

**CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE UNA AGRUPACIÓN GÉNICA
CODIFICANTE PARA ARNs NUCLEOLARES PEQUEÑOS EN UNA CEPA
H14 KP1(+) DE *Trypanosoma rangeli*.**

**GÓMEZ PEDRAZA MARÍA CAROLINA
NOCUA MARTINEZ PAOLA ANDREA**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
BOGOTÁ ENERO DE 2007**

**CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE UNA AGRUPACIÓN GÉNICA
CODIFICANTE PARA ARNs NUCLEOLARES PEQUEÑOS EN UNA CEPA
H14 KP1(+) DE *Trypanosoma rangeli*.**

**GÓMEZ PEDRAZA MARÍA CAROLINA
NOCUA MARTINEZ PAOLA ANDREA**

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

MICROBIÓLOGO INDUSTRIAL

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
BOGOTÁ D.C.
ENERO 2007**

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 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 al dogma y 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”.

FORMATO DESCRIPCIÓN TRABAJO DE GRADO

AUTOR O AUTORES

Apellidos	Nombres
Gómez Pedraza	María Carolina
Nocua Martínez	Paola Andrea

DIRECTORA

Apellidos	Nombres
Puerta Bula	Concepción Judith

ASESORA

Apellidos	Nombres
Cuervo Patiño	Claudia Liliana

TRABAJO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE: Microbiólogo Industrial

TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO: "Caracterización y Análisis de una Agrupación Génica Codificante para ARNs Nucleolares pequeños en una cepa H14 KP1(+) de *Trypanosoma rangeli*"

FACULTAD DE CIENCIAS

PROGRAMA: Carrera X Especialización ____ Maestría ____ Doctorado ____

NOMBRE DEL PROGRAMA: Microbiología Industrial

CIUDAD: BOGOTA AÑO DE PRESENTACIÓN DEL TRABAJO: ENERO DE 2007

NÚMERO DE PÁGINAS: 120

TIPO DE ILUSTRACIONES:

- Tablas, gráficos y diagramas
- Fotografías

PALABRAS CLAVES:

Trypanosoma rangeli, ARNs nucleolares pequeños, C/D snoARNs, H/ACA snoARNs, procesamiento del rARN ribosomal,

RESUMEN DEL CONTENIDO

Trypanosoma rangeli es un parásito flagelado de animales, insectos triatomíneos y del hombre, distribuido en América Central y América del Sur. Aunque *T. rangeli* no es patógeno para el hombre, a diferencia de *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas, presenta los mismos reservorios y es transmitido al ser humano por los mismos vectores en las áreas endémicas de esta enfermedad, produciendo infecciones mixtas, complicando así el diagnóstico específico de la enfermedad chagásica.

Uno de los grandes aportes de la biología molecular ha sido la identificación de marcadores genéticos o moleculares en el genoma de estos organismos, de manera que poblaciones morfológicamente indiferenciables han resultado constituidas por subpoblaciones genéticamente divergentes. Es así como en *T. rangeli* se han identificado dos subpoblaciones denominadas grupo 1 [KP1(-)] y grupo 2 [KP1(+)], determinadas por la presencia del minicírculo KP1 en el ADN mitocondrial o cinetoplasto del parásito.

Teniendo en cuenta que los ARNs nucleolares pequeños (snoARNs) son secuencias altamente conservadas a lo largo de la escala evolutiva y son indispensables en el procesamiento del ARN ribosomal (rARN) en este estudio se pretendió explorar la utilización de los snoARNs como marcadores moleculares de las subpoblaciones (Grupo 1 y 2) del parásito y contribuir además al conocimiento del genoma del mismo, secuenciando la agrupación génica Cl codificante para varios snoARNs en la cepa H14 KP1(+) de *T. rangeli* con el fin de compararla con la previamente descrita en la cepa C23 KP1(-) de *T. rangeli* (Puerta, 2005).

Los resultados obtenidos mediante análisis bioinformáticos, permitieron la identificación de cinco snoARNs, de los cuales tres pertenecen a la familia H/ACA (Cl3, Cl5 y Cl6) y dos a la familia C/D (Cl1 y Cl4), en estos se logró identificar las zonas de complementariedad con el rARN secuencias conservadas como la caja AGA y las cajas C/D, C'/D' respectivamente.

Por otra parte, al comparar estos snoARNs con la secuencia previamente reportada en la cepa C23 KP1(-) de *T. rangeli*, se obtuvo un alto porcentaje de identidad tanto en la secuencia de

nucleótidos como en la organización de los mismos, razón por la cual se sugiere en principio que estos genes no son útiles para identificar las subpoblaciones KP1(+) y KP1(-) del parásito.

De igual forma, al comparar la agrupación génica CI de la cepa H14 de *T. rangeli* con la de otros tripanosomátidos mediante análisis bioinformáticos, se pudo en primer lugar identificar la presencia en *T. cruzi* de los snoARNs CI3 y CI5, los cuales no han sido anotados a la fecha en el proyecto genoma de este parásito. Así mismo, se detectó una mayor identidad en la secuencia entre *T. rangeli* y *T. cruzi* que entre *T. rangeli* y *T. brucei*; lo cual sustenta una mayor proximidad filogenética entre *T. rangeli* y *T. cruzi* a pesar de que estos parásitos pertenecen a secciones diferentes (Salivaria y Stercolaria, respectivamente).

En segundo lugar se determinó que las secuencias de los snoARNs estudiados comparten los motivos característicos con sus ortólogos en tripanosomátidos, por lo cual es de esperar que estos snoARNs modifiquen los mismos blancos en el ARN ribosomal.

Finalmente, la organización de estos snoARNs en el genoma de los distintos tripanosomátidos refleja las relaciones filogenéticas entre los mismos, en el sentido de que las diferentes especies de tripanosomas conservan el mismo orden, seguido de *Leishmania* en donde si bien se encuentran todos los snoARNs en una misma agrupación, el orden de estos difiere y de *Leptomonas* en donde la agrupación incluye otros snoARNs diferentes.

**CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE UNA AGRUPACIÓN GÉNICA
CODIFICANTE PARA ARNs NUCLEOLARES PEQUEÑOS EN UNA CEPA
H14 KP1(+) DE *Trypanosoma rangeli*.**

María Carolina Gómez Pedraza

Paola Andrea Nocua Martínez

APROBADO

Dra. CONCEPCIÓN J. PUERTA, Ph.D
DIRECTORA

CLAUDIA L. CUERVO P, MSc
CODIRECTORA

Dra. IVONNE BALZER Ph.D
JURADO

JUAN GERMÁN RODRÍGUEZ
JURADO

**CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE UNA AGRUPACIÓN GÉNICA
CODIFICANTE PARA ARNs NUCLEOLARES PEQUEÑOS EN UNA CEPA
H14 KP1(+) DE *Trypanosoma rangeli*.**

**GÓMEZ PEDRAZA MARÍA CAROLINA
NOCUA MARTINEZ PAOLA ANDREA**

APROBADO

Dra. ANGELA UMAÑA M. MPhil
DECANA ACADÉMICA

Mbio. LUIS DAVID GÓMEZ MSc
DIRECTOR DE CARRERA

*Este trabajo de grado lo dedico a mis padres,
quienes han estado siempre a mi lado
para comprenderme, apoyarme y ayudarme
a cumplir todas las metas que a lo largo de mi
Vida me he propuesto. A mi novio, quien
siempre ha estado conmigo y ha vivido
como yo todo este proceso, por su paciencia
y sobre todo su amor. A mi mejor amiga
y compañera de tesis con quien compartí
muchas experiencias gratificantes a lo largo
de estos años ya que sin ella no lo
hubiese logrado, y sobre todo a mi Padre Celestial
por no dejarme desfallecer nunca
y ser la luz que siempre guió mi camino.*

Paola Andrea Nocua Martínez

Este trabajo de grado lo dedico a Dios por estar siempre a mi lado, por ser la fuerza que me inspiró a seguir siempre adelante. A mis padres, por ser mi inspiración y apoyo en la realización de mis sueños y a quienes debo todo lo que soy. A Juan por su paciencia, comprensión y amor incondicional, que hicieron de mi una persona más fuerte, y a mi gran amiga Paola quien fue mi ángel guardián en los momentos más difíciles en el desarrollo de este trabajo.

María Carolina Gómez Pedraza

AGRADECIMIENTOS

A Dios por ser la luz que guía nuestro camino, fuente de toda sabiduría y fortaleza.

A nuestros padres por su apoyo incondicional en todo momento y por brindarnos la seguridad y confianza para seguir adelante.

A Conchita, por su confianza, dedicación y apoyo en la realización de este proyecto. Por habernos brindado la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, quien con su exigencia y constancia nos permitió crecer académica y personalmente.

A Claudia, por su excelente asesoría a lo largo de este trabajo, por ser siempre nuestra luz en los momentos difíciles, por toda su dedicación, las enseñanzas impartidas a lo largo de este año y sobre todo por ser nuestra gran amiga.

A Paula, Hugo, Brian y Janeth, por la paciencia, los consejos y los buenos momentos compartidos.

A Carlos por su paciencia y la ayuda brindada para la culminación de este trabajo.

Y a todas aquellas personas quienes de una forma u otra nos brindaron su apoyo incondicional.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	
2.1 Generalidades de <i>Trypanosoma rangeli</i>	3
2.2 Taxonomía	4
2.3 Ciclo de Vida	5
2.4 Vectores	9
2.5 Epidemiología	10
2.6 Caracterización Bioquímica de <i>T. rangeli</i>	10
2.6.1 Sensibilidad a la Lisis mediada por Complemento	11
2.6.2 Caracterización de Azúcares de membrana con Lectinas	11
2.6.3 Producción de Neuraminidasa	11
2.6.4 Caracterización Antigénica	12
2.6.5 Análisis de Isoenzimas	12
2.7 Variabilidad de <i>T. rangeli</i>	13
2.8 Características Moleculares	
2.8.1 Cinetoplasto de <i>T. rangeli</i>	16
2.8.2 ARNs nucleolares pequeños (snoARNs)	17
3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	29
4. OBJETIVOS	
4.1 Objetivo General	31
4.2 Objetivos específicos	31
5. MATERIALES Y MÉTODOS	
5.1 Obtención del ADN del Parásito	32
5.2 Amplificación de la Agrupación Génica mediante PCR	32
5.2.1 Electroforesis en Gel de Agarosa	33
5.2.2 Extracción del Fragmento de ADN	33

5.3 Clonación de la Agrupación génica CI de la Cepa H14 de <i>T. rangeli</i>	34
5.3.1 Obtención de Clones Recombinantes	34
5.4 Extracción de ADN Plasmídico	35
5.5 Digestión del ADN con Enzimas de Restricción	35
5.6 Ensayos de “Southern blot”	35
5.6.1 Electroforesis en Gel de Agarosa	35
5.6.2 Transferencia e Inmovilización del ADN a un soporte Sólido	36
5.6.3 Obtención y Marcación de la Sonda	36
5.6.4 Ensayos de Hibridación	36
5.7 Secuenciación	37
5.8 Análisis Bioinformáticos	37
6. DIAGRAMA DE FLUJO	38
7. RESULTADOS	
7.1 PCR del gen miniexon	39
7.2 Amplificación del Fragmento de 620 pb Codificantes para la Agrupación Génica CI en <i>T. rangeli</i>	40
7.2.1 Análisis por “Southern blot” de los fragmentos amplificados	42
7.2.1.1 Obtención y marcación de la sonda	42
7.2.1.2 Resultados del ensayo de “Southern blot”	43
7.3 Clonación de la Agrupación Génica CI de <i>T. rangeli</i>	44
7.4 Ensayos de “Southern blot” para la detección de la Agrupación Génica Codificante para snoARNs de <i>T. rangeli</i>	46
7.5 Análisis de la Agrupación Génica CI de <i>T. rangeli</i> H14	47
7.6 Comparación de la Agrupación Génica CPH14 con otros Tripanosomátidos	54
8. DISCUSIÓN	62
9. CONCLUSIONES	72
10. PERSPECTIVAS	74
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
12. ANEXOS	86

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Morfología de <i>T. rangeli</i>	3
Figura 2. Ciclo de vida de <i>T. rangeli</i>	7
Figura 3. Formas básicas evolutivas que identifican a <i>T. rangeli</i>	8
Figura 4. <i>Rhodnius prolixus</i>	9
Figura 5 Representación esquemática de los minicírculos	17
Figura 6 Estructura básica de un C/D snoARN	20
Figura 7 Estructura básica de un H/ACA snoARN	24
Figura 8 Representación esquemática de la agrupación génica CI de <i>T. rangeli</i> C23	26
Figura 9 Secuencia de nucleótidos de la agrupación génica CI de la cepa C23 KP1(-) de <i>T. rangeli</i>	33
Figura 10 Mapa circular del plásmido pGEM®-T Easy	34
Figura 11 PCR del gen miniexon	39
Figura 12 Amplificación del fragmento de interés mediante PCR TrF1/TrR2 en un gel al 1%.	41
Figura 13 Amplificación del fragmento de interés mediante PCR TrF1/TrR2 en un gel al 2%.	41
Figura 14 Digestión del ADN del clon CL de la cepa C23 de <i>T. rangeli</i>	42
Figura 15 Prueba de la sonda	43
Figura 16 Ensayo de “Southern blot” para el producto de la PCR TrF1/TrR2	44
Figura 17 Presencia del fragmento de amplificación TrF1/TrR2 en las colonias examinadas	45
Figura 18 Digestión de ADN plasamídico con EcoRI	46
Figura 19 Ensayo de “Southern blot” para la detección de la agrupación génica CI de la cepa H14 KP1(+) de <i>T. rangeli</i>	47

