENCIA INTERGÉNICA DEL GEN  
HISTONA H2A ENTRE CEPAS KP1 (+) y KP1 (-) de *Trypanosoma rangeli***



BRIAN ALEJANDRO SUÁREZ MANTILLA

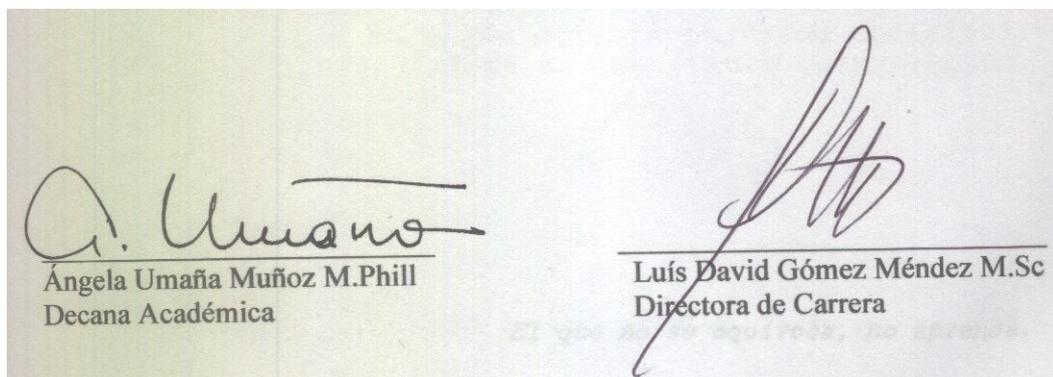


**COMPARACIÓN DE LA SECUENCIA INTERGÉNICA DEL GEN  
HISTONA H2A ENTRE CEPAS KP1 (+) y KP1 (-) de *Trypanosoma rangeli***



BRIAN ALEJANDRO SUÁREZ MANTILLA

APROBADO



## DEDICATORIA

Simón y Amparo por su desmedido apoyo para el logro de todos mis objetivos durante estos cinco años de lucha.

Sandra Kalil, quien desde que estuvo a mi lado me colaboró de forma incondicional y desinteresada apoyando permanentemente todas mis decisiones.

Al Dios en el que creo por iluminarme con su sabiduría y llenarme de bendiciones, para la culminación de un éxito más en mi vida.

*El que no se equivoca, no aprende.*



## AGRADECIMIENTOS

Dra. Conchita Puerta por sus exigencias, sabiduría y confianza otorgándome la responsabilidad de cumplir con el desarrollo de este trabajo, contribuyendo a mi formación y gusto por la Biología Molecular.

Claudia Cuervo por todas sus enseñanzas y paciencia tenida en el desarrollo de este trabajo, amiga, colega y maestra.

Paula Pavía, Camila Calderón, Hugo Diez, Janeth Rodríguez, "las niñas" Paola Nocua y Carolina Gómez, y las vecinas de Inmuno Diana Castañeda, Paola Santander, Claudia Urueña y Francia Rojas; compañeros de laboratorio que cuando necesite de ellos, estuvieron pendientes para resolver alguna duda o inconveniente.

Profesores: Dr. Manuel Ruiz-García y Carlos Manuel Estévez M.Sc; quienes contribuyeron de forma especial resolviendo dudas temáticas en el trabajo.

A los jurados designados por la disposición en la evaluación de este trabajo.

Dr. Rubén Santiago Nicholls y Marleny Montilla del laboratorio de Parasitología del Instituto Nacional de Salud (INS) por el suministro y mantenimiento de las cepas empleadas.

Dr. Gustavo A Vallejo del Laboratorio de Investigaciones en Parasitología Tropical, Universidad del Tolima (Ibagué) por la caracterización molecular de las cepas.

Miembros de mi familia que se preocuparon y vieron en mí una persona con grandes capacidades y futuro.

A todos aquellos compañeros y profesores de carrera que en algún momento pudieron contribuir brindándome su importante colaboración.

Fecha de sustentación: Enero 24 del 2006.



## TABLA DE CONTENIDO

Número	Título	Página
	Lista de figuras	ix
	Lista de tablas	xi
	Lista de anexos	xii
	Resumen	13
1.	Introducción	15
2.	Marco teórico y revisión de literatura	17
2.1.	Generalidades de <i>Trypanosoma rangeli</i>	17
2.1.1.	Estadios morfológicos de <i>T. rangeli</i>	17
2.1.1.1.	En el huésped vertebrado	17
2.1.1.2.	En el huésped invertebrado o triatóminos vectores	18
2.1.1.3.	Características principales de cada uno de los estadios morfológicos	18
2.1.2.	Ciclo de vida	19
2.1.3.	Vectores	21
2.1.4.	Reservorios	22
2.1.5.	Ciclos de transmisión	23
2.2.	Características taxonómicas	24
2.3.	ADNk (ADN del Cinetoplasto)	26
2.4.	Variabilidad de <i>T. rangeli</i>	29
2.4.1.	Bioquímica	30
2.4.1.1.	Respuesta a la lisis mediada por el complemento	30
2.4.1.2.	Isoenzimas	30
2.4.1.3.	Neuroaminidasas	31
2.4.1.4.	Lectinas	31
2.4.2.	Genética	32
2.5.	Histonas	33
2.5.1.	Histona H2A en <i>T. rangeli</i>	34
2.6.	Aproximaciones filogenéticas	37
2.6.1.	Métodos de distancia	39
2.6.1.1.	Método ‘Neighbor-Joining’	40
2.6.2.	Métodos discretos	40
2.6.2.1.	Método de máxima parsimonia	41
2.6.2.2.	Método de máxima verosimilitud ‘Likelihood’	41
2.6.3.	El valor ‘Bootstrap’	42
3.	Formulación del problema y justificación	44
3.1.	Formulación del problema	44
3.2.	Preguntas de la investigación	45
3.3.	Justificación de la investigación	45
4.	Objetivos	47
4.1.	Objetivo general	47
4.2.	Objetivos específicos	47
5.	Materiales y métodos	48
5.1.	Metodología general	48
5.2.	ADN de los Parásitos	49



5.3.	Clon C1	49
5.4.	Amplificación de la región no codificante de la Histona H2A	50
5.5.	Clonación de la región no codificante de la Histona H2A	51
5.6.	Análisis de las colonias recombinantes	53
5.6.1.	PCR	53
5.6.2.	Ensayos de ‘Southern Blot’	54
5.7.	Secuenciación	54
5.8.	Análisis bioinformáticos	55
5.8.1.	Método ‘Neighborg Joining’	55
5.8.2.	Método máxima parsimonia	56
5.8.3.	Método máxima verosimilitud	56
6.	Resultados	57
6.1.	Amplificación por PCR del fragmento intergénico de la histona H2A	57
6.1.1.	Cepa Tre	57
6.1.2.	Cepa 5048	58
6.1.3.	Cepa Choachí	58
6.2.	Construcción de la molécula de ADN recombinante usando pGEM® T-Easy como vector de clonación	59
6.3.	Análisis por PCR de los clones obtenidos	60
6.4.	Análisis por ‘Southern Blot’	63
6.5.	Secuenciación	67
6.6.	Análisis bioinformáticos	69
7.	Discusión	78
8.	Conclusiones	86
9.	Recomendaciones	87
10.	Referencias	88
11.	Anexos	100



## LISTA DE FIGURAS

Número de figura	Título	Página
1.	<i>Trypanosoma rangeli</i> en hemolinfa de <i>Rhodnius prolixus</i>	19
2.	Diseño esquemático del ciclo biológico de <i>T. rangeli</i>	20
3.	<i>Rhodnius prolixus</i>	21
4.	Representación esquemática de los minicírculos KP1, KP2 y KP3 de <i>T. rangeli</i>	28
5.	Representación esquemática del nucleosoma, constituido por el octámero de histonas	34
6.	Alineamiento entre la región intergénica de la Histona H2A para las cepas C23 KP1 (-) y H14 KP1 (+) de <i>T. rangeli</i>	37
7.	Esquema general de la metodología realizada	48
8.	Localización de los oligonucleótidos utilizados	51
9.	Secuencia de la región no codificante de la histona H2A (391 pb) de la cepa H14 de <i>T. rangeli</i>	51
10.	Plásmido pGEM®-T Easy	52
11.	Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % del ADN producto del PCR en la cepa Tre	5
12.	Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % del ADN producto del PCR en la cepa 5048	58
13.	Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % del ADN producto del PCR en la cepa Choachí	5
14.	Test de blancas y azules	60
15.	Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % de los productos de la PCR realizadas a los clones Trec1 – Trec5	61
16.	Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % de los productos de la PCR realizadas a los clones C5048 1 – C5048 5	62
17.	Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % de los productos de la PCR realizadas a los clones Cho1 – Cho5	62
18.	Electroforesis en gel de agarosa al 1 % del producto de digestión con la enzima <i>EcoRI</i> del clon Trec 2	63
19.	Electroforesis en gel de agarosa al 1 % del producto de digestión con la enzima <i>EcoRI</i> del clon C5048-3	64
20.	Electroforesis en gel de agarosa al 1 % del producto de digestión con la enzima <i>EcoRI</i> del clon Cho 1	64
21.	Prueba de marcación de la sonda	65
22.	Ensayo de ‘Southern Blot’ del clon Trec 2	65
23.	Ensayo de ‘Southern Blot’ del clon C5048-3	66
24.	Ensayo de ‘Southern Blot’ del clon Cho 1	66
25.	Secuencia de nucleótidos del clon Trec 1	68
26.	Secuencia de nucleótidos del clon C5048-3	69
27.	Secuencia de nucleótidos del clon Cho 1	69
28.	Múltiple alineamiento ‘CLUSTAL – W’ de las regiones intergénicas no codificantes de la histona H2A de <i>T. rangeli</i> procedente de diversas cepas del parásito	74



29. Árbol de 'Neighbor-Joining' utilizando el programa MEGA 3.1, de las secuencias intergénicas H2A 75
30. Árbol de Máxima Parsimonia utilizando el programa MEGA 3.1, de las secuencias intergénicas H2A para *Trypanosoma rangeli* 75
31. Árbol de Máxima Verosimilitud 'Likelihood' utilizando el programa PAUP 4.0, de las secuencias intergénicas H2A para *Trypanosoma rangeli* 75
32. Árbol de 'Neighbor-Joining' utilizando el programa PAUP 4.0, de las secuencias intergénicas H2A para *T. rangeli*, *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. infantum* 76
33. Árbol de máxima parsimonia utilizando el programa PAUP 4.0, de las secuencias intergénicas H2A para *T. rangeli*, *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. infantum* 77



## LISTA DE TABLAS

Número de tabla	Título	Página
1.	Clasificación taxonómica del parasito en estudio	23
2.	Características de los grupos 1 y 2 de <i>T. rangeli</i>	28
3.	Características de los genes de las Histonas H2A descritos en tripanosomátidos	35
4.	Métodos filogenéticos mas comúnmente utilizados	42
5.	Clasificación de las cepas utilizadas en este estudio	48
6.	Programa de PCR utilizado para amplificar la región intergénica de la histona H2A de <i>T. rangeli</i>	49
7.	Productos de amplificación para los clones seleccionados en cada una de las tres cepas.	60
8.	Número de bases secuenciadas en cada una de los clones analizados	67
9.	Porcentaje de identidad en las secuencias de la región intergénica del gen H2A entre cepas KP1 (+) y KP1 (-) de <i>T. rangeli</i> .	69
10.	Mutaciones encontradas entre las secuencias utilizadas (Tre, 5048, Choachí, C23, H14) de <i>T. rangeli</i>	70
11.	Resumen del contenido (%) de cada nucleótido en las secuencias analizadas, obtenido por el programa MEGA 3.1	71



## LISTA DE ANEXOS

Número de anexo	Título	Página
1.	Electroforesis en gel de agarosa	98
2.	Protocolo de extracción rápida de ADN de geles de azarosa según ‘QIA–Quick Gel Extraction Kit Protocol’ (QIAGEN)	100
3.	Protocolo de ligación utilizando el plásmido pGEM® T-Easy (Promega)	102
4.	Preparación de Medios de cultivo	103
5.	Transformación de células mediante electroporación (Promega®)	105
6.	Extracción de ADN plasmídico según ‘Wizard ® Plus SV Minipreps’ (Promega)	106
7.	Digestión del ADN plasmídico	107
8.	Extracción rápida de ADN bacteriano para chequeo por PCR	108
9.	Transferencia alcalina de ADN a membrana de “nylon”	109
10.	Marcación y prueba de la sonda H2A del clon C1 cepa H14	111
11.	‘Southern Blot’ - Hibridación	112
12.	Números de acceso para las secuencias reportadas	116
13.	Resumen de resultados obtenidos para cada uno de los métodos filogenéticos	119



## RESUMEN

*Trypanosoma rangeli* es considerado un parásito de importancia clínica dada la reactividad antigénica cruzada que presenta con *Trypanosoma cruzi*, el agente causal de la enfermedad de Chagas y la presencia de infecciones mixtas tanto en el hospedero vertebrado como en los insectos transmisores de ambos protozoarios, dificultando la identificación morfológica de las especies y originando reacciones serológicas cruzadas que complican el diagnóstico específico de la infección chagásica.

Varios han sido los métodos bioquímicos y moleculares que han permitido demostrar variabilidad entre aislados del parásito. Actualmente, *T. rangeli* ha sido clasificado según la presencia o ausencia del minicírculo KP1 en el ADN del cinetoplasto y diferencias en la amplificación del gen mini-exon en grupo 1 o cepas KP1 (-) y grupo 2 o cepas KP1 (+). Recientemente, estos grupos han sido asociados con las líneas evolutivas del vector *Rhodnius*, siendo las cepas KP1 (+) asociadas con la línea evolutiva 'Prolixus' y las cepas KP1 (-) con la línea evolutiva 'Pallescens' sugiriendo fenómenos de co-evolución o adaptación simultánea entre el vector y el parásito. Estudios recientes usando las secuencias de los ITS de las subunidades 18, 5.8 y 28 S del ADN ribosomal demostraron variabilidad inter-específica sugiriendo la presencia de más grupos con respecto a los ya mencionados.

En el presente trabajo, se empleó la región intergénica del gen histona H2A como un marcador diferencial entre cepas de *T. rangeli*. Para ello se analizaron las secuencias respectivas en las cepas KP1 (-) Tre, C23, 5048 y las cepas KP1 (+) Choachí y H14 de *T. rangeli*. Luego de amplificar, clonar y secuenciar la región respectiva de las cepas KP1 (-) 5048 y Tre y de la cepa KP1 (+) Choachí, las secuencias obtenidas fueron analizadas junto con las ya reportadas para las cepas KP1 (-) C23 y la cepa KP1 (+) H14.

Los resultados mostraron como todas las cepas KP1 (-) del parásito (Tre, C23, 5048) se agrupan en un clado aparte de las cepas KP1 (+) (Choachí y H14) y de



*Trypanosoma cruzi*, organismo utilizado como grupo raíz externo. De la misma manera, fue posible comparar estas secuencias con las reportadas para cepas de *T. cruzi*, *T. brucei* y *Leishmania infantum* donde fue posible observar una mayor cercanía filogenética entre *T. rangeli* y *T. cruzi* que con respecto a *T. brucei* el cual es transmitido por saliva y según resultados previos se relacionaba mas cercanamente a *T. rangeli*.

Estos resultados constituyen la primera evidencia de secuencias nucleares que apoyan la subdivisión de *T. rangeli* en las poblaciones KP1 (-) y KP1 (+), así como soportan la hipótesis acerca de la aparición de las cepas KP1 (-) a partir de una posible divergencia temprana presente en las cepas KP1 (+) mediante un fenómeno de simplificación génica como pudo haber sucedido con la delección del minicírculo KP1 en el ADN del cinetoplasto.



## 1. INTRODUCCIÓN

*Trypanosoma rangeli* es un parásito protozooario hemoflagelado que con frecuencia puede infectar al hombre, animales silvestres, domésticos e insectos vectores en distintas regiones del centro y sur de América (Guhl & Vallejo, 2003); donde hasta el momento no se ha demostrado ser patógeno para el huésped humano, contrario a lo que sucede con *Trypanosoma cruzi* el agente causal de la enfermedad de Chagas, con quien comparte vectores, reservorios y ubicación geográfica provocando infecciones mixtas tanto en el hospedero vertebrado como en los insectos transmisores de ambos protozoarios, dificultando la identificación morfológica de las especies (Vallejo *et al.*, 1988) y originando reacciones serológicas cruzadas que complican el diagnóstico específico de la infección chagásica (Guhl & Marinkelle, 1982; Guhl *et al.*, 1987).

Por lo anterior, este parásito genera importantes consecuencias prácticas en la epidemiología de la enfermedad de Chagas, pues la presencia de *T. rangeli* en las áreas endémicas de *T. cruzi* plantea la necesidad de desarrollar metodologías que garanticen el acertado diagnóstico de la enfermedad (Vallejo *et al.*, 2000b). Así mismo, resulta de gran interés el estudio de las características genotípicas de *T. rangeli* con el fin de dilucidar el panorama evolutivo, filogenético y biológico de dicho parásito. De esta forma, se han utilizado herramientas bioquímicas y moleculares que evidencian variabilidad entre los individuos de esta especie.

Utilizando amplificación del ADNk (ADN del Cinetoplasto), en Colombia se han detectado dos grupos de *T. rangeli* molecularmente diferentes. Un grupo de cepas aisladas de *Rhodnius prolixus* presentan tres clases de minicírculos en el ADNk denominados KP1, KP2 y KP3, mientras que las cepas aisladas de *Rhodnius colombiensis* presentan solamente dos clases denominados KP2 y KP3. Esta diferencia molecular ha sido evidenciada mediante la técnica de PCR y técnicas de hibridación en mas de 50 cepas de diferente origen geográfico en Colombia (Vallejo *et al.*, 2002a; 2003; Urrea *et al.*, 2005).



A su vez se ha determinado que las cepas KP1 (+) se asocian con la línea evolutiva del vector *R. prolixus*, mientras que las cepas KP1 (-) se asocian con los triatóminos del grupo ‘pallenscens’ (*R. colombiensis*, *R. ecuadoriensis* y *R. pallenscens*) (Urrea *et al.*, 2005; Vallejo *et al.*, 2007).

Los anteriores estudios, indican que las cepas aisladas de estos triatóminos no solamente difieren en la clase de minicírculo que portan, sino que la diversidad se extiende a otras características moleculares y biológicas (Vallejo *et al.*, 2000 b), de manera que se ha propuesto la división de *T. rangeli* en dos grupos: grupo 1, al cual pertenecen las cepas que no portan el minicírculo KP1 [KP1 (-)] y grupo 2, al cual pertenecen las cepas que portan el minicírculo KP1 [KP1(+)] (Vallejo *et al.*, 2002).

Teniendo en cuenta que estudios moleculares postulan a la proteína Histona H2A de *T. rangeli* como un marcador molecular de las poblaciones KP1 (+) y KP1 (-) del flagelado (Puerta *et al.*, 2000; Cuervo *et al.*, 2006); en el presente trabajo se utilizó la secuencia intergénica de la Histona H2A, como base molecular para establecer evidencias que se sumen a las ya existentes para sustentar la clasificación de *T. rangeli* en cepas KP1 (+) y KP1 (-).



## 2. MARCO TEÓRICO Y REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Generalidades de *Trypanosoma rangeli*

*Trypanosoma rangeli* es un protozoo flagelado del hombre y otros vertebrados, caracterizado por tener una morfología similar a *Trypanosoma lewisi*, especie del subgénero Herpetosoma transmitida principalmente por las heces del vector (D' Alessandro & Gore - Saravia, 1999).

La forma sanguínea de *T. rangeli* es delgada y mide alrededor de 26 a 34  $\mu\text{m}$  de longitud incluyendo el flagelo libre. Tiene un cinetoplasto pequeño y subterminal, característica que al microscopio permite diferenciarlo de *T. cruzi* al menos en los parásitos con morfología característica. El núcleo está situado cerca a la mitad del cuerpo y la membrana ondulatoria está bien definida (Fig. 1) (Cuba, 1998).

*T. rangeli* se considera un parásito de importancia médica y epidemiológica debido a que presenta alto grado de reactividad inmunológica cruzada con *T. cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas, interfiriendo en su diagnóstico serológico (Guhl & Vallejo, 2003).

#### 2.1.1. Estadios morfológicos de *T. rangeli*

Morfológicamente es posible distinguir en el ciclo vital de *T. rangeli* las siguientes formas:

##### 2.1.1.1. En el huésped vertebrado:

- Tripomastigotes sanguíneos circulantes que no se multiplican, en la opinión de la gran mayoría de autores (Guhl & Vallejo, 2003).

##### 2.1.1.2. En el huésped invertebrado o triatóminos vectores:

- Fase intestinal (intestino anterior o "estómago", medio y posterior): Se describen las siguientes formas: amastigotes, epimastigotes (cortos, medianos y largos),



esferomastigotes y tripomastigotes largos y cortos. Tripomastigotes cortos diferentes a los tripanosomas metacíclicas presentes en glándulas salivares, pueden ser encontrados en el recto y ser evacuadas con las heces (D'Alessandro & Gore-Saravia 1999).

- Fase hemolinfática y de parasitismo intracelular de los hemócitos: Los flagelados que parasitan libremente la hemolinfa son formas tripomastigotes, epimastigotes (cortos, medianos y muy largos) y tripomastigotes. Grandes masas de flagelados en activa división binaria longitudinal y también en división múltiple, son observadas. En paralelo, formas intracelulares, esferomastigotes y tripomastigotes, contenidas en el citoplasma muy vacuolizado de los hemócitos son fácilmente observables en los triatóminos vectores naturales (Cuba, 1998).

- Fase en glándulas salivares: En las glándulas salivares del insecto se encuentran las formas tripomastigotes metacíclicas infectivas de *T. rangeli* (Cuba, 1998).

### 2.1.1.3. Características principales de cada uno de los estadios morfológicos:

- *Epimastigote*: (20-40 x 2  $\mu$ m) Forma elongada en la que el flagelo se origina próximo y por delante del núcleo, emerge por un costado del cuerpo arrastrando la membrana citoplasmática en un corto trayecto dando la imagen de una membrana ondulante corta y se libera por el extremo anterior. Este estadio se desarrolla en el vector y en cultivos axénicos y constituye una de las formas proliferativas de *T. rangeli*. Es también la forma de más fácil cultivo *in vitro* (Cuba, 1998).

- *Amastigote*: (2 - 4  $\mu$ m) Forma esférica u ovalada que carece de flagelo libre y tiene capacidad replicativa (Cuba, 1998).

- *Tripomastigote*: (20 x 25  $\mu$ m) Forma elongada con el cinetoplasto situado por detrás del núcleo; el flagelo nace en su proximidad y emerge por un costado del cuerpo, se libera por el extremo anterior creando la imagen de una membrana ondulante de importante extensión; este estadio está presente en la circulación del mamífero (tripomastigote circulante) y carece de capacidad replicativa (Rodríguez *et al.*, 2004).





**Fig. 1.** *Trypanosoma rangeli* (Choachi-2V) en hemolinfa de *Rhodnius prolixus*, día 10 post-infección experimental: se observan dos formas metacíclicas (A) y dos epimastigotas (B), teñidos por Giemsa, 100x (Palau *et al.*, 2001).

### 2.1.2. Ciclo de vida

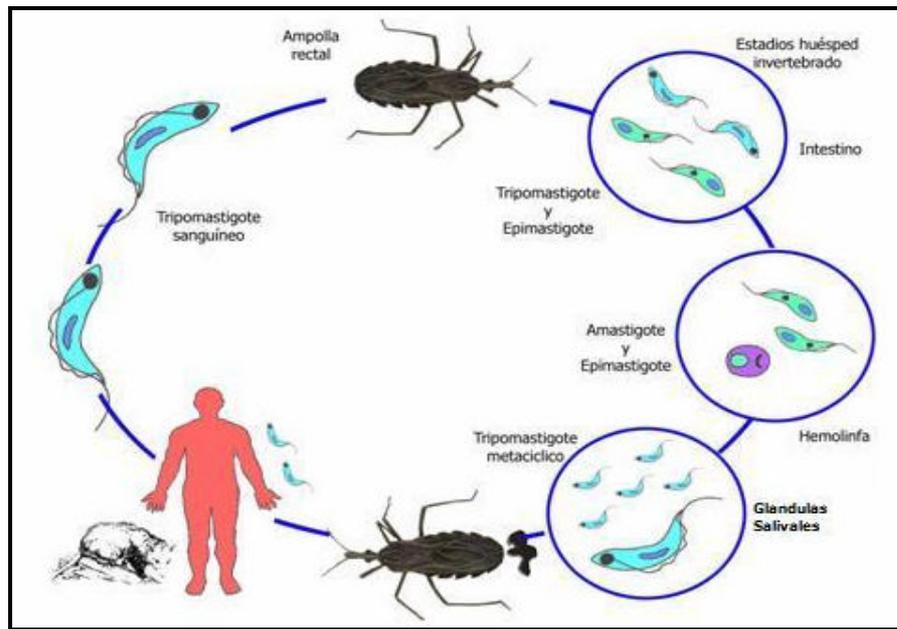
El ciclo de vida esquemático de *T. rangeli* que se presenta en la figura 2, se basa primordialmente en las observaciones hechas en *Rhodnius ecuadoriensis*, triatómino que circula en Ecuador y Perú, y en un modelo murino utilizando cobayas (*Cavia porcellus*) (Cuba, 1998).

La transmisión del parásito se hace principalmente por la picadura del triatomineo vector conocido en nuestro país como “pito” (Fig.3), pero también es posible por la contaminación con deyecciones del insecto. *T. rangeli* se localiza en el vector, en la porción delgada del intestino medio y muy poco en el recto (Fig. 3) (Guhl & Vallejo, 2003).

En el intestino, *T. rangeli* se transforma en epimastigote, que mide de 39 a 60 micras de longitud. Estas formas invaden la hemolinfa, donde se multiplican y llegan a medir hasta 80 micras. Después de 10 a 15 días de estar en la hemolinfa, invaden las glándulas salivares donde se transforman en tripomastigotes metacíclicos, con 13 a 20 micras de longitud (D’Alessandro & Gore-Saravia, 1999; Vallejo & Guhl, 2003).

Por su parte, los huéspedes vertebrados se infectan durante la picadura del insecto infectado, al inocularle durante la mordida saliva rica en las formas

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



**Fig. 2.** Esquema del ciclo biológico de *Trypanosoma rangeli* en sus huéspedes vertebrado e insecto triatómino vector. Se representan las formas más frecuentemente observadas del flagelado (Pavía, 2004).

### 2.1.3. Vectores

Los vectores de *T. rangeli* comprobados biológicamente, son los triatóminos que en condiciones naturales o experimentales tienen capacidad para desarrollar tripomastigotes metacíclicos infectantes en sus glándulas salivares. En 12 de las 15 especies de *Rhodnius* descritas actualmente, se ha comprobado el desarrollo de *T. rangeli* en las glándulas salivares y su capacidad vectorial a través de la picadura en condiciones naturales o experimentales (Guhl & Vallejo, 2003).

En adición a estos vectores, solo se ha reportado la infección natural de *T. rangeli* en glándulas salivares de *Triatoma dimidiata* capturados en viviendas humanas de



Colombia con transmisión para el vertebrado por picadura. La simple presencia de flagelados semejantes a *T. rangeli* en el intestino del insecto no constituye una prueba de la capacidad vectorial del insecto, pues la evidencia definitiva es la demostración de los tripomastigotes metacíclicos en las glándulas salivares con capacidad infectiva para el vertebrado (Vallejo *et al.*, 2000b).

Los vectores triatomíneos se infectan al picar animales que portan el parásito en sangre, seguido de esto los parásitos se desarrollan en el intestino del insecto (Guhl & Vallejo, 2003) e invaden el hemocel y glándulas salivares ocasionando lesiones tales como aumento excesivo de la hemolinfa, procesos anormales de muda y malformaciones (Kreier & Baker, 1992).



**Fig. 3.** *Rhodnius prolixus* (Tomado de <http://wikipedia.org/rhodnius.htm>).

Los vectores transmisores de *T. rangeli* cumplen un papel relevante en la segregación de cepas del parásito con características genéticas diversas, constituyéndose en un modelo biológico importante para comprender procesos de coevolución entre tripanosoma-triatómimo (Urrea *et al.*, 2005). Es así, como se ha podido demostrar la transmisión selectiva de algunos genotipos por parte de los vectores locales, actuando como filtros biológicos del parásito (Vallejo *et al.*, 2007) y sumando evidencias mediante ensayos de RAPDs y morfometría a la relación existente entre cepas KP1 (+) aisladas de *R. prolixus* y cepas KP1 (-) aisladas de *R. ecuadoriensis*, *colombiensis* y *pallescens* (Vallejo *et al.*, 2007).