Figura 20	Secuencia de la agrupación génica de la cepa H14	48
Figura 21	Representación esquemática de la agrupación génica CI de <i>T. rangeli</i> de la cepa H14 KP1(+)	48
Figura 22	Alineamiento entre las secuencias de la cepa C23 y H14	49
Figura 23	Representación gráfica de la estructura de los snoARNs de la cepa H14 KP1(+) de <i>T. rangeli</i>	52
Figura 24	Contig 24854 de <i>T. cruzi</i> .	57
Figura 25	Contig 20874 de <i>T. cruzi</i> .	57
Figura 26	Alineamiento múltiple para la secuencia de <i>T. rangeli</i> H14.	58
Figura 27	Comparación de la representación esquemática de la agrupación CI en tripanosomátidos.	61

LISTA DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1.	Características de los grupos 1 y 2 de <i>T. rangeli</i>	15
Tabla 2.	Ejemplos de C/D snoARNs de algunos tripanosomátidos	22
Tabla 3.	Ejemplos de H/ACA snoARNs de algunos tripanosomátidos	25
Tabla 4.	Comparación de los snoARN de <i>Trypanosoma rangeli</i> con sus ortólogos en tripanosomátidos	28
Tabla 5.	Identificación de las mutaciones encontradas en la secuencia de la cepa H14 de <i>T. rangeli</i>	51
Tabla 6.	Porcentaje de identidad de los alineamientos de cada snoARN de la agrupación génica de la cepa H14 con sus ortólogos.	55
Tabla 7.	Porcentaje de identidad entre los snoARNs CI3 y CI5 de la cepa H14 de <i>T. rangeli</i> con diferentes contigs de <i>T. cruzi</i> .	56
Tabla 8.	Modificaciones del rARN guiadas por los snoARNs ortólogos de la agrupación CI de <i>Trypanosoma rangeli</i>	69

RESUMEN

Trypanosoma rangeli es un parásito flagelado de animales, insectos triatomíneos y del hombre, distribuido en América Central y América del Sur. Aunque *T. rangeli* no es patógeno para el hombre, a diferencia de *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas, presenta los mismos reservorios y es transmitido al ser humano por los mismos vectores en las áreas endémicas de esta enfermedad, produciendo infecciones mixtas, complicando así el diagnóstico específico de la enfermedad chagásica.

Uno de los grandes aportes de la biología molecular ha sido la identificación de marcadores genéticos o moleculares en el genoma de estos organismos, de manera que poblaciones morfológicamente indiferenciables han resultado constituidas por subpoblaciones genéticamente divergentes. Es así como en *T. rangeli* se han identificado dos subpoblaciones denominadas grupo 1 [KP1(-)] y grupo 2 [KP1(+)], determinadas por la presencia del minicírculo KP1 en el ADN mitocondrial o cinetoplasto del parásito.

Teniendo en cuenta que los ARNs nucleolares pequeños (snoARNs) son secuencias altamente conservadas a lo largo de la escala evolutiva y son indispensables en el procesamiento del ARN ribosomal (rARN) en este estudio se pretendió explorar la utilización de los snoARNs como marcadores moleculares de las subpoblaciones (Grupo 1 y 2) del parásito y contribuir además al conocimiento del genoma del mismo, secuenciando la agrupación génica C1 codificante para varios snoARNs en la cepa H14 KP1(+) de *T. rangeli* con el fin de compararla con la previamente descrita en la cepa C23 KP1(-) de *T. rangeli* (Puerta, 2005).

Los resultados obtenidos mediante análisis bioinformáticos, permitieron la identificación de cinco snoARNs, de los cuales tres pertenecen a la familia H/ACA (CI3, CI5 y CI6) y dos a la familia C/D (CI1 y CI4), en estos se logró identificar las zonas de complementariedad con el rARN secuencias conservadas como la caja AGA y las cajas C/D, C'/D' respectivamente.

Por otra parte, al comparar estos snoARNs con la secuencia previamente reportada en la cepa C23 KP1(-) de *T. rangeli*, se obtuvo un alto porcentaje de identidad tanto en la secuencia de nucleótidos como en la organización de los mismos, razón por la cual se sugiere en principio que estos genes no son útiles para identificar las subpoblaciones KP1(+) y KP1(-) del parásito.

De igual forma, al comparar la agrupación génica CI de la cepa H14 de *T. rangeli* con la de otros tripanosomátidos mediante análisis bioinformáticos, se pudo en primer lugar identificar la presencia en *T. cruzi* de los snoARNs CI3 y CI5, los cuales no han sido anotados a la fecha en el proyecto genoma de este parásito. Así mismo, se detectó una mayor identidad en la secuencia entre *T. rangeli* y *T. cruzi* que entre *T. rangeli* y *T. brucei*; lo cual sustenta una mayor proximidad filogenética entre *T. rangeli* y *T. cruzi* a pesar de que estos parásitos pertenecen a secciones diferentes (Salivaria y Stercolaria, respectivamente).

En segundo lugar se determinó que las secuencias de los snoARNs estudiados comparten los motivos característicos con sus ortólogos en tripanosomátidos, por lo cual es de esperar que estos snoARNs modifiquen los mismos blancos en el ARN ribosomal.

Finalmente, la organización de estos snoARNs en el genoma de los distintos tripanosomátidos refleja las relaciones filogenéticas entre los mismos, en el sentido de que las diferentes especies de tripanosomas conservan el mismo

orden, seguido de *Leishmania* en donde si bien se encuentran todos los snoARNs en una misma agrupación, el orden de estos difiere y de *Leptomonas* en donde la agrupación incluye otros snoARNs diferentes.

1. INTRODUCCIÓN

Trypanosoma rangeli (*T. rangeli*) es un protozoo parásito de diversas especies de animales domésticos y silvestres, insectos triatominos del género *Rhodnius* y también del hombre. Este flagelado se encuentra ampliamente distribuido en América Central y América del Sur, superponiendo su distribución geográfica con la otra especie de tripanosomátido, *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), agente etiológico de la enfermedad de Chagas (Cuba, 1998). A pesar de que *T. rangeli* es no patógeno para el ser humano, constituye un serio problema en la epidemiología y el diagnóstico de la enfermedad de Chagas porque ambos parásitos infectan los mismos hospederos vertebrados y vectores triatominos en los países en los cuales son endémicos (Mangrich et al., 2001; Vallejo et al., 2003).

Por lo tanto en países donde *T. rangeli* y *T. cruzi* infectan 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 las dos especies de parásitos (Vallejo, 1998).

Antes de la adopción de la tecnología del ADN, los métodos para el diagnóstico y caracterización de los tripanosomátidos y otros parásitos estaban basados en parámetros biológicos, bioquímicos e inmunológicos (reacciones con anticuerpos monoclonales, policlonales y perfiles isoenzimáticos). No obstante, estos métodos están sujetos a variación fenotípica, pudiendo ser afectados cualitativa y cuantitativamente por la regulación de la expresión génica. Así mismo, durante las etapas del ciclo de vida del parásito se pueden encontrar diferentes enzimas, lípidos, glicoproteínas y ARNs, además de antígenos estadio específicos (Vallejo, 1998).

Uno de los grandes aportes de la biología molecular a estos métodos de detección y caracterización, ha sido la identificación de marcadores genéticos o moleculares en el genoma de estos organismos, de manera que poblaciones morfológicamente indiferenciables han resultado constituidas por subpoblaciones genéticamente divergentes (Vallejo et al., 2002a).

En *T. rangeli* se han identificado dos subpoblaciones denominadas grupo 1 [KP1(-)] y grupo 2 [KP1(+)], determinadas por la presencia del minicírculo KP1 en el ADN mitocondrial o cinetoplasto del parásito (Guhl y Vallejo, 2003; Vallejo et al., 2000).

En este estudio se secuenció la agrupación génica C1 codificante para varios ARNs nucleolares pequeños (snoARNs) en la cepa H14 KP1(+) de *T. rangeli* con el objetivo de compararla con la previamente descrita en la cepa C23 KP1(-) de *T. rangeli* (Puerta, 2005). Lo anterior con el fin de explorar la utilización de los genes snoARNs como marcadores moleculares de las subpoblaciones (grupo 1 y 2) del parásito y contribuir además al conocimiento del genoma del parásito.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades de *Trypanosoma rangeli*

T. rangeli descrito por Tejera en 1920, es un parásito flagelado que infecta vertebrados salvajes y domésticos, incluyendo a los humanos (Urrea et al., 2005).

T. rangeli posee una estructura morfológica semejante a *Trypanosoma lewisi*, especie tipo del subgénero *Herpetosoma*. La forma sanguínea es delgada con una longitud de 26 a 34 μm , incluyendo el flagelo libre, posee un cinetoplasto pequeño, redondo y subterminal, el núcleo está cercano a la mitad del cuerpo y la membrana ondulante bien desarrollada (Figura 1) (Guhl y Vallejo, 2003).

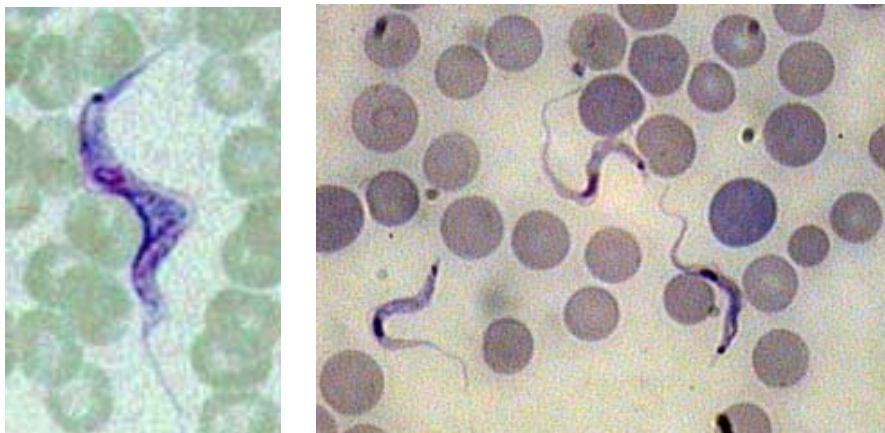


Figura 1: Morfología de *Trypanosoma rangeli*. (Tomado de <http://www.trangelidb.ufsc.br/>)

T. rangeli es la segunda especie de tripanosomátido que con frecuencia infecta al hombre en varios países de América Latina. Aunque *T. rangeli* es no patógeno para el hospedero vertebrado, dicho parásito se estudia dentro del contexto de la biología y la epidemiología de *T. cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas, pues ambas especies comparten vectores (Vallejo

et al., 1988), y producen infecciones mixtas en los vertebrados, originando reacciones serológicas cruzadas que complican el diagnóstico específico de la infección chagásica (Guhl y Vallejo, 2003).

T. rangeli se encuentra ampliamente distribuido en diferentes regiones de Centroamérica tales como Guatemala, El Salvador, Costa Rica y Panamá, en países localizados en el norte de Suramérica tales como Colombia, Venezuela, y Perú, y de manera reciente se ha informado la presencia del parásito en Brasil (Palaú et al., 2001).

2.2 Taxonomía

Dos secciones sin estatus taxonómico fueron creados por Hoare en 1972 para separar los tripanosomas de mamífero cuyo desarrollo ocurre exclusivamente en el intestino de los vectores, y son transmitidos por las heces, la sección Stercoraria, de los tripanosomas transmitidos por inoculación de formas metacíclicas en la saliva; sección Salivaria (De Santaluzabel et al., 2004; Grisard, 2002). Actualmente *T. rangeli* está clasificado en el subgénero *Herpetosoma* perteneciente a la sección Stercolaria (Maia da Silva et al., 2004).

Aunque *T. rangeli* se encuentra en el intestino del vector, en la materia fecal usualmente no se encuentran formas metacíclicas y la contaminación fecal no es el mecanismo usual de transmisión. Después del desarrollo inicial en el intestino, los flagelados penetran a través de la pared, pasan a la hemolinfa y finalmente llegan a glándulas salivares, siendo transmitidos por inoculación de la saliva del vector rica en formas metacíclicas del parásito (Guhl y Vallejo, 2003).

Hoare en 1972 consideró a *T. rangeli* como una especie atípica del subgénero *Herpetosoma*. Añez en 1982 propuso cambiar a *T. rangeli* del subgénero *Herpetosoma*, proponiendo el subgénero *Tejeraia* dentro de la sección Salivaria, indicando que la posición taxonómica de *T. rangeli* y la taxonomía del subgénero *Herpetosoma* debe ser revisada. De acuerdo a lo anterior, estudios recientes de Maia da Silva et al., (2004) indican que *T. rangeli* se relaciona más con *T. cruzi* que con *T. lewisi*.

No obstante, actualmente *T. rangeli* se clasifica en:

Súper Reino	<i>Eukaryota</i>
Orden	<i>Kinetoplastida</i>
Familia	<i>Trypanosomatidae</i>
Género	<i>Trypanosoma</i>
Subgénero	<i>Herpetosoma</i>
Especie	<i>T. rangeli</i>

(Hughes y Piontkivska, 2003; Mejía et al., 2004a).

2.3 Ciclo de vida

Al igual que *T. cruzi*, el ciclo de vida de *T. rangeli* se lleva a cabo en dos etapas, una en el huésped invertebrado o vector y la segunda en el huésped vertebrado. Los triatomíneos vectores se infectan al ingerir sangre de animales con formas tripomastigotes del parásito. Posteriormente, *T. rangeli* se desarrolla en el intestino del insecto produciendo formas similares a amastigotes, epimastigotes cortos, epimastigotes largos y tripomastigotes (Vallejo, 1998).

Posteriormente los flagelados penetran desde el intestino hacia la hemolinfa donde se multiplican intra y extracelularmente, pudiendo ser reconocidos por

el sistema de defensa del vector, del cual se escapan para ascender a las glándulas salivares donde finalmente se transforman en las formas infectantes, los tripomastigotes metacíclicos (Gomes et al., 1999; Guhl y Vallejo, 2003; Maia da Silva et al., 2004). Hecker y colaboradores demostraron que *T. rangeli* invade la hemolinfa pasando a través del epitelio del intestino utilizando una ruta intracelular dentro de una vacuola parasitófora (Hecker et al., 1990).

Para lograr la transformación completa hasta tripomastigotes metacíclicos infectivos en las glándulas salivares, el parásito se une a la superficie de éstas, por medio de ciertos carbohidratos específicos con residuos de N-acetil glucosamina, manosa, N-acetil-galactosamina y fucosa, los cuales le sirven de receptores (Basseri et al., 2002).

Algunos de los parásitos que se encuentran en el intestino van al recto y son evacuados con las heces sin llegar a colonizar las paredes del recto, pudiendo ser transmitidos al huésped vertebrado (D'Alessandro y Saravia, 1992). Sin embargo se ha reportado que este mecanismo de transmisión fecal no es usual (Maia da Silva et al., 2004).

Los tripomastigotes metacíclicos entran en la sangre del huésped vertebrado por capilaridad al ocurrir la picadura del insecto (Figura 2). El número de tripomastigotes se incrementa con el tiempo en la sangre del vertebrado y la duración de la parasitemia en el hombre puede llegar a ser de hasta 18 meses (D'Alessandro y Saravia, 1992)

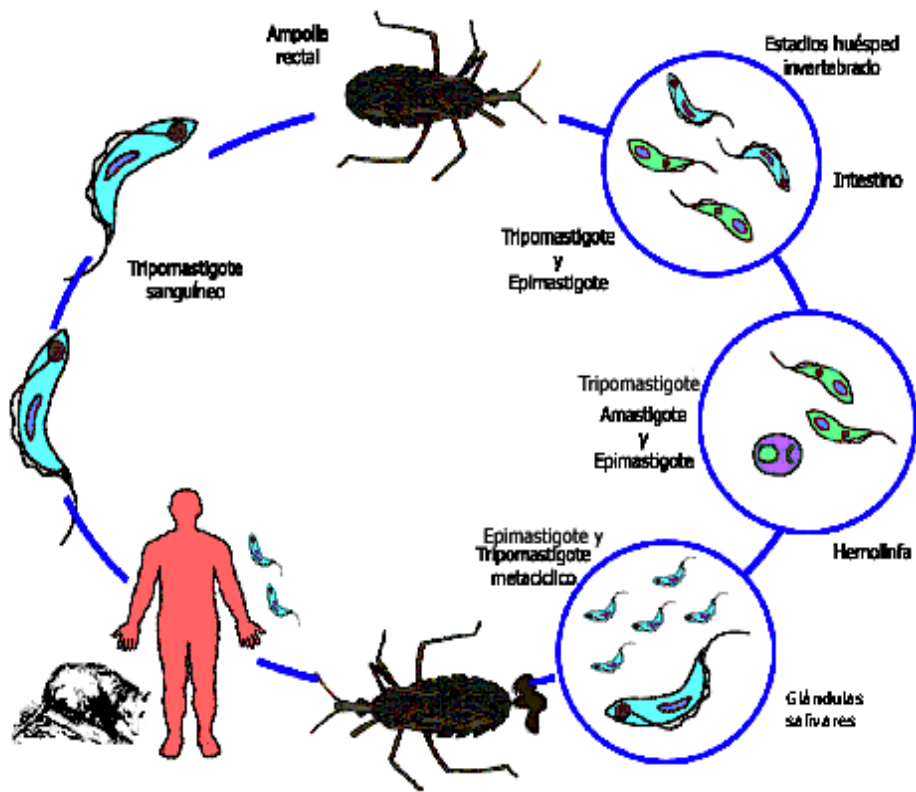


Figura 2: Ciclo de vida de *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* en sus huéspedes vertebrado e insecto vector. (Pavia, 2007)

En cuanto a su morfología *T. rangeli* presenta diferentes formas de acuerdo al sitio donde se encuentre:

- Epimastigote: presente en el tracto digestivo del insecto vector, es replicativo (mediante fisión binaria), de morfología elongada (20-40 µm), y no es infectivo para el hospedero mamífero.
- Tripomastigote: presente en fluidos extracelulares del mamífero hospedero (tripomastigotes sanguíneos) y en la ampolla rectal del vector (tripomastigotes metacíclicos). El tripomastigote es el único estadio no replicativo, es de morfología elongada y se caracteriza por la presencia de un flagelo que emerge cercano al núcleo permaneciendo unido a la membrana plasmática (Figura 3) (Cuba, 1998).

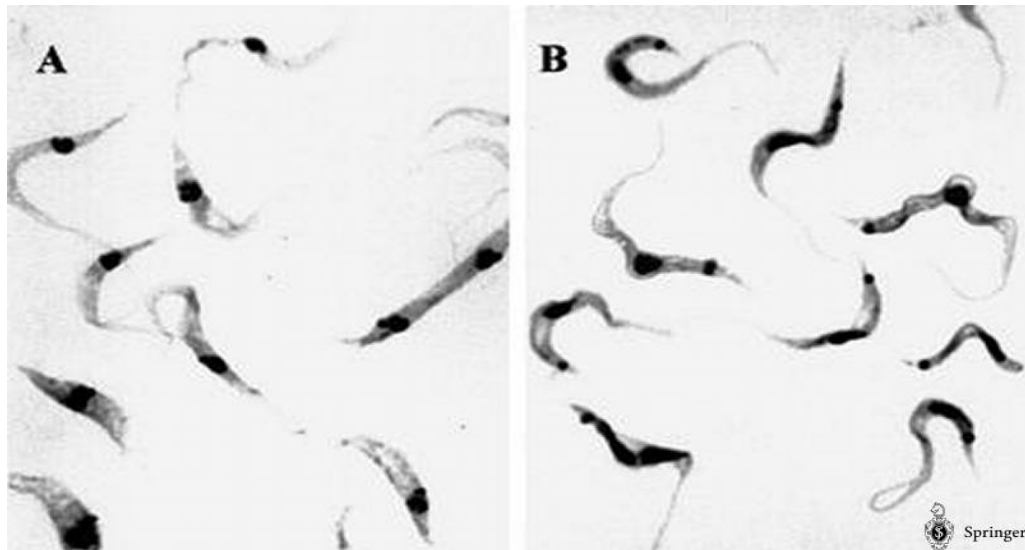


Figura 3: Formas básicas evolutivas que identifican *T. rangeli* morfológicamente, observadas en los huéspedes: **A.** Epimastigotes **B.** Tripomastigotes (Koerich et al., 2002).

Para que un tripanosoma sea considerado como *T. rangeli sensu stricto*, debe presentar una morfología en la sangre del vertebrado compatible con la morfología del subgénero *Herpetosoma* y debe infectar a los triatomíneos vectores con formación de tripomastigotes metacíclicos infectantes en las glándulas salivares. Por lo tanto los flagelados con morfología del subgénero *Herpetosoma* aislados del intestino, pero incapaces de invadir la hemolinfa y producir tripomastigotes metacíclicos en las glándulas salivares de vectores triatomíneos biológicamente comprobados en principio no son considerados como *T. rangeli*, siendo definidos como similares a *T. rangeli* o rangeliformes. (Vallejo et al., 2002a), ejemplos de estos son *Trypanosoma diasi*, *Trypanosoma myrmecophagae*, *Trypanosoma cebus*, *Trypanosoma saimiri*, *Trypanosoma barnolai*, *Trypanosoma mesnilbrimonti*, *Trypanosoma leeuwenhoekii*, *Trypanosoma preguici*, *Trypanosoma mycetae* y *Trypanosoma advieri* (Vallejo et al., 2003).

2.4 Vectores

El género *Rhodnius* es particularmente susceptible a la infección por *T. rangeli* y a la transmisión por inoculación de su saliva. El ciclo extraintestinal en el vector es un fenómeno inconstante que involucra la hemolinfa y las glándulas salivares con producción de tripomastigotes metacíclicos que solo es finalizado por cepas con una fuerte relación y adaptabilidad con su vector local (Guhl et al., 2002; Vallejo et al., 2003).

La transmisión inoculativa al hospedero vertebrado ocurre durante la picadura del vector, especialmente con vectores del género *Rhodnius*. En 12 de las 15 especies de *Rhodnius* actualmente descritas, 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 et al., 2002; Vallejo et al., 2002a; 2003).



Figura 4: *Rhodnius prolixus*: Insecto vector del género *Rhodnius* particularmente susceptible a la infección por *T. rangeli* y a la transmisión por inoculación de su saliva. (Tomado de www.proto.ufsc.br).

Además del género *Rhodnius*, solo se ha reportado la infección natural de *T. rangeli* en glándulas salivares de *Triatoma dimidiata* capturados en viviendas humanas de Colombia, transmitiendo el parásito al hospedero vertebrado mediante picadura. La simple presencia de flagelados semejantes a *T. rangeli* en el intestino de un insecto no prueba que este sea un vector, ya que la evidencia definitiva de su capacidad vectorial es la demostración de tripomastigotes metacíclicos en glándulas salivares y la transmisión del parásito por inoculación a hospederos vertebrados. (Guhl y Vallejo, 2003; Vallejo et al., 2002a, 2003).

2.5 Epidemiología

T. rangeli se encuentra ampliamente distribuido a través de América Latina desde el sur de México hasta la Amazonia de Brasil, siendo Guatemala y Venezuela los países con mayor número de casos de infección en humanos reportados. Se han encontrado animales infectados principalmente en Venezuela, Colombia y Panamá, correspondiendo a perros, gatos, marsupiales y murciélagos entre otros. Estas estimaciones han sido poco difíciles de establecer dado que es muy frecuente encontrar infecciones mixtas por *T. cruzi* y *T. rangeli*, las cuales dificultan la identificación exacta del parásito y por ende no permiten un análisis estadístico preciso sobre la prevalencia y/o incidencia de *T. rangeli*. Por su parte, en Chile, Paraguay, Uruguay y Argentina no existen reportes confirmados de la presencia de *T. rangeli*, en vectores animales y/o el hombre (D'Alessandro y Saravia, 1992).

2.6 Caracterización bioquímica de *T. rangeli*

Varios métodos bioquímicos han sido utilizados para caracterizar *T. rangeli* y diferenciarlo de *T. cruzi*. Entre ellos se encuentran: sensibilidad a lisis mediada por el complemento, caracterización de azúcares de superficie

mediante el uso de lectinas, producción de neuraminidasa, caracterización antigénica y análisis de isoenzimas (Guhl y Vallejo, 2003).

2.6.1 Sensibilidad a la lisis mediada por complemento

En contraste con los cultivos de epimastigotes de *T. cruzi*, los cultivos de epimastigotes de *T. rangeli* son resistentes a la actividad de la lisis por el complemento activado por vía alterna. Esta diferencia en la susceptibilidad a la lisis mediada por el complemento ha sido usada para diferenciar las dos especies en cultivo o a nivel del intestino en el vector (Gulh y Vallejo, 2003; Vallejo et al., 2002a).

2.6.2 Caracterización de azúcares de membrana con lectinas

Varias investigaciones han caracterizado a *T. rangeli* y *T. cruzi* por sus azúcares de superficie. Los resultados de estos estudios han demostrado que varias lectinas tienen especial afinidad por los azúcares D-galactosa, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina y ácido N-acetilneuramínico, azúcares de la superficie de epimastigotes de *T. cruzi*. Así mismo se ha encontrado que los cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* y *T. rangeli* presentan manosa y glucosa en su superficie celular, presentando aglutinación común con las lectinas de *Canavalia ensiformis*, *Pisum sativum* y *Lens culinaris* (Cuba, 1998; Gulh y Vallejo, 2003; Rodríguez-González et al., 2004; Vallejo et al., 2002a).