Sánchez *et al.* (2005) demostraron la existencia de un factor tripanolítico en la hemolinfa de *R. prolixus* frente a la infección experimental con cepas KP1 (-)

aisladas de *R. pallescens*, *ecuadoriensis* y *colombiensis*, lo cual impediría la circulación de las cepas KP1 (-) en vectores circulando al oriente de la cordillera de los andes, confirmando una vez más el papel de filtro biológico que cumplen los vectores en la dinámica de transmisión de los parásitos y la estrecha asociación entre las dos subpoblaciones de *T. rangeli* y las dos líneas evolutivas principales del vector *Rhodnius*.

#### **2.1.4. Reservorios**

Las especies del subgénero *Herpetosoma* suelen tener hospederos específicos, sin embargo *T. rangeli* presenta un amplio rango de reservorios vertebrados distribuidos en cinco ordenes: Edentata, Marsupialia, Carnivora, Rodentia y Primates. Diferentes especies que incluyen ratas, ratones, hámster, conejos, perros, cobayos, murciélagos y primates han sido experimentalmente infectadas con *T. rangeli* (Vallejo *et al.*, 2000b).

#### **2.1.5. Ciclos de transmisión**

La principal vía de transmisión del tripanosoma entre sus hospedadores es la transmisión vectorial en la cual se pueden distinguir tres ciclos: el ciclo silvestre, el ciclo doméstico y el ciclo peridoméstico (Rodríguez *et al.*, 2004).

El ciclo silvestre o ciclo primitivo del tripanosoma es de naturaleza eminentemente zoonótica, donde el protozooario circula entre vectores y reservorios silvestres a lo largo de la mayor parte del continente americano desde hace millones de años. La tripanosomiasis silvestre prefiere ambientes ecológicamente cerrados o semiabiertos, variando en las proporciones de hospederos a vectores dependiendo de una serie de factores como el clima, altitud, humedad, características fauno florísticas y disponibilidad de alimentos (Rodríguez *et al.*, 2004).

En el ciclo doméstico el hombre sobresale como principal reservorio de la infección, llevando al parásito hacia las zonas urbanas y hacia nuevas regiones y países no endémicos, tal como sucede con *T. cruzi* donde es posible hacer una

asociación entre su tipo de transmisión y los linajes actualmente descritos (Triana *et al.*, 2006).

En el ciclo peridoméstico intervienen mamíferos (roedores domésticos, marsupiales, gatos, perros) que libremente entran y salen de las residencias y los triatomíneos silvestres que son atraídos por la luz de las casas y por el alimento. Este ciclo sirve de unión a los ciclos silvestre y doméstico, aunque algunos autores lo incluyen en el ciclo doméstico (Rodríguez *et al.*, 2004).

En este contexto es posible encontrar el parásito en distintas regiones de Latinoamérica, albergándose en mamíferos de medio y pequeño tamaño y en los insectos vectores. Entre otros, prevalecen aquellos ecosistemas donde los vectores pueden formar sus colonias tales como palmeras, cocos, troncos, pedregales, etc. Se trata de un estado de equilibrio desarrollado a través de una larga adaptación que se traduce en la baja o ninguna acción patogénica del protozoario sobre sus hospederos naturales vertebrados (Rodríguez *et al.*, 2004).

## 2.2. Características taxonómicas

La clasificación sistemática de estos parásitos de acuerdo con Maslov *et al.*, (2001) se describe en la tabla 1.

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica del parásito en estudio.

<b>CLASIFICACIÓN</b>	
Super Reino	<i>Eukarya</i>
Reino	<i>Protista</i>
Phylum	<i>Euglenozoa</i>
Orden	<i>Kinetoplastida</i>
Familia	<i>Trypanosomatidae</i>
Género	<i>Trypanosoma</i>
Subgénero	<i>Herpetosoma</i>
Especie	<i>rangeli</i>



Tradicionalmente, *T. rangeli* ha sido clasificado en el subgénero *Herpetosoma*, junto con *T. lewisi*, la especie más importante de este subgénero. Dos secciones sin estado taxonómico fueron creadas por Hoare (1972), para separar los tripanosomas cuyo desarrollo ocurre exclusivamente en el intestino de los vectores y son transmitidos por heces (*Stercoraria*), de los tripanosomas transmitidos por medio de la inoculación de formas metacíclicas en la saliva de las moscas TSE – TSE (*Salivaria*) (Da Silva *et al.*, 2004). En este sentido, *T. rangeli* a pesar de ser también transmitido por la saliva, se ubica en la sección *Stercoraria* junto con *T. lewisi*.

Para que un tripanosoma sea considerado como *T. rangeli* “sensu-esticto”, debe presentar una morfología en la sangre del vertebrado compatible con la morfología del subgénero *Herpetosoma* y debe infectar a los triatóminos vectores con formación de tripomastigotes metacíclicos infectantes en las glándulas salivares (Fig. 1).

De conformidad con lo anterior, los flagelados con morfología del subgénero *Herpetosoma* aislados del intestino en los triatóminos vectores o de la sangre en los vertebrados, capaces de desarrollarse en el intestino, pero incapaces de invadir la hemolinfa y producir tripomastigotes metacíclicos en las glándulas salivares de vectores triatóminos biológicamente comprobados, no podrán ser considerados como *T. rangeli*, siendo definidos como similares a *T. rangeli* o rangeliformes (*T. rangeli*-like) (Vallejo *et al.*, 2000b).

Contribuyendo a esclarecer la posición taxonómica de *T. rangeli* se han analizado las relaciones filogenéticas entre aislados de *T. rangeli* procedentes de humanos, mamíferos silvestres y vectores originarios de diferentes zonas geográficas comparando el ADN de la subunidad pequeña del ARN ribosomal (ARNr). Los resultados obtenidos indican que el subgénero *Herpetosoma* es polifilético y soporta fuertemente la división de este grupo en dos linajes monofiléticos, uno a partir de *T. rangeli* junto con especies relacionadas y otro conformado por *T. lewisi* y taxones relacionados (Da Silva *et al.*, 2004).



En contraste con lo anterior, Añez (1982) propuso remover a *T. rangeli* del subgénero *Herpetosoma* creando el subgénero *Tejeraia* dentro de la sección Salivaria.

De esta forma se propone la validación del subgénero *Herpetosoma* como un taxón conformado solo por especies del grupo *lewisi* y el mantenimiento de *T. lewisi* como la especie tipo de este subgénero; además la clasificación de *T. rangeli*, *T. rangeli-like* y especies relacionadas en un grupo *T. rangeli* relacionado mas cercanamente a las especies del subgénero *Schizotrypanum* (*T. cruzi*) que del *Herpetosoma* (*T. lewisi*) o *Trypanozoon* (*T. brucei*) (Da Silva *et al.*, 2004).

### 2.3. ADNk (ADN del Cinetoplasto)

En los países latinoamericanos en donde *T. cruzi* y *T. rangeli* se presentan en los mismos reservorios y son transmitidos al hombre por los mismos vectores, es de gran importancia el desarrollo de metodologías que permitan la caracterización y el diagnóstico diferencial de los dos parásitos. Donde las secuencias de ADNk o ADN del cinetoplasto se han utilizado para el diagnóstico y caracterización de estos tripanosomátidos, de ahí la importancia de su estudio (Vallejo, 1998).

Este particular ADN representa el genoma mitocondrial y constituye entre el 10 y el 20 % del ADN total. Está conformado por una compleja red, que en cada célula contiene entre 5000 y 10000 minicírculos y 50 maxicírculos concatenados entre si (Thomas *et al.*, 1993). Los maxicírculos son similares al ADN mitocondrial de los eucariotas superiores y codifican ARNs ribosomales y proteínas involucradas en la cadena respiratoria que tiene lugar en la mitocondria. Por su parte los, minicírculos codifican para los ARNs guías involucrados en el proceso de edición del ARN mensajero (ARNm) de los genes mitocondriales. Todos los minicírculos presentan por lo menos una región conservada que varía entre 100 y 200 pb. En *T. cruzi* existen cuatro copias de la región conservada dispuestas en ángulos de 90° como sucede en el minicírculo KP3 de *T. rangeli* (Fig. 4) (Guhl & Vallejo, 2003).



Sorpresivamente, *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 (Fig. 4) en una misma cepa del parásito (Vallejo, 1998). Es así como los minicírculos con una sola región conservada, denominados KP1, tienen un tamaño de 165 pb (Vallejo *et al.*, 1997), mientras que los que poseen dos regiones o KP2, poseen 1,6 kb (Vallejo, 1998) y los minicírculos con 4 regiones conservadas o KP3, tienen un tamaño de 1600 pb (Vallejo, *et al.*, 1997).

La presencia de cada tipo de minicírculo en el parásito se detecta por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los cebadores S35, S36 y KP1L, en donde los productos de amplificación de 165 pb corresponden al minicírculo KP1, en tanto que los fragmentos de 760 pb y 300 – 450 pb corresponden a los minicírculos KP2 y KP3, respectivamente (Vallejo *et al.*, 2002).

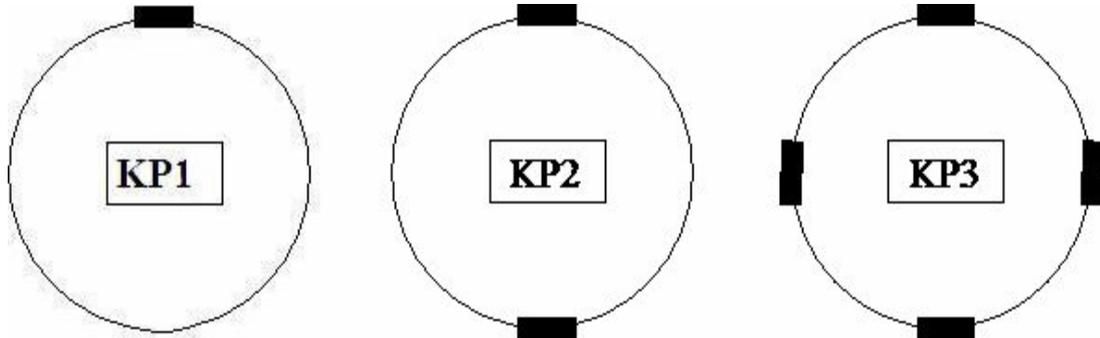
Utilizando la amplificación del ADNk como marcador molecular, en Colombia se han detectado dos grupos de *T. rangeli* molecularmente diferentes. Un grupo de cepas aisladas de *Rhodnius prolixus* que presentan tres clases de minicírculos de ADNk denominados KP1, KP2 y KP3 y otro grupo de cepas aisladas de *Rhodnius colombiensis* que presentan solamente los minicírculos KP2 y KP3 (Vallejo *et al.*, 2000 b).

Estudios de Vallejo, (1998); Vallejo *et al.* (2000 a y b); (2002) y (2003) en el Departamento del Tolima, sugieren la existencia de estas variantes poblacionales en una misma región geográfica, llegando a sugerir la división de *T. rangeli* en dos grupos molecularmente diferentes: cepas KP1 (-) pertenecientes al grupo 1 y cepas KP1 (+), al grupo 2, cada uno con características biológicas y bioquímicas diferentes (Tabla 2).

Al parecer, las especies de *T. rangeli* han coevolucionado con las especies de *Rhodnius*, pues las cepas de *T. rangeli* aisladas de *R. pallescens*, *R. ecuadoriensis*, *R. colombiensis* en Colombia presentan el perfil de *T. rangeli* 1



KP1 (-) y las cepas de *T. rangeli* asiladas de *R. prolixus*, el perfil de *T. rangeli* 2 KP1 (+) (Vallejo *et al.*, 2003).



**Fig. 4.** Representación esquemática de los minicírculos KP1, KP2 y KP3 de *Trypanosoma rangeli*. Los bloques representan las regiones conservadas de cada uno de los minicírculos (Adaptado de Vallejo *et al.*, 1998).

De igual forma se estableció una asociación molecular entre los resultados obtenidos por PCR usando el ADNk y el gen mini-exon, donde las cepas del grupo KP1 (+) amplifican un producto de 340 pb para este último gen y las cepas KP1 (-) amplifican una banda de 380 pb (Urrea *et al.*, 2005).

Los estudios de co-evolución de los parásitos y sus hospederos constituyen un tópico central en la parasitología porque aportan importante información para comprender la filogenia, la adaptación y la especificidad de los parásitos a sus hospederos. Es así como las interacciones entre las subpoblaciones de *T. rangeli* y las diferentes especies del género *Rhodnius* constituyen importantes modelos para los estudios de co-evolución.

Finalmente, Maia Da Silva *et al.*, (2004) estudiando la presencia de polimorfismo en las secuencias del ARNr, encontraron que las poblaciones de *T. rangeli* se distribuyen en cuatro grupos: Grupo A, compuesto de aislados de Colombia, Venezuela, Honduras y Brasil (Rondonia e Islas Marajo); grupo B formado exclusivamente por aislados de Acre, Amazonas y Río Negro medio en Brasil; grupo C constituido por aislados de Panamá, el Salvador y Colombia; y grupo D representado por el aislado SC 58 de Santa Catarina en Brasil.

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

	<b>Grupo 1</b>	<b>Grupo 2</b>	<b>Referencias</b>
<b>Minicírculo KP1</b>	Ausente	Presente	Vallejo <i>et al.</i> , 1998; 2002; 2003
<b>Amplificación del gen mini-exon</b>	380 pb	340 pb	Carranza <i>et al.</i> , 2001, Vallejo <i>et al.</i> , 2003
<b>Vectores</b>	<i>R. colombiensis</i> <i>R. pallescens</i> <i>R. ecuadoriensis</i> <i>P. megistus</i> <i>P. geniculatus</i>	<i>R. prolixus</i>	Vallejo <i>et al.</i> , 2000 a y b
<b>% Lisis mediada por el complemento</b>	0 - 5,5 %	26,60 – 31,4 %	Bernal <i>et al.</i> , 2001
<b>Afinidad por Lectinas (<i>Phytolaca americana</i>)</b>	Negativo	Positivo	Bernal <i>et al.</i> , 2001
<b>Producción de Neuraminidasa</b>	Mayor	Menor	Bernal <i>et al.</i> , 2001
<b>Reactividad cruzada antigénica</b>	Si	Si	Ayala <i>et al.</i> , 2001

## 2.4. Variabilidad de *T. rangeli*

Las primeras evidencias de variabilidad entre aislados de este parásito fueron reportadas por Zeledón, (1965) y más tarde por Souza, (1966), quienes encontraron que las cepas de *T. rangeli* aisladas en Panamá, a diferencia de las aisladas en Colombia y Venezuela, no se desarrollaban en el vector *Rhodnius prolixus*, sino en *Rhodnius pallescens*. Desde entonces, se han realizado diversos estudios tendientes a dilucidar el grado de polimorfismo de *T. rangeli*.

### 2.4.1. Bioquímica

Varios métodos bioquímicos se han aplicado a la caracterización de *T. rangeli*. Entre ellos se destacan la sensibilidad a la lisis mediada por el complemento, la caracterización de los azúcares de superficie utilizando lectinas, la producción de



neuraminidasa, la caracterización antigénica y el análisis de isoenzimas (Vallejo *et al.*, 2000b).

#### **2.4.1.1. Respuesta a la lisis mediada por el complemento**

En contraste con los epimastigotes de cultivo de *T. cruzi* los epimastigotes de cultivo de *T. rangeli* son resistentes a la lisis mediada por el complemento activado por la vía alterna. Esta diferencia en la susceptibilidad a la lisis mediada por el complemento ha sido utilizada para diferenciar las dos especies en cultivo a nivel del intestino del vector (Schotellus & Muller, 1984; Marinkelle *et al.*, 1985).

No obstante, se ha observado que el comportamiento frente al complemento varía según la cepa de *T. rangeli*, es así como las cepas KP1 (-) presentan un mayor porcentaje de resistencia a la lisis mediada por el complemento que las KP1 (+) (Tabla 2) (Bernal *et al.*, 2001).

#### **2.4.1.2. Isoenzimas**

Los estudios realizados con *Trypanosoma rangeli* son escasos y además en cada estudio se ha utilizado un número pequeño de cepas. Holguín *et al.*, (1987) analizaron cepas de *T. rangeli* de ciclos selváticos y doméstico en Colombia. Estos autores estudiaron 14 enzimas: Glucosa fosfato isomerasa (GPI), Fosfoenol piruvato sintasa (PEP), Manosa 6-Fosfato Isomerasa (MPI), Fosfoglucomutasa (PGM), Alanina amino transferasa (ALAT), Aspartato aminotransferasa (ASAT), Aconitato hidratasa (ACON), Malato deshidrogenada (MDH), Piruvato Quinasa (PK), Isocitrato deshidrogenasa (ICD), Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), Lactato deshidrogenasa (LDH), Fosfoglucoquinasa (PGK) y la Enzima mállica (ME). Los autores encontraron que solo la enzima Isocitrato deshidrogenasa (ICD) mostró alguna variación, indicando que las isoenzimas no conseguían diferenciar las cepas domésticas de las silvestres, contrario a lo sucedido con *T. cruzi* (Vallejo *et al.*, 2000b).

Diferentes estudios de perfiles isoenzimáticos de cepas de *T. rangeli* indican que estos perfiles son menos similares cuando la distancia geográfica de los lugares de



los aislados se incrementa. Los parásitos aislados de Colombia, Venezuela y Honduras muestran menor variabilidad con respecto al patrón isoenzimático comparado con los aislados de Santa Catarina - Brasil (Steindel *et al.*, 1992; 1994).

#### **2.4.1.3. Neuroaminidasa**

Pereira & Moss (1985), reportaron que los epimastigotes de cultivo de *T. rangeli* a diferencia de los de *T. cruzi*, producen neuraminidasas en cantidades fácilmente detectables. Consecuentemente, esta enzima es un importante marcador bioquímico que permite la diferenciación de las dos especies de flagelados.

Llamativamente, estudios de Vallejo & Guhl 2003, sugieren que las cepas de *T. rangeli* varían en la producción de neuroaminidasa, donde en las cepas KP1 (+) es menor que en las KP1 (-) (Tabla 2) (Bernal *et al.*, 2001).

#### **2.4.1.4. Lectinas**

Varios investigadores han caracterizado los azúcares de superficie de *T. cruzi* y *T. rangeli* mediante afinidad específica con varias lectinas. Se ha encontrado que los epimastigotes de *T. cruzi* y *T. rangeli* presentan manosa y glucosa en su superficie celular, presentando aglutinación común con las lectinas de *Cannavalla ensiformis*. No obstante, la presencia de residuos de N – Acetilgalactosamina en la superficie de *T. rangeli* permite aglutinación específica por las lectinas de *Vicia villosa* y *Phytolaca americana* (De Miranda Santos & Pereira, 1984).

De especial interés es el hecho de que tal como se observa en la tabla 2, existen diferencias entre las cepas del grupo 1 y grupo 2 de *T. rangeli* en su afinidad por las lectinas, como es el caso de las lectinas de *Phytolaca americana*, las cuales muestran un mayor porcentaje de aglutinación con las cepas de *T. rangeli* 2 o KP1 (+) (Bernal *et al.*, 2001).



#### 2.4.2. Genética

Durante mas de tres décadas los investigadores han detectado variabilidad en la biología de las poblaciones de *T. rangeli* de diferentes orígenes geográficos. Tratando de comprender esta variabilidad se han aplicado técnicas bioquímicas y moleculares para la caracterización de estas poblaciones. Así por ejemplo los estudios de huella digital del ADN por Macedo *et al.*, (1993) mostraron diferencias genéticas entre las cepas de Brasil y las aisladas en Honduras, Colombia y Venezuela.

Estudios realizados por Steindel *et al.*, (1994) empleando técnicas de amplificación aleatoria de ADN polimorfo (RAPD) y análisis de isoenzimas también revelaron dos grupos distintos de cepas de *T. rangeli*, uno formado por las cepas de Santa Catarina (Brasil) y el otro, por las cepas procedentes de Colombia, Honduras y Venezuela, confirmándose lo reportado en el estudio anterior.

Grisard *et al.*, (1999) determinó la existencia de variabilidad en las secuencias del gen mini-exon entre las cepas de estos países, confirmando entonces los anteriores estudios, según los cuales las cepas oriundas de Centro América y la región Norte de Sur América difieren de las cepas del Brasil.

Estudios realizados por Henriksson *et al.*, (1996) y Toaldo *et al.*, (2001), analizando cariotipos moleculares de varias cepas de *T. rangeli* han mostrado una variación en el tamaño de las bandas cromosómicas desde 400 kb hasta 2900 kb revelando polimorfismo cromosómico entre cepas aisladas de El Salvador, Honduras, Venezuela, Colombia y Panamá y cepas del sur del Brasil.

Por otro lado, según lo demostrado por Beltrame-Botelho *et al.*, (2004) al utilizar los espaciadores internos transcritos (ITS) de la subunidad 5,8 S en el ADNr de distintas especies de *T. rangeli*, se estableció este como un marcador útil en la diferencia inter-especies con tripanosomátidos como *T. cruzi*, pero no arrojo evidencias significativas que permitan agrupar las cepas de *T. rangeli* en los dos



grupos moleculares ya caracterizados, formando una única agrupación con alta confianza por las mínimas diferencias encontradas.

## 2.5. Histonas

Las histonas son proteínas estructurales que juegan un importante rol en la organización y función del ADN dentro del núcleo eucariótico. Ellas son proteínas altamente básicas y extremadamente conservadas a lo largo de la escala evolutiva (Cummings *et al.*, 2005). Las histonas se asocian con el ADN en todas las células eucarióticas y permiten su empaquetamiento en los nucleosomas, la unidad estructural básica de la cromatina. El núcleo central de los nucleosomas consiste de un complejo octamérico de cuatro histonas H2A, H2B, H3 y H4 (Fig. 5B), asociado a un fragmento de ADN de 146 pb, que envuelve al octámero (Lewin, 2004).

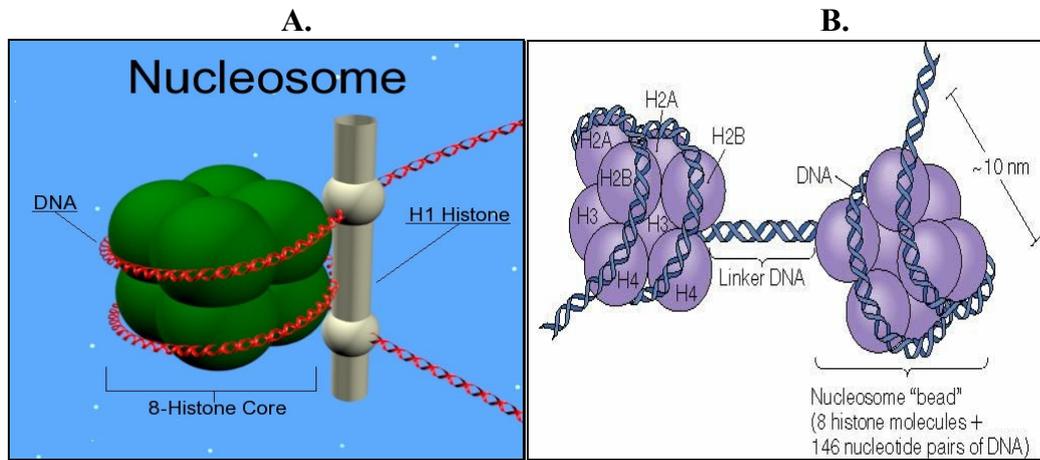
Una quinta Histona, H1, se sitúa por fuera del octámero, en el ADN enlazante, sellando dos giros completos de ADN (Fig. 5A) (Galanti *et al.*, 1998) y se presenta con mayor variabilidad de secuencia y tamaño en distintas especies o tejidos, mientras que las otras cuatro están altamente conservadas (Luque & Herraes, 2001).

Una vez formados los nucleosomas, estos se condensan formando fibras de 10 y 30 nm. Estas fibras poseen un enrollamiento helicoidal que da lugar a una estructura de solenoide, el cual contiene 6 nucleosomas por vuelta y se organiza en un orden de estructura superior formando gigantescos 'loops', los cuales constituyen el componente básico tanto de la cromatina en interfase, como de los cromosomas mitóticos (Lewin, 2004).

Recientemente, ha sido descrito como las histonas no solamente desarrollan un papel fundamental en el empaquetamiento del ADN, sino que intervienen en los eventos que requieren de un cambio en la configuración de la cromatina: recombinación, replicación, reparación del ADN y transcripción. Por ejemplo, durante la transcripción de algunos genes, se ha visto que la acetilación de los residuos de lisina de ciertas histonas, mediada por la enzima histona



acetiltransferasa, participa en la inducción de la expresión de los mismos (Wolffe & Hayes, 1999).



**Fig. 5.** A) Representación esquemática del nucleosoma constituido por dos copias de las Histonas (H2A, H2B, H3, H4) formando un octámero alrededor del cual se enlaza el ADN, la quinta histona H1 se ubica en el exterior de la estructura. B) El núcleo de histonas se señalan y se muestra como se enlaza cada uno de los nucleosomas a través del ADN 'linker' (Cummings *et al.*, 2005).

### 2.5.1. Histona H2A en *T. rangeli*

Según lo reportado por Puerta *et al.*, (2000) el locus codificante para la histona H2A en la cepa C23 KP1 (-) de *T. rangeli* está conformado por lo menos de 11 unidades génicas de 790 nucleótidos (nts) de longitud, organizadas en tandem y localizadas en un único cromosoma de aproximadamente 1,9 mb. Las unidades génicas activamente se transcriben en un ARNm de 700 nts, los cuales se encuentran poliadenilados.

En contraste, en *T. cruzi*, existen dos tipos de unidades codificantes para la histona H2A: 0,76 y 1,2 kb, las cuales básicamente difieren en la inserción de una secuencia del tipo 'Short Interspersed Nucleotide Element' (SINE) en la región 3' no traducida de las unidades de 1,2 kb, y dan origen a su vez, a dos tipos de transcritos diferentes, los cuales adicionalmente se regulan diferencialmente durante el ciclo celular del parásito (Marañón *et al.*, 2000).

De otra parte, la histona H2A de *T. rangeli* de la cepa C23 (Tabla 3) es una proteína de 135 aminoácidos que tiene teóricamente un punto isoelectrico de 12,12 y un peso molecular de 14,45 kDa (Asford & Horn, 2004). Análisis comparativo de esta secuencia con la histona H2A de *T. cruzi*, *Leishmania infantum*, *Crithidia fasciculata* y humano, muestra un 94, 76, 74 y 50 % de identidad, respectivamente (Puerta *et al.*, 2000).

Estudios recientes de Cuervo *et al.*, (2004; 2006), mostraron que los genes codificantes para la histona H2A en la cepa H14 KP1 (+) del parásito, básicamente comparten la misma región codificante, con un 99,5 % de identidad. Por el contrario, la región intergénica tiene un 5 % de divergencia (Fig. 6). Con base en estos resultados, se estandarizó una prueba de PCR – ‘Low Stringer Single Primer’ (LSSP) para distinguir entre cepas de *T. rangeli* KP1 (+) y KP1 (-).

Otra diferencia importante entre estas cepas KP1 (+) y KP1 (-) del parásito es la localización cromosómica de los genes H2A, por cuanto el análisis de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) reveló que en las cepas Choachí y H14, KP1 (+), los genes H2A están localizados en dos cromosomas de 1,1 y 1,9 mb, mientras que en las cepas Tre y 5048 KP1 (-) están localizados en cromosomas de 1,7 y 1,9 mb (Tabla 3) (Cuervo *et al.*, 2006). Resultados similares fueron encontrados para el gen KMP-11 (Urueña *et al.*, 2004; Diez *et al.*, 2005).



**Tabla 3.** Características de los genes de las Histonas H2A descritos en tripanosomátidos

<b>HISTONA</b>	<b>TAMAÑO DE LA UNIDAD (pb)</b>	<b>NUMERO DE COPIAS</b>	<b>CROMOSOMA (pb)</b>	<b>TAMAÑO TRANSCRITO (pb)</b>	<b>PRESENCIA DE HORQUILLA 3' UTR *</b>	<b>VARIABILIDAD</b>	<b>TIPO DE REGULACION</b>	<b>REFERENCIAS</b>
H2A <i>T. cruzi</i>	1200	Difiere entre las diversas cepas	Varia entre 0,65 1,1 kb entre cepas	1000	SI	En el número de copias de las unidades entre cepas, en el tamaño de los cromosomas y la ubicación.	Post transcripcional asociada a la replicación del ADN para las formas replicativas, transcripcional para las formas no replicativas.	Marañon <i>et al.</i> , 2000 Thomas <i>et al.</i> , 2000 Marañon <i>et al.</i> , 1998
H2A <i>L. infantum</i>	676	2 clusters cada uno con 3 copias	--	398 por copia	SI	En la región 3'UTR	Post-transcripcional	Soto <i>et al.</i> , 2003 Soto <i>et al.</i> , 2004
H2A <i>T. rangeli</i> 2 (H14)	800	11-12	1,1 1,9	700	SI	En la secuencia de nts entre las unidades de una misma cepa	ND	Cuervo <i>et al.</i> , 2006
H2A <i>T. rangeli</i> 1 C23	800	Menos de 11	1,7 1,9	700	SI	En la secuencia de nts entre las unidades de una misma cepa.	ND	Puerta <i>et al.</i> , 2000

\* UTR: "Untranslated transcribed region".