2.6.3 Producción de neuraminidasa

En 1985 Pereira y Moss reportaron que cultivos de epimastigotes de *T. rangeli* producen neuraminidasa en cantidades fácilmente detectables, comparada con cultivos de epimastigotes de *T. cruzi*. Estas enzimas se

vuelven así importantes marcadores bioquímicos para la diferenciación de las dos especies de flagelados (Gulh y Vallejo, 2003).

2.6.4 Caracterización antigénica

Diversos estudios han demostrado que *T. rangeli* presenta una reacción antigénica cruzada con *T. cruzi*. Esta reacción cruzada ha sido mostrada mediante inmunolectroforesis, ELISA, inmunofluorescencia directa e inmunodifusión doble. Estos estudios muestran que las dos especies comparten por lo menos el 60% de sus antígenos (Gulh y Vallejo, 2003).

2.6.5 Análisis de isoenzimas

Pocos son los estudios de isoenzimas que se han llevado a cabo en *T. rangeli* y además en cada uno de estos estudios el número de cepas utilizado ha sido pequeño. Una primera aproximación usando enzimas para estudiar a *T. rangeli* fue reportado por Kreutzer y Sousa quienes describieron diferencias en los perfiles de las isoenzimas para cepas de Panamá (Gulh y Vallejo, 2003; Kreutzer y Sousa, 1981; Rodríguez-González et al., 2004).

En 1986 Ebert realizó un estudio de isoenzimas de *T. rangeli* y su relación con otros tripanosomas transmitidos por triatomíneos. De este se encontró que de 9 enzimas examinadas solo 3 mostraron perfiles específicos para *T. rangeli*: la Enolasa, la Fosfoglucomutasa (PGM) y la Fosfoglucosa Isomerasa (GPI).

Otra importante contribución a la caracterización enzimática de *T. rangeli* fue reportada por Steindel et al., (1994), quienes usaron 16 cepas de este parásito, de las cuales 8 fueron aisladas de *R. prolixus* y de pacientes de Honduras, Colombia y Venezuela, mientras que las otras 8 cepas se tomaron

de *Panstronqylus megistus* o roedores (*Echimys dasythrix*) del estado de Santa Catarina al sur de Brasil. Los autores estudiaron las enzimas Aspartato amino transferasa (ASAT), Alanina Aminotransferasa (ALAT), Fosfogluco Isomerasa (GPI), Fosfoglucomutasa (PGM), y la Enzima Málica (ME), encontrando que todas las cepas de Santa Catarina fueron isoenzimáticamente idénticas, mientras las cepas de Honduras, Colombia y Venezuela también formaron un grupo altamente homogéneo. Los dos grupos presentaron diferentes patrones para todas las enzimas, excepto para la enzima málica, sugiriendo la existencia de 2 grupos diferentes de cepas de *T. rangeli* (Guhl y Vallejo, 2003; Steindel et al., 1994).

2.7 Variabilidad de *T. rangeli*

Durante más de tres décadas se ha 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 caracterizar estas poblaciones (Vallejo et al., 2002a).

Esta heterogeneidad entre las especies de *T. rangeli* ha sido demostrada mediante técnicas de “ADN fingerprinting”, electroforesis multilocus de enzimas, amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), secuencias de minicírculos de kADN, cariotipo molecular y análisis de genes de mini-exones (Guhl et al., 2002; Vallejo, 1998).

Así por ejemplo, Vallejo et al., (1994) analizaron los polimorfismos del ADN mitocondrial encontrando un nuevo minicírculo de kADN denominado KP1, el cual fue detectado en las cepas de *T. rangeli* aislados en Colombia, Honduras y Venezuela pero no en las cepas aisladas en Santa Catarina al sureste de Brasil. Este hallazgo fue confirmado en un estudio realizado por Steindel et al., (1994) quienes encontraron diferencias en estos dos grupos

de cepas mediante el uso de electroforesis de isoenzimas y amplificación aleatoria de regiones de ADN mediante AP-PCR (Steindel et al., 1994; Vallejo et al., 2000; 2002a).

Más adelante, Vallejo et al., (2002b) realizaron ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los iniciadores S35, S36 y KP1L, los cuales amplifican el ADN de los minicírculos del parásito, encontrando que las cepas de *T. rangeli* difieren en el tipo de minicírculos que portan. Es así como las cepas aisladas de *Rhodnius prolixus* presentan los productos de amplificación correspondientes a los minicírculos KP1, KP2 y KP3 y las cepas aisladas de *Rhodnius colombiensis*, *Rhodnius pallescens* y *Rhodnius ecuadoriensis* presentan los productos de amplificación derivados de los minicírculos KP2 y KP3, pero no de KP1. De manera que algunas especies de *Rhodnius* son susceptibles a cepas de *T. rangeli* KP1(+), mientras otras especies son susceptibles a cepas KP1(-) (Tabla 1). Llamativamente ambos tipos de cepas fueron encontrados en una misma localidad en el departamento del Tolima (Colombia) (Guhl et al., 2002; Guhl y Vallejo, 2003; Mejía et al., 2004b; Vallejo et al., 2001).

Estudios recientes demuestran además variabilidad entre las cepas pertenecientes a los grupos 1 y 2 [cepa KP1(-) y KP1(+)] en el comportamiento biológico, tal como la resistencia a la lisis por el complemento, diferencias en el perfil antigénico y características bioquímicas como presencia de lectinas y neuraminidasas (Tabla 1).

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

Característica	Grupo 1	Grupo 2	Referencias
KP1	Ausente	Presente	Vallejo, 1998; Vallejo et al., 2002; 2003.
Amplificación del gen del miniexón	380 pb	340 pb	Carranza et al., 2003.
Vectores	<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 et al., 2000.
% de Lisis mediada por el complemento	0 – 5,5 %	26,60 – 31,4 %	Bernal et al., 2001.
Afinidad por lectinas	Negativo	Positivo	Bernal et al., 2001.
Producción de neuraminidasa	Mayor	Menor	Bernal et al., 2001.
Reactividad cruzada antigénica	Si	Si	Aya et al., 2001.

De igual forma, esta divergencia genética entre los dos grupos mencionados fue corroborada a través de ensayos de amplificación de las secuencias de los genes miniexón (Vallejo, 1998), en donde se obtuvieron dos productos de 340 y 380 pb. El producto de 380 pb de amplificación del miniexón, siempre se presentó asociado con los productos derivados de los minicírculos KP2 y KP3 del ADN del cinetoplasto (kADN). En tanto que el producto de 340 pb siempre se presentó asociado con los minicírculos KP1, KP2 y KP3 (Vallejo et al., 2002b; 2003). Lo anterior sugiere la división de *T. rangeli* en dos grupos asociados con líneas evolutivas específicas de vectores en Colombia y otros países de América Latina, debido probablemente a una adaptación

secundaria a su condición parasitaria en vectores triatominos (Urrea, et al., 2005).

2.8 Características moleculares

2.8.1 Cinetoplasto

Los protozoos del orden *Kinetoplastida* son organismos unicelulares flagelados que deben su nombre a la presencia de una red compacta de maxicírculos y minicírculos de ADN, conocida como cinetoplasto el cual constituye el ADN mitocondrial del parásito (Thomas et al., 1993). Durante los últimos 20 años las secuencias de ADN cinetoplasto (kADN) han sido utilizadas para el diagnóstico y la caracterización de los tripanosomátidos.

El ADN del cinetoplasto representa el genoma mitocondrial de estos parásitos y constituye entre el 10 y el 20% del ADN celular. Está formado por una compleja red, que en cada célula contiene entre 5.000 y 10.000 minicírculos cuyos tamaños varían de 0,5 kb (*Trypanosoma vivax*) a 2,5 kb (*Crithidia fasciculata*), y 25 a 50 copias de los maxicírculos los cuales varían desde 19 kb (*Bodo caudatus*) a 39 kb (*Phytomonas davidii*) (Vallejo, 1998).

Los maxicírculos son similares al ADN mitocondrial de los eucariotes superiores y codifican ARNs ribosomales (rARN) y proteínas involucradas en la traducción de energía en la mitocondria. La presencia de grandes cantidades de minicírculos refleja la habilidad de estos organismos para revisar las secuencias de nucleótidos de los transcritos mitocondriales por un nuevo proceso denominado edición del ARN, en el cual varios residuos de uracilo son insertados o eliminados en sitios específicos de la secuencia (Vallejo et al., 2002b).

Todos los minicírculos presentan por lo menos una región conservada que varía entre 100 y 200 pb y los minicírculos de cada especie de tripanosomátido poseen el mismo número de regiones conservadas. En *T. brucei* y *Leishmania tarentolae* se ha observado una sola región conservada, en *T. lewisi* y *Phytomonas serpens* existen dos copias de la región conservada y en *T. cruzi* existen cuatro copias de la región conservada (Vallejo et al., 1994).

Hasta el momento, *T. rangeli* es el único tripanosomátido en el cual se han observado minicírculos con distinto número de regiones conservadas, a saber, los minicírculos KP1 con una región conservada, los KP2 con dos regiones conservadas separadas por un ángulo de 180° y los KP3 con cuatro regiones conservadas separadas por ángulos de 90° (Figura 5). Siendo aun más llamativo el hecho de que la presencia de estos minicírculos defina subpoblaciones del parásito.

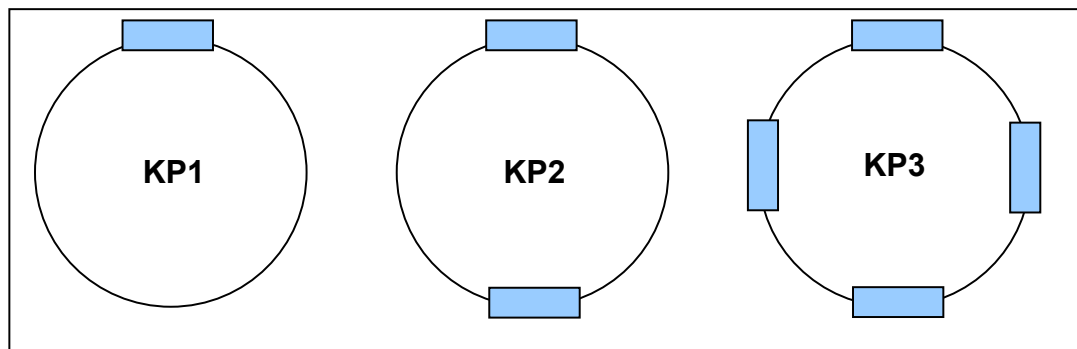


Figura 5: Representación esquemática de los minicírculos de *T. rangeli* con distinto número de regiones conservadas (KP1, KP2 y KP3 respectivamente). Adaptado de Vallejo (1998).

2.8.2 ARNs nucleolares pequeños

En las células eucarióticas, el nucleolo es un compartimiento especializado destinado para la biogénesis de los ribosomas, este proceso incluye la transcripción, modificación, procesamiento y ensamblaje del rARN en la subunidad ribosomal (Kiss-László et al., 1996).

En el nucleolo de todos los organismos eucariotas se transcriben los genes que codifican para el ARN ribosomal (rARN), como transcritos precursores de gran tamaño, los cuales son procesados y modificados para producir moléculas de rARN maduras; y ocurren además las modificaciones posteriores a la transcripción del rARN como lo son la metilación de la ribosa en la posición 2-OH y la conversión de los residuos de uridina a pseudouridina.

Estos procesos están guiados por una compleja población de ARNs nucleolares pequeños (snoARNs), los cuales son heterogéneos en su tamaño, en la estructura de sus motivos y en la asociación con diferentes proteínas, y es ésta diversidad, la que hace que estén involucrados en varios procesos y sean sintetizados de manera diferente. Las enzimas implicadas en estas reacciones son necesarias para los snoARNs, que junto con proteínas adicionales forman partículas ribonucleares estables denominadas snoRNP (Balakin et al., 1996; Levitan et al., 1998; Puerta, 2005; Samarsky et al., 1998; Uliel et al., 2004).

En todos los eucariotas los genes del rARN, son transcritos en el nucleolo como precursores del transcrito 34-45S. En levaduras y metazoarios el precursor del rARN es procesado en el rARN maduro de 18S, 5.8S y 28S. En tripanosomas, sin embargo, el rARN de las subunidad grande se procesa

dando lugar a seis rARNs, denominados 28 S α , 28 S β , sr1, sr2, sr4 y sr6 (Dunbar et al., 2000a; Puerta, 2005).

Basados en la presencia de secuencias conservadas en la estructura de los snoARNs, estos se dividen en dos grandes familias o grupos: los C/D snoARNs y los H/ACA snoARNs. (Levitan et al., 1998; Puerta, 2005; Samarsky et al., 1998). Los primeros se encargan de metilar el rARN, mientras que los segundos intervienen en la conversión de los residuos de uridina a pseudouridina y algunos de estos snoARNs participan en el procesamiento del rARN.

➤ **C/D snoARNs**

La mayoría de los C/D snoARNs se encargan junto con la enzima metilasa (fibrilarina) de mediar la metilación del esqueleto de la ribosa en la posición 2-OH. Los snoARNs forman un complejo estable unido a cuatro proteínas llamadas: fibrilarina o Nop1, Nop56, Nop58p y Snu13p (Kiss-László et al, 1996; Puerta, 2005; Uliel et al, 2004). Se han encontrado las proteínas homólogas exceptuando a Snu13p en *Trypanosoma brucei*, sugiriendo que los tripanosomátidos son similares a otros eucariotas pero diferentes a *Archaea*, en donde las proteínas Nop56p y la Nop58p son sustituidas por una proteína sencilla denominada Nop5p (Dunbar et al., 2000b; Uliel et al., 2004).

Los C/D snoARNs se caracterizan por tener elementos cortos conservados llamados caja C (5'-PuUGAUGA-3') y caja D (5'-CUGA-3') ubicados cerca de los extremos 5' y 3' respectivamente, los cuales son esenciales para su acumulación, procesamiento, localización y funcionamiento. Muchos snoARNs contienen entre las cajas C y D, secuencias menos conservadas denominadas caja C' y D' (Figura 6) (Liang et al, 2005; Samarsky et al, 1998).

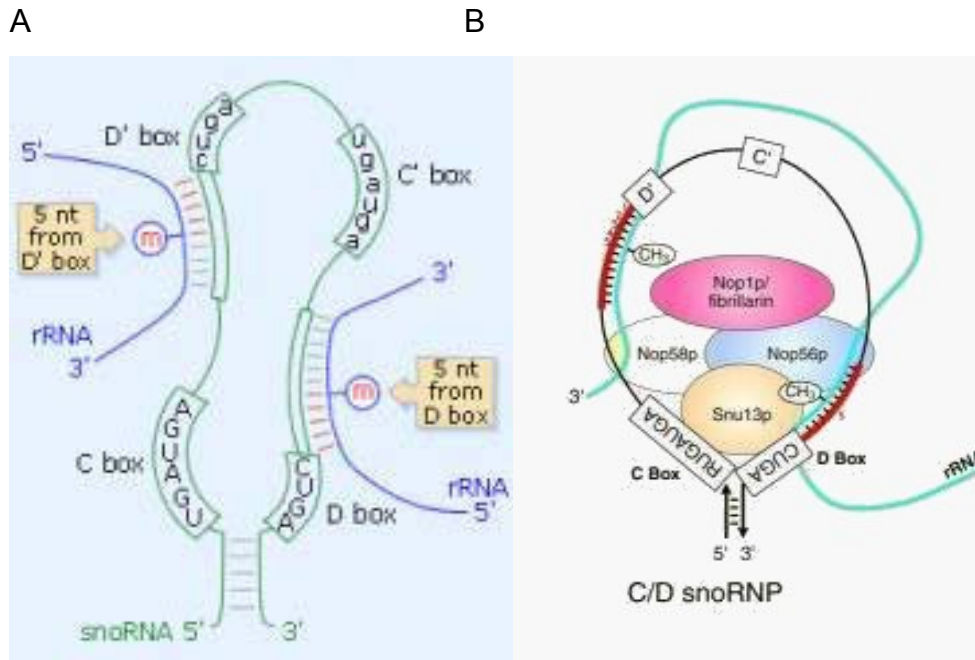


Figura 6: Estructura básica de un C/D snoARN. A. Se observan las cajas C y D, al igual que la C' y D'. B. Formación del complejo ribonucleoprotéico (C/D snoRNP) y su asociación con el C/D snoARN. Tomado de <http://bioinf.scri.sari.ac.uk/images/snorna/cd.jpg> y www.filgen.jp/Product/Bioscience/snoRNA/image-snoRNA.jpg.

Las cajas C y D son esenciales para la unión directa o indirecta de la fibrilarina y para la acumulación de snoARNs. Ambas cajas y su unión a proteínas son parte de la señalización del procesamiento necesario para la maduración de estos snoARNs. La característica principal de estos snoARNs, es que la mayoría contienen regiones que son perfectamente complementarias a las regiones a modificarse de cada rARN de las subunidades 18S o 28S (Levitan et al., 1998).

La región donde se da la complementariedad de bases entre el blanco de ARN que se va a modificar (rARN) y el snoARN, se encuentra siempre localizada 5 nucleótidos corriente arriba de la caja D y/o D' formando un dúplex de 10 a 21 nucleótidos; ésta es una regla universal para todos los C/D snoARNs denominada la "Regla +5" (Bachelierie et al., 1995; Liang et al., 2005; Puerta, 2005).

En la actualidad, se han descrito dos tipos de snoARNs que contienen las cajas C y D que se ligan a la fibrilarina. El primer grupo representado por U3, U8, U14 y U22, que participan en el procesamiento del rARN, considerando el segundo grupo, al cual pertenecen la mayoría de los snoARNs descritos recientemente, los encargados de guiar la metilación del rARN. (Levitan et al., 1998).

Levitan et al., (1998), fueron los primeros en caracterizar un C/D snoARN en tripanosomátidos, concretamente en *Leptomonas collosoma* llamado snoARN-2. Con un tamaño de 85 nucleótidos de longitud este snoARN tiene el potencial de guiar la metilación en los rARN 5,8S y 18S, y cumple con la regla +5 universal. Estudios realizados por Xu et al., (2001) en *L. collosoma* confirman la presencia de los C/D snoARNs en este organismo, ya que identificaron tres C/D snoARNs denominados B3, B4 y B5, que cumplen igualmente con la regla universal (Tabla 2).

Dunbar et al., (2000b) secuenciaron siete sitios de metilación del rARN en *T. brucei*: 28S mA740, 28S mA2713, 18S mC18, 18S mU652, 5.8S mG75, 28S mC3573 y 28S mG3578, e identificaron los snoARNs que mediaban las reacciones de metilación de cada sitio. Además 6 de los 15 snoARNs eran homólogos de los snoARNs encontrados en levaduras y vertebrados y en cada caso se cumplía con la regla +5, lo que sugiere que en tripanosomátidos la mayoría de los snoARNs cumplen con esta regla de metilación.

Tabla 2: Ejemplos de C/D snoARNs de algunos tripanosomátidos

Especies	Nomenclatura inicial	Nomenclatura actual	Blanco	Referencia
<i>Leptomonas collosoma</i>	sno-2		5.8S, G75	Levitan et al., 1998; Xu et al., 2001
	B2		28S, C3485, G3403	
	TS1		28, U910, A931S	
	TS2		28S, G2981, G893	
	G2		28S, A3697, A3709	Liang et al., 2001
	B3		28S, G1261	
	B4		28S, U4046	
	B5		28S, G2382	
	B6		LSU, C2909, A2917	
B7		SSU, A2065		
<i>Trypanosoma brucei</i>	TBR1	TB9Cs2C1	LSU, C3722	Dunbar et al., 2000b
	TBR2	TB10Cs3C1	LSU, A3684	Liang et al., 2005
	TBR3	TB11Cs3C2	SSU, C1489	Roberts et al., 1998 Liang et al., 2005
	TBR4	TB10Cs3C5	LSU, A3036	
	TBR5/92	TB11Cs2C2	G4141	
	TBR6	TB10Cs3C4	LSU, A1176, A1139	
	TBR7/76	TB10Cs2C1	G1868	
	TBR8	TB9Cs2C4	SSU, C1867	
	TBR9	TB10Cs2C2	LSU, A740	
	TBR10	TB6Cs1C2	LSU, A2713	
	TBR11	TB11Cs1C2	LSU, G3578	
	TBR 12		SSU, U2853	
	TBR 13	TB6Cs1C3	LSU, U2853	
	TBR 14	TB8Cs3C3	SSU, C18, 5.8S, G75	
	TBR 15	TB8Cs1C4	LSU, C3360	
	TBR 16	TB6Cs1C1	LSU, C3573	
	TBR 17/270			
	TBC-1		LSU, A737, C754	Liang et al., 2005
	TBC-2		LSU, G919	
	TBC-3		SSU, G1867	
	TBC-4		LSU, G1022	
TBC-5		LSU, A3879, SSU, U686		
TBC-6		LSU, U2993, G2967		

LSU (subunidad grande). SSU (subunidad pequeña)
Tomado de Uliel et al., (2004).

Recientemente, Liang et al., (2005) encontraron que la mayoría de los snoARNs en tripanosomátidos se encuentran organizados en agrupaciones génicas que contienen ambos tipos de snoARNs y se repiten varias veces en el genoma de los parásitos. En concreto, estos autores identificaron en el genoma de *T. brucei* la presencia de 21 agrupaciones génicas codificantes para 57 C/D snoARNs y 34 H/ACA snoARNs, los cuales pueden asistir 84 reacciones de metilación y 32 de pseudouridilación, respectivamente.

Varios estudios sugieren que en tripanosomátidos como *Crithidia fasciculata* los snoARNs portan alrededor de 100 metilaciones, cifra similar a la encontrada en mamíferos (de 93 a 95) (Dunbar et al., 2000a). Dado que hasta el momento para el caso de *T. brucei* los 57 C/D snoARNs descubiertos cubren el 80% de las metilaciones esperadas, es de suponer que estos snoARNs tienen la capacidad de guiar hasta dos eventos de metilación. Es así como ciertos C/D snoARNs poseen dos sitios diferentes de complementariedad al rARN (Liang et al., 2005).

➤ **H/ACA snoARNs**

Los H/ACA snoARNs están constituidos por dos horquillas unidas entre sí por una región de cadena sencilla que contiene el dominio H (ANANNA) y por una región de cadena sencilla que contiene la tripleta ACA. El lazo de cada horquilla presenta una región de complementariedad con el rARN de 4 a 10 nucleótidos y da lugar a la formación del bolsillo de pseudouridinilación (Puerta, 2005) (Figura 7). En eucariotas se identificaron cuatro proteínas Gar1p, Nop10p, Nhp2p y Cbf5/diskarina formando un complejo con otros snoARNs denominados H/ACA ribonucleoproteínas (snoRNPs); todas estas proteínas, exceptuando la Gar1p son esenciales para la estabilidad de los snoARNs (Bachellerie et al., 1995; Uliel et al., 2004) (Figura 7).

Los H/ACA snoARNs son los encargados, junto con la enzima pseudouridina sintasa (Cbf5p) de la conversión de uridina a pseudouridina (Puerta, 2005; Samarsky et al., 1998). El residuo de uridina a modificarse esta siempre localizado de 14 a 16 nucleótidos corriente arriba del dominio H o de la caja ACA del snoARN. En levaduras y mamíferos, las dos horquillas son esenciales para la modificación del rARN, así el snoARN solo guíe una modificación (Uliel et al., 2004).

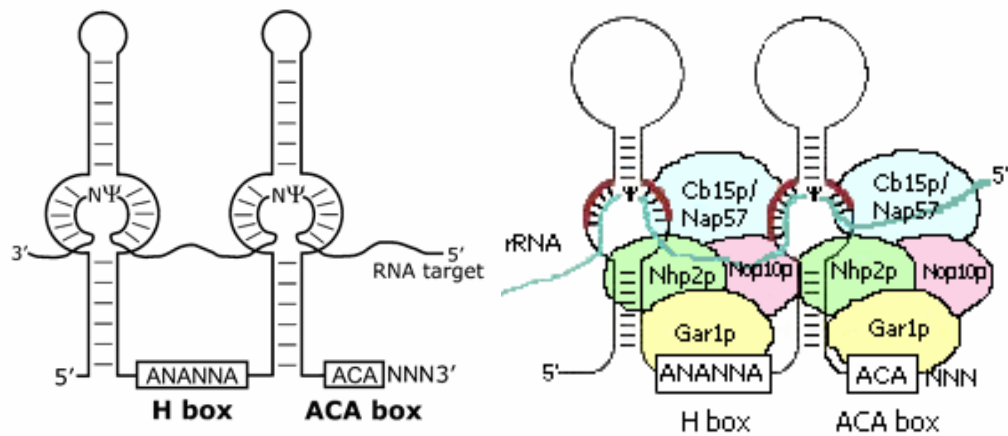


Figura 7: Estructura básica de un H/ACA snoARN. A. Se observan las cajas H y ACA, al igual que el bolsillo de pseudouridinilación. B. Formación del complejo ribonucleoprotéico (H/ACA snoRNP) y su asociación con el H/ACA snoARN. Tomado de www.lbme.biotoul.fr/grpkiss/images/tk-uk.gif http://bioinf.scri.sari.ac.uk/cgi-bin/plant_snorna/home y <http://bioinf.scri.sari.ac.uk/images/snorna/cd.jpg> respectivamente.