H14_Int	TAGATACACC	TGGGGGAACG	CCATTGCCCA	GCCACGGTGA	CTCACGTGTG
C23_Int	TAGATACGCC	TGGGGGAACG	CCATTGCCCA	GCCACAGTGA	CTCACGTGTG
H14_Int	GCCCCATAGA	ATAGTGTGTT	TGTTTTTATT	TATTTATTTG	TGTTGGCGTG
C23_Int	GCCCCATAGA	ATAGTGTGTT	TGTTTTTATT	TATTTATTTG	TGTTGGCGTG
H14_Int	GCTTCTCCCA	ATTTCTCCTC	TCGCCTCTTC	CACGGGAATG	CGCAACGTCC
C23_Int	GCTTCTCCCA	ATTTCTCCTC	TCGCCTCTTC	CACGGGAATG	CGCAACGTC-
H14_Int	TTGTTTTTTT	TTTGGATTTT	TGAAACATTT	TCGCCGGCAC	CTGGCGGCGG
C23_Int	---TTTTTTT	TTTGGATTTT	TGAAACATTT	TCGCCGGCAC	CTGGCGGCGG
H14_Int	CGTGGGTGCT	GCGTCTGCTT	TCTGTGGCTG	CATGCGTGCT	TTCTCCTTTT
C23_Int	CGTGGGTGCT	GCGTCTGCTT	TCTGTGGCTG	CATGCGTGCT	TTCTCCTTTT
H14_Int	TTCTTTTTTT	TGTTTCCTTC	TTGTATTGT-	-TTTCTTTGT	TTTTCAAGAT
C23_Int	T-----TTTT	TGTTTCCTTC	TTGTGTTGTG	TTTTCTTTGT	TCTTCAAGAT
H14_Int	CACAGCTGCA	ACAAGCAA			
C23_Int	CACAGCTGCA	ACAAGCAA			

**Fig. 6.** Alineamiento de la región intergénica de la Histona H2A entre las cepas C23 KP1 (-) y H14 KP1 (+) de *T. rangeli*, según las secuencias reportadas en el GenBank (No de acceso: AF169130, y AY147905 respectivamente). En rojo se denota el iniciador H14 IntF y en azul se denota el iniciador H14 IntR los cuales amplifican un fragmento de aproximadamente 310 pb.

## 2.6. Aproximaciones filogenéticas

Según Li (1997), los datos moleculares, en particular las secuencias de ADN son herramientas más poderosas que los datos morfológicos y físicos en los estudios evolutivos, ya que estos construyen las características fenotípicas de un individuo, sus datos son mucho más manejables para tratamientos cuantitativos y son mas abundantes, lo cual es específicamente útil en el estudio de microorganismos.

Los árboles filogenéticos sirven para ilustrar las relaciones evolutivas entre un grupo de organismos, este se compone de nudos y ramas, donde una rama conecta dos nudos adyacentes, los nudos representan las unidades taxonómicas (especies, poblaciones, individuos o genes) y las ramas definen las relaciones entre las unidades en términos de descendiente y ancestro, el patrón de ordenamiento de estas ramas se conoce como topología y la longitud de la rama usualmente representa el número de cambios que han ocurrido en la rama (Nei, 1987).

Dichos árboles pueden ser enraizados o sin raíz, en los primeros existe un nudo particular llamado raíz, desde el cual una única ruta lleva a algún otro nudo. La

dirección de cada ruta corresponde al tiempo evolutivo, y la raíz (outgroup) es el ancestro común de todas las unidades taxonómicas operativas (OTUs) bajo estudio. Un árbol sin raíz es un árbol que solo especifica las relaciones entre los OTUs, pero no define la ruta evolutiva, los árboles sin raíz no hacen suposiciones o requieren conocimiento acerca de ancestros comunes (Li, 1997).

Un grupo de taxa se dice ser monofilético si estos son derivados desde un ancestro común único, pero se le llama polifilético si estos son derivados desde más de un ancestro común. También es posible llamar un grupo como parafilético si los taxones son derivados desde un ancestro común, pero el grupo no incluye todos los taxones descendientes del mismo ancestro común (Li, 1997). En estudios de filogenética es importante la identificación de clados, un clado es definido como un grupo monofilético que incluye todas las especies descendientes del ancestro común (Nei, 1987).

Autores como Nei, (1987) y Felsenstein, (1988) han propuesto distintos métodos para reconstruir árboles, porque un único método no se desarrolla bien bajo todas las circunstancias. Estos métodos pueden ser clasificados en cuatro tipos: métodos de matriz de distancia, métodos de máxima parsimonia, métodos de máxima verosimilitud y métodos bayesianos. En los métodos de matriz de distancia, las distancias evolutivas (números de nucleótidos o sustituciones de aminoácidos entre secuencias) son computadas para todos los pares de taxones y el árbol filogenético es construido usando un algoritmo basado sobre algunas relaciones funcionales entre los valores de distancia. En los métodos de máxima parsimonia, son usados los caracteres de estado (la posición del nucleótido o el aminoácido) y la ruta mas corta que conduce a estos caracteres de estado es escogida como el mejor árbol. En el método de máxima verosimilitud se busca el valor máximo para las configuraciones de estado de carácter entre las secuencias en estudio para cada árbol posible y escoge como árbol preferido aquel con el valor de ML mas grande (Li, 1997).



Una gran controversia ha sido desarrollada en taxonomía, la cual se basa en la disputa entre cladistas y feneticistas, el termino cladistico puede ser definido como el estudio de las rutas de la evolución, en otras palabras, están interesados en cuantas ramas hay entre un grupo de organismos, cual rama se conecta con otra y cual es la secuencia en el ordenamiento de las ramas. Un cladograma es un árbol que representa las relaciones entre ancestro y descendiente, refiriéndose a la topología de un árbol filogenético enraizado (Avisé, 1994).

Por otro lado, la fenética es el estudio de las relaciones entre un grupo de organismos sobre la base del grado de similaridad ente ellos, bien sea por su similaridad molecular, fenotípica o anatómica y el árbol que expresa estas relaciones fenéticas es llamado fenograma, el cual puede servir como un indicador de relaciones cladisticas y no necesariamente es idéntico al cladograma. Si hay relación lineal entre el tiempo de divergencia y el grado de divergencia genética (o morfológica), los dos tipos de árboles podrían ser idénticos el uno con el otro (Avisé, 1994).

### **2.6.1. Métodos de distancia**

Estos métodos se fundamentan en la idea de que al poder conocer la distancia evolutiva actual entre todos los miembros de un grupo de secuencias, es posible reconstruir la historia evolutiva de estas secuencias, basada en las relaciones entre las distancias presentes en el árbol (Tabla 4) (Page & Holmes, 2000).

Considerando los métodos de distancia, es posible distinguir entre métodos para construir árboles y métodos para obtener distancias. Sí la estimación de la distancia evolutiva es pobre, entonces el desempeño de un método de distancia puede ser afectado adversamente, lo cual no puede ser una verdadera reflexión de los meritos del método para construir el árbol por si mismo. Las mayores objeciones para los métodos de distancia han sido; que al resumir un grupo de secuencias por una matriz de distancia en los pares de bases se pierde información



y que las longitudes de las ramas estimadas por estos métodos no pueden ser interpretables evolutivamente (Page & Holmes, 2000).

#### **2.6.1.1. Método ‘Neighbor-Joining’(NJ)**

Es un método relacionado conceptualmente al análisis por agrupamiento, pero también permitido para tasas desiguales de cambios moleculares entre ramas, es ampliamente usado para la construcción de árboles, el cual combina velocidad computacional con resultados únicos (más implementaciones dan un árbol sencillo), estos dos atributos lo han hecho muy atractivo (Page & Holmes, 2000).

Este es un método de agrupamiento mas no un método óptimo y así mismo sufre de las limitaciones que este no optimiza a criterio de tamaño entre el árbol y los datos, sin embargo, es un buen método heurístico para estimar la mínima evolución (ME) del árbol. Una estrategia para encontrar la mínima evolución del árbol es primero computar el árbol de NJ, después observar si en cualquier rearrreglo local del árbol NJ se produce un árbol mas corto. Esta estrategia no garantiza encontrar el árbol de ME, pero a menudo estos dos tipos de árboles son muy similares (Page & Holmes, 2000).

#### **2.6.2. Métodos discretos**

En contraste a los métodos de distancia, los métodos discretos operan directamente sobre las secuencias o en funciones derivadas de estas, más que sobre las distancias apareadas (Tabla 4). De allí la procura para evitar la pérdida de información que ocurre cuando las secuencias son convertidas a distancias. Los dos métodos más discretos son la máxima parsimonia (MP) y la máxima verosimilitud (ML); el primero escoge el árbol (o árboles) que requieren los menores cambios evolutivos, y el ML escoge el árbol (o árboles) que de todos los árboles es el más probable de haber producido los datos observados (Page & Holmes, 2000).



### 2.6.2.1. Método Máxima Parsimonia (MP)

El principio de la máxima parsimonia es la búsqueda de un árbol que requiere el número más pequeño de cambios evolutivos para explicar las diferencias observadas entre los OTUs bajo estudio (Li, 1997).

Los datos para máxima parsimonia comprenden los sitios individuales para cada nucleótido; para cada sitio, la meta es reconstruir la evolución de este sitio sobre un árbol sujeto a la restricción de apelar al menor número de cambios evolutivos posibles (Page & Holmes, 1998). A este árbol se le conoce como árbol de máxima parsimonia, cuya particularidad radica en lo que corresponde al árbol con el número más largo de sitios informativos, donde el principio básico radica en inferir el mínimo número de sustituciones requeridas para un árbol dado, entre mas grande sea el número de secuencias a trabajar hay muchos más árboles posibles para considerar, a su vez que el número de sustituciones para cada sitio informativo (Felsenstein, 2003).

Finalmente, se escogerá el árbol o árboles con el número mínimo de sustituciones y si existe más de un árbol parsimonioso, un único árbol no podrá ser inferido (Li, 1998).

### 2.6.2.2. Método Máxima Verosimilitud o ‘Maximum Likelihood’ (ML)

El método ML fue desarrollado por Felsenstein (1973, 1981) quien desarrolló algoritmos ML para aminoácidos o secuencias de nucleótidos; este requiere de un método probabilístico para el proceso de sustitución de nucleótidos. Es decir, se debe especificar la probabilidad de transición desde un estado de nucleótido a otro en un intervalo de tiempo en cada rama (Li, 1997).

‘Likelihood’ es la probabilidad de observar los datos dado un modelo particular, diferentes modelos pueden hacer estos datos mas o menos probables, este método surge del hecho de poder encontrar la probabilidad de obtener D dado H, en el contexto de filogenia molecular, D es el grupo de secuencias para comparar y H es el árbol filogenético, por lo tanto se pretende encontrar la probabilidad de obtener



las secuencias observadas dado un árbol particular. No se debe confundir el termino 'likelihood' con la probabilidad de que este árbol mostrado es el real, más bien es la probabilidad de que el árbol se ha ocasionado según los datos colectados (Page & Holmes, 1998).

### 2.6.3. El valor 'Bootstrap'

Este valor en estadística es una técnica computacional para estimar parámetros cuando la distribución es difícil de derivar analíticamente, se ha utilizado frecuentemente como una manera de estimación el nivel de confianza para la hipótesis filogenética (Li, 1997). Este valor se utiliza como una alternativa de remuestreo donde el número de réplicas serán puestas por el usuario y con base en este número se calculará el porcentaje de confiabilidad para cada rama.

El 'Bootstrap' asume que la muestra original puede representar un espacio original, tanto que cada pseudomuestra puede ser tratada como una muestra real. Obviamente, para llegar bien a esta suposición, la muestra original debe ser lo suficientemente larga. Este remuestreo debe tener un reemplazo, de lo contrario todas las pseudomuestras son las mismas excepto los sitios que son arreglados en diferente orden, lo cual no producirá ninguna variabilidad entre pseudomuestras (Li, 1997).

**Tabla 4.** Algunos de los métodos filogenéticos más comúnmente utilizados, clasificados según el tipo de datos usados y el método para construir el árbol (Page & Holmes, 1998).

		Tipo de datos	
		Distancia	Sitio Nucleótidos
Método de construcción del árbol	Algoritmo de agrupamiento	UPGMA Neighbour Joining	
	Criterio óptimo	Mínima evolución	Máxima Parsimonia Máxima verosimilitud



### 3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

#### 3.1. Formulación del problema

La importancia del estudio de *T. rangeli* se enmarca en el contexto de su asociación con *T. cruzi*, el agente causal de la enfermedad de Chagas. Esta enfermedad es una parasitosis caracterizada por la presencia de cardiopatía o daños intestinales. Es de amplia distribución en Centro y Sur América, encontrándose únicamente en el hemisferio americano desde México hasta el sur de la Argentina (OMS, 2002).

Estudios encabezados por el Ministerio de Salud, en colaboración con el Centro de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Tropical (CIMPAT) de la Universidad de los Andes, el Centro de Investigaciones de Enfermedades Tropicales (CINTROP) de la Universidad Industrial de Santander y el Instituto Colombiano de Medicina Tropical (ICMT), estimaron que alrededor del 7 % de la población colombiana está infectada y que cerca del 23 % está en alto riesgo de adquirir la infección (Guhl & Nicholls, 2001).

Por otro lado, *Trypanosoma rangeli* es la segunda especie de tripanosoma que con frecuencia infecta al hombre en Colombia y en varios países latinoamericanos, adquiriendo gran importancia en los últimos años debido a que puede producir infecciones mixtas con *T. cruzi*. Además, *T. rangeli* complica el diagnóstico por infección con *T. cruzi* ya que estos parásitos inmunológicamente presentan reactividad cruzada. Adicionalmente, la presencia de *T. rangeli* en ambos ciclos de transmisión de la enfermedad de Chagas (domiciliar y silvestre) (Vallejo & Guhl, 2003), hace necesaria la caracterización molecular de las cepas de *T. cruzi* y *T. rangeli*.

Así mismo, estudios recientes demuestran como la inmunización de ratones con cepas de *T. rangeli* inducen una respuesta protectora frente al reto con cepas virulentas de *T. cruzi* (Paláu *et al.*, 2003; Basso *et al.*, 2004). De manera que la



caracterización molecular de las cepas de *T. rangeli* es determinante con miras a su utilización en estrategias de inmunización contra la infección por *T. cruzi*.

### 3.2. Preguntas de investigación

Con base en antecedentes moleculares (Cuervo *et al.*, 2006), se evidenció la posibilidad de utilizar la región intergénica para la histona H2A en *T. rangeli* como un marcador molecular para las subpoblaciones mencionadas y de esta forma contribuir con otra herramienta para esclarecer el panorama filogenético de este organismo, teniendo en cuenta la importancia de este modelo biológico a nivel clínico.

De esta manera, se pretende utilizar la región intergénica del gen H2A como un marcador molecular que permita distinguir los dos grupos moleculares de *T. rangeli* postulados actualmente como cepas KP1 (+) y KP1 (-), donde se puedan observar diferencias en las secuencias estudiadas que soporten la clasificación actual y sea de útil comparación dentro de la especie y con otros tripanosomátidos.

### 3.3. Justificación de la investigación

Estudios realizados por Urrea *et al.*, (2005) observaron mediante técnicas de PCR e hibridación, que la secuencia del minicírculo KP1 está presente en todas las cepas de *T. rangeli* aisladas del vector *R. prolixus*, mientras esta ausente en las cepas aisladas de vectores de la línea evolutiva *Pallescens* (*R. colombiensis*, *R. pallescens* y *R. ecuadoriensis*). Estos hallazgos sugieren la existencia de dos grupos de *T. rangeli* molecularmente diferentes y denominados como cepas KP1 (+) y KP1 (-) (Vallejo *et al.*, 2002).



Bajo este esquema surge la necesidad de estudiar los distintos grupos de *T. rangeli* encontrados y reportados hasta el momento, caracterizando sus aspectos mas relevantes, teniendo en cuenta la importancia a nivel de diagnostico, genética e inmunoterapia de este parásito enmarcado en lo correspondiente a la enfermedad de Chagas, de gran interés en nuestro país y América latina.

Se estudiará la región no codificante o intergénica de los genes H2A puesto que dicha región no esta sometida a presión evolutiva de codificar para un producto protéico funcional y por lo tanto puede acumular más mutaciones. Sin embargo, diferentes estudios muestran como la regulación de la expresión génica en tripanosomátidos ocurre a nivel post-transcripcional a través de elementos localizados en esta región (Folgueira *et al.*, 2005). En este sentido vale la pena mencionar que estudios recientes en *T. cruzi* han demostrado como el análisis de las secuencias 3' del gen de la calmodulina permite diferenciar los linajes *T. cruzi* I y *T. cruzi* II de este parásito (Brandao & Fernández, 2006).



## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo general

- Utilizar la región intergénica del gen Histona H2A como un marcador molecular que permita distinguir los dos grupos moleculares de *T. rangeli* postulados actualmente como cepas KP1 (+) y KP1 (-).

### 4.2. Objetivos específicos

- Comparar los fragmentos obtenidos de la región intergénica del gen para la histona H2A entre cepas KP1 (+) y KP1 (-) de *Trypanosoma rangeli*.
- Observar diferencias en las secuencias que soporten la clasificación actual y sea de útil comparación dentro de la especie y con otros tripanosomátidos.
- Determinar las relaciones evolutivas presentes entre las secuencias de *T. rangeli* empleadas mediante la reconstrucción de árboles filogenéticos.



## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Metodología general

Con los objetivos planteados y los antecedentes teóricos previamente descritos, se elaboró el correspondiente diseño experimental el cual se describe de forma global en la figura 7.

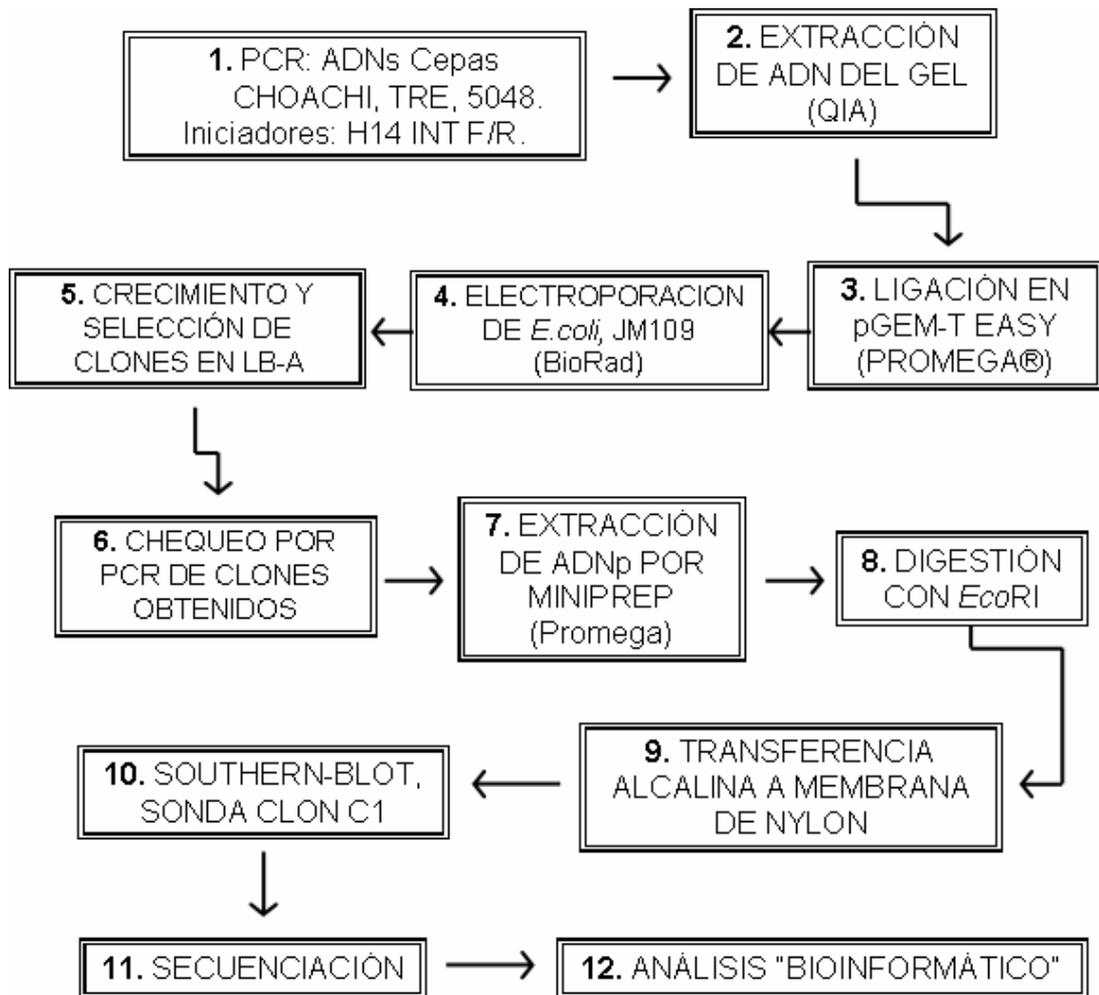


Fig. 7. Esquema general de la metodología empleada.

## 5.2. ADN de los parásitos

Se utilizaron ADNs de las diferentes cepas de *T. rangeli* como se indica en la tabla 5, los cuales hacen parte del banco ADN o genoteca del laboratorio de Parasitología Molecular (LPM) de la Pontificia Universidad Javeriana (PUJ). Con las cepas H14 (No de acceso: AY147905), C23 (AF169130) y *T. cruzi* cepa Y (AF167074) se utilizaron las secuencias reportadas en el NCBI GenBank

**Tabla 5.** Clasificación de las cepas utilizadas en este estudio  
\* Secuencias obtenidas desde el GenBank.

NOMBRE	CÓDIGO	PROCEDENCIA	GRUPO	KP1	REFERENCIA
Tre		Colombia	1	-	Morales <i>et al.</i> , 2002
C23*	MAOT/CO/8 2/C-23	San Marcos (Sucre)	1	-	Zúñiga <i>et al.</i> , 1997
5048	MHOM/CO/ 99/5048	Santa Marta	1	-	Morales <i>et al.</i> , 2002
Choachí	IRHO/CO/86/ Choachí	Cundinamarca	2	+	Vallejo, 1998
H14*	MHOM/Hond /H14	Honduras	2	+	Acosta <i>et al.</i> , 1991

## 5.3. Clon C1

Se trabajó con el clon C1, el cual codifica para la histona H2A de la cepa H14 KP1 (+) de *Trypanosoma rangeli* (Cuervo *et al.*, 2006). Dicho clon contiene un fragmento de 935 pb, el cual consta de un marco abierto de lectura (ORF) de 408 pb seguido por la región intergénica de 391 pb y por las primeras 146 pb del ORF de la siguiente unidad, clonado en el sitio múltiple de clonación del plásmido pGEM®-T Easy (Cuervo *et al.*, 2006) (Fig. 8 y 9).



#### 5.4. Amplificación de la región no codificante del gen histona H2A

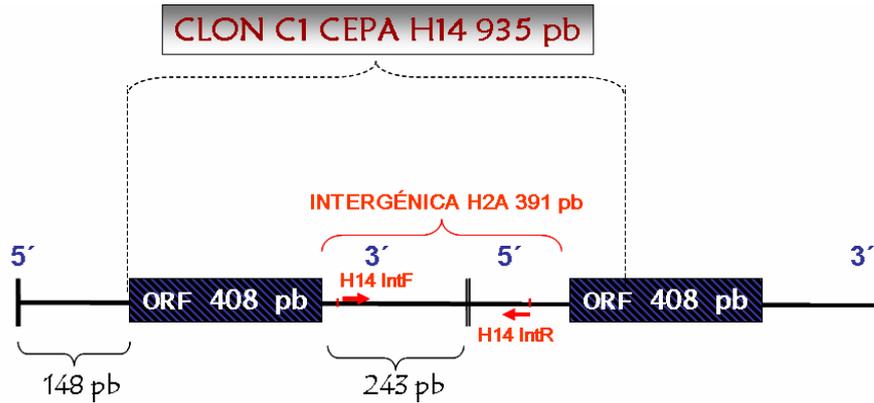
Para la amplificación de la región intergénica del gen codificante para la Histona H2A en *Trypanosoma rangeli* se realizó un ensayo de PCR usando los iniciadores H14 IntF (5' TAGATACACCTGGGGGAACG 3') y H14 IntR (5' TCACAGCTGCAACAAGCAAAC 3'), los cuales amplifican un fragmento de aproximadamente 310 pb (Fig. 8). Para ello se utilizaron 125 ng de ADN genómico del parásito, 20 pmoles de cada iniciador, 2,5 µL de buffer de reacción 10 X (10mM Tris-HCl pH 9,0, 50 mM KCl, y 0,1 % de Triton X-100), 2,6 U de Taq ADN polimerasa correctora (Roche ®), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dioxinucleótido trifosfatado (dNTPs), en un volumen final de reacción de 25 µL. El programa de la reacción utilizado se muestra en la tabla 6 según lo descrito por Cuervo *et al.*, (2006).

Los productos de amplificación esperados de aproximadamente 310 pb fueron visualizados en un gel de agarosa al 1,5% (Anexo 1). El ADN obtenido se extrajo del gel de acuerdo a las instrucciones de la casa fabricante (QIAGEN®), usando el estuche comercial QIA – Gel extraction kit, (Anexo 2) para luego ser insertado en el plásmido vector.

**Tabla 6.** Programa de PCR utilizado para amplificar la región intergénica de la Histona H2A de *Trypanosoma rangeli* (Cuervo *et al.*, 2006).

Número de ciclos	Primers: H14IntF/H14IntR	Temperatura (°C)	Tiempo (seg)
	Denaturación inicial	95	300
35	Denaturación	95	30
	Anillaje	65	40
	Extensión	72	40
	Extensión final	72	300





**Fig. 8.** Localización de los oligonucleótidos utilizados, en la cepa H14 de *Trypanosoma rangeli*. Se muestra el tamaño del fragmento secuenciado de 935 pb para el clon C1-H14, donde se obtuvo la región codificante y los dos extremos no codificantes 5' y 3' presentes en dos copias repetidas en tandem del gen H2A.

10	20	30	40	50	60
AGGGGCCATGAAGCC	CAGCGCAGAGAGGAAC	GCGACTCGCTAGATACACCT	GSSGGAACG		
70	80	90	100	110	120
CCATIGCCCAGCCACGGT	GACTCACGTGTGGCCCCATAG	AATAGTGTGTTT	TTATT		
130	140	150	160	170	180
TTATTATTGTTGTGGCGT	GCTTCTCCAAATTTCTCCT	CTCGCCTCTTCCACGGGAATG			
190	200	210	220	230	240
CGCAACGTCCTTGT	TTTTTTTTGGATTTTTGAAACAT	TTTCGCCGGCACCT	TGGCGGG		
250	260	270	280	290	300
CGTGGGTGCTGCGTCTGCT	TCTGTGGCTGCATGCTGCT	TTCTCCTTTTTCTTTTT			
310	320	330	340	350	
TGTTTCCTTCTTGTA	TGTTTTTCTTTT	TCAAGATCACAGCTGCAACA	AGCAAC		
360	370	380			
AAGCCACTTTTTTICAG	TTTTTGCAATTCAC				

**Fig. 9.** Secuencia de la región no codificante de la histona H2A (391pb) de la cepa H14 de *T. rangeli*. En rojo se denota el oligonucleótido H14 IntF y en azul se denota el oligonucleótido H14 IntR (Cuervo *et al.*, 2006).

## 5.5. Clonación de la región no codificante de la Histona H2A

Una vez verificada la calidad del fragmento de PCR mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa y determinando su concentración por espectrofotometría a 260 y 280 nm (Sambrook *et al.*, 2001), se procedió a la clonación de los productos de amplificación en el plásmido vector pGEM®-T Easy (Promega®) (Anexo 3) (Fig. 10).

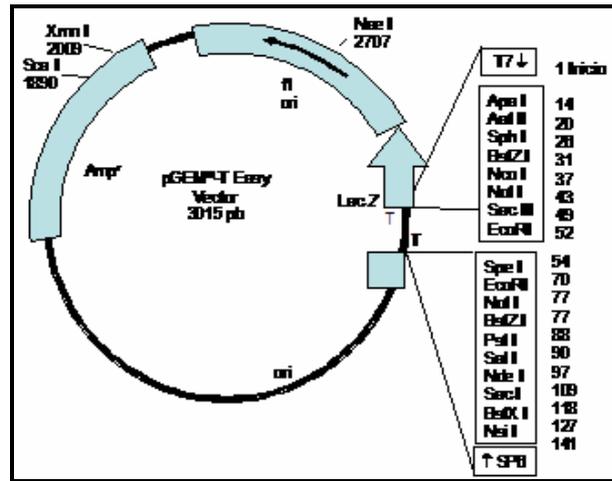


Fig. 10. Plásmido pGEM®-T Easy. Mapa circular del vector y puntos de referencia de la secuencia.