Xu et al., (2001) identificaron el primer H/ACA snoARN en tripanosomátidos (*L. collosoma*) denominado h1. Con una longitud de 69 nucleótidos este snoARN contiene la caja ACA al final del extremo 3' y es el encargado de la pseudouridinilación en la subunidad 28S del rARN en la posición 3643. Este H/ACA snoARN y la mayoría de los identificados en tripanosomátidos forman una sola horquilla y en lugar de la tripleta ACA contienen la secuencia AGA en el extremo 3' (Liang et al., 2001; 2002; 2005). Esta misma estructura ha sido descrita para los snoARNs de *Archaea* y *Euglena*, por lo cual se ha postulado que dado que los tripanosomas y *Euglena* se separaron de

manera temprana en la línea evolutiva de los eucariotas, sus H/ACA snoARNs pueden constituir el extremo 5' de los snoARN de los eucariotas superiores, los cuales probablemente se originaron luego de un evento de duplicación (Puerta, 2005).

En contraste con los C/D snoARNs, los H/ACA snoARNs tienen secuencias conservadas muy cortas, por lo tanto solo se han identificado 15 H/ACA snoARNs en levaduras. Liang et al., (2003), caracterizaron 9 H/ACA snoARNs en *L. collosoma* y 34 en *T. brucei*, estos están constituidos por una sola horquilla y contienen la caja AGA.

Tabla 3: Ejemplos de H/ACA snoARNs en algunos tripanosomátidos

Especie	Nomenclatura inicial	Nomenclatura actual	Blanco	Referencia
<i>Leptomonas collosoma</i>	H1		25S, ψ 3643	Liang et al., 2001
	H2		LSU, ψ 3230	
	H3		SSU, ψ 1395	
	H4			
	H5			
	H6			
	H7		SSU, ψ 33	
	H8			
	H9		SSU, ψ 1591	
<i>Trypanosoma brucei</i>	SLA1	TB11Cs2H1	SL ARN, ψ 28	Liang et al., 2002
	TBH1		LSU, ψ 2988	
	TBH2		LSU, ψ 1242	

LSU (Subunidad grande de rARN), SSU (Subunidad pequeña del rARN)
Adaptado de Uliel et al., (2004).

Todos los snoARNs que guían alguno de los dos tipos de modificación son transcritos por la ARN polimerasa II, mientras que los snoARNs que se encuentran involucrados con el procesamiento del rARN como U3 y U22 son transcritos por la ARN polimerasa III (Uliel et al., 2004).

En vertebrados, todos los snoARNs que guían las modificaciones son intrónicos, se encuentran codificados dentro de los intrones de genes que codifican para proteínas, pero algunos genes de snoARNs como el U3, se transcriben de manera independiente. La mayoría de los snoARNs en levaduras son codificados por genes independientes, pero hay también siete genes de snoARNs intrónicos y cinco policistrónicos organizados en grupos. En contraste, muchos snoARNs identificados en plantas, son policistrónicos, sin embargo existen también snoARNs intrónicos. En tripanosomátidos, como se mencionó anteriormente, la mayoría de snoARNs, por no decir todos, están presentes en grupos policistrónicos que intercalan los snoARNs C/D y los H/ACA; estos grupos se repiten generalmente varias veces en el genoma, parecido a la organización de los genes snoARNs en plantas (Dunbar et al., 2000a; Liang et al., 2001; 2003; Uliel et al., 2004; Xu et al., 2001).

2.8.2.1 snoARNs en *T. rangeli*

Morales et al., (2002) a partir de una librería genómica de *T. rangeli* clonaron un fragmento de 801 pb denominado Clon 1, en el cual se identificó la presencia de un C/D snoARN, denominado snoARN-CI1. Posteriormente, estudios de bioinformática revelaron la presencia de otros 5 snoARNs en dicho fragmento (Puerta, 2005).

Es así como se identificaron seis snoARNs, tres de ellos pertenecientes a la familia de C/D snoARN y tres a la familia de H/ACA (Puerta, 2005) (Figura 8).

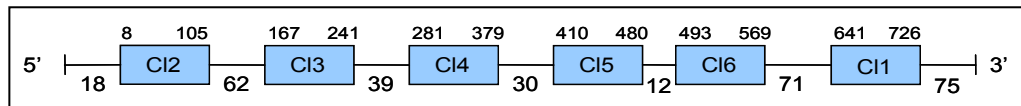


Figura 8: Representación esquemática de la agrupación génica CI de *T. rangeli* (Número de acceso al GenBank AY028385). Las cajas representan la región codificante para cada uno de los snoARNs. Los números representan la posición de los nucleótidos en la agrupación. Tomado de Puerta, (2005).

El primer gen que hace parte de la agrupación CI en *T. rangeli* es el denominado TrCI2, cuyo ortólogo TB11Cs4C2 en *T. brucei* codifica para un C/D snoARN implicado en la metilación del uracilo 1080 y de la adenina 1091 de la subunidad ribosómica grande (LSU). Este gen se encuentra bastante conservado en tripanosomátidos con identidad de 60% a 80% entre diferentes especies estudiadas (Tabla 4).

Es de gran interés que aunque hay desviaciones de la secuencia consenso entre las diferentes especies, ésta secuencia es idéntica en *T. rangeli* y en *T. cruzi*. El segundo gen de esta agrupación corresponde a TrCI3, el cual codifica para un H/ACA snoARN encargado de la pseudouridinilación en la posición 1357 de la subunidad LSU en su ortólogo TB11Cs4H1 de *T. brucei*. El tercer gen de la agrupación es TrCI4, codifica para un C/D snoARN encargado de la metilación de la uridina 611 de la LSU en su ortólogo TB11Cs4C3 de *T. brucei*. TrCI5, el cuarto gen de la agrupación, codifica para un H/ACA snoARN cuyo ortólogo TB11Cs4H2 en *T. brucei* modifica las uridinas 61 y 1907 de la subunidad ribosómica pequeña (SSU). El quinto gen de la agrupación corresponde a TrCI6, el cual, al igual que sus ortólogos TB11Cs4H3, TC11C4H3, H6 y LM27C1H1 de *T. brucei*, *T. cruzi*, *L. major* y *L. collosoma*, respectivamente (Tabla 4), codifica para un H/ACA snoARN responsable de la isomerización de la uridina 566 de la LSU. El sexto y último gen corresponde al descrito anteriormente C/D snoARN-CI1 o TrCI1, el cual se encarga de metilar las adeninas 1326 y 1338 de la LSU en *T. brucei* (Puerta, 2005).

Tabla 4: Comparación de los snoARNs de *Trypanosoma rangeli* con sus ortólogos en tripanosomátidos

snoARN de <i>T. rangeli</i> (Tamaño en nt)	Ortólogo en tripanosomátidos			
	Nombre	Especie	Tamaño (nt)	Identidad (%)
CI1 86	TC11C4C1	<i>T. cruzi</i>	87	80,2
	TB11Cs4C1	<i>T. brucei</i>	89	73,3
	G2	<i>L. collosoma</i>	84	78,8
	LM27C1C1	<i>L. major</i>	88	70,5
CI2 88	TC11C4C2	<i>T. cruzi</i>	87	88,5
	TB11Cs4C2	<i>T. brucei</i>	96	85,4
	TS1	<i>L. collosoma</i>	91	71,4
	LM27C1C2	<i>L. major</i>	88	60,0
CI3 75	TB11Cs4H1	<i>T. brucei</i>	74	71,4
	LM27Cs1H1	<i>L. major</i>	66	77,3
CI4 94	TC11C4C3	<i>T. cruzi</i>	90	83,7
	TB11Cs4C3	<i>T. brucei</i>	101	64,0
	TS2	<i>L. collosoma</i>	99	72,4
	LM27C1C3	<i>L. major</i>	89	71,3
CI5 71	TB11Cs4H2	<i>T. brucei</i>	69	76,2
	LM27Cs1H3	<i>L. major</i>	69	74,2
CI6 77	TC11C4H3	<i>T. cruzi</i>	72	88,9
	TB11Cs4H3	<i>T. brucei</i>	76	74,3
	HB	<i>L. collosoma</i>	69	62,5
	LM27Cs1H2	<i>L. major</i>	66	64,8

Tomado de Puerta, (2005).

3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

T. rangeli es un parásito flagelado capaz de infectar a humanos, animales domésticos y silvestres y a insectos triatomíneos en Centro y Sur de América; pero no presenta patogenicidad para el hombre a diferencia de *T. cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas. Sin embargo, dado que ambos parásitos presentan los mismos reservorios y son transmitidos al ser humano por los mismos vectores en las áreas endémicas de esta enfermedad, produciendo infecciones mixtas, se dificulta la identificación morfológica, complicando así el diagnóstico específico de la infección chagásica. Considerando la relación taxonómica, la variabilidad inter e intraespecífica, y el hecho de que ellos compartan por lo menos el 60% de su constitución antigénica soluble, hacen que varias técnicas presenten reacción cruzada que lleva a la determinación de resultados erróneos o inconclusos (Grisard, 2002).

Por lo tanto, la importancia del estudio de *T. rangeli* se enmarca en el contexto de su asociación con la enfermedad de Chagas. Esta enfermedad es una parasitosis de amplia distribución en Centro y Sur América, encontrándose únicamente en el hemisferio americano desde México hasta Argentina. La prevalencia de la infección humana con *T. cruzi* ha sido estimada en 16 a 18 millones de casos en 15 países en América Latina, constituyendo un problema de salud pública (OMS, 2000). Según los reportes de la Organización Panamericana de la Salud en Colombia, existen alrededor de 90.0000 personas infectadas por lo cual se hace necesario el estudio a fondo de los mecanismos que gobiernan la patogenicidad del parásito.

Estudios realizados por Vallejo et al., (1998) y (2000), describen como cepas de *T. rangeli* aisladas de triatomíneos pertenecientes al género *Rhodnius*,

presentan varias clases de micocírculos (KP1, KP2 y KP3), así como presentan diferentes comportamientos en el vector. Por lo cual la variabilidad dentro de la misma especie puede representar valiosas variantes taxonómicas.

Reportes adicionales de Vallejo et al., (2003) indican que las diferencias previamente reportadas entre cepas de *T. rangeli* aisladas de diferentes regiones geográficas no se deben a barreras geográficas sino a la adaptación específica del parásito a un vector particular. Es así como se encontraron en la saliva de los vectores exclusivamente cepas KP1(-) en *Rhodnius colombiensis* y cepas KP1(+) en *Rhodnius prolixus*, en la misma área geográfica. Esto indica que algunas especies de *Rhodnius* son susceptibles a cepas de *T. rangeli* KP1(+) y otras son susceptibles a KP1(-). Cada especie de *Rhodnius* parece seleccionar la subpoblación a la cual es naturalmente más susceptible para transmitirlo así al hospedero vertebrado por inoculación de la saliva. Por lo tanto, se sugiere que la variabilidad de la interacción entre *T. rangeli* y sus vectores biológicos pueden definir las características locales de su epidemiología en muchos países de América Latina. Dado que cepas de *T. rangeli* aisladas de diferentes vectores triatominos presentan variabilidad genética detectada por marcadores moleculares independientes (Vallejo et al., 2003), y que la secuencia génica que codifica para los snoARNs de *T. rangeli* en una cepa C23 KP1(-) está caracterizada (Puerta, 2005), en este trabajo se amplificó, clonó y secuenció la agrupación génica C1 que codifica para los snoARNs de la cepa H14 KP1(+) de *T. rangeli*, con el propósito de encontrar diferencias dentro de su secuencia que puedan ser utilizadas como marcadores moleculares para la identificación y diferenciación de cepas KP1(-) y KP1(+), (grupos 1 y 2, respectivamente), del parásito.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL:

Amplificar, clonar y secuenciar la agrupación génica CI codificante para varios ARN nucleolares pequeños (snoARNs) en la cepa H14 KP1(+) de *T. rangeli*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Amplificar la agrupación génica CI codificante para varios snoARNs en la cepa H14 KP1(+) de *T. rangeli* mediante la técnica de PCR, utilizando los cebadores TrF1/TrR2 los cuales amplifican un fragmento de 620 pb de la misma.
- Clonar la agrupación génica codificante para los snoARNs utilizando como vector de clonación el plásmido pGEM®-T Easy.
- Secuenciar la agrupación génica codificante para los snoARNs.
- Comparar la secuencia de la cepa KP1(+) obtenida de *T. rangeli* con la secuencia reportada de la cepa C23 KP1(-) y otros tripanosomátidos mediante análisis bioinformáticos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Obtención del ADN del parásito

La cepa de *T. rangeli* utilizada en este estudio fue la cepa H14 KP1(+) proveniente de Honduras (MHOM/Hon/H14), caracterizada y donada por el Laboratorio de Parasitología del Instituto Nacional de Salud (Bogotá, Colombia).

El ADN de la cepa H14 de *T. rangeli* fue extraído del cultivo de parásitos utilizando el método de fenol-cloroformo-isoamílico (1:1:24) y precipitado mediante la utilización de 2,5 volúmenes de etanol (Puerta y Urueña, 2005) (ANEXO 1).

La concentración del ADN extraído se determinó mediante espectrofotometría de U.V a 260 nm, teniendo en cuenta que una unidad de densidad óptica a 260 nm equivale a 50 µg/ml de ADN de doble cadena (Puerta y Urueña, 2005). Adicionalmente esta cepa fue caracterizada como KP1(+) mediante la técnica de la PCR del miniexon (Grisard et al., 1999).