La clonación de los fragmentos de interés (~310 pb) para cada cepa se realizó ligando el inserto al plásmido pGEM®-T Easy (Promega®), mediante reacción con la enzima T4 DNA ligasa (Promega) según indicaciones de la casa comercial (solución amortiguadora de ligación 2 X, pGEM®-T Easy-vector, 50 ng y 3 U/ $\mu$ L de la enzima T4 ADN ligasa), a 4°C durante toda la noche. Esta reacción de ligación se realizó usando una relación inserto: vector de 3:1 (Anexo 3) (Puerta & Urueña, 2005).

Posteriormente, bacterias JM109 (50  $\mu$ L) de alta eficiencia de transformación (Promega®), fueron transformadas con 2  $\mu$ L del producto de ligación, mediante electroporación utilizando el equipo electroporador de BioRad® Systems (Anexos 4 y 5). Posteriormente, las bacterias se resuspendieron en 950  $\mu$ L del medio enriquecido SOC (Anexo 4), y se incubaron por 1,5 h a 37°C con agitación constante (aproximadamente 150 rpm) (Puerta & Urueña, 2005).

Finalmente, 100  $\mu$ L de bacterias transformadas se sembraron en cajas con agar Luria Bertani (LB-A), suplementado con ampicilina 100  $\mu$ g/mL (Anexo 4), 0,5 mM de Isopropilo- $\beta$ -galactosido (IPTG) (Gibco-BRL) y 80  $\mu$ L/mL de 5-bromo -



4-cloro -3-indolil- $\beta$ -D-galactosido (X-Gal) (Gibco-BRL) e incubadas toda la noche a 37 °C, para realizar el correspondiente test de blancas y azules.

Posterior a la incubación, el ADN plasmídico (ADNp) de las colonias blancas se extrajo mediante el estuche comercial 'Wizard® Plus SV Minipreps DNA purification system' (Anexo 6) y luego se sometió a digestión con la endonucleasa *EcoRI* (Gibco-BRL), este ensayo se realizó a un volumen final de reacción de 30  $\mu$ l durante 3h a 37 °C (Anexo 7). La enzima *EcoRI* corta a ambos lados del sitio de clonación (Fig. 10); liberando el fragmento clonado correspondiente, en este caso, a la región no codificante de la histona H2A de las cepas a evaluar de *T. rangeli*.

## 5.6. Análisis de los colonias recombinantes

Posterior al crecimiento de las colonias transformadas en agar LB-A, se realizó el correspondiente test de blancas y azules (Anexo 5) (Puerta & Urueña, 2005), donde aleatoriamente fueron seleccionadas cinco colonias de color blanco, para hacer repiques en caldo LB-A y alicuotar 700  $\mu$ L para conservar en glicerol al 15 % a -20°C.

### 5.6.1. PCR

Los cultivos de bacterias recombinantes crecidos en caldo LB-A según la turbidez del medio, fueron utilizados para verificar mediante PCR la presencia del fragmento de interés clonado en cada colonia.

Este ensayo se realizó utilizando el protocolo rápido de extracción de ADN para cada colonia (Anexo 8), ADN de *T. rangeli* como control positivo y agua 'mili-Q' como control negativo de la reacción, el programa de amplificación fue el mismo que se utilizó en el ensayo preliminar.



### 5.6.2. Ensayos de ‘Southern Blot’

Los fragmentos de ADN resultantes de la digestión anterior fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1%, visualizados por tinción con bromuro de etidio en el visualizador para geles de electroforesis (BioRad® Systems) y transferidos a membranas de ‘nylon’ usando el método alcalino, según lo indicado por Sambrook *et al.* (2001) (Anexo 9).

Finalmente, las membranas fueron hibridadas con el fragmento del clon C1, correspondiente a la Histona H2A de *T. rangeli* marcado con biotina utilizando el estuche comercial ‘BIOPrime DNA labelling system’ (Invitrogen®) (Anexo 10). Posterior a la hibridación, las señales fueron reveladas colorimétricamente de acuerdo a lo señalado en el anexo 11.

### 5.7. Secuenciación

La secuenciación de nucleótidos de ambas hebras del ADN se llevó a cabo mediante procedimientos estándares del servicio suministrado por la compañía MacroGen® (Corea) en un equipo secuenciador automático 3730XL, utilizando las condiciones del estuche comercial BigDye™ y los iniciadores universales M13F y M13R, según la reacción descrita por Sanger, (1977).

### 5.8. Análisis bioinformáticos

Los estudios de similitud a nivel de nucleótidos entre las secuencias obtenidas y las previamente reportadas en las bases de datos del GenBank para las cepas H14 (No de acceso AY147905) y C23 (No de acceso AF169130), de *T. rangeli*, se realizaron usando el programa BLAST ([www.ch.embnet.org](http://www.ch.embnet.org)) (Stephen *et al.*, 1997).



Para comparar las respectivas secuencias de nucleótidos obtenidas se hizo uso del programa L – ALIGN ([www.ch.embnet.org](http://www.ch.embnet.org)) (Corpet, 1988), y para alinear múltiples secuencias se utilizó el programa CLUSTAL–W v1.81 (Thompson *et al.*, 1994) utilizando parámetros por defecto del sitio ‘Web’ (<http://workbench.sdsc.edu>), estos son: (Penalidad de un espacio abierto: 15, Penalidad de la extensión del espacio: 6,66, Tamaño de transición del ADN: 0,5 y Retraso de la secuencia divergente: 30 %), finalmente el alineamiento fue manualmente ajustado utilizando el programa ‘BioEdit Sequence Alignment Editor’ (Hall, 1999), cuyos resultados fueron utilizados para realizar las correspondientes aproximaciones filogenéticas.

La frecuencia de bases, composición y valores de divergencia fueron calculadas con el programa MEGA 3.1 (Kumar *et al.*, 2004).

#### **5.8.1. Método ‘Neighbor Joining’**

El análisis Neighbor Joining se llevó a cabo en el programa MEGA 3.1 (Kumar *et al.*, 2004), utilizando el ‘Bootstrap’ como método de remuestreo con un valor de 1.000 réplicas, y a las subunidades A y B para la región intergénica del gen H2A en la cepa Y de *T. cruzi* como grupo raíz externo. Los sitios incluidos como ‘gaps/missing data’ fueron las deleciones completas, el modelo de sustitución utilizado para los nucleótidos fue el modelo propuesto por Kimura, (1980) de 2-parámetros, las sustituciones incluían transiciones y transversiones, el patrón entre linajes fue homogéneo y las estimaciones se hicieron entre sitios uniformes.

#### **5.8.2. Método Máxima Parsimonia**

El análisis de máxima Parsimonia se llevó a cabo en los programas MEGA 3.1 (Kumar *et al.*, 2004) y PAUP 4.0 (Swofford, 1998) utilizando el ‘Bootstrap’ como método de remuestreo con un valor de 1.000 réplicas, y a las subunidades A y B para el gen H2A en la cepa Y de *T. cruzi* como grupo raíz externo. Los sitios incluidos como ‘gaps/missing data’ fueron las deleciones completas y la opción de búsqueda usada fue el ‘Close Neighbor Interchange’ (CNI) nivel 1 de 10 réplicas para la adición aleatoria de árboles.



### **5.8.3. Método Máxima Verosimilitud ‘Likelihood’**

El análisis de máxima verosimilitud se llevó a cabo en el programa PAUP 4.0 (Swofford, 1998) utilizando el ‘Bootstrap’ como método de remuestreo con un valor de 1.000 réplicas, la búsqueda heurística se empleó como modelo de búsqueda, el modelo de sustitución fue el HKY85 propuesto por Hasegawa, Kishino y Yano, (1985) y se utilizaron a las subunidades A y B para el gen H2A en la cepa Y de *T. cruzi* como grupo raíz externo.



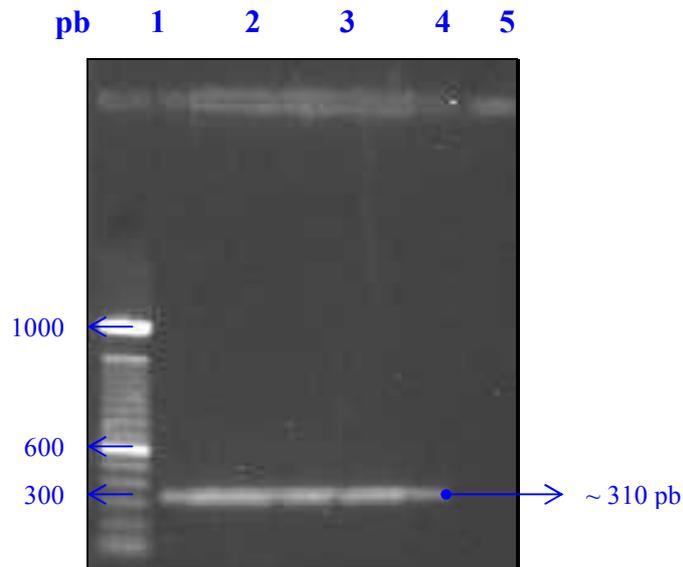
## 6. RESULTADOS

### 6.1. Amplificación por PCR del fragmento intergénico de la histona H2A

Para la amplificación de la región intergénica de la Histona H2A se realizaron ensayos de PCR para cada una de las cepas utilizando los oligonucleótidos H14 IntF y H14 IntR (Fig. 9) mediante el programa descrito en la tabla 6; obteniéndose los siguientes resultados:

#### 6.1.1 Cepa Tre

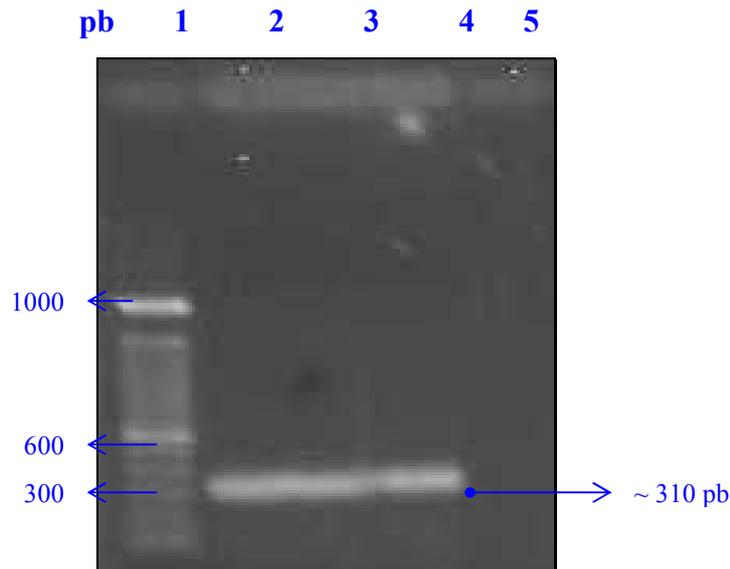
En la cepa Tre correspondiente al grupo 1 o KP1 (-) se observó un único producto de amplificación del tamaño esperado. En tanto que en el control de reacción (agua en lugar de ADN) no se observó amplificación (Fig. 11).



**Fig. 11.** Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 %, del ADN producto de PCR en la cepa Tre. Carril 1: Marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen), Carriles 2-4: Producto de PCR con los cebadores H14 IntF y H14 IntR, Carril 5: Control de reacción.

### 6.1.2 Cepa 5048

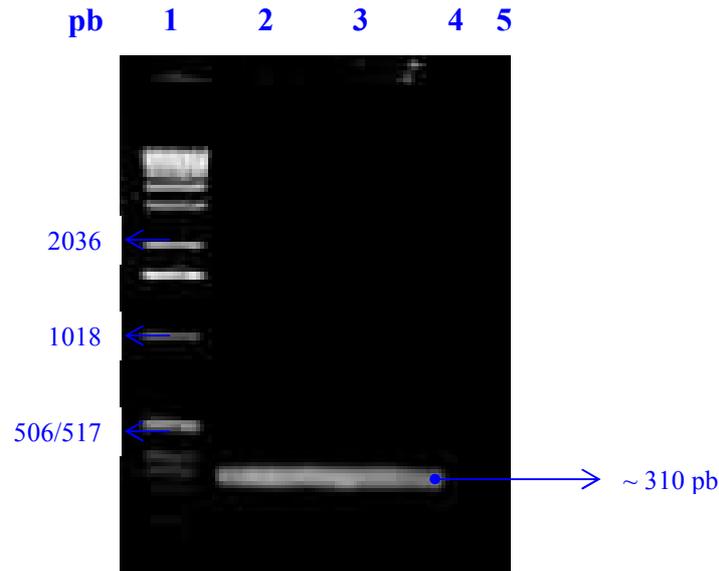
En esta cepa, que también corresponde al grupo 1 o KP1 (-), se observó un único fragmento de amplificación de aproximadamente 310 pb y el control de reacción funcionó adecuadamente (Fig. 12).



**Fig. 12.** Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, del ADN producto de PCR en la cepa 5048. Carril 1: Marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen ®), Carriles 2-5: Producto de PCR con los cebadores H14 IntF y H14 IntR, Carril 6: Control de reacción.

### 6.1.3 Cepa Choachí

En la cepa Choachí, agrupada dentro de las cepas KP1 (+), se amplificó un fragmento de aproximadamente 310 pb, en tanto que en el control de reacción no se observó señal de amplificación (Fig. 13).



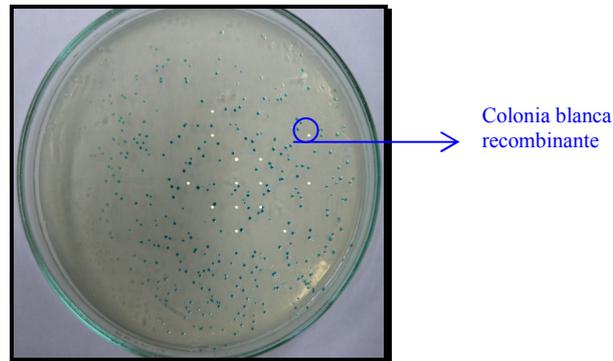
**Fig. 13.** Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, del ADN producto de PCR en la cepa Choachí. Carril 1: Marcador de peso molecular 1 kb (Invitrogen®), Carriles 2-4: Producto de PCR con los cebadores H14 IntF y H14 IntR, Carril 5: Control de reacción.

## 6.2. Construcción de la molécula de ADN recombinante usando pGEM®-T Easy como vector de clonación (Promega®).

Las bandas obtenidas producto de la PCR fueron extraídas del gel de agarosa usando el estuche comercial QIA-Quick extraction kit protocol (Anexo 2), y fueron utilizadas para ser insertadas en el plásmido vector pGEM®-T Easy.

Al realizar el test de blancas y azules luego de la transformación de las bacterias con la molécula de ADN recombinante, se evidenciaron en su mayoría colonias blancas y unas pocas de color azul (Fig. 14). Las primeras corresponden a las bacterias transformadas del plásmido recombinante, ya que la inserción del ADN foráneo irrumpe el marco abierto de lectura del péptido  $\alpha$  de la  $\beta$ -galactosidasa, inactivándolo. Por su parte, las bacterias transformadas con el plásmido solamente presentaron color azul, debido a la ocurrencia del fenómeno de complementación entre el péptido  $\alpha$  del plásmido y el péptido  $\Omega$  de la bacteria de manera que se produce la enzima  $\beta$ -galactosidasa, la cual degrada el sustrato X-gal y la bacteria toma una pigmentación azul (Sambrook *et al.*, 2001)

En cada uno de los casos, se tomaron 5 colonias blancas de manera aleatoria las cuales fueron examinadas mediante PCR y 'Southern Blot', con el fin de confirmar la presencia del fragmento correspondiente al gen H2A.



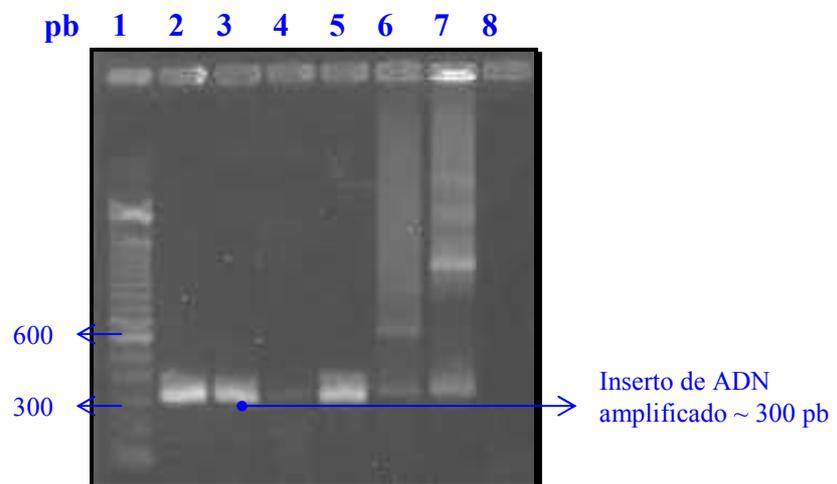
**Fig. 14.** Test de blancas y azules. Colonias de *Escherichia coli* JM109 transformadas con el plásmido recombinante pGEM®-T Easy, crecidas en agar LB-A. Transcurridas 16 h de incubación a 37 °C, se observan colonias puntiformes pequeñas, algunas pigmentadas de color azul y otras de color blancuzco.

### 6.3. Análisis por PCR de los clones obtenidos

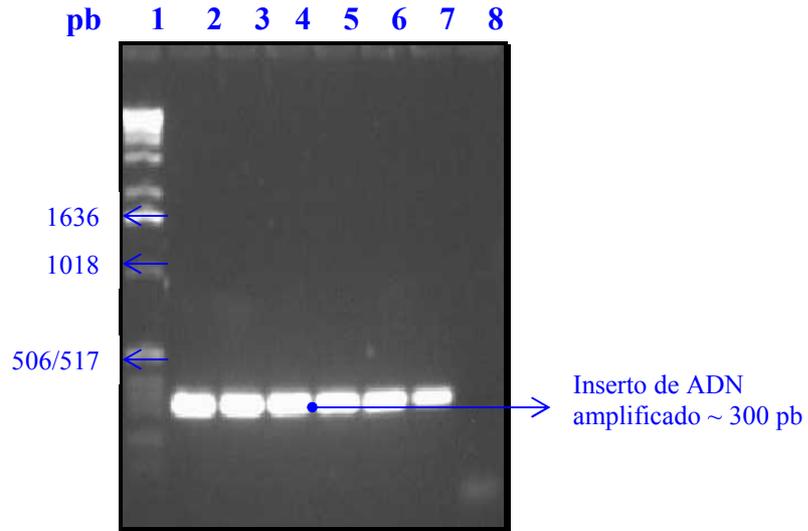
Los ensayos de PCR se realizaron a partir de un extracto crudo (Anexo 8) de cada uno de las colonias seleccionadas al azar (Tabla 7). Es así como para el caso de los clones de la cepa Tre (Trec 1 - 5) se encontró que tres de ellos contenían el fragmento (Tabla 7, Fig. 15), en tanto que para el caso de la cepa 5048 todas las colonias (C5048 1 - 5) amplificaron el fragmento esperado (Tabla 7, Fig. 16). En cuanto a la cepa Choachí, de las 5 colonias estudiadas (Cho 1 - 5) todas presentaron el fragmento de interés (Tabla 7, Fig. 17). Con base en la intensidad del producto de amplificación se seleccionaron los clones Trec 2, C5048 3 y Cho 1, para continuar los ensayos de 'Southern Blot' y secuenciación.

**Tabla 7.** Productos de amplificación para los clones seleccionados en cada una de las tres cepas.

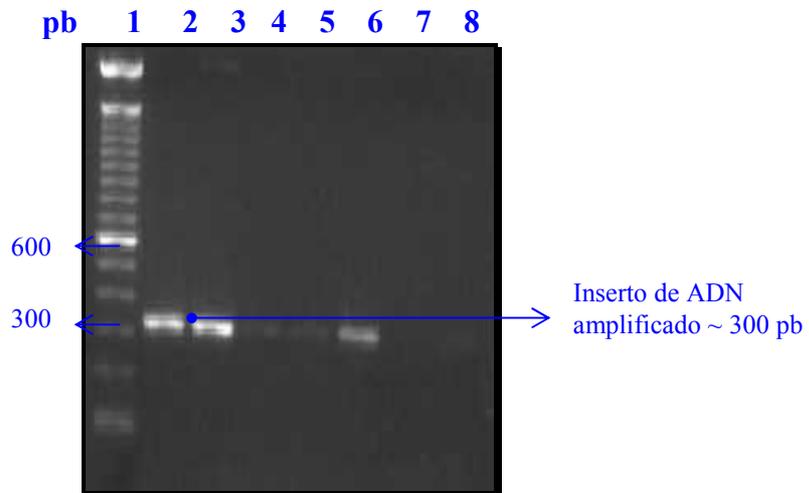
Cepa	Colonias	Presencia del fragmento esperado
Tre	Trec 1	Si
	Trec 2	Si
	Trec 3	No
	Trec 4	Si
	Trec 5	No
5048	C5048 - 1	Si
	C5048 - 2	Si
	C5048 - 3	Si
	C5048 - 4	Si
	C5048 - 5	Si
Choachí	Cho 1	Si
	Cho 2	Si
	Cho 3	Si
	Cho 4	Si
	Cho 5	Si



**Fig. 15.** Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % de los productos de la PCR realizada a los clones Trec1 - Trec5. Carril 1: Patrón de peso molecular 100 pb (Invitrogen®), Carriles 2 al 6: Colonias Trec1 - Trec5 escogidas aleatoriamente, donde se observa que solo para los clones Trec1, 2 y 4 amplificó el fragmento de ~ 300 pb, Carril 7: ADN de *Trypanosoma rangeli* como control positivo y Carril 8: Control de reacción. Con la flecha se señala el clon Trec2 escogido para continuar con el experimento.



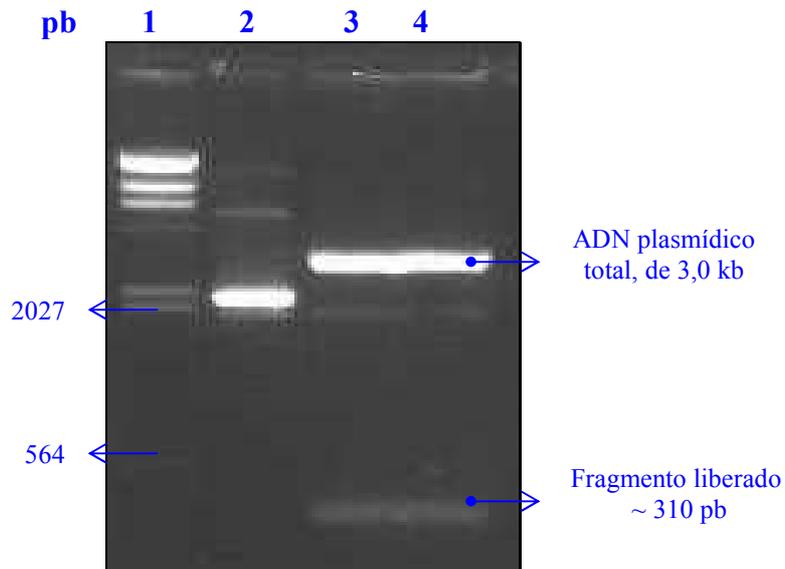
**Fig. 16.** Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % producto de la PCR realizada a los clones C5048-1-C5048-5. Carril 1: Marcador de peso molecular 1 kb (Invitrogen ®). Carriles 2 al 6: Colonias C5048-1 – C5048-5 escogidas aleatoriamente, donde se observa que todos los clones tienen el fragmento de interés, Carril 7: ADN de *Trypanosoma rangeli* como control positivo y Carril 8: Control de reacción. Con la flecha se señala el clon c5048 3 escogido para continuar con el experimento.



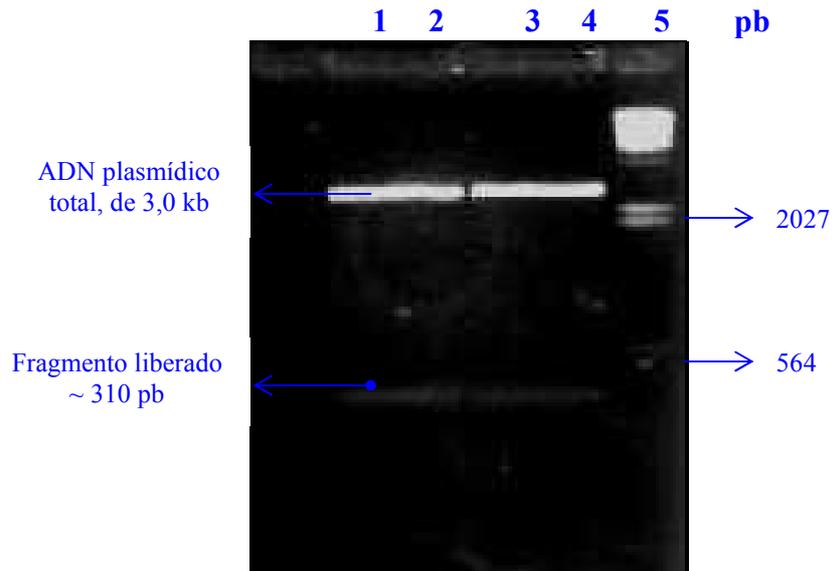
**Fig. 17.** Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % producto de la PCR realizada a los clones Cho 1 – Cho 5. Carril 1: Marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen ®), Carriles 2 al 6: Colonias Cho 1 – Cho 5 escogidas aleatoriamente, donde se observa que todos los clones amplifican el fragmento de interés y solo para Cho 1 y Cho 2 se muestra una mejor concentración, Carril 7: Control de reacción. Se señala el clon Cho 1 escogido para continuar con el experimento.

#### 6.4. Análisis por ‘Southern Blot’

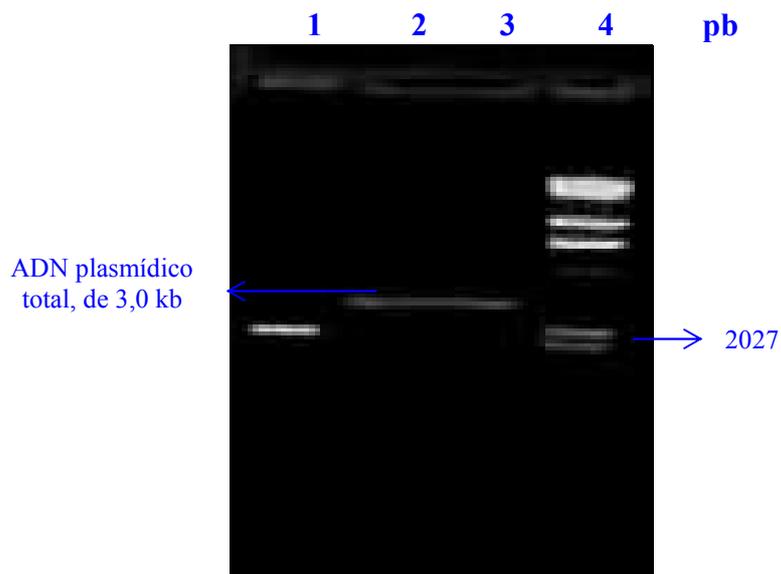
Tras realizar “stocks glicerolizados” de cada uno de los clones seleccionados, se procedió a la extracción del ADN plasmídico de los mismos con el fin de verificar la presencia del fragmento amplificado, y realizar ensayos de hibridización. Para esto, se digirieron cada uno de los clones con la endonucleasa *EcoRI* para liberar el fragmento clonado antes de su inmovilización en membranas de “nylon” e hibridización. Es así como en las figuras 18 y 19 se muestra la presencia del inserto clonado con un tamaño esperado de aproximadamente 300 pb, en el caso de los clones Trec 2 y C5048–3 correspondientes a las cepas Tre y 5048. En el caso del clon Cho 1 a pesar de no observarse a simple vista la liberación del fragmento (Fig. 20), al realizarse el ensayo de hibridización se evidenció claramente la presencia del mismo (Fig. 24).



**Fig. 18.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de digestión con la enzima *EcoRI*, del clon Trec2. Carril 1: Marcador de peso molecular  $\lambda$  *Hind* III, Carril 2: ADN del clon Trec2 sin digerir, Carril 3-4: ADN del clon Trec 2 digerido con la enzima *EcoRI*.