5.2 Amplificación de la agrupación génica mediante PCR

Los cebadores que se utilizaron para la técnica de PCR fueron el TrF (5'-CGCCCCGTCTTGCCCTGT-3') y el TrR2 (5'-CGCAGCAAGGACAGGAGGGA-3'), los cuales amplifican un fragmento de 620 pb (Figura 9) (Morales et al., 2002). Todas las reacciones se llevaron a un volumen final de 25 µl conteniendo: 100 ng del ADN purificado de la cepa del parásito, 1 X de buffer de reacción (10 mM Tris-HCl, pH 9,0, 50 mM KCl, y 0,1% de Triton X-100), 1,25 unidades de *Taq* ADN polimerasa (Corpogen), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP (Gibco-BRL), y 20 pmol de cada cebador. Como control

negativo se utilizó la misma reacción adicionando agua en lugar de ADN (Morales et al., 2002).

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador PTC-100 MJ-Research, con las siguientes condiciones: denaturación a 95 °C/5 min, 15 ciclos de 95 °C/30s, anillaje a 63 °C/1 min, extensión a 72 °C/30s, 20 ciclos de 95 °C/30s, anillaje a 60 °C/1min, extensión a 72 °C/30s y una incubación final de 72 °C por 5 min.

```

1 GCATGCCTGC ACACCCGCGC CACGATGGAC ACACATTGTT CGAGGTCCAA ACAGTTTGAG
61 CGATGCCGTG AGAACGGAAC ACTAAAATCA CCTTTCGACT GAGCGCCTGC CTCCCCCTCC
121 CACTTGCGCG CGTCGCGCCT GCGGGCGTTT CCCC GGCGCC CCGCCCCCGT CTTGCCCTGT
181 CTGGCGCCCT GTCTGCGCAC GCGGTCAGTG ACGGGTGCGC CCGAAAGCGC AAGAGAGAGA
241 TGGAGAGTGG GCAGGGCGGG GGTGTGGTG GGTTTGCGCC GCTGCTGATG GAAAAAACA
301 ACTGTTGTGC GCGAGGGCGC GCGAGCCCTG TGAGCGCACT TGCGTGATAG CCATCTCAA
361 AACTCAACAG GTCTGACGGC CGCACCCCG CACCCCGCGC GCGGCCAGCA GACAAGGCGC
421 GCTTGAGAC CCACCGCCTC GCAGCAGTGG GCGCGTGGGT GCATCAGCGC CCCGAGAAGT
481 GAGTGATGGA GCTGAAGCGC AACATCCCTT GGGCCGGCGG CCTGCTGTTG GTGCCGCGCG
541 TGGCGCCCT GTCCGATTGT GCGAGAGTTT GGGGCGAGGA CGGGCGAGAA GACGCGAGAA
601 CGGGAGCAAG AGCGAAGAAG GCGGGGAGGA GACGGCTGCG ACGCATGATG CGATTTTGCA
661 GTTTCCTGTC AGCCTGACGC CGACAGCGCG TGACGACACA ACTTCAACT CAGCTCACAC
721 TGAAACGACT TGCTTTCCCC CCTTTTCTC TTTCTTCCCC CCTCCCTCCT GTCCTTGCTG
781 CGCGTCGCTC GCCGCGGCCG C

```

Figura 9: Secuencia de nucleótidos de la agrupación génica Cl de la cepa C23 KP1(-) de *T. rangeli*. Los oligonucleótidos (TrF y TrR2) que amplifican el fragmento de 620 pb se encuentran subrayados. (Tomado de Morales et al., 2002).

5.2.1 Electroforesis en gel de agarosa

10 µl del producto obtenido de la PCR, se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1 % (ANEXO 2) teñido con bromuro de etidio para su visualización (ANEXO 3).

5.2.2 Extracción del fragmento de ADN

La banda de amplificación observada fue cortada y purificada de acuerdo con lo indicado por el estuche comercial “QIA – Quick Gel Extraction” (Morales et al., 2002) (ANEXO 4).

5.3 Clonación de la agrupación génica CI de la cepa H14 de *T. rangeli*

El ADN obtenido (633 pb) fue ligado al plásmido pGEM®-T Easy (Promega®) mediante reacción con la enzima T4 ADN ligasa (Promega®) según indicaciones de la casa comercial (buffer de ligación 2 X, pGEM®-T Easy, vector 50 ng y T4 ADN ligasa 3 U/μl) a 4 °C durante toda la noche. Esta reacción se realizó usando una relación 3:1 insecto:vector (Puerta y Urueña, 2005) (ANEXO 5).

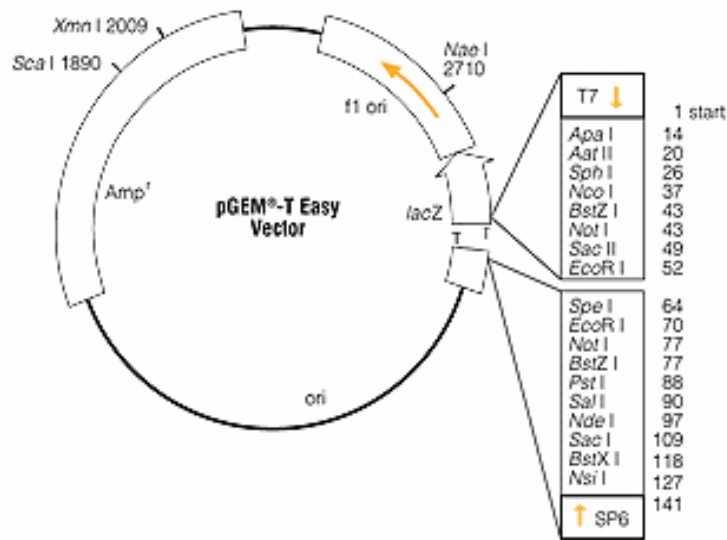


Figura 10: Mapa circular del plásmido pGEM®-T Easy (Promega) (Tomado de www.tdx.cesca.es/TESIS_UB/AVAILABLE/TDX-0123106-084234//04.TESIS_EFD_M%C9TODOS.pdf).

Células bacterianas competentes de *E. coli* JM109 fueron transformadas con el ADN plasmídico producto de la ligación mediante un proceso de electroporación utilizando BioRad Systems MicroPulser (ANEXO 6).

5.3.1 Obtención de clones recombinantes

Posterior a la transformación, 100 μl de bacterias fueron sembradas en el medio Luria Bertani (LB) suplementado con 0,1 mg/ml de ampicilina, 80 μg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-Gal) y

0,5 mM de Isopropiltio- β -D-galactosido (IPTG) (Gibco-BRL), incubándose durante toda la noche a 37 °C. Siguiendo a esta incubación se realizó el Test de blancas y azules, seleccionando las colonias blancas ya que estas son las colonias que posiblemente contienen el fragmento clonado debido a la interrupción del gen *Lac Z* (ANEXO 7) (Puerta y Urueña, 2005).

5.4 Extracción de ADN plasmídico

El ADN plasmídico de las colonias blancas fue extraído mediante el estuche comercial “Wizard Plus SV Minipreps” (Promega®) (ANEXO 8), y sometido a digestión con la endonucleasa EcoRI la cual corta en ambos lados del sitio de clonación (Figura 10).

5.5 Digestión del ADN con enzimas de restricción

El sitio múltiple de clonación del vector se digirió con la endonucleasa EcoRI para liberar el fragmento de ADN de 620 pb. Para ello, 2 μ g de ADN fueron digeridos utilizando una relación de unidades de enzima/ μ g de ADN a digerir, de diez, en un volumen final de reacción de 30 μ l, durante 24 h a 37 °C (Puerta y Urueña, 2005).

5.6 Ensayos de “Southern blot”

5.6.1 Electroforesis en gel de agarosa

El fragmento de ADN plasmídico obtenido de la colonia recombinante digerida y sin digerir, se analizó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% utilizando TAE como solución tampón (Tris – HCl 0,04 M pH 7,2, ácido glacial 29,6 mM y EDTA 2 mM pH 8,0), con posterior tinción con bromuro de etidio (Sigma) a una concentración final de 0,5 μ g/ml de agua destilada (ANEXOS 2 y 3) (Puerta y Urueña, 2005).

5.6.2 Transferencia e inmovilización del ADN a un soporte sólido

Una vez separados los fragmentos de ADN, estos fueron transferidos a una membrana de “nylon” (HybondTM-N+, amersham farmacia biotech), siguiendo el método de transferencia alcalina descrito por Sambrook y Russell (2001), para su posterior hibridación (ANEXO 9) (Puerta y Urueña, 2005).

5.6.3 Obtención y marcación de la sonda

Como sonda para los ensayos de hibridación se utilizó el ADN de la agrupación génica Cl de la cepa C23 de *T. rangeli*. Para esto, se extrajo el ADN de las colonias recombinantes Clon 1 las cuales contienen dicha agrupación mediante el uso del estuche comercial “Wizard Plus SV Minipreps” (Promega[®]). (ANEXO 8)

Seguido a esto, el inserto del Clon 1, clonado en el plásmido pBlue-script, se extrajo mediante digestión del ADN plasmídico con la enzima de restricción NotI que corta ambos lados del sitio múltiple de clonación, para luego ser separado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, y recuperado del mismo mediante la utilización del estuche comercial “QIAquick Gel Extraction” (ANEXO 4). El inserto obtenido fue marcado con biotina mediante la técnica de “Random primer”, de acuerdo a la casa fabricante (Gibco-BRL) (ANEXO 10). Posterior a la marcación se realizó la prueba de la sonda (ANEXO 11) (Puerta y Urueña, 2005).

5.6.4 Ensayos de hibridización

Luego de transferir el ADN a la membrana de “nylon”, esta fue sometida a una reacción de prehibridización por 2 h a 42 °C en formamida al 50%, Na₂HPO₄ 0,12 M, pH 7,2, NaCl 0,25 M, SDS al 7%, EDTA 1 mM y ADN de esperma de salmón denaturado 200 µg/ml de solución (Puerta y Urueña, 2005).

Posteriormente, el filtro fue hibridado con la sonda no radiactiva previamente denaturada, en una solución nueva de la mezcla anteriormente descrita a 42 °C durante 24 h. A continuación, el filtro fue enjuagado brevemente en una solución de SSC 2 X, SDS al 0,5 % (p/v) a temperatura ambiente, por 5 min con constante agitación. Luego, el filtro fue lavado durante 15 min en cada una de las siguientes soluciones: SSC 1X – SDS al 0,5 % (p/v), SSC 0,5 X - SDS al 0,5 % (p/v) y SSC 0,1 X – SDS al 0,5 % (p/v) a 42, 55 y 65 °C, respectivamente. Una vez seco el filtro, se continuó con la reacción de detección con el conjugado fosfatasa alcalina-estreptavidina, según lo recomendado en el Manual de Photogen Detection System (Gibco-BRL), con el sustrato NBT/BCIP (Gibco-BRL) (Puerta y Urueña, 2005) (ANEXO 12).