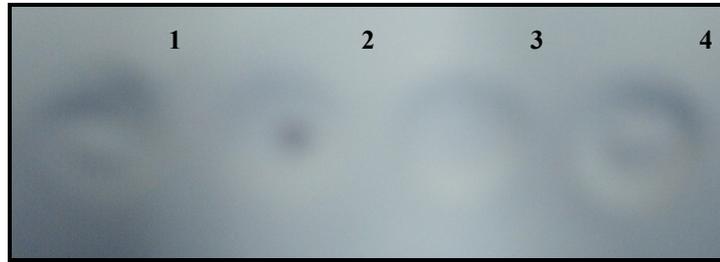


**Fig. 19.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de digestión con la enzima *EcoRI*, del clon C5048 – 3. Carril 1-2: ADN del clon C5048-3 digerido con la enzima *EcoRI*, Carril 3-4: ADN c5048-3 digerido con *NotI*, Carril 5: Marcador de peso molecular  $\lambda$  *Hind III*.



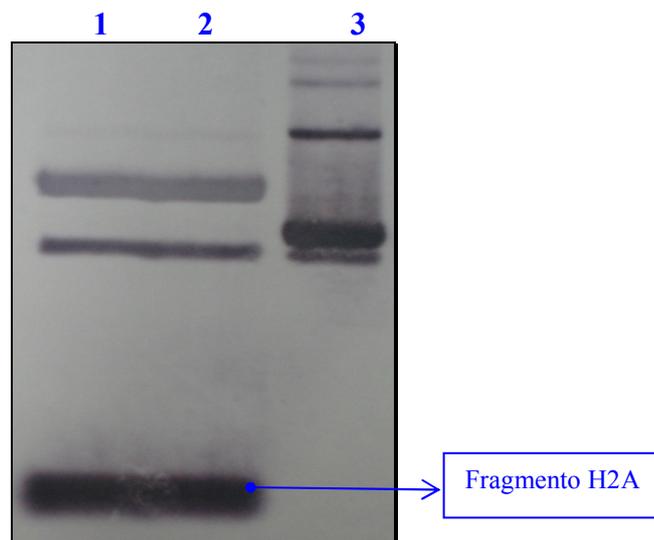
**Fig. 20.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de digestión con la enzima *EcoRI* en el clon Cho1. Carril 1: ADN del clon Cho1 sin digerir. Carriles 2 – 3 ADN del clon Cho1 digerido con la enzima *EcoRI*, Carril 4: Marcador de peso molecular  $\lambda$  *Hind III*.

Para los ensayos de hibridación se utilizó como sonda el inserto del clon C1 marcado con biotina; al realizarle la prueba de su actividad se observó señal hasta un título de 1/1000 (Fig. 21).

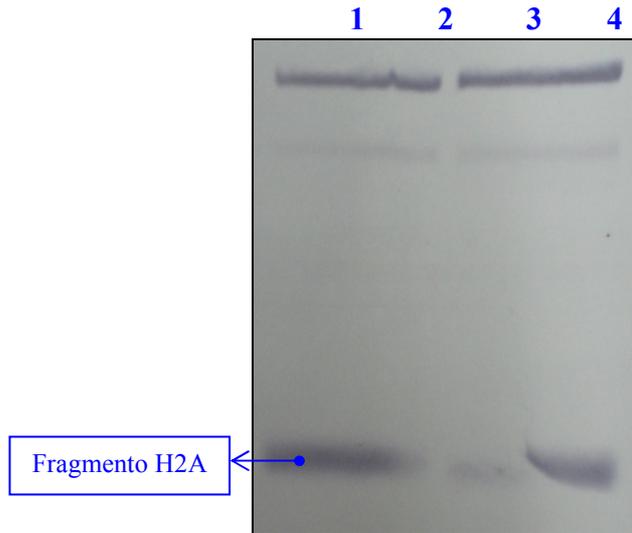


**Fig. 21.** Titulación de la marcación de la sonda. Pozos 1 - 4: Diluciones de la sonda 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000, respectivamente.

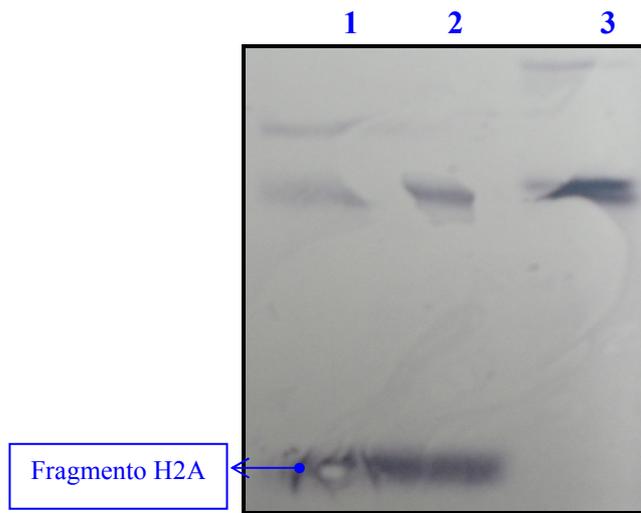
Luego de realizar la transferencia alcalina y los ensayos de hibridación mediante procedimientos estándar para cada uno de los clones, se observó claramente una fuerte señal de hibridación, lo cual indica que cada uno de los productos de digestión corresponde a un fragmento de la histona H2A (Fig. 22 – 24).



**Fig. 22.** Ensayo de 'Southern Blot' del clon Trec 2. Se observa señal para el producto de digestión que corresponde a parte de la secuencia del gen H2A. Carriles 1 - 2: ADN plasmídico del clon Trec 2 digerido con la enzima *EcoRI*, Carril 3: ADN plasmídico del clon Trec 2 sin digerir.



**Fig. 23** Ensayo de 'Southern Blot' del clon c5048-3. Se observa señal para el producto de digestión que corresponde a parte de la secuencia del gen H2A. Carriles 1-2: ADN plasmídico del clon C5048-3 digerido con *Sal* I, Carriles 3-4: ADN plasmídico del clon c5048-3 digerido con la enzima *Eco*RI.



**Fig. 24** Ensayo de 'Southern Blot' del clon Cho 1. Se observa señal para el producto de digestión que corresponde a parte de la secuencia del gen H2A. Carriles 1-2: ADN plasmídico del clon Cho 1 digerido con la enzima *Eco*RI, Carril 3: ADN plasmídico del clon Cho 1 sin digerir.

## 6.5. Secuenciación

Luego de haber confirmado mediante la técnica de ‘Southern Blot’ que los fragmentos clonados correspondían a un fragmento del gen Histona H2A, se procedió a realizar la secuenciación de ambas hebras de ADN de cada uno de los tres clones seleccionados. Es así como en la tabla 8 se muestra el número de bases secuenciadas con cada uno de los iniciadores utilizados.

Vale la pena resaltar que las secuencias obtenidas en este trabajo se derivan de productos de PCR amplificados mediante la enzima Expand High Fidelity PCR System-Roche®, que tiene como ventaja la actividad correctora de lectura ‘Proofreading’ sumada a la actividad polimerasa. Los productos así amplificados fueron clonados en el plásmido pGEM®-T Easy, seleccionándose un solo clon de forma aleatoria, al cual se le realizó la secuenciación de ambas hebras del ADN. Por lo anterior, los datos obtenidos son confiables y corresponden a la secuencia de una sola de las copias del gen, pero no representan una secuencia consenso de las mismas.

Para realizar los análisis bioinformáticos, en primer lugar se procedió a revisar y editar las secuencias obtenidas. Para ello, se eliminaron los fragmentos “contaminantes” pertenecientes al plásmido de clonación mediante análisis BLAST-N y ubicación de los iniciadores H14 IntF/H14 IntR (Tabla 8). Posteriormente, se realizó un alineamiento entre las secuencias obtenidas con ambos iniciadores, luego de invertir y complementar la secuencia obtenida con la del iniciador M13 reverso (M13R). Finalmente, se obtuvieron las secuencias definitivas con tamaños de 309, 307 y 324 pb para los clones Trec 1, C5048-3 y Cho 1, respectivamente. (Tabla 8, Fig. 25 – 27). Vale la pena resaltar la concordancia total obtenida entre la secuencia de ambas cadenas de cada clon.

Estas secuencias se encuentran reportadas en la base de datos del GenBank con los números de acceso: EF100609, EF100610 y EF100611 (Anexo 12).



**Tabla 8.** Número de bases secuenciadas en cada uno de los clones analizados.

CLON	CEBADORES USADOS	No DE BASES SECUENCIADAS
Tre	M13F	466
Tre	M13R	872
<b>Secuencia editada</b>	<b>M13F/R</b>	<b>309</b>
Choachí	M13R	606
Choachí	M13F	606
Choachí	SP6	826
Choachí	T7	620
<b>Secuencia editada</b>	<b>M13F/R/T7</b>	<b>324</b>
5048	M13F	924
5048	M13R	826
<b>Secuencia editada</b>	<b>M13F/R</b>	<b>307</b>

SECUENCIA DEL CLON TREC 1 (309 pb)						
1	TAGATACACC	TGGGGGAACG	CCATTGCCCA	GCCACAGTGA	CTCACGTGTG	GCCCCATAGA
61	ATAGTGTGTT	TGTTTTTATT	TATTTATTTG	TGTTGGCGTG	GCTTCTCCCA	ATTTCTCCTC
121	TCGCCTCTTC	CACGGGAATG	TGCAACGTCT	TTTTTTTTTG	GATTTTTGAA	ACATTTTCGC
181	CGGCACCTGG	CGGCGGCGTG	GGTGCTGCGT	CTGCTTTCTG	TGGCTGCATG	CGTGCTTTCT
241	CCTTTTTTTT	TTGTTTCCTT	CTTGTGTTGT	GTTTTCTTTG	TTCTTCAAGA	TCACAGCTGC
301	AACAAGCAA					

**Fig. 25.** Secuencia de nucleótidos del clon Trec 1, No de acceso en GenBank (EF100609). En rojo se denota el oligonucleótido H14 IntF y en azul H14 IntR. Los números a la izquierda indican la posición de la secuencia.

SECUENCIA DEL CLON C5048-3 (307 pb)						
1	TAGATACACC	TGGGGGAACG	CCATTGCCCA	GCCACAGTGA	CTCACGTGTG	GCCCCATAGA
61	ATAGTGTGTT	TGTTTTTATT	TATTTATTTG	TGTTGGCGTG	GCTTCTCCCA	ATTTCTCCCC
121	TCGCCTCTTC	CACGGGAATG	CGCAACGTCT	TTTTTTTTTG	ATTTTTGAAA	CATTTTCGCC
181	GGCACCTGGC	GGGCGGCGTG	GTGCTGCGTC	TGCTTTCTGT	GGCTGCATGC	GTGCTTTCTC
241	CTTTTTTTTT	GTTTCCTTCT	TGTGTTGTTG	TTTCTTTGTT	CTTCAAGATC	ACAGCTGCAA
301	CAAGCAA					

**Fig. 26.** Secuencia de nucleótidos del clon c5048-3, No de acceso en GenBank (EF100610). En rojo se denota el oligonucleótido H14 IntF y en azul el H14 IntR. Los números a la izquierda indican la posición en la secuencia.



SECUENCIA DEL CLON CHO 1 (324 pb)						
1	TAGATACACC	TGGGGGAACG	CCATTGCCCA	GCCACAGTGA	CTCACGTGTG	GCCCCATAGA
61	ATAGTGTGTT	TGTTTTTATT	TATTTATTG	TGTTGGCATG	GCTTCTCCA	ATTTCTCCTC
121	TCGCCTCTTC	CACGGGAATG	CGCAACGTCC	TTGTTTTTTT	TTTGGGGGGG	GGATTTTTGA
181	AACATTTTCG	CCGGCACCTG	GCGGCGGCGT	GGGTGCTGCG	TCTGCTTCT	GTGGCTGCAT
241	GCGTGCTTTC	TCCTTTTTTT	TTTTTTTTTG	TTTCCTTCTT	GTGTTGTTTT	CTTTGTTTTT
301	CAAGATCACA	GCTGCAACAA	GCAA			

**Fig. 27.** Secuencia final de nucleótidos del clon Cho 1, No de acceso en GenBank (EF600611). En rojo se denota el oligonucleótido H14IntF y en azul el H14 IntR. Los números a la izquierda indican la posición en la secuencia.

## 6.6. Análisis bioinformáticos

En primer lugar se corroboró la identidad de los fragmentos clonados mediante comparación con las secuencias reportadas en las bases de datos NCBI usando la herramienta BLAST-N ([www.ch.embnet.org](http://www.ch.embnet.org)) (Stephen *et al.*, 1997); encontrándose identidad del 99,4 % con la región intergénica de la histona H2A en la cepa Tre, 98,7 % con 5048 y 92 % con Choachí, con respecto a la cepa C23 KP1 (-). Por otro lado se obtuvo un 95,3 % de identidad con la cepa Tre, 94,7 % con 5048 y 94,5 % con Choachí, con respecto a la histona H2A en la cepa H14 KP1 (+) (Tabla 9). Llamativamente, esta región solo presentó un 55,2, 55,5 y 54,5 % de identidad al comparar la subunidad A de *T. cruzi* (760 pb) con las cepas Tre, 5048 y Choachí. Al comparar con la subunidad B de *T. cruzi* (1,2 kb) la identidad disminuye significativamente porque esta copia tiene insertado un elemento SIRE, elemento que no se encuentra en el genoma de *T. rangeli* (Vásquez, 1999) (Tabla 9).

**Tabla 9.** Porcentaje (%) de identidad en las secuencias de la región intergénica del gen H2A entre cepas KP1 (+) y KP1 (-) de *T. rangeli*.

	Tre KP1 (-)	5048 KP1 (-)	Choachí KP1 (+)
<b>C23 KP1 (-)</b>	99,47	98,7	92
<b>H14 KP1 (+)</b>	95,3	94,7	96,3
<b><i>T. cruzi</i> Y sub. A</b>	55,2	55,5	54,5
<b><i>T. cruzi</i> Y sub. B</b>	32,1	32,3	33,2



Posteriormente, con las tres secuencias obtenidas durante el desarrollo de este trabajo y las dos previamente reportadas en el GenBank, se realizaron los correspondientes análisis de alineamiento entre cada una de estas mediante la herramienta L-ALIGN ([www.ch.embet.org](http://www.ch.embet.org)) (Corpet, 1988) así como también se realizó un múltiple alineamiento de nucleótidos mediante la opción CLUSTAL-W v1.81 (Thompson *et al.*, 1994) (Fig. 28). Encontrándose diferencias tanto en el tamaño de los fragmentos como en su secuencia entre las regiones intergénicas de la histona H2A de los dos grupos del parásito denominados como KP1 (+) y KP1 (-), diferencias que se ubican entre los nucleótidos 149 y 290 del fragmento amplificado.

Las diferencias mas significativas entre las secuencias se localizan en los nucleótidos 150 – 154, donde las cepas KP1 (+) mantienen conservada una región de 4 nts (CTTG), la cual esta ausente en las cepas KP1 (-); en la posición 263 – 269 las cepas KP1 (+) conservan una región de siete timinas para la cepa Choachí y seis para H14 mientras que en las cepas KP1 (-) dicha región está ausente. Por último, en las posiciones 287 y 288 las cepas KP1 (-) mantienen conservado el dimero “GT” el cual se encuentra ausente en las cepas KP1 (+) (Fig. 28).

También se observaron mutaciones a nivel individual en cada cepa siendo la mayoría de ellas cambios en un único nucleótido (SNPs por la sigla en inglés ‘Single nucleotide polymorphisms’), en donde ocurrieron 7 transiciones, 3 de ellas en cada una de las cepas KP1 (-) y 4 en las dos cepas KP1 (+). Además se presentaron también a nivel individual eventos de inserciones y/o deleciones, dos en dos de las cepas KP1 (-) y ocho en la cepa Choachí KP1 (+).

En concreto, en las cepas KP1 (-) la cepa C23 presentó una transición de A → G en la posición 8, la cepa Tre C → T en la posición 141 y la cepa 5048 presentó una transición de C → T en la posición 119 y dos eventos de inserción/delección de timinas en las posiciones 163 y 263.



Por su parte, en cuanto a las cepas KP1 (+), la cepa H14 presentó una transición de la posición 36 A → G y de T → C en el nucleótido 260 y de G → A en la posición 283. La cepa Choachí presentó una transición de G → A en la posición 98, un evento de delección/inserción de una timina en la posición 269 y de 7 guaninas en la posición 176 – 182 (Tabla 10).

Por otra parte, a pesar de que el contenido de A/T supera al de G/C en todas las secuencias como era de esperarse para una región no codificante; el porcentaje de cada nucleótido difiere entre las secuencias, especialmente el contenido de timina, el cual es mayor en las secuencias de las cepas KP1 (+) (Tabla 11).

**Tabla 10.** Mutaciones encontradas entre las secuencias utilizadas (Tre, 5048, Choachí, C23 y H14) de *T. rangeli*.

	8	36	98	119	141	150	151	152	153	163	176-182
C23	G	A	G	T	C	-	-	-	-	T	-
5048	A	A	G	C	C	-	-	-	-	-	-
Tre	A	A	G	T	T	-	-	-	-	T	-
H14	A	G	G	T	C	C	T	T	G	T	-
Choachí	A	A	A	T	C	C	T	T	G	T	G

	260	263	261-268	269	283	288-289	300
T	T	T	-	-	G	GT	T
T	-	-	-	-	G	GT	C
T	T	-	-	-	G	GT	C
C	T	T	-	A	-	-	T
T	T	T	T	G	-	-	T

■ KP1 (-)    ■ KP1 (+)

**Tabla 11.** Resumen del contenido medio (%) de cada nucleótido para las correspondientes cepas analizadas, obtenido por el programa MEGA 3.1.

	T	C	A	G	G + C
Tre	38,8	23,6	14,6	23,0	46,6
5048	37,8	24,4	14,7	23,1	47,5
C23	38,5	23,9	14,2	23,3	47,2
<b>Promedio KP1 (-)</b>	<b>38,4</b>	<b>24</b>	<b>14,5</b>	<b>23,13</b>	<b>47,13</b>
Choachí	39,2	22,8	14,2	23,8	46,6
H14	39,6	23,7	14,2	22,5	46,2
<b>Promedio KP1 (+)</b>	<b>39,4</b>	<b>23,2</b>	<b>14,12</b>	<b>23,15</b>	<b>46,35</b>
<i>T. cruzi</i> Y Unit A	31,6	24,6	21,3	22,5	47,1
<i>T. cruzi</i> Y Unit B	33,1	30,9	13,7	22,3	53,2
<b>Promedio <i>T. cruzi</i> Y</b>	<b>32,35</b>	<b>27,75</b>	<b>17,5</b>	<b>22,4</b>	<b>50,15</b>



De especial interés es el hecho de que la secuencia repetida invertida potencialmente formadora del 'Stem-loop' que interviene en la regulación de estos genes se encuentra totalmente conservada en todas las secuencias, (Fig. 28) así como los posibles sitios de adición de la secuencia líder o mini-exon que interviene en el proceso de 'trans-splicing' (Thomas *et al.*, 1993). Llamativamente en el tracto de polipirimidina que también interviene en este proceso, en las cepas KP1 (+) se insertan de 6 a 7 nucleótidos de timina.

Finalmente, la distancia y relación filogenética entre las cepas se determinó mediante los análisis de 'Neighbor-Joining' y máxima parsimonia y máxima Verosimilitud respectivamente, con un valor 'Bootstrap' de 1.000 replicas en todos los casos (Anexo 13).

En todos los casos cuando se utilizan las dos unidades de 0,76 kb y 1,2 kb de *T. cruzi* como grupo externo en el análisis, se observa que las cepas KP1 (-) se clasifican en un clado distinto al de las KP1 (+) (Fig. 29, 30, 31).

De especial interés es el hecho de que las cepas KP1 (+) de *T. rangeli* en todos los resultados utilizando este marcador molecular y con los diferentes métodos de construcción de árboles, se aprecia que estas divergieron primero de la línea evolutiva principal y se muestran más cercanas a *T. cruzi*.

Adicionalmente, cuando se amplían el número de secuencias de *T. cruzi* a analizar y se utiliza a *Leishmania infantum* como grupo externo, se observa que de una parte se mantiene la topología del árbol para las cepas KP1 (-) y KP1 (+) de *T. rangeli*, y de otra que *T. cruzi* y *T. rangeli* forman clados distintos a partir de un ancestro común (Fig. 32 y 33).

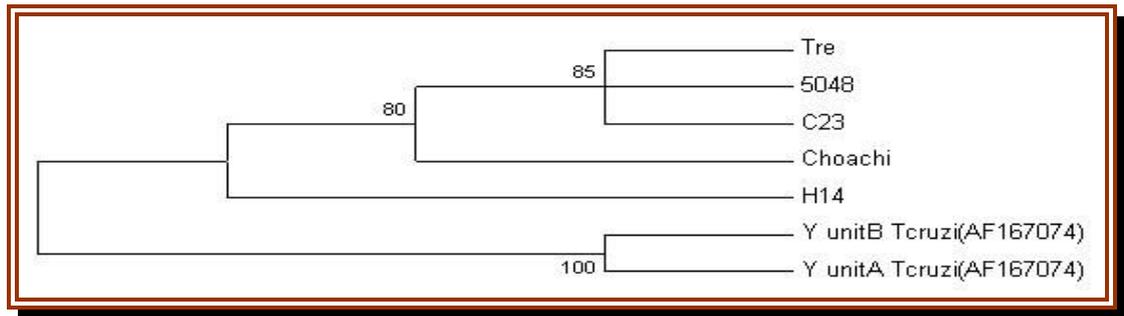
Finalmente, cabe anotar que contrario a la asunción inicial de que al ser *T. rangeli* transmitido por saliva, este se encuentra mas cercano a *T. brucei* que a *T. cruzi* (OMS, 2002), en estos resultados se evidencia claramente una mayor cercanía a *T. cruzi* que a *T. brucei*.



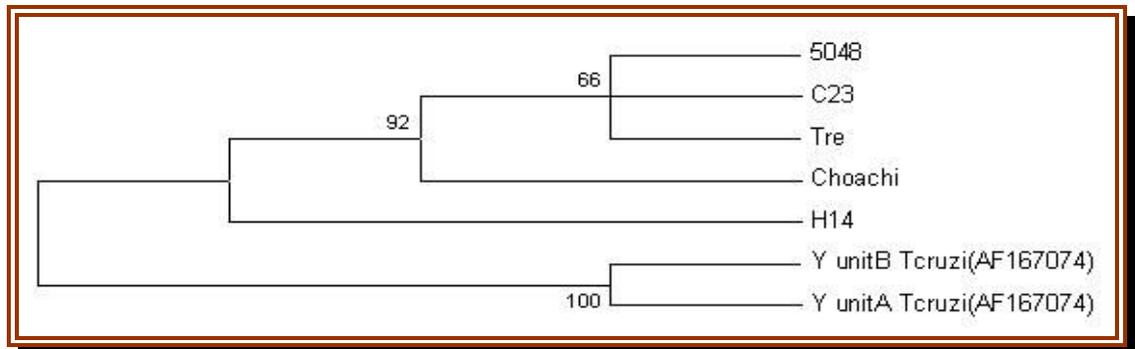
C23	tagatac <b>gcc</b> <b>tgggggaacg</b> <b>ccattgceca</b> gccacagtga ctcacgtgtg
5048	tagatacacc <b>tgggggaacg</b> <b>ccattgceca</b> gccacagtga ctcacgtgtg
TRE	tagatacacc <b>tgggggaacg</b> <b>ccattgceca</b> gccacagtga ctcacgtgtg
H14	tagatacacc <b>tgggggaacg</b> <b>ccattgceca</b> gccac <b>g</b> gtga ctcacgtgtg
CHOACHI	tagatacacc <b>tgggggaacg</b> <b>ccattgceca</b> gccacagtga ctcacgtgtg
C23	gccccataga atagtgtggt tgtttttatt tatttatttg tgttggcgtg
5048	gccccataga atagtgtggt tgtttttatt tatttatttg tgttggcgtg
TRE	gccccataga atagtgtggt tgtttttatt tatttatttg tgttggcgtg
H14	gccccataga atagtgtggt tgtttttatt tatttatttg tgttggcgtg
CHOACHI	gccccataga atagtgtggt tgtttttatt tatttatttg tgttggc <b>atg</b>
C23	gettetecca atttetecte tegecette cacgggaatg cgcaacgtc-
5048	gettetecca atttetecc <b>c</b> tegecette cacgggaatg cgcaacgtc-
TRE	gettetecca atttetecte tegecette cacgggaatg <b>t</b> gcaacgtc-
H14	gettetecca atttetecte tegecette cacgggaatg cgcaacgtcc
CHOACHI	gettetecca atttetecte tegecette cacgggaatg cgcaacgtcc
C23	---ttttttt tttgg----- --atttttga aacattttcg cgggcacctg
5048	---ttttttt tt-gg----- --atttttga aacattttcg cgggcacctg
TRE	---ttttttt tttgg----- --atttttga aacattttcg cgggcacctg
H14	ttgttttttt tttgg----- --atttttga aacattttcg cgggcacctg
CHOACHI	ttgttttttt tttggggggg ggatttttga aacattttcg cgggcacctg
C23	gCGGCGGCGT GGGTGCTGCG TCTGCTTTCT GTGGCTGCAT GCGTGCTTTC
5048	gCGGCGGCGT GGGTGCTGCG TCTGCTTTCT GTGGCTGCAT GCGTGCTTTC
TRE	gCGGCGGCGT GGGTGCTGCG TCTGCTTTCT GTGGCTGCAT GCGTGCTTTC
H14	gCGGCGGCGT GGGTGCTGCG TCTGCTTTCT GTGGCTGCAT GCGTGCTTTC
CHOACHI	gCGGCGGCGT GGGTGCTGCG TCTGCTTTCT GTGGCTGCAT GCGTGCTTTC
C23	TCC <b>TTTTTTT</b> <b>TTT</b> -----G TTTCCTTCTT GTGTTGTGTT TTCTTTGTTC
5048	TCC <b>TTTTTTT</b> <b>TT</b> -----G TTTCCTTCTT GTGTTGTGTT TTCTTTGTTC
TRE	TCC <b>TTTTTTT</b> <b>TTT</b> -----G TTTCCTTCTT GTGTTGTGTT TTCTTTGTTC
H14	TCC <b>TTTTTTT</b> <b>TTTTTTTT</b> -G TTTCCTTCTT <b>G</b> ATTGT--T TTCTTTGTTT
CHOACHI	TCC <b>TTTTTTT</b> <b>TTTTTTTT</b> TTTCCTTCTT GTGTTGT--T TTCTTTGTTT
C23	TTCA <b>AG</b> ATCA <b>CAG</b> CTGCAAC <b>AAG</b> CAA
5048	TTCA <b>AG</b> ATCA <b>CAG</b> CTGCAAC <b>AAG</b> CAA
TRE	TTCA <b>AG</b> ATCA <b>CAG</b> CTGCAAC <b>AAG</b> CAA
H14	TTCA <b>AG</b> ATCA <b>CAG</b> CTGCAAC <b>AAG</b> CAA
CHOACHI	TTCA <b>AG</b> ATCA <b>CAG</b> CTGCAAC <b>AAG</b> CAA

**Fig. 28.** Múltiple alineamiento CLUSTAL-W, de las regiones intergénicas no codificantes de la Histona H2A de *T. rangeli* procedente de diversas cepas del parásito. Se agrupan primero en el orden C23, 5048, Tre KPl (-) y H14, Choachí KPl (+) respectivamente. En negrita se denota la secuencia invertida con potencial para formar el ‘Stem-loop’. En azul se denotan los dinucleótidos AG aceptores del ‘trans-splicing’, en rojo se denota el tracto de polipirimidinas, las diferencias entre las secuencias de las cepas KPl (+) y KPl (-) se marcan en recuadros, las diferencias en un solo nucleótido ‘SNPs’ se denotan en verde. En letra minúscula se denota el inicio de la región 3’ no codificante y de forma contigua se denota la región 5’ en mayúscula.

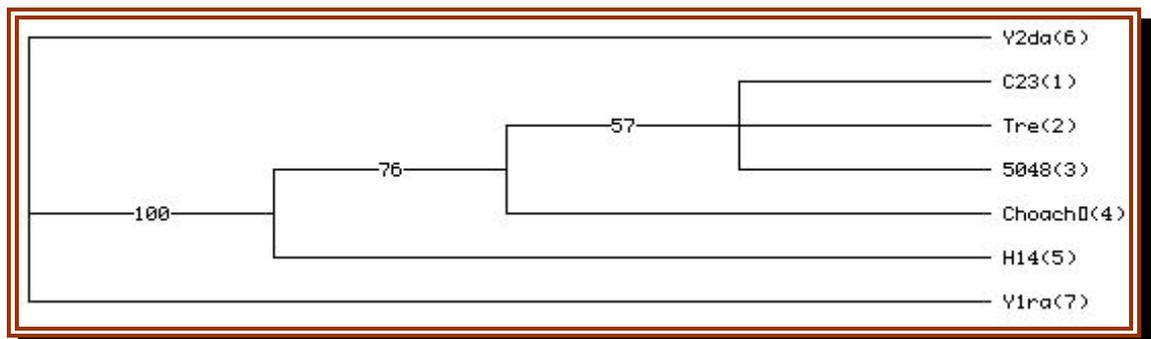




**Fig. 29.** Árbol Neighbor-Joining con un valor 'Bootstrap' de 1.000 réplicas utilizando el programa MEGA 3.1 de las secuencias intergénicas H2A utilizadas en el estudio: KP1 (-) 5048 (No de acceso: EF100610), Tre (EF100609), C23 (AF169130), KP1 (+) Choachi (EF600611), H14 (AY147905) y las unidades A y B de *T. cruzi* cepa Y (AF167074) utilizadas como grupo raíz externo, comprendidas entre los nucleótidos 664-926 y 1427-1993 respectivamente.

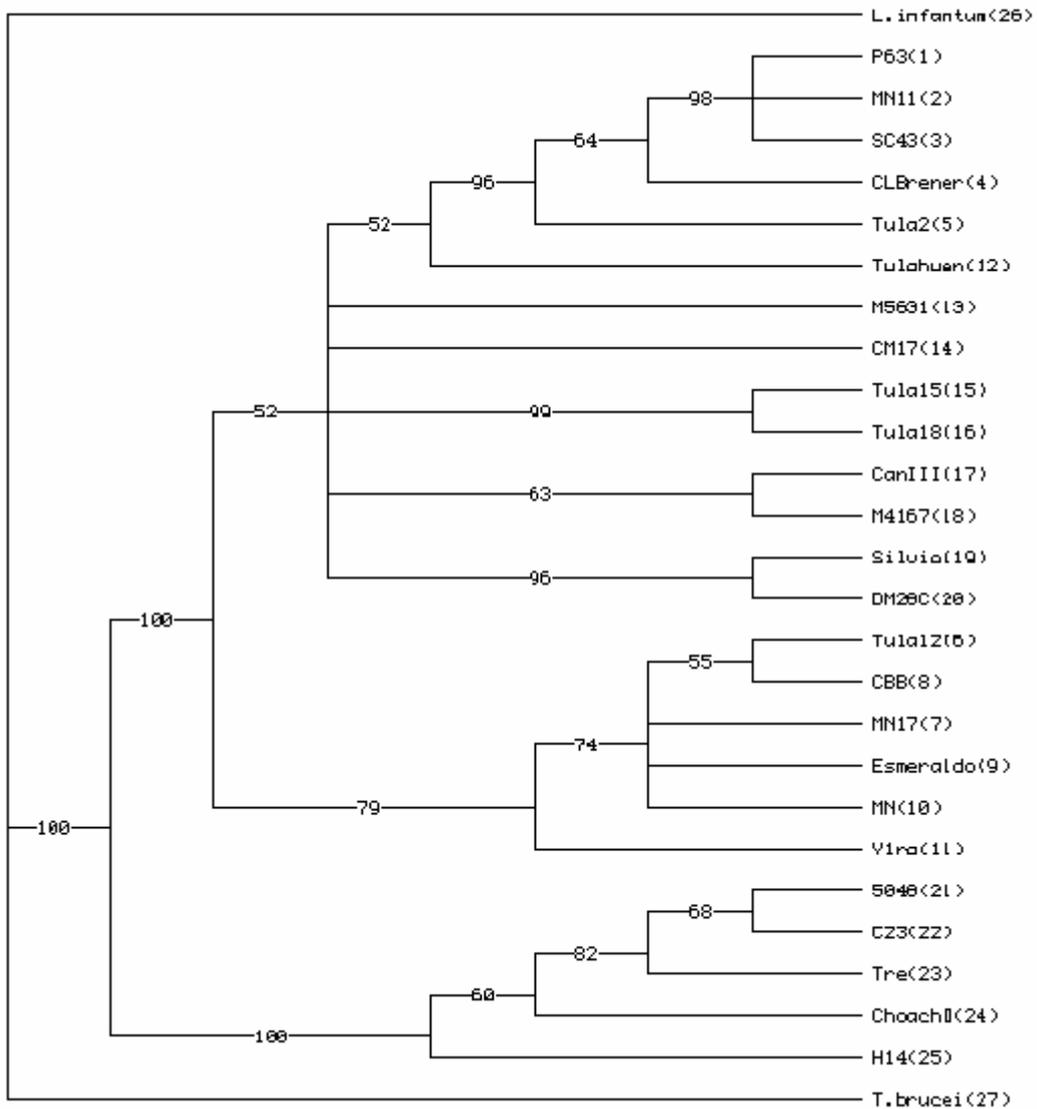


**Fig. 30** Árbol Máxima Parsimonia con un valor 'Bootstrap' de 1.000 réplicas utilizando el programa MEGA 3.1 de las secuencias intergénicas H2A utilizadas en el estudio: KP1 (-) 5048 (No de acceso: EF100610), Tre (EF100609), C23 (AF169130), KP1 (+) Choachi (EF600611), H14 (AY147905) y las unidades A y B de *T. cruzi* cepa Y (AF167074) utilizadas como grupo raíz externo, comprendidas entre los nucleótidos 664-926 y 1427-1993 respectivamente.



**Fig. 31.** Árbol Máxima Verosimilitud 'likelihood' con un valor 'Bootstrap' de 1.000 réplicas utilizando el programa PAUP 4.0, de las secuencias intergénicas H2A utilizadas en el estudio: KP1 (-) 5048 (No de acceso: EF100610), Tre (EF100609), C23 (AF169130), KP1 (+) Choachi (EF600611), H14 (AY147905) y la unidad A de *T. cruzi* cepa Y (AF167074) utilizadas como grupo raíz externo, comprendidas entre los nucleótidos 664-926 y 1427-1993 respectivamente.

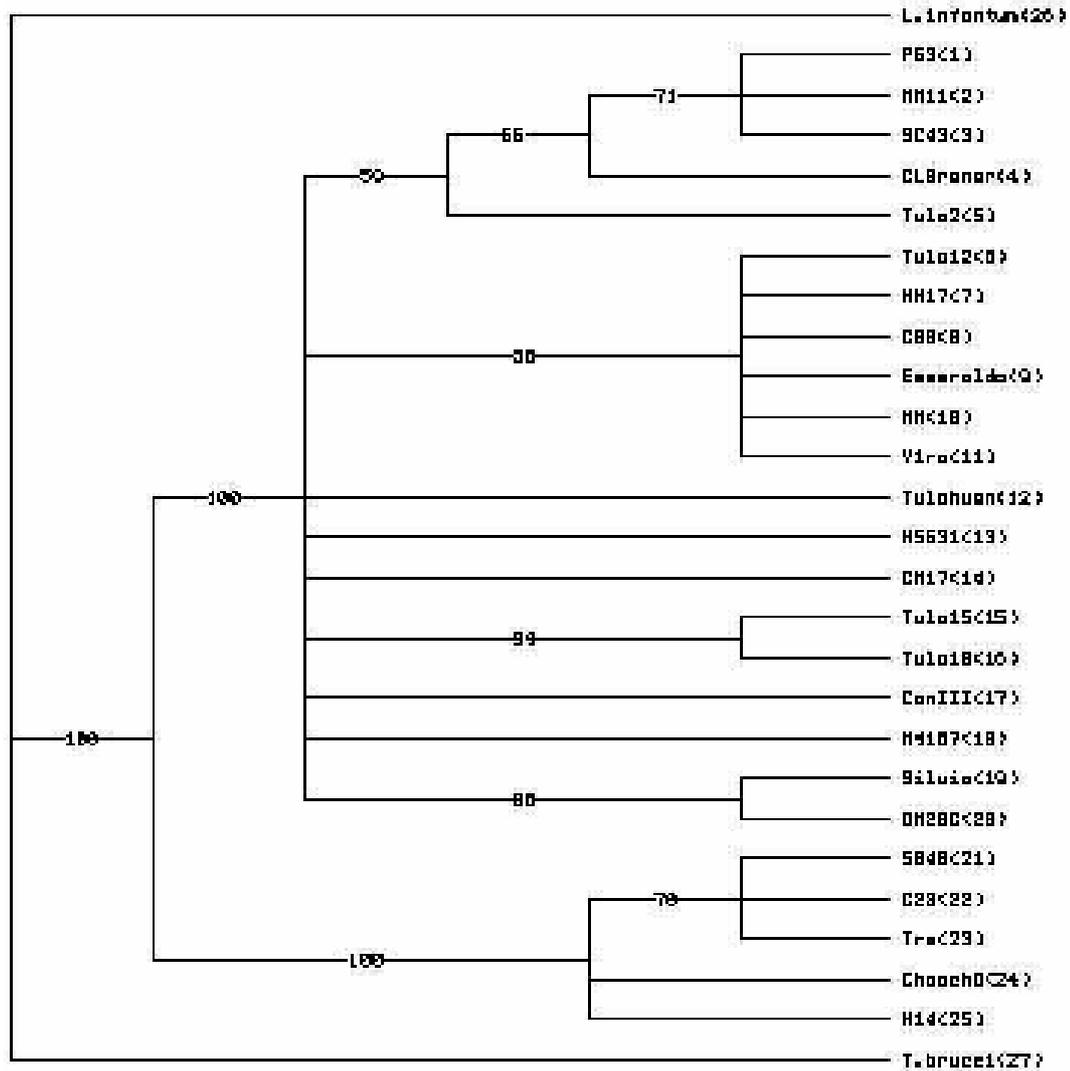




**Fig. 32.** Árbol de 'Neighbor-Joining' con un valor 'Bootstrap' de 1.000 réplicas utilizando el programa PAUP 4.0, de las secuencias intergénicas H2A reportadas en este estudio para *T. rangeli* y en la base de datos del GenBank para *T. cruzi*, *T. brucei* y *Leishmania infantum* usado como grupo raíz externo.

*T. rangeli*: Cepa Tre (EF100609), 5048 (EF100610), C23 (AF169130), Choachí (EF600611), H14 (AY147905); *T. cruzi*: Cepa P63 (No de acceso AY540658), MN (AY540657), MN11 (DQ021891), MN17 (DQ021892), SC43 (AY540659), CL Brener (AF545081), Tulahuan (AY540660), Tula 2 (DQ021887), Tula 12 (DQ021888), Tula 15 (DQ021889), Tula 18 (DQ021890), M5631 (AY540661), Silvio X10 (AF545080), DM28C (AF545079), CM17 (AY540656), Can III (AY540654), M4167 (AY540653), CBB (AY540655), Esmeraldo (AF545082), Y Ira (AF167074); *T. brucei* (AY159408); *L. infantum* (AJ419627).





**Fig. 33.** Árbol de máxima parsimonia con un valor 'Bootstrap' de 1.000 réplicas utilizando el programa PAUP 4.0, de las secuencias intergénicas H2A reportadas en este estudio para *T. rangeli* y en la base de datos del GenBank para *T. cruzi*, *T. brucei* y *Leishmania infantum* usado como grupo raíz externo. *T. rangeli*: Cepa Tre (EF100609), 5048 (EF100610), C23 (AF169130), Choachí (EF600611), H14 (AY147905); *T. cruzi*: Cepa P63 (No de acceso AY540658), MN (AY540657), MN11 (DQ021891), MN17 (DQ021892), SC43 (AY540659), CL Brener (AF545081), Tulahuen (AY540660), Tula 2 (DQ021887), Tula 12 (DQ021888), Tula 15 (DQ021889), Tula 18 (DQ021890), M5631 (AY540661), Silvio X10 (AF545080), DM28C (AF545079), CM17 (AY540656), Can III (AY540654), M4167 (AY540653), CBB (AY540655), Esmeraldo (AF545082), Y 1ra (AF167074); *T. brucei* (AY159408); *L. infantum* (AJ419627).



## 7. DISCUSIÓN

El estudio de los proyectos genoma humano y de otros organismos ha puesto de manifiesto que los marcos abiertos de lectura codificantes para productos proteicos constituyen el 1,5 % del genoma, los cuales además no exhiben diferencias significativas con especies similares. Por lo tanto, el 98,5 % restante del genoma que se compone de regiones intergénicas, secuencias reguladoras, secuencias repetitivas y ARN no codificantes para proteínas, cobra importancia en este sentido (Zemann *et al.*, 2006).

En tripanosomátidos la mayoría de los genes codificantes para proteínas se organizan en tandem y se transcriben de forma policistronica (Thomas *et al.*, 1993). De forma que los policistrones deben ser madurados a monocistrones mediante dos mecanismos: La adición de la secuencia líder del ‘splicing’ o mini-exon en el extremo 5’ y la de una cola de poli-adeninas en el extremo 3’. Como consecuencia, en tripanosomátidos la regulación de la expresión génica no es controlada durante el inicio de la transcripción, sino de forma post-transcripcional a través del procesamiento, estabilidad, localización y traducción de los ARNs mensajeros (Nozaki & Cross, 1995).

De esta manera las regiones no codificantes localizadas entre los diferentes marcos de lectura o regiones intergénicas, se han visto implicadas en los mecanismos de regulación de la expresión génica que operan tanto a nivel post-transcripcional como traduccional. Se ha demostrado que las señales del ‘trans-splicing’ presentes en las regiones intergénicas determinan la poliadenilación del gen localizado corriente arriba, afectando así su proceso de maduración (Nozaki & Cross, 1995). Ejemplos de estos tipos de regulación lo constituyen las secuencias intergénicas de los genes codificantes para la proteína de choque térmico 70 (HSP70) de *Leishmania infantum* que operan a nivel traduccional (Folgueira *et al.*, 2005) y las de los genes codificantes para el antígeno de membrana FL-160 de *T. cruzi*, los cuales actúan a nivel post-transcripcional (Weston *et al.*, 1999).



Las regiones intergénicas de tripanosomátidos constituyen por lo tanto un blanco inherente de estudio a pesar de no tener función codificante para productos proteicos. Es así, como por ejemplo Brandao & Fernández. (2006) demuestran como la región 3' no traducida (la cual hace parte de la región intergénica o espaciadora) de los genes codificantes para la calmodulina, acumula mutaciones entre los diferentes linajes de *T. cruzi*, que hacen posible su distinción utilizando métodos filogenéticos.

La histona H2A es una proteína conservada evolutivamente la cual puede presentar organización genómica diferente según la especie y la cepa (Maxson *et al.*, 1983). En *T. cruzi* se han encontrado diferencias en el número de copias, organización cromosomal y el nivel de expresión de sus mARNs (Thomas *et al.*, 2000). Por su parte, en *T. rangeli* se han observado diferencias a nivel de la secuencia al comparar la región intergénica del gen H2A entre dos cepas (Cuervo *et al.*, 2006). Por lo tanto, estas secuencias pueden constituir un marcador nuclear útil para la agrupación y diferenciación de distintas cepas de *T. rangeli*, adicional a los actualmente postulados como es el ADNk (Vallejo *et al.*, 2002), espaciador no transcrito de los genes ribosomales (SIU-ITS) (Da Silva *et al.*, 2004) y el gen mini-exon (Grisard *et al.*, 1999).

Por otra parte, Yang *et al.*, (2004) estudiaron las relaciones filogenéticas entre varias especies del grupo de *Drosophila melanogaster* usando las regiones espaciadoras de los genes histona H2A-H2B, encontrando resultados consistentes al usar distintos métodos de reconstrucción filogenética como máxima parsimonia, máxima verosimilitud y métodos bayesianos.

Simpson *et al.* (2006), utilizaron las secuencias de proteínas de choque térmico 'HSPs' y genes ribosomales como la SSU-ARNr, con el fin de agrupar especies de tripanosomátidos y parásitos de vida libre, todos pertenecientes al orden *Kinetoplastida*; demostraron la cercanía ancestral de *Bodo saltans* a especies del género *Trypanosoma*.



Dentro del anterior contexto, en este trabajo se estudiaron las relaciones filogenéticas entre diversas cepas de *T. rangeli* y *T. cruzi* usando como base la región intergénica de los genes codificantes para la histona H2A del parásito.

En primer lugar, se detectaron diferencias en el tamaño de los fragmentos amplificados al utilizar los iniciadores H14IntF/R. Encontrándose mayor tamaño en las cepas KP1 (+) Choachí y H14 correspondientes a 324 y 316 pb respectivamente, que en las cepas KP1 (-) Tre, 5048 y C23 los cuales amplificaron fragmentos de 309, 307 y 309 pb respectivamente, mostrando estas últimas secuencias una menor dispersión en sus tamaños. Esta diferencia se caracteriza principalmente por eventos de inserción/delección, donde para el caso de las cepas KP1 (+) no existe homogeneidad en dicho polimorfismo ya que para la cepa Choachí existe una inserción de siete nucleótidos de guanina en la posición 166 ausente en la cepa H14. Estos resultados sugieren una mayor heterogeneidad dentro del grupo KP1 (+), comparado con las cepas KP1 (-). Hecho que debe confirmarse al realizar este ensayo con un número superior de cepas.

Llamativamente, estudios de cariotipo realizados en el LPM de la PUJ han demostrado como al separar los cromosomas de cepas KP1 (-) y KP1 (+) del parásito mediante electroforesis en gel de campo pulsado, las primeras exhiben un corrido homogéneo indistinguible entre ellas, mientras que las cepas KP1 (+) presentan heterogeneidad entre sus perfiles de migración (Urueña & Santander, 2003).

En segundo lugar, el análisis de las características de esta región permitió evidenciar la presencia de elementos importantes que participan en la regulación génica, por ejemplo fue posible evidenciar la región putativa formadora de la horquilla involucrada en eventos de regulación génica de los genes histona acoplados al ciclo celular (Alsford & Horn, 2004), la cual se encuentra ubicada en la región 3' no transcrita del gen en las posiciones 11-32 de las secuencias



reportadas. Para todos los casos se observa que es un segmento altamente conservado demostrando la importancia del ADN intergénico en eventos de expresión y regulación génica. Igualmente, en esta misma secuencia se encontraron señales típicas del procesamiento y maduración del ARN mensajero policistrónico en tripanosomátidos, tales como: 5 posibles sitios “AG” de adición del mini-exon o ‘splice’ líder precedidos por el tracto de polipirimidinas requeridas para el proceso de ‘trans-splicing’, los cuales se conservan entre las secuencias estudiadas (Benz *et al.*, 2005) (Fig. 28).

Por otra parte, al comparar la región intergénica de los genes H2A de *T. rangeli* con la previamente reportada para *T. cruzi* cabe destacar la ausencia en *T. rangeli* de los elementos de repetición del tipo SIRE insertados en la región intergénica de los genes H2A (Requena *et al.*, 1992, López *et al.*, 1999, Vásquez *et al.*, 1999).

Con los resultados de secuenciación de las tres cepas de *T. rangeli* y las consignadas en la base de datos del GenBank y en los respectivos proyectos genoma de los parásitos, se elaboraron aproximaciones filogenéticas con el fin de evidenciar la agrupación de estas cepas al ser comparadas con una especie cercana como *T. cruzi* utilizada como grupo raíz.

Mediante el método de distancia ‘Neighbor-Joining’ (Kimura & Nei, 1987) es posible evidenciar que las cepas KP1 (-) se agrupan en un clado claramente definido formando un grupo monofilético soportado por un valor ‘Bootstrap’ del 85 %, distinto a las cepas KP1 (+).

En contraste, también es claro las diferencias presentes entre las secuencias de *T. rangeli* y *T. cruzi* utilizado como grupo raíz, donde la histona H2A se encuentra codificada por dos subunidades de 0,76 (A) y 1,2 kb (B), donde esta última tiene insertado un elemento de tipo SIRE de 447 pb (Puerta *et al.*, 1994).



Adicionalmente, la alta divergencia existente entre las secuencias de estas dos especies de *Trypanosoma* se correlaciona soportando con un valor 'Bootstrap' del 100 % para el clado de *T. cruzi*, claramente distinto al de *T. rangeli*.

De igual forma, la topología del anterior árbol se mantiene al realizar los respectivos análisis discretos (MP y ML), basados en modelos probabilísticos los cuales sugieren una mayor confiabilidad al momento de observar dichas agrupaciones. Para el caso de máxima parsimonia (Felsenstein, 1983) el clado de las cepas KP1 (-) tiene un soporte del 66 %, donde este valor disminuye debido a que la cepa 5048 difiere en la delección de 2 nucleótidos en las posiciones 163 y 263 y en un 'SNP' en la posición 119. Igualmente se observa que *T. cruzi* forma un clado aparte con un 'Bootstrap' del 100 %.

Al emplear el método de máxima verosimilitud o 'Likelihood', fue posible evidenciar una topología semejante a la obtenida con los dos análisis anteriores, donde también difieren los valores que soportan dicha agrupación por las diferencias en el modelo aplicado. En este modelo la agrupación de las cepas KP1 (-) se soporta por un valor del 57 %, inferior a los dos anteriores debido al modelo de sustitución obtenido según la variante (HKY85), el cual sigue el modelo propuesto por Kimura de 2-parámetros (Kimura, 1980) utilizado en el método NJ, donde se tiene una frecuencia mutacional distinta para todas las bases, considerando las diferencias entre las frecuencias de transversiones y transiciones (Felsenstein, 2004), que en las secuencias analizadas se encuentran en menor número. El 76 % encontrado para el nudo correspondiente a las cepas KP1 (-) y Choachí converge con lo mostrado por los dos modelos anteriores, donde las cepas KP1 (+) no se agrupan en un solo clado claramente definido, formando una rama aparte de las cepas KP1 (-), debido a las diferencias en 8 nucleótidos además para la cepa Choachí, teniendo en cuenta que los 'gaps' en el alineamiento son datos tomados como pérdida y no se tienen en cuenta. De especial interés es el hecho de que en este árbol, todas las cepas de *T. rangeli* se agrupan en un solo clado con un valor 'Bootstrap' del 100 %.



De esta manera, los tres modelos de reconstrucción filogenética utilizados muestran como las cepas KP1 (+) y en especial H14, aislada procedente de Honduras, fueron las primeras en divergir de la línea evolutiva principal. Datos que concuerdan con la hipótesis filogenética de que las cepas KP1 (+) dieron origen a las KP1 (-) ya que es más fácil contemplar un escenario en donde haya ocurrido un fenómeno de simplificación genética a través de la delección del minicírculo KP1 (+). Fenómeno que puede ocurrir debido a la presión selectiva generado en las nuevas especies vectores de triatóminos del grupo 'Pallescens' (Urrea *et al.*, 2005)

Llama la atención como todas las cepas colombianas, independiente del grupo al cual pertenece se agrupan en un solo clado con valores 'Bootstrap' de 80, 92 y 76 % en los análisis de NJ, MP y ML, respectivamente. Diferencias, que están dadas por las características intrínsecas de cada uno de los modelos seguidos para la reconstrucción de los árboles.

Si bien existen reportes de asociación de las cepas de *T. rangeli* con su origen geográfico (Steindel *et al.*, 1994), en este caso es necesario ampliar el número de cepas para ver si la asociación anteriormente mencionada permanece.

Según los estudios realizados hasta el momento, se ha podido demostrar variabilidad genética entre las cepas de *Trypanosoma rangeli* (Beltrame-Botelho *et al.*, 2004). De esta forma, se han sugerido agrupaciones para las cepas de este parásito donde la más utilizada es la propuesta por Vallejo *et al.*, (2002) donde se clasifican en grupo 1 a las cepas KP1 (-) y grupo 2 a las KP1 (+) según la presencia o ausencia del minicírculo KP1 con un bloque de secuencia conservada en el ADN del cinetoplasto. Urrea *et al.*, (2005) demostraron que existe una asociación molecular entre el huésped triatómino y el grupo de cepas, relacionando las cepas KP1 (-) con los vectores correspondientes a la línea evolutiva Pallescens y a las cepas KP1 (+) con la línea Prolixus. Estudios realizados por Maia da Silva *et al.*, (2004) utilizando RAPDs sugieren la



existencia de más de un grupo de *T. rangeli* clasificando las cepas en grupos A, B, C y D independiente del origen geográfico de la cepa.

Los resultados encontrados en este estudio apoyan los trabajos de Vallejo *et al.*, (2003) y Urrea *et al.*, (2005) en donde las cepas de *T. rangeli* se agruparon en dos clados distintos, siendo el clado de las cepas KP1 (-) claramente definido y soportado por valores 'Bootstrap' significativos en los tres métodos de reconstrucción filogenética empleadas. De especial interés, es el hecho de que las cepas KP1 (+) y KP1 (-) de *T. rangeli* descritas por Vallejo *et al.*, (2003) parecen corresponder a los grupos A y C de Maia Da Silva *et al.*, (2004). Por lo tanto, se requiere aumentar el número de cepas, especialmente las cepas KP1 (+), así como también se deben incluir aislados procedentes de otros orígenes geográficos, para confirmar estos resultados.

Adicionalmente, al realizar análisis de MP y NJ utilizando un mayor número de cepas reportadas en el GenBank para *T. cruzi*, *T. brucei* y *Leishmania infantum* entre otras, usada esta última especie como grupo raíz externo, cuya aparición se remite a hace más de 55 millones de años en el paleoceno (Kerr, 2006) se evidencia como las diferencias en la región intergénica del gen H2A permite distinguir *T. rangeli* de *T. cruzi*.

Por otro lado, Da Silva *et al.*, (2004) utilizando secuencias de ADNr indicaron que el subgénero *Herpetosoma* es polifilético y a su vez se divide en dos linajes monofiléticos (*T. rangeli* y *T. lewisi*) donde el clado para las cepas de *T. rangeli* se encuentra más cercano a los individuos del subgénero *Schyzotrypanum* (*T. cruzi*) que a *T. lewisi* o *T. brucei*. En este sentido, es importante anotar que en este estudio también se evidenció con mayor proximidad filogenética entre *T. rangeli* y *T. cruzi* que entre *T. rangeli* y *T. brucei*, a pesar de que estos dos últimos parásitos son transmitidos por la saliva del vector (Sección Salivaria), mientras que *T. cruzi* se transmite por las heces de los triatóminos (Sección Stercoraria) (de Santa-Izabel *et al.*, 2004). Resultados de la caracterización molecular genética de distintos genes de *T. rangeli* llevada a cabo en el LPM de la PUJ, como los



codificantes para la Histona H2A (Puerta *et al.*, 2000, Cuervo *et al.*, 2006), la proteína de membrana 11 del cinetoplasto (Diez *et al.*, 2005) y la proteína de choque térmico 70 (Cuervo *et al.*, 2004), soportando estos hallazgos.



## 8. CONCLUSIONES

- ☑ Se soportó la clasificación actualmente reportada para *T. rangeli* como grupos 1 [KP1 (-)] y 2 [KP1 (+)] al utilizar la región intergénica del gen histona H2A como un marcador molecular nuclear diferencial entre cepas.
- ☑ Las cepas KP1 (-) de *T. rangeli* forman un clado bien definido y soportado con valores 'Bootstrap' significativos.
- ☑ Las cepas KP1 (+) de *T. rangeli* presentan mayor heterogeneidad entre si, comparadas con las cepas KP1 (-).
- ☑ Con las cepas de *T. rangeli* estudiadas, es posible sugerir que las cepas KP1 (+) serían las primeras en divergir, probablemente dando origen a las cepas KP1 (-) a través de eventos de simplificación génica como quizá sucedió con la delección del minicírculo KP1 en el ADN del cinetoplasto.
- ☑ Se confirmó la ausencia de elementos repetidos del tipo SIRE en la región intergénica del gen H2A en las cepas de *T. rangeli*.
- ☑ La región intergénica del gen que codifica para la histona H2A permite diferenciar las especies de *T. cruzi* y *T. rangeli*.
- ☑ Se confirmó una mayor proximidad filogenéticamente *T. rangeli* y *T. cruzi* que entre *T. rangeli* y *T. brucei*.



## 9. RECOMENDACIONES

- Aumentar el número de cepas para realizar futuros análisis de este mismo tipo que soporten la clasificación actual del parásito y mejoren la agrupación del mismo al realizar análisis filogenéticos.
  
- Utilizar como blanco de estudio la región intergénica completa del gen Histona H2A.
  
- Continuar la caracterización molecular de las cepas KP1 (+) y KP1 (-) de *T. rangeli* teniendo en cuenta genes de importancia nucleares y mitocondriales en la relación huésped-parásito y/o respuesta inmune.
  
- Comparar estos resultados con los obtenidos posteriormente mediante la secuenciación del genoma completo de *Trypanosoma rangeli* y utilizar otros marcadores moleculares que permitan elucidar el panorama evolutivo, filogenético y biológico del mismo.



## 10. REFERENCIAS

- ▶ **Acosta, I., Romanha, A.J., Cosenza, H. y Kretti, A.U. 1991.** Trypanosomatids isolates from Honduras: Differentiation between *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 44: 676 - 683.
  
- ▶ **Alsford, S. y Horn, D. 2004.** Trypanosomatid histones. Molecular Microbiology. 53: 365 – 372.
  
- ▶ **Añez, N. 1982.** Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. IV – A reconsideration of its systematic position. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 77: 405 - 415.
  
- ▶ **Avise, J.C. 1994.** Molecular markers, natural history and evolution. Chapman & Hall. New York, USA. p. 22 - 43, 109 - 124.
  
- ▶ **Ayala, C., Arévalo, A., Urrea, D., García, J., Yara, D., Lozano, L., Carranza, J. y Vallejo, G. 2001.** Caracterización antigénica de cepas de *Trypanosoma rangeli* aisladas en ciclos de transmisión doméstica y silvestre en áreas endémicas de Colombia. Memorias del XXXVI Congreso Nacional de Ciencias Biológicas.
  
- ▶ **Basso, B., Cervetta, L., Moretti, E., Carlier, Y. y Truyens, C. 2004.** Acute *Trypanosoma cruzi* infection: IL-12, IL-18, TNF, sTNF $\alpha$  and NO in *T. rangeli* vaccinated mice. Vaccine. 22: 1868 - 1872.
  
- ▶ **Beltrame-Botelho, I.T., Gaspar-Silva, D., Steindel, M., Davila, A.M.R. y Grisard, E.C. 2004.** Internal transcribed spacers (ITS) of *Trypanosoma rangeli* ribosomal DNA (rDNA): a useful marker for inter-specific differentiation. Infection, Genetics and Evolution. 5: 17 - 28.
  
- ▶ **Benz, C., Nilsson, D., Andersson, B., Clayton, C. y Guilbride, D.L. 2005.** Messenger RNA processing sites in *Trypanosoma brucei*. Molecular and Biochemical Parasitology. 143 : 125 – 134.



- ▶ **Bernal, M., Vallejo, G., Guhl, F. y Marinkelle, C.J. 2001.** Afinidad por lectinas, sensibilidad a lisis mediada por el complemento y producción de neuraminidasa en cepas domésticas y silvestres de *Trypanosoma rangeli* aisladas en Colombia. Memorias del XXXVI Congreso Nacional de Ciencias Biológicas.
  
- ▶ **Brandao, A. y Fernandes, O. 2006.** *Trypanosoma cruzi*: Mutations in the 3' untranslated region of calmodulin gene are specific for lineages *T. cruzi* I, *T. cruzi* II, and the Zymodeme III isolates. *Experimental Parasitology*. 112: 247 - 252.
  
- ▶ **Carranza, J.C., Vallejo, G., García, J., Yara, D., Urrea, D., Arévalo, A., Aya, C. y 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.
  
- ▶ **Corpet, F. 1988.** Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research*. 16: 10881 - 10890.
  
- ▶ **Cuba, C.A. 1998.** Revisión de los aspectos biológicos y diagnósticos de *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*, artículo de revisión. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 31: 207 - 220.
  
- ▶ **Cuervo, C.L. 2004.** Caracterización molecular del gen H2A de la cepa H14 KP1 (+) en *Trypanosoma rangeli*. Tesis de Maestría en Microbiología, Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
  
- ▶ **Cuervo, C.L., Puerta, C., Mayorga, D. y López, M.C. 2004b.** Caracterización parcial de los genes que codifican para la proteína de choque térmico HSP70 de *Trypanosoma rangeli*. *Infectio*. 8: 268 - 278.
  
- ▶ **Cuervo, C.L., López, M.C. y Puerta, C. 2006.** The *Trypanosoma rangeli* histone H2A gene sequence serves as a differential marker for KP1 strains. *Infection Genetics and Evolution*. 6: 401 - 409.
  
- ▶ **Cummings, M., Klug, W., Mensua, L. y Bueno, D., 2005.** Concepts of genetics. Fifth edition. Prentice hall. Madrid, España. p.110-112.



- ▶ **D'Alessandro-Bacigalupo, A. y Gore-Saravia, N. 1999.** *Trypanosoma rangeli*. Parasitic Protozoa. Academia Press. 2: 1 – 54.
  
- ▶ **Da Silva, M.F., Noyes, H., Campaner, M., Junqueira, A.C.V., Coura, J.R., Añez, N., Shaw, J.J., Stevens, J.R. y 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.
  
- ▶ **De Miranda Santos, I. y Pereira, M.E. 1984.** Lectin discriminate between pathogenic and non-pathogenic South American Trypanosomes. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 33: 839 - 44.
  
- ▶ **de Santa-Izabel, A., Vermelho, A.B., Branquinha, M.H. 2004.** Proteolytic activities in *Trypanosoma rangeli* and stercorarian trypanosome: taxonomic implications. Parasitology Research 94: 342 – 348.
  
- ▶ **Díez, H., Thomas M.C., Urueña, C.P., Santander, S.P., Cuervo, C.L., López M.C. y Puerta, C.J. 2005.** Molecular characterization of the kinetoplastid membrane protein-11 genes from the parasite *Trypanosoma rangeli*. Parasitology. 130: 643 - 651.
  
- ▶ **Felsenstein, J. 1973.** Maximum-likelihood and minimum-steps methods for estimating evolutionary trees from data on discrete characters. Systematics Zoology. 22: 240 - 249.
  
- ▶ **Felsenstein, J. 1981.** Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. Journal of molecular evolution. 17: 368 – 376.
  
- ▶ **Felsenstein, J. 1988.** Phylogenies from molecular sequences: Inference and reliability. Annual review of genetics. 22: 521 – 565.
  
- ▶ **Felsenstein, J. 2004.** Inferring phylogenies. Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland, USA. p. 97 – 104, 200 – 212.



- ▶ **Folgueira, C., Quijada, L., Soto, M., Abanades, D.R., Alonso, C. y 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. *Journal of Biological Chemical.* 42: 32172 - 32183.
  
- ▶ **Galanti, N., Galindo, M., Sabaj, V., Espinoza, I. y Toro G.C. 1998.** Histone Genes in *Trypanosomatids*. Review from Department of Cell Biology and Genetics, School of Medicine, University of Chile.
  
- ▶ **Grisard, E.C., Campbell, D.A. y Romanha, A.J. 1999.** Mini-exon gene sequence polymorphism among *Trypanosoma rangeli* strains isolated from distinct geographical regions. *Parasitology.* 118: 375 - 382.
  
- ▶ **Guhl, F. y Marinkelle, C.J. 1982.** Antibodies against *Trypanosoma cruzi* in mice infected with *T. rangeli*. *Annual Tropical Medicine Parasitology.* 76: 361 - 366.
  
- ▶ **Guhl, F., Hudson, L. Marinkelle, C.J., Jaramillo, C. y Bridge, D. 1987.** Clinical *Trypanosoma rangeli* infection as a complication of 'Chagas' disease. *Parasitology.* 94: 475 - 484.
  
- ▶ **Guhl, F. y Nicholls, S. 2001.** Manual de Procedimientos para el Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. Universidad de los Andes. Bogotá, Colombia.
  
- ▶ **Guhl, F. y Vallejo, G.A. 2003.** *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920 – An update review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 98: 435 - 442.
  
- ▶ **Hall, T.A. 1999.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series.* 41: 95 – 98.
  
- ▶ **Hall, B.G. 2005.** Phylogenetic trees made easy. A how to manual. 2<sup>nd</sup> edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, USA. p. 9 - 60.



- ▶ **Hasegawa, M., Kishino, H. y Yano, T. 1985.** Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*. 22: 160 – 174.
  
- ▶ **Henriksson, J., Solar, A., Rydaker, M., Sousa, O.E. y Petterson U. 1996.** Karyotype variability in *Trypanosoma rangeli*. *Parasitology*. 112: 385 - 391.
  
- ▶ **Hoare, C.A. 1972.** The Trypanosomes of Mammals a zoological Monograph. Blackwell Scientific Publication, Oxford.
  
- ▶ **Kerr, S. 2006.** Molecular trees of trypanosomes incongruent with fossil records of hosts. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 101: 25 – 30.
  
- ▶ **Kimura, M. 1980.** A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 16: 111 – 120.
  
- ▶ **Kreier, J y Baker, J. 1992.** Parasitic Protozoa. Academic press Inc. New York, USA. p. 1 - 15.
  
- ▶ **Kumar, S., Tamura, K. y Nei, M. 2004.** MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150 - 163.
  
- ▶ **Lewin, 2004.** Chromosomes consist of nucleosomes. In: *Genes VIII*. Oxford University Press Inc. New York-USA. p: 797 - 844.
  
- ▶ **Li, W.H. 1997.** Molecular evolution. Sinauer Associates Inc Publishers. Sunderland, USA. p. 99 - 141.
  
- ▶ **Luque, J., y Herraiez, A. 2001.** Texto ilustrado de Biología Molecular e ingeniería genética: Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. Editorial Harcourt. Madrid, España p. 55 - 60.
  
- ▶ **López, M.C., Olivares, M., González. C.I., Martín, F., Garcia, J.L. y Thomas, M.C. 1999.** Elementos móviles: ¿Ventaja evolutiva o parasitismo molecular?. *Ars. Pharmacology*. 40: 5 - 24.



- ▶ **Macedo, A.M., Vallejo, G.A., Chiari, E. y Peña, S.D.J. 1993.** ADN fingerprinting reveals relationships between strains of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*. En: Pena S D J, Chakraborty R, Epplen J T, Jeffreys A J, eds. DNA Fingerprinting: State of the Science. Basel/Switzerland, Birkhauser Verlag, p. 321 - 329.
  
- ▶ **Maia da Silva F., Rodriguez A.C., Campaner M., Takata C.S., Brigido M.C., Junqueira A.C., Coura J.R., Takeda G.F., Shaw J.J. y Teixeira M.M. 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 - 94.
  
- ▶ **Marañón, C., Puerta, C., Alonso, C. y López M.C. 1998.** Control mechanisms of the H2A genes expresión in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 92: 313 - 324.
  
- ▶ **Marañón, C., Thomas, M.C., Puerta, C., Alonso, C. y López, M.C. 2000.** The stability and maturation of the H2A histone mRNAs from *Trypanosoma cruzi* are implicated in their post-transcriptional regulation. *Biochemical Biophysical Acta*. 1490: 1 - 10.
  
- ▶ **Marinkelle, C.J., Vallejo, G.A., Guhl, F., y Sanchez, N. 1985.** Diferenciación entre *T. cruzi* y *T. rangeli* en el intestino del vector *Rhodnius prolixus*, en base al comportamiento de estos flagelados frente a la actividad lítica del complemento. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 27: 21 - 25.
  
- ▶ **Maslov, D.A., Merzlyak, E., Yurchenko, V., Kolesnikov, A.A., Alexandrov, K. y Podlipaev, S.A. 2001.** Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids based on small subunit rRNA genes: polyphyly of Leptomonas and Blastocrithidia. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 48:161 - 169.
  
- ▶ **Maxson, R., Cohn, R., Kedes, L. y Mohum, T. 1983.** Expression and organization of histone genes. *Annual review of genetics*. 17: 239 – 277.
  
- ▶ **Morales, L., Romero, I., Diez, H., Del Portillo, P., Montilla, M., Nicholls, S. y Puerta, C. 2002.** Characterization of a candidate *T.rangeli* small nucleolar RNA gene and its application in a PCR-based parasite detection. *Experimental Parasitology*. 102: 72 – 80.



- ▶ **Nei, M. 2000.** Molecular evolutionary and phylogenetics. Columbia University Press. New York, USA. p. 287 - 294.
  
- ▶ **Nozaki, T. & Cross, G.A. 1995.** Effects of 3' untranslated and intergenic regions on gene expression in *Trypanosoma cruzi*. Molecular and Biochemical Parasitology. 75: 55 – 67.
  
- ▶ **Organización Mundial de la Salud (OMS). 2002.** Control de la enfermedad de Chagas. Informe de un Comité de Expertos. Serie de Informes Técnicos. Ginebra, Suiza. No. 905.
  
- ▶ **Page, R. & Holmes, E.C. 1998.** Molecular evolution, A Phylogenetic approach. Blackwell Science Oxford. London, England. p.172 - 185.
  
- ▶ **Paláu, M.T., Mejía, A. y Zuñiga, C.A. 2001.** *Trypanosoma rangeli*: Lo que se conoce y el impacto de su presencia. Revista Medicina UNAB, Chile. 24-11-2004.
  
- ▶ **Paláu, M.T., Mejía, A.J., Vergara, U. y Zúñiga, C.A. 2003.** Action of *Trypanosoma rangeli* in infections with virulent *Trypanosoma cruzi* populations. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 98: 543 - 548
  
- ▶ **Pavía, P. 2004.** Identificación de *T. cruzi* y *T. rangeli* mediante dos pruebas de PCR basadas en los genes codificantes para la Histona H2A y el snoRNA-C11 respectivamente. Tesis de Maestría en Microbiología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
  
- ▶ **Pereira, E.E. y Moss, D. 1985.** Neuraminidase activity in *Trypanosoma rangeli*. Molecular and Biochemistry Parasitology. 15: 95 – 103
  
- ▶ **Puerta, C., Martin, J., Alonso, C. y López, M.C. 1994.** Isolation and characterization of the gene encoding histone H2A from *Trypanosoma cruzi*. Molecular and Biochemical Parasitology. 64: 1 – 10.
  
- ▶ **Puerta, C., Cuervo, P., Thomas, M.C. y López, M.C. 2000.** Molecular characterization of the histone H2A gene from the parasite *Trypanosoma rangeli*. Parasitology Research. 86: 916 – 922.



- ▶ **Puerta, C.J. y Urueña, C. 2005.** Prácticas de Biología Molecular. Editorial Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. p. 24 - 30, 45 - 63, 64 - 67.
  
- ▶ **Requena, J.M., Jiménez, A., Soto, M., López, M.C. y Alonso, C. 1992.** Characterization of a highly repeated interspersed DNA sequence of *Trypanosoma cruzi* its potential use in diagnosis and strain classification. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 51: 271 - 280.
  
- ▶ **Rodríguez, E.M., Briceño, L., Chiurillo, M.A., Mosca, W. y Campos, Y. 2004.** Tripanosomiasis americana: aspectos teóricos. Curso latinoamericano sobre enfermedades infecciosas. Instituto de Biomedicina UCV. Caracas, Venezuela.
  
- ▶ **Saitou, N. and Nei, M. 1987** The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4: 406 - 425.
  
- ▶ **Sambrook J., Maniatis T. y Fritsh E.F. 2001.** Molecular cloning. A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York, USA. p. 6.33 – 6.37.
  
- ▶ **Sánchez, I.P., Pulido, X.C., Carranza, J.C., Triana, O. y Vallejo, G.A. 2005.** Inmunidad natural de *Rhodnius prolixus* (Hemiptera): Reduviidae: Triatominae) Frente a la infección con *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* KP1 (-) aislados de *Rhodnius pallescens*, *Rhodnius colombiensis* y *Rhodnius ecuadoriensis*. *Rev. Asoc. Col. Ciencias Biol.* 17: 108 – 118.
  
- ▶ **Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A.R. 1977.** DNA sequencing with chain terminanting inhibitors. *Proceedings of National Academic of Science USA*. 74: 5463 - 5546.
  
- ▶ **Schotellus, J. y Muller, V. 1984.** Interspecific differentiation of *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma conorhini* and *Trypanosoma rangeli* by lectins in combination with complement lysis. *Acta Trópica*. 41: 29 - 38.
  
- ▶ **Simpson, A., Stevens, J.R. y Lukes, J. 2006.** The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends in Parasitology*. 22: 168 – 174.



- ▶ **Soto, M., Requena, J.M., Gómez, J.M., Navarrete, I. y Alonso, C. 1992.** Molecular characterization of a *Leishmania donovani infantum* antigen indentified as histone H2A. *European Journal of Biochemistry*. 205: 211 - 216.
  
- ▶ **Soto, M., Quijada, L., Larreta, R., Iborra, S., Alonso, C. y Requena, J.M. 2003.** *Leishmania infantum* processes a complex family of histone H2A genes: Structural characterization and analysis of expression. *Parasitology*. 127: 95 – 105.
  
- ▶ **Soto, M., Iborra, S., Quijada, L., Folgueira, C., Alonso, C. y Requena J.M. 2004.** Cell-cycle-dependent translation of histone mRNAs is the key control point for regulation of histone biosíntesis in *Leishmania infantum*. *Journal of Biochemistry*. 379: 617 – 625.
  
- ▶ **Sousa, O.E. 1966.** *Trypanosoma rangeli* in Panamá. The thirty-seventh annual report of the work and operation of Gorgas Memorial Laboratory. 16 - 17.
  
- ▶ **Steindel, M., Murta, S.M., Carvalho-Pinto, J.C., Grisard, C.E. y Romanha, A.J. 1992.** The isoenzyme patterns of strains of *Trypanosoma rangeli* from different geographical regions. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*. 87: 244 - 252.
  
- ▶ **Steindel, M., Dias, E., Carvalho, C., Grisard, C.E., Menezes, C., Murta, S., Simpson, A. y Romanha, A. 1994.** Randomly Amplified Polimorphic DNA (RAPD) and Isoenzyme analysis of *Trypanosoma rangeli* strains. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 41: 261 - 267.
  
- ▶ **Stephen, A., Madden, T., Schaffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D. 1997.** Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search program. *Nucleic Acids Research*. 25: 3389 - 3402.
  
- ▶ **Swofford, D.L. 1998.** PAUP\*. Phylogenetic análisis using parsimony (\*and other methods) Version 4. Associates, Sinauer. Sunderland, USA.
  
- ▶ **Thomas, M.C., Fernández, A., Moro, A., García, J.A. y González, A. 1993.** Biología molecular de tripanosomátidos. Nuevas tendencias, *Parasitología Molecular*. 135 - 143.



- ▶ **Thomas, M.C., Olivares, M., Escalante, M., Marañón, C., Montilla., Nicholls, S., López, M.C. y Puerta, C. 2000.** Plasticity of the histone H2A genes in a Brazilian and six Colombian strains of *Trypanosoma cruzi*. *Acta tropica*. 75: 203 - 210.
  
- ▶ **Thompson, J.D., Higgins, D.G. y Gibson, T.J. 1994.** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequences weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acid research*. 22: 4673 – 4680.
  
- ▶ **Toaldo, C.B., Stenidel, M., Sousa, M.A. y Tavares, C.C. 2001.** Molecular karyotype and chromosomal localization of genes encoding O – tubuline, Cisteíne Proteinase, HSP70 and Actin in *Trypanosoma rangeli*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 96: 113 - 121.
  
- ▶ **Triana, O., Ortiz, S., Dujardin, J.C. y Solari, A. 2006.** *Trypanosoma cruzi*: Variability of stocks from Colombia determined by Karyotype and minicircle Southern blot analysis. *Experimental Parasitology*. 113: 62 – 66.
  
- ▶ **Urrea, D.A., Carranza, J.C., Cuba, C.A., Gurgel-Goncalves, R., Guhl, F., Schofield, C.J., Triana, O. y Vallejo, G.A. 2005.** Molecular characterization 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. *Infection Genetic and Evolution*. 2:123 - 129.
  
- ▶ **Urueña, C.P., Santander, S.P., Díez, H., Montilla, M., Zarante, I., Thomas, M.C., López, M.C. y Puerta, C. 2004.** Chromosomal localization of the KMP-11 genes in the KP1 (+) and KP1 (-) strains of *Trypanosoma rangeli*. *Biomédica*. 2: 200 - 203.
  
- ▶ **Urueña, C.P. y Santander, S.P. 2003.** Determinación de la localización cromosómica de los genes que codifican para la proteína KMP11 de *Trypanosoma rangeli*. Tesis de pregrado en Bacteriología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
  
- ▶ **Vallejo, G.A., Marinkelle, C.J., Guhl, F. y De Sánchez, N. 1988.** Comportamiento de la infección y diferenciación morfológica entre *Trypanosoma cruzi* y *T. rangeli* en el intestino vector *Rhodnius prolixus*. *Revista Brasileira de Biología*. 3: 577 - 587.



- ▶ **Vallejo, G.A., Silva, J.C., Castañeda, N., Jaramillo, J.C., Carranza, J.C., Sánchez, J.L. y Guhl, F. 1997.** Two major sub-populations of *Trypanosoma rangeli* in Colombia defined by supespecific kDNA probes. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 92: 192 - 197.
  
- ▶ **Vallejo, G.A. 1998.** Estudios comparativos entre las secuencias de kDNA de *Trypanosoma rangeli* y su aplicación en el diagnóstico molecular de la tripanosomiasis americana. Actualidad Biológica. 20: 43 – 56.
  
- ▶ **Vallejo, G.A., Guhl, F., Carranza, J.C., Lozano, L.E. y Marinkelle, C.J. 2000a.** Evolución clonal o especiación en *Trypanosoma rangeli*. Memorias curso Taller Internacional CIMPAT. Universidad de los Andes. Bogotá, Colombia.
  
- ▶ **Vallejo, G.A., Guhl, F., Carranza, J.C. y Marinkelle, C.J. 2000b.** Caracterización biológica, bioquímica, molecular y genética de *Trypanosoma rangeli* en Colombia y en América. Memorias curso Taller Internacional CIMPAT. Universidad de los Andes. Bogotá, Colombia.
  
- ▶ **Vallejo, G.A., Guhl, F., Carranza, J.C., Lozano, L.E., Sánchez, J.L., Jaramillo, J.C., Gualtero, D., Castañeda, N., Silva, J. y Steindel, M. 2002.** kDNA markers define two major *Trypanosoma rangeli* lineages in Latin-America. Acta Tropica. 81: 77 - 82.
  
- ▶ **Vallejo, G.A., Guhl, F., Carranza, J.C., Moreno, J., Triana, O. y 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. Infection Genetics and Evolution. 3: 39 – 45.
  
- ▶ **Vallejo, G.A., Guhl, F., Carranza, J.C., Triana, O., Pérez, G., Ortiz, P.A., Marín, D.H., Villa, L., Suárez, J., Sánchez, I.P., Pulido, X., Rodríguez, I.B., Rivera, F.A., Cuba-Cuba, C. y 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.
  
- ▶ **Vasquez, M.P. y Lewin, M.J. 1999.** Functional analysis of the intergenic regions of Tcpl2β gene loci allowed the construction of an improved *T. cruzi* expression vector. Gene. 239. 217 – 225.



- ▶ **Weston, D., La Flamme, A.C. y Van Voorhis, W.C. 1999.** Expression of *Trypanosoma cruzi* surface antigen FL-160 is controlled by elements in the 3' untranslated, the 3' intergenic, and the coding regions. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 102: 53 - 66.
  
- ▶ **Wolffe, A.P. y Hayes, J.J. 1999.** Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids Research*. 27: 711 - 720.
  
- ▶ **Yang, Y., Zhang, Y.P., Quian, Y.H. y Zeng, Q.T. 2004.** Phylogenetic relationships of *Drosophila melanogaster* species group deduced from spacer regions of Histone gene H2A-H2B. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 30: 336 – 343.
  
- ▶ **Zeledón, 1965.** *Trypanosoma rangeli* en glándulas salivales de *Rhodnius pallescens* de Panamá. *Review Biology Tropical*. 13: 157 - 159.
  
- ▶ **Zemann, A., Bekke, A., Kiefmann, M., Brosius, J. y Schmitz, J. 2006.** Evolution of small nucleolar RNAs in nematodes. *Nucleic Acids Research*. 34: 2676 – 2685.
  
- ▶ **Zúñiga, C., Palau, M., Penin, P., Gamallo, C. y Dediego, J.A. 1997.** Characterization of a *Trypanosoma rangeli* strain of Colombian origin. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 92: 523 - 530.



## 10. ANEXOS

### ANEXO 1

#### Electroforesis en gel de agarosa

1. Pesar la agarosa dependiendo del porcentaje y volumen que se va a utilizar. Ejemplo: Para una cámara de 30 mL pesar 0,3 g de agarosa y diluir en 30 mL de buffer TAE 1 X.
2. Calentar la mezcla hasta disolver y servir con los peines adecuados en la cámara cuando la temperatura haya disminuido sin dejar que esta se solidifique.
3. Dejar solidificar aproximadamente 40 minutos para que el gel tome la forma de la cámara.
4. Retirar el peine de la cámara y adicionar buffer TAE 1 X al punto que el gel quede totalmente sumergido en este.
5. Sembrar 10  $\mu$ L de marcador de peso molecular, según el tamaño a evaluar y la concentración del gel.
6. Sembrar las muestras de ADN adicionadas de 2  $\mu$ L de buffer de carga 'Load buffer' por cada 10  $\mu$ L de ADN.
7. Conectar los electrodos a la cámara y a la fuente de poder, asegurándose de poner adecuadamente los correspondientes colores, donde el ADN debe correr del electrodo negativo (negra) hacia el electrodo positivo (rojo).
8. Correr la electroforesis cuadrando el voltaje y miliamperaje (100 V – 70 mAmps).

#### SOLUCIONES:

##### 1. Buffer TAE 50 X

- |                              |         |
|------------------------------|---------|
| - Tris                       | 24,2 g  |
| - Ácido Acético              | 5,71 mL |
| - EDTA 0.5M                  | 10 mL   |
| - H <sub>2</sub> O destilada | 100 mL  |

A partir de esta solución TAE 50 X se prepara el TAE 1 X

##### 2. Buffer de muestra 6 X

- |                      |        |
|----------------------|--------|
| - Azul de Bromofenol | 0,25 g |
| - Xilen Cianol FF    | 0,25 g |



- H<sub>2</sub>O destilada 100 mL  
Almacenar a 4° C.

#### COLORACIÓN CON BROMURO DE ETIDIO (BrEt)

1. Una vez corrido el gel, se sumerge en una mezcla de BrEt (0,5 µg/mL) y agua. A partir de un stock de 10 mg/mL se toma 5 µL de BrEt por cada 100 mL de agua.
2. El gel y la mezcla se ponen en agitación por 40 minutos
3. Se retira el exceso de BrEt en el gel con agua destilada por 15 minutos
4. Se observa el gel en el transiluminador U.V (302 nm). Así se puede visualizar el complejo ADN – BrEt.
5. En caso necesario el gel es visto bajo el analizador de geles BioRad® Systems, para tomar la respectiva imagen y así analizar la intensidad de sus bandas y realizar las respectivas comparaciones.

#### DECONTAMINACIÓN DE LOS RESIDUOS CONTAMINADOS CON BrEt

1. Se recolecta la solución en un bote únicamente utilizado para este fin, adicionando 1 g de carbón activado por litro de solución.
2. Agitar la mezcla anterior Over Night (O.N).
3. Filtrar la mezcla anterior con papel filtro y se desecha en el lavadero, seguido de un chorro de agua.

Nota: El BrEt es una sustancia teratogénica y carcinogénica, por lo cual se requiere de estrictas medidas de bioseguridad para su manipulación tales como; guantes, gafas, gorro, bata y gafas con protección a la luz UV, así como también de los respectivos pictogramas de riesgo que denoten el peligro de este elemento y el empleo de mecanismos adecuados de decontaminación para aquellos residuos contaminados con dicha sustancia.



## ANEXO 2

### Protocolo de extracción rápida de ADN en gel de agarosa QIA – Quick Gel Extraction Kit Protocol, (QIAGEN)

1. Cortar el fragmento de ADN desde el gel de agarosa con la banda de interés y mantener protegido de la luz.
2. Pesar la banda de gel obtenida y adicionar buffer QG en una proporción de 3:1 con respecto al peso del fragmento. (100 mg ~ 100 µL).
3. Incubar a 50° C por 10', o hasta que el gel se haya disuelto completamente en el buffer, si es necesario utilizar vórtex para disolver.
4. Chequear que el color de la mezcla sea amarillo, similar al buffer QG sin disolver agarosa. Si el color de la mezcla se torna violeta o naranja, agregar 10 µL de Acetato de Sodio 3 M pH 5,0 y mezclar. De tal forma que el color de la mezcla cambiará a amarillo.

La adsorción del ADN a la membrana QIA-Quick es eficiente solo a  $\text{pH} \leq 7,5$ . El buffer QG contiene un indicador de pH el cual es amarillo a  $\text{pH} \leq 7,5$  y naranja o violeta a pH mayor, permitiendo una fácil determinación del pH óptimo para la unión al ADN.

5. Agregar 1 volumen de Isopropanol según el peso en mg de la muestra y mezclar.  
Por ejemplo, si la banda de gel pesa 100 mg, adicionar 100 µL de Isopropanol. Este paso incrementa la liberación de fragmentos de ADN < 500 pb y > 4 kb. Para fragmentos de ADN entre 500 pb y 4 kb, la adición de Isopropanol no tiene efecto sobre el rendimiento. No centrifugar la muestra en este paso.
6. Poner la columna QIA-Quick en un tubo eppendorf estéril.
7. Para unir el ADN, poner la muestra en la columna y centrifugar por 2 minutos. El máximo volumen a poner en la columna es de 800 µL. Para volúmenes mayores, simplemente descartar y cargar nuevamente.
8. Descartar lo que pasa a través de la columna y ponerla nuevamente en el tubo eppendorf, el cual puede ser reutilizado en este paso.
9. (Opcional): Adicionar 0,5 mL de buffer QG a la columna QIA-Quick y centrifugar por 1 minuto. Con el fin de remover cantidades pequeñas de agarosa. Esto es requerido cuando el ADN será usado para secuenciación, transcripción in vitro o microinyección.



10. Adicionar 0,75 mL de buffer PE a la columna para lavarla, centrifugando durante 2 min.

Nota: Dejar la columna quieta de 2-5 minutos después de adicionar el buffer PE, antes de la centrifugación.

11. Descartar el flujo que pasó a través de la columna y centrifugar la columna nuevamente durante 2 minutos.
12. Poner la columna en un nuevo tubo eppendorf estéril.
13. Para eluir el ADN, adicionar 50  $\mu$ L de buffer EB o H<sub>2</sub>O al centro de la membrana y centrifugar la columna por 1 minuto. Alternativamente, adicionar 30  $\mu$ L de buffer de elusión al centro de la membrana para aumentar la concentración de ADN, dejar la columna quieta por 1 minuto, y entonces centrifugar por 1 minuto.



### **ANEXO 3**

#### Protocolo de ligación utilizando el plásmido pGEM® T-Easy (Promega)

Se utilizó una proporción de 3:1 entre el inserto y el vector, porque si la concentración del inserto es poca, hay que mantener una relación 3:1 o mayor.

1. Adicionar en un tubo eppendorf:

- 5 µL de buffer de ligación rápido 2 X, Ligasa T4 de ADN
- 1 µL del plásmido pGEM® T-Easy
- 3 µL del inserto de ADN
- 1 µL de la enzima Ligasa T4 de ADN

2. Incubar por 1 hora a 37° C y almacenar a 4° C O.N.

- Emplear reactivos que correspondan a la misma casa comercial
- Dar vortex al buffer de ligación antes de usar
- Largos tiempos de incubación pueden incrementar el número de transformantes



## ANEXO 4

### Preparación de Medios de cultivo

#### 1. Caldo/Agar Luria Bertani suplementado con Ampicilina (LB-A).

Pesar los siguientes componentes:

- NaCl 5 g
- Triptona 5 g
- Extracto de levadura 2,5 g
- Agua 500 mL
- Hervir hasta disolución y autoclavar
- Adicionar la Ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL, al medio estéril luego de que la temperatura haya disminuido. Partiendo de un stock de 20 mg/mL, adicionar 5 µL por cada mL de medio LB.

#### 2. Agar LB-A

Idem al anterior adicionando:

- Agar-Agar 5 g

#### 3. Caldo LB-A Glicerol

- Adicionar un volumen de Glicerol al 30 % por partes iguales con el medio LB según el volumen que se desee preparar.

#### 4. Stock de Ampicilina

- Vaciar el contenido de la cápsula de Ampicilina y agregar bajo condiciones de esterilidad 50 mL de agua destilada estéril
- Filtrar con filtros milipore de 0,45 µm de diámetro, alícuotar y guardar en nevera a -20° C.

#### 5. Medio SOC

Pesar los siguientes componentes:

- 2 g de Bacto – peptona o triptona
- 0,5 g de extracto de levadura
- 0,5 g de NaCl ó 0,2 mL de NaCl 5 M
- 95 mL de agua destilada
- 1 mL de KCl 250 nM (0,186 g en 10 mL de agua)
- Ajustar a pH final de 7,0 con NaOH 10 M
- Llevar a 100 mL con agua destilada



- Autoclavar a 121° C, 15 lb de presión durante 15 minutos.

Dejar enfriar y adicionar los siguientes componentes previamente autoclavados:

- 1 mL de MgCl<sub>2</sub> 1 M (0.95 g/10 mL)
- 1 mL de MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 1 M (2.47 g/10 mL)
- 1,8 mL de Glucosa en solución al 20 % (1,8 g/10 mL, filtrar en filtros de 0,22 micras).



## **ANEXO 5**

### Transformación de células mediante electroporación (Promega®)

1. Dejar a temperatura ambiente 2 cajas con agar LB-A (Anexo 3) y suplementarlo con 100  $\mu$ L de Tio-Isopropil- $\beta$ -D-Galactósido (IPTG) y 50  $\mu$ L 5-Br-4-Cl-3-indolil- $\beta$ -D-galáctosido (X-Gal), homogenizando sobre la caja. Dejar incubando durante 1 h a 37° C.
2. Sacar del congelador a -70° C el vial con 40  $\mu$ L de las células *E. coli* JM109 y mantenerlas en hielo hasta el momento de utilizar.
3. Encender y alistar el equipo electroporador BioRad Systems®, utilizando el programa Ec1 para bacterias.
4. Mezclar 7  $\mu$ L del producto de ligación con los 40  $\mu$ L de células JM109 y adicionar todo este volumen en la celda de electroporación.
5. Con la celda puesta en el electroporador, dar el pulso con el programa requerido y anotar las condiciones de la electroporación (Kv y mseg).
6. Sacar la celda con las células y adicionar 900  $\mu$ L de medio SOC (Anexo 3), homogenizar evitando la formación de burbujas en la celda.
7. Transferir el contenido de la celda a un nuevo tubo eppendorf incubando a 37° C durante 90 ' en baño de maría.
8. Sembrar en superficie 200  $\mu$ L de la transformación en la caja de agar LB-A suplementado con IPTG y X-Gal. Homogenizar e incubar a 37° C durante aproximadamente 16 h.

### PRUEBA DE TRANSFORMACIÓN (Test de blancas y azules).

1. Después de la incubación, tomar una asada de al menos dos colonias blancas que indica el crecimiento de bacterias transformadas y recombinantes que poseen el inserto de interés clonado. Aquellas colonias de pigmento azul indican la degradación del sustrato X-Gal por bacterias transformadas pero que no poseen el inserto.
2. Pasar las colonias de interés a 5 mL de caldo LB-A, rotular e incubar a 37° C durante 16 h en agitación constante.

Nota: Esta prueba aplica para cepas de *E. coli* y plásmidos que tengan el sistema  $\alpha$  complementación de la  $\beta$ -galactosidasa.



## **ANEXO 6**

### Extracción de ADN plasmídico 'Wizard® Plus SV Minipreps' (Promega®)

1. A partir del cultivo de interés crecido en caldo LB-A, tomar una alícuota de 750  $\mu$ L y mezclar con 750  $\mu$ L de caldo LB-A glicerol al 30%, almacenar a  $-20^{\circ}$  C para su conservación.
2. Centrifugar todo el contenido de caldo LB-A con cultivo restante a 10.000 rpm durante 10 '.
3. Adicionar 250  $\mu$ L de solución de lisis celular y mezclar por inversión.
4. Agregar 10  $\mu$ L de solución proteasa alcalina, mezclar por inversión e incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
5. Agregar 350  $\mu$ L de solución de neutralización y mezclar por inversión.
6. Centrifugar a 10.000 rpm durante 10 minutos a T ° ambiente.
7. Insertar la columna en un tubo eppendorf nuevo y decantar el lisado dentro de esta.
8. Centrifugar a 10.000 rpm por 1 minuto a T ° ambiente y descartar lo que ha pasado a través de la columna.
9. Agregar 750  $\mu$ L de solución de lavado adicionada con etanol y centrifugar a 10.000 rpm por 1 '. Descartar el flujo que pasa a través de la columna y reinsertar la columna en el tubo eppendorf.
10. Repetir el paso anterior con 250  $\mu$ L de solución de lavado.
11. Centrifugar a máxima velocidad por 5 minutos a temperatura ambiente.
12. Transferir la columna a un nuevo tubo eppendorf estéril y adicionar 100  $\mu$ L de agua libre de endonucleasas a la columna, centrifugar a 10.000 rpm por 1 minuto.
13. Descartar la columna, rotular el eppendorf con el producto de extracción y almacenar a  $-20^{\circ}$  C.



## **ANEXO 7**

### Digestión del ADN plasmídico

1. En un tubo eppendorf estéril mezclar los siguientes reactivos:

- ADN plasmídico 10  $\mu$ L
- Agua 'Mili-Q' Estéril 16  $\mu$ L
- Buffer enzima *EcoRI* 3  $\mu$ L
- Enzima *EcoRI* 1  $\mu$ L

- Incubar durante 3 horas a 37° C en baño termostatado.
- Chequear la digestión en un gel de agarosa al 1% utilizando  $\lambda$  *HindIII* como marcador de peso molecular y visualizar bajo luz UV después de teñir con Bromuro de Etidio.



## **ANEXO 8**

### Extracción rápida de ADN bacteriano para chequeo por PCR

1. A partir de un cultivo bacteriano crecido en caldo LB-A tomar una alícuota de 100  $\mu$ L y someterla a 100° C en baño de maría durante 10 minutos.
2. Centrifugar durante 10 minutos a 10.000 rpm, tomando 2,5  $\mu$ L del sobrenadante para realizar la PCR.



## ANEXO 9

### Transferencia alcalina de ADN a membrana de 'Nylon'

1. Una vez corrido, teñido y visualizado el gel, se monta la pirámide según como se indica en la figura de abajo:
2. Sobre una cubeta que contiene el buffer de transferencia NaOH 0,4 N (16 g/L), se coloca un vidrio a manera de puente. Sobre este se coloca una tira de papel 'Whatman' 3M de manera que haga contacto con la solución buffer y lo suficientemente ancha para que el gel quede en contacto con ella.
3. Sobre esta tira de papel se coloca el gel y sobre el se ubica cuidadosamente el filtro de nylon (del mismo tamaño del gel) previamente humedecido en el buffer o en agua.
4. Se hace rodar un agitador de vidrio sobre la membrana para sacar las burbujas del aire que estén atrapadas.
5. Sobre el filtro se ponen 3 tiras de papel Whatman 3 M del mismo tamaño del gel y el primero de ellos debe estar humedecido en el buffer.
6. Poner encima de esto un colchón de papeles absorbentes de igual tamaño que pueden ser papel periódico, o papel de cocina.
7. Finalmente, se pone encima de esto el otro vidrio soporte y un objeto que haga peso sobre esta superficie, permitiendo que el buffer ascienda por capilaridad.
8. Desarmar la pirámide cuidadosamente, el filtro de 'Nylon' se neutraliza con el ADN mirando hacia arriba durante 10 minutos. El gel de agarosa debe ser visto bajo luz UV para observar que no queden residuos del ADN sin transferir.
9. Marcar los pozos de los dientes con lápiz, se identifica con la fecha y corta la esquina derecha. Se sumerge la membrana con el ADN mirando hacia arriba en SSC 2 X, durante 15 minutos con agitación.
10. Dejar secar la membrana sobre una toalla absorbente.
11. Fijar en luz UV la membrana durante 5 minutos por ambos lados.

Nota: La duración de la transferencia depende del tamaño del ADN a transferir, para fragmentos pequeños se recomiendan tiempos no superiores a las 4-5 h y para fragmentos pequeños se deja O.N.



SOLUCIONES:

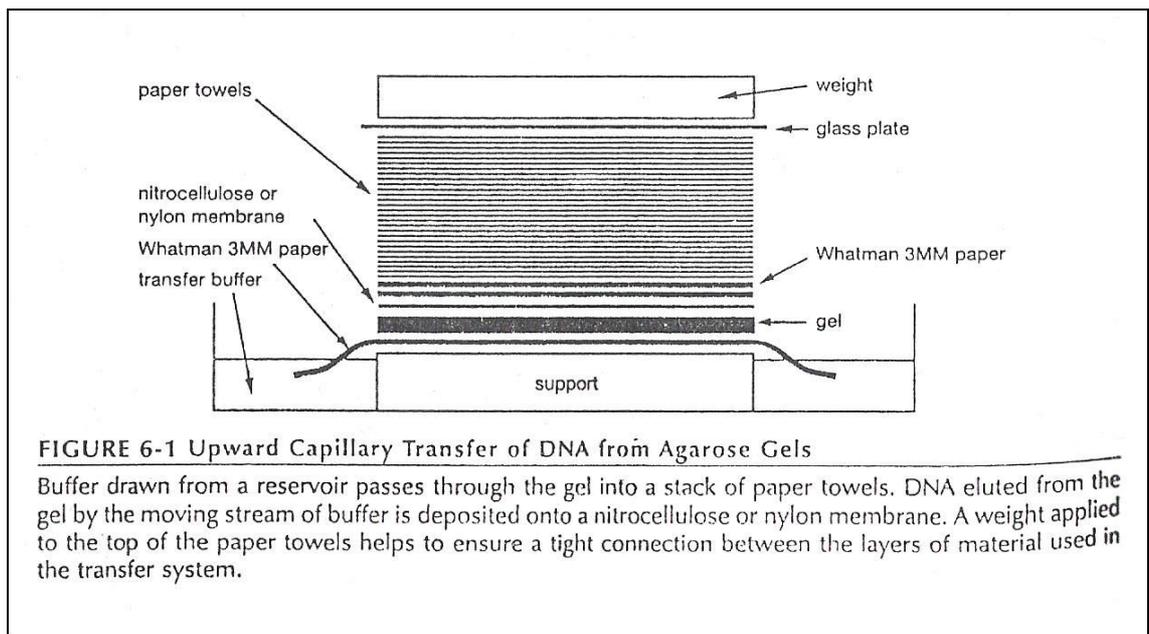
1. SSC 20 X

- Citrato de Sodio dihidratado      88 g
- NaCl                                      175 g
- H<sub>2</sub>O destilada                        1 L
- pH final                                 7,0

A partir de esta solución se prepara la cantidad de solución 2 X y 6 X deseada.

2. NaOH 0,4 N

- NaOH en pastillas                    16 g
- H<sub>2</sub>O destilada                        1.000 mL



## **ANEXO 10**

Marcaje y prueba de la sonda (Histona H2A del clon C1 cepa H14 *T. rangeli*)

1. Diluir la sonda purificada en TBS-T a partir de 1/10 (1  $\mu$ L de sonda y 9  $\mu$ L de TBS-T) hasta 1/10.000. Hacer las mismas diluciones del ADN control 2.
2. Marcar los pozos en la membrana de acuerdo a las diluciones (una fila/muestra).
3. Sembrar en cada pozo 5  $\mu$ L de la dilución correspondiente y un pozo control de TBS-T.
4. Dejar secar la membrana para luego fijarla a luz UV durante 5 minutos.
5. Bloquear la membrana con leche descremada al 5 % por 30 minutos a T ° ambiente con suave agitación.
6. Retirar el conjugado y hacer tres lavados con TBS-T de 10 minutos cada uno a T ° ambiente y suave agitación.
7. Adicionar buffer final de lavado (Tris-MgCl<sub>2</sub>, pH 9) durante 10 minutos en agitación suave.
8. Incubar la membrana a temperatura ambiente durante 30 minutos en oscuridad a T ° ambiente y agitación con la solución de revelado (BCIP y NBT) (Anexo 10).
9. Lavar el filtro con agua destilada y secarlo con papel filtro, mantener la membrana completamente seca y protegida de la luz para evitar que se pierda la señal.



## ANEXO 11

### ‘Southern Blot’ - Hibridación

1. Colocar un filtro en una caja a la medida, con el ADN mirando hacia arriba.
2. Agregar la solución de prehibridación (Solución 1) precalentada a 65° C, de tal manera que quede cubierto el filtro.
3. Incubar con agitación a 42 °C durante 1-4 h.
4. Descartar la solución de prehibridación y adicionar la solución de hibridación (Solución 2), precalentada a 42 °C.
5. Incubar con agitación O.N a 42° C (hasta 2 días).
6. Retirar cuidadosamente el filtro y lavarlo para retirar el exceso de sonda no unida, guardar la sonda a 0° C.
7. Lavar la membrana 1 vez en SSC 2 X, SDS (0,1 % a 0,5 %, dependiendo del ‘background’) a temperatura ambiente durante 5 minutos.
8. Lavar 15 minutos en SSC 1 X, SDS 0,5 % a 42 °C.
9. Lavar 15 minutos en SSC 0,5 X, SDS 0,5 % a 42 °C.
10. Lavar 15 minutos en SSC 0,1X, SDS 0,5 % a 42 °C.
11. Enjuagar en SSC 2 X y guardar a T ° ambiente hasta revelado.

#### SOLUCIONES:

1. Prehibridación:

<b>Reactivo</b>	<b>Vf = 12,5 mL</b>	<b>Vf = 25 mL</b>
Formamida	6,25 mL del frasco	12,5 mL del frasco
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,2 0,12 M	1,5 mL de una al 1 M	3 mL de una a 1 M
SDS 7 %	4,37 mL de 20 %	8,75 mL de 20 %
NaCl 0,25 M	0,625 mL de 5 M	1,25 mL de 5 M
EDTA 1 mM	25 µL de 0,5 M	50 µL de 0,5 M

Por cada 25 mL de esta solución, se le adiciona 50 µL de esperma de salmón (10 mg/mL), previamente denaturada.

2. Solución de Hibridación: Es la misma solución anterior más la sonda marcada previamente denaturada.



### 3. Esperma de salmón (E. S)

- Disolver 200 mg de E.S en 20 mL de agua
- Agitar con magneto de 4 – 6 h hasta disolución
- Agregar 117 mg de NaCl y disolver
- Extraer una vez con fenol y recuperar fase acuosa
- Extraer una vez con fenol:cloroformo y recuperar fase acuosa
- Pasar 12 veces por aguja No 17
- Precipitar adicionando 40 mL de etanol absoluto frío
- Centrifugar a 12000 rpm durante 30'
- Desechar sobrenadante
- Lavar con etanol al 70 % (10 mL por 5 minutos a 12000 rpm)
- Dejar secar 5 minutos con el tubo boca abajo
- Resuspender en agua estéril en 20 mL, alicuotar en eppendorf y guardar a 20° C.

### 4. Solución de lavados/100 mL.

- SSC 2 X: 10 mL de 20 X + 2,5 mL de SDS 20 %
- SSC 1 X: 5 mL de 20 X + 2,5 mL de SDS 20 %
- SSC 0,5 X: 2,5 mL de 20 X + 2,5 mL de SDS 20 %
- SSC 0,1 X: 0,5 mL de 20 X + 2,5 mL de SDS 20 %.

## REVELADO DE MARCAJE NO RADIOACTIVO.

### MARCAJE NO RADIOACTIVO

Denaturar el ADN a marcar durante calentamiento en baño maria durante 5 minutos e inmediatamente colocarlo en hielo, en un volumen de 24  $\mu$ L (se inicia con 25-500 ng de ADN).

1. Agregar: 5 mL de dNTP mix 10-X + 5  $\mu$ L de solución *Random primer* 2,5 X.
2. Mezclar muy bien.
3. Adicionar 1  $\mu$ L de enzima Klenow y mezclar en centrifuga.
4. Incubar a 37 °C por 1 hora.



## UNIÓN DEL CONJUGADO FOSFATASA ALCALINA-STREPTAVIDINA

1. Lavar el filtro brevemente en TBST 1 X (Solución 1) a temperatura ambiente.
2. Incubar en solución de bloqueo (Solución 2) 1 hora a 65° C con suave agitación.
3. Mientras tanto, centrifugar el tubo del conjugado SA-AP a 15.000 rpm por 30 minutos a 4° C.
4. Remover cuidadosamente 14 µL del sobrenadante y diluir 1/1.000 en TBST a T ° ambiente con agitación.
5. Remover la solución de bloqueo y enjuagar brevemente con TBST a T ° ambiente con agitación.
6. Adicionar el conjugado diluido e incubar por 45 minutos–1 h a T ° ambiente y suave agitación.
7. Retirar el conjugado y lavar la membrana con TBST por 15 minutos a T ° ambiente y suave agitación. Repetir este lavado durante 1 h.
8. Lavar con buffer final de lavado (Solución 3) durante 1 h a T ° ambiente con suave agitación.

## DETECCIÓN

1. Incubar la membrana a T ° ambiente durante 30 minutos en oscuridad y agitación con la solución de revelado (Solución 4) precalentada.
2. Lavar el filtro con agua destilada y secarlo con papel filtro, mantener la membrana completamente seca y protegida de la luz para evitar que se pierda la señal.

## DEHIBRIDAR

- A. SSC 0,1 X  
SDS 0,1 %  
A 80 – 90 ° C 2 veces por 20 minutos y se utilizan 2,5 mL para cada uno
- B. SSC 0,01 X  
SDS 0,01 %  
A 65° C 2 veces por 20'.



## SOLUCIONES:

### 1. TBS 1 X.

- Tris 100 mM 3 g
- NaCl 150 mM 8 g
- KCl 0,2 g
- H<sub>2</sub>O destilada 800 mL
- Ajustar a pH 7,4 con HCl y completar el volumen a 1.000 mL y autoclavar.

### 2. TBST

- Tween-20 (0,05 %) 50 µL para cada 100 mL de solución TBS 1 X.

### 3. Solución de bloqueo

- Leche descremada 5 g
- TBST 100 mL

### 4. Buffer final de lavado

- Tris 100 mM 6,057 g
  - NaCl 100 mM 2,09 g
  - MgCl<sub>2</sub> 6 H<sub>2</sub>O 0,5 g
  - H<sub>2</sub>O destilada 500 mL
- Cuadrar pH a 9,8 y autoclavar

### 5. Solución de revelado del 'Kit'

- NBT (75 mg/mL): Adicionar 44 µL para un Vf=10 mL de buffer final de lavado; ó 66 µL para un Vf=15 mL.
- BCIP (50 mg/mL): Adicionar 33 µL para un Vf=10 mL de buffer final de lavado; ó 49,5 µL para un Vf=15 mL.

### 6. Soluciones para deshibridar

- SSC 0,1 X/SDS 0,1 %  
Lavar las membranas en esta solución a 80-90 °C dos veces durante 20 minutos cada lavado.
- SSC 0,1 X/SDS 0,1 %  
Lavar las membranas en esta solución a 65° C dos veces durante 20 minutos cada lavado.



**ANEXO 12**

**NÚMEROS DE ACCESO AL GENBANK PARA LAS SECUENCIAS REPORTADAS**

NCBI Nucleotide

Search: Nucleotide for [ ] Get Clear

Display: GenBank Show 5 Send to Hide Sequence Linear feature

Range from begin to end Reverse-complemented strand Features: Help

EF100611, Report *Trypanosoma rangeli*. [gi:118573941] [Links](#)

[Features](#) [Sequence](#)

LOCUS EF100611 324 bp DNA linear INV 06-DEC-2006

DEFINITION *Trypanosoma rangeli* isolate Choachi histone H2A intergenic region sequence.

ACCESSION EF100611

VERSION EF100611.1 GI:118573941

KEYWORDS .

SOURCE *Trypanosoma rangeli*

ORGANISM [Trypanosoma rangeli](#)  
 Eukaryota; Eukaryota; Kinetoplastida; Trypanosomatidae; *Trypanosoma*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 324)  
 AUTHORS Suarez, R.A., Cuervo, C.L., Raucher, J. and Puerta, C.J.  
 TITLE The intergenic region of histone H2A genes supports two major *Trypanosoma rangeli* lineages  
 JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 324)  
 AUTHORS Suarez, R.A., Cuervo, C.L. and Puerta, C.J.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (01-NOV-2006) Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana, Cra 7a No. 42- 82, ed 50 Lab 113, Bogotá, DC 1, Colombia

FEATURES Location/qualifiers

source 1..324  
 /organism="Trypanosoma rangeli"  
 /mol\_type="genomic DNA"  
 /isolate="Choachi"  
 /db\_xref="taxon:5631"  
 /country="Colombia"  
 /note="type: KPl(+)"

[misc feature](#) <1..>324  
 /note="histone H2A intergenic region"

ORIGIN

```

1 tagatcaccc tgggggaacg ccattgccc gccacagtag ctacagtggt gccccataga
61 atagtgtgtt tgtttttatt tattttattt tgttggcctg gctctcccca attctctctc
121 tggccctctc ccgggaatg gccaacgccc tttttttttt ttgggggggg ggtattttga
181 aacatttttg ccgcaactg gggggggcgt ggtgtgtgag tctgttttct gttgtgtcat
241 ggtgtcttcc tccctttttt ttttttttgg ttccctctct ggttgttttc ctitgttttt
301 caagaccaca gttgcaacaa gaaa
//
    
```

[Back to top](#) | [WISN to the Help Desk](#) | [Sitemap](#) | [FAQ](#) | [RSS](#)

Sep 27 2006 19:20:06







### ANEXO 13

Resumen de resultados obtenidos para cada uno de los métodos filogenéticos

#### ‘NEIGHBOR JOINING’

MEGA 3.1

No. of Taxa : 7

Data File : C:\Documents and Settings\HP\Mis documentos\Secuencias\H2A no  
cd2.meg

Data Title : : H2A no cd2.txt

Data Type : Nucleotide

Analysis : Phylogeny reconstruction

Tree Inference : =====

Method : Neighbor-Joining

Phylogeny Test and options : Bootstrap (1000 replicates; seed=64238)

Include Sites : =====

Gaps/Missing Data : Complete Deletion

Substitution Model : =====

Model : Nucleotide: Kimura 2-parameter

Substitutions to Include : d: Transitions + Transversions

Pattern among Lineages : Same (Homogeneous)

Rates among sites : Uniform rates

No. of Sites : 258

No Of Bootstrap Reps = 1000

Type: Rooted

SBL: 0.5002840

Condensed value: Condensed value

#### MÁXIMA PARSIMONIA

MEGA 3.1

No. of Taxa : 7

Data File : C:\Documents and Settings\HP\Secuencias\H2A no cd2.meg

Data Title : : H2A no cd2.txt

Data Type : Nucleotide

Analysis : Phylogeny reconstruction

Tree Inference : =====

Method : Maximum Parsimony

Phylogeny Test and options : Bootstrap (1000 replicates; seed=3364)

Search Options : CNI (level=1) with initial tree byRandom addition (10 reps)

Include Sites : =====

Gaps/Missing Data : Complete Deletion

No. of Sites : 258

No Of Bootstrap Reps = 1000

CI = 1.000000



RI = 1.000000  
RCI = 1.000000(for all sites)  
iCI = 1.000000(for parsimony informative sites)  
iRI = 1.000000(for parsimony informative sites)  
iRCI = 1.000000(for parsimony informative sites)

#### PAUP 4.0

Optimality criterion set to parsimony.

Bootstrap method with heuristic search:  
Number of bootstrap replicates = 1000  
Starting seed = 1954894183  
Optimality criterion = parsimony  
Character-status summary:  
Of 332 total characters:  
All characters are of type 'unord'  
All characters have equal weight  
53 characters are constant  
136 variable characters are parsimony-uninformative  
Number of parsimony-informative characters = 143  
Gaps are treated as "missing"  
Starting tree(s) obtained via stepwise addition  
Addition sequence: simple (reference taxon = P63)  
Number of trees held at each step during stepwise addition = 1  
Branch-swapping algorithm: tree-bisection-reconnection (TBR)  
Steepest descent option not in effect  
Initial 'MaxTrees' setting = 100  
Branches collapsed (creating polytomies) if maximum branch length is zero  
'MultTrees' option in effect  
Topological constraints not enforced  
Trees are rooted

1000 bootstrap replicates completed  
Note: Effectiveness of search may have been diminished due to tree-buffer overflow.  
Time used = 00:14:43.4

Bootstrap 50% majority-rule consensus tree

### MÁXIMA VEROSIMILITUD

#### PAUP 4.0

Bootstrap method with heuristic search:  
Number of bootstrap replicates = 1000  
Starting seed = 1615799153  
Optimality criterion = likelihood  
Likelihood settings:  
Number of substitution types = 2 (HKY85 variant)  
Transition/transversion ratio = 2 (kappa = 3.7720756)  
Assumed nucleotide frequencies (empirical frequencies):  
A=0.16003 C=0.24951 G=0.23295 T=0.35751  
Among-site rate variation:  
Assumed proportion of invariable sites = none  
Distribution of rates at variable sites = equal  
These settings correspond to the HKY85 model  
Number of distinct data patterns under this model = 62  
Molecular clock not enforced  
Starting branch lengths obtained using Rogers-Swofford approximation method  
Trees with approximate likelihoods 5% or further from the target score are rejected  
without additional iteration  
Branch-length optimization = one-dimensional Newton-Raphson with pass limit=20,  
delta=1e-06  
-ln L (unconstrained) = unavailable due to missing-data and/or ambiguities  
Starting tree(s) obtained via stepwise addition  
Addition sequence: as-is  
Number of trees held at each step during stepwise addition = 1  
Branch-swapping algorithm: tree-bisection-reconnection (TBR)  
Steepest descent option not in effect  
Initial 'MaxTrees' setting = 100  
Branches collapsed (creating polytomies) if branch length is less than or equal to 1e-08  
'MultTrees' option in effect  
Topological constraints not enforced  
Trees are rooted

1000 bootstrap replicates completed  
Time used = 00:05:54.6

Bootstrap 50% majority-rule consensus tree