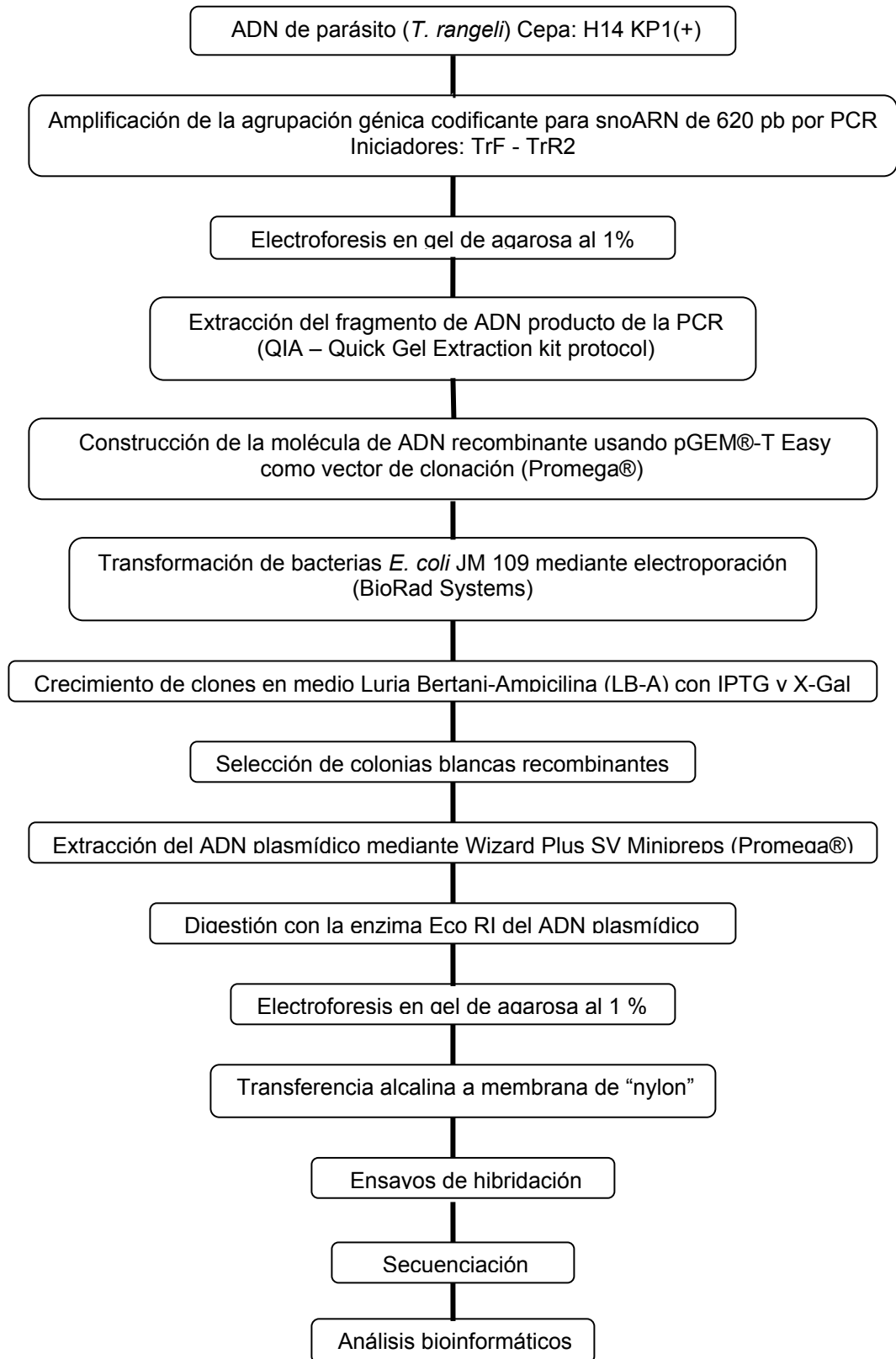
5.7 Secuenciación

La secuenciación automática de ambas hebras de ADN de la agrupación génica CI se realizó mediante el servicio de Macrogen (World Heeridian Venture Center) en Corea, utilizando los iniciadores TrF y TrR2, según la reacción descrita por Sanger et al., (1977).

5.8 Análisis bioinformáticos

Los estudios de homología a nivel de nucleótidos con las secuencias codificantes para los snoARNs previamente reportadas en las bases de datos, se realizó utilizando el programa BLAST (www.ch.embnet.org), (Stephen et al, 1997). Para comparar las secuencias de nucleótidos obtenidos se utilizó un estudio adicional mediante el programa L-ALIGN (www.ch.embet.org), (Corpet, 1988), y para el análisis de múltiples secuencias se utilizó el programa CLUSTAL – W.

6. Diagrama de Flujo



7. RESULTADOS

7.1 PCR del gen Miniexon

El ADN de la cepa H14 KP1(+) de *T. rangeli*, "stock" 16-VI-05, se sometió a una PCR de miniexón para verificar su pureza, es decir que no estuviese mezclado con ADN de cepas KP1(-), ni con ADN de *T. cruzi* y ratificar que se trabajó con una cepa KP1(+), teniendo como controles otras cepas de este mismo grupo.

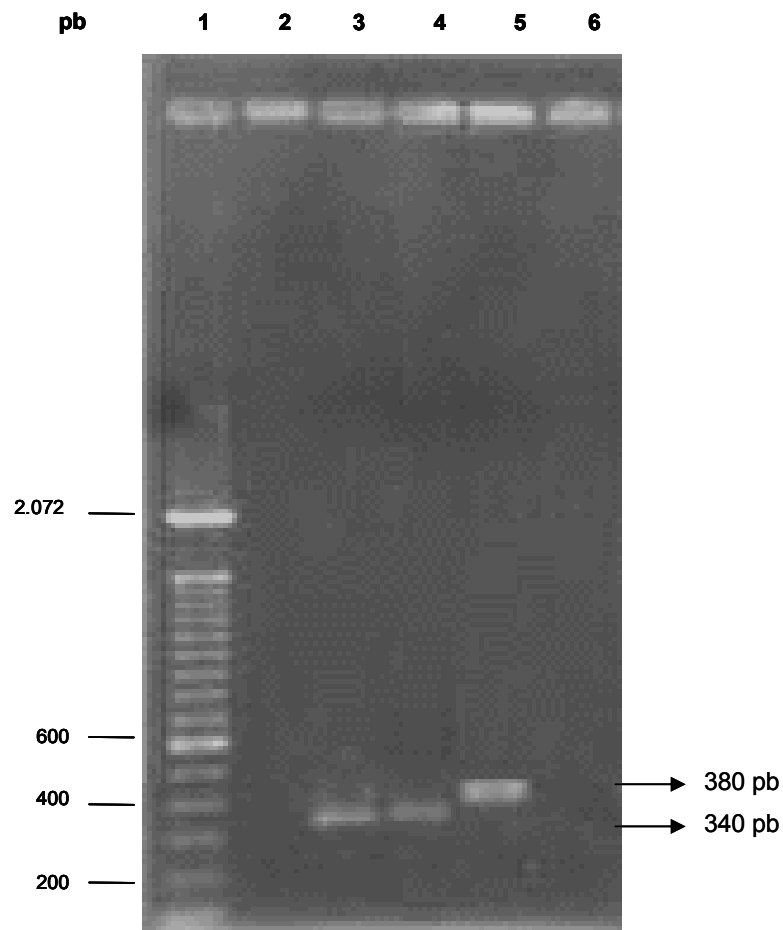


Figura 11: PCR del gen miniexon: Análisis del ADN de la cepa H14, comparada con ADNs de otras cepas. (1) Marcador de peso molecular de 100 pb, (2) *T. cruzi*, (3) H14 (16-VI-05), (4) Choachí 11-V-05 KP1(+), (5) Tre 24-VI-05 KP1(-) y (6) Control negativo.

Como se observa en la figura 11, esta PCR permite identificar fragmentos con diferentes pesos moleculares, permitiendo diferenciar las cepas KP1(-) de las KP1(+), las cuales revelan una banda de 380 y 340 pb respectivamente. Esto se pudo evidenciar en el pozo 3, donde el ADN de la cepa H14 mostró una banda de 340 pb, de igual forma que en el pozo 4 con el ADN de la cepa Choachí, como control positivo. Por el contrario en el pozo 5, el ADN de la cepa Tre mostró una banda de 380 pb, característico de las cepas KP1(-). Así mismo se observa como no se obtuvo señal de amplificación con el ADN de *T. cruzi* (pozo 2). Por los resultados obtenidos anteriormente se infirió que el ADN de la cepa H14 (16-VI-05), no estaba contaminado, lo cual garantiza el estado de este ADN utilizado.

7.2 Amplificación del fragmento codificante para la agrupación génica CI en *T. rangeli*

Para amplificar la región codificante de esta agrupación génica se realizó la PCR TrF1-TrR2, cuyo producto se corrió en un gel de agarosa al 1%. Al revelar el gel se observó la amplificación de bandas con tamaños muy cercanos, por encima del fragmento de 564 pb del marcador de peso molecular (Figura 12). Con el fin de determinar el fragmento de amplificación de interés, los productos de la PCR fueron resueltos en un gel de agarosa al 2%. Como se aprecia en la figura 13, se separaron dos fragmentos los cuales migraron a una distancia de los pozos de 5 y 4,6 cm.

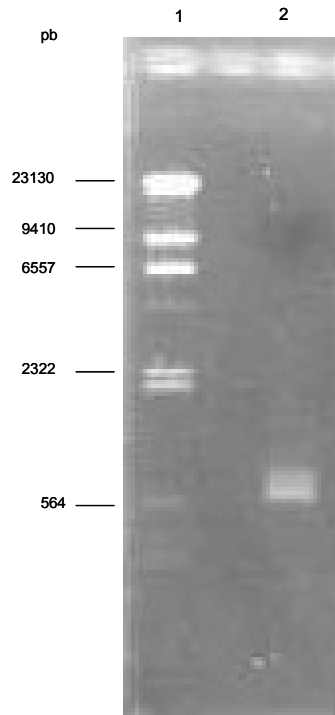


Figura 12: Amplificación del fragmento de interés mediante la PCR TrF1-TrR2. Separación de los productos en un gel de agarosa al 1%. (1) Marcador de peso molecular de λ HindIII, (2) Control negativo y (3) Ceba H14 (16-VI-05).

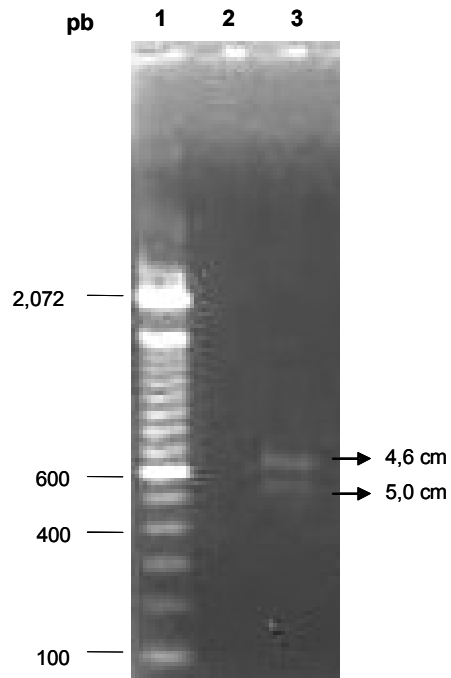


Figura 13: Amplificación del fragmento de interés mediante la PCR TrF1-TrR2. Separación de los productos en un gel de agarosa al 2%. (1) Marcador de peso molecular de 100 pb, (2) Control negativo y (3) Ceba H14 (16-VI-05).

7.2.1 Análisis por “Southern blot” de los fragmentos amplificados

Para determinar cual de los dos fragmentos amplificados correspondía al fragmento que codifica para la agrupación génica Cl, se realizó un ensayo “Southern blot”. En primer lugar los fragmentos fueron transferidos a una membrana “nylon” para luego ser hibridados con el ADN de la agrupación génica Cl de la cepa C23 de *T. rangeli*, utilizado como sonda.

7.2.1.1 Obtención y marcación de la sonda

Para la obtención de la sonda se extrajo el ADN plasmídico del Clon 1, codificante para una agrupación de snoARNs de la cepa C23 de *T. rangeli*. Dicho clon fue sometido a digestión con la enzima de restricción Not I, liberando de esta forma el fragmento deseado como se puede observar en la figura 14.

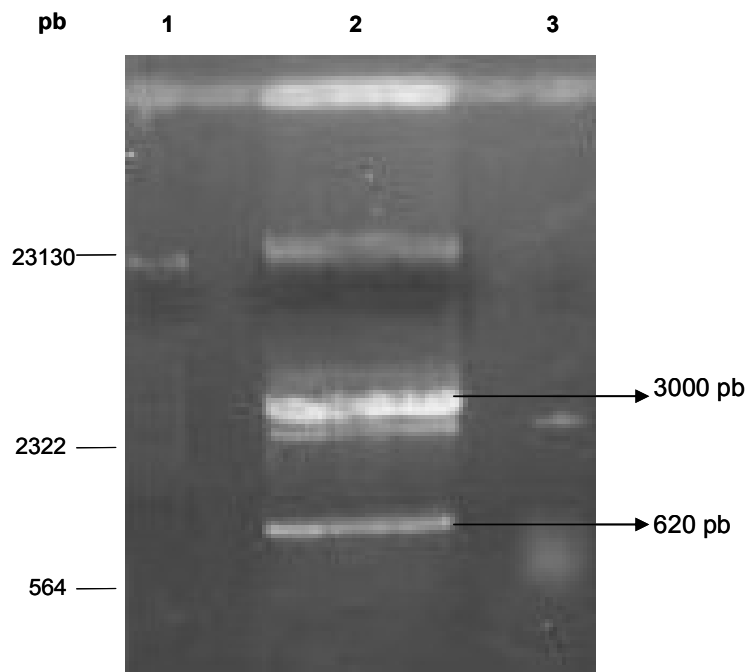


Figura 14: Digestión del ADN del Clon 1 de la cepa C23 de *T. rangeli*. (1) Marcador de peso molecular λ HindIII, (2) ADN digerido del Clon 1 de la cepa C23 y (3) ADN sin digerir del mismo clon.

Una vez obtenida la sonda se realizó su marcación con biotina, observándose actividad de la misma hasta una dilución de 1/100, tal como se muestra en la figura 15; donde se sembró la sonda pura en el pozo 1, con dilución 1/10 en el pozo 2 y con dilución 1/100 en el pozo 3.



Figura 15: Prueba de la sonda. (1) Pura, (2) Dilución 1/10 y (3) Dilución 1/100.

7.2.1.2 Resultados del ensayo de “Southern blot”

Finalmente, los resultados del “Southern blot” mostraron una fuerte señal de hibridación correspondiente al fragmento de amplificación de menor tamaño el cual se encontraba a 5 cm de distancia del pozo. Por lo tanto, este fragmento fue el que se tomó para continuar los estudios propuestos.

Adicionalmente vale la pena mencionar que la banda de amplificación de mayor tamaño mostró igualmente una señal débil de hibridación.

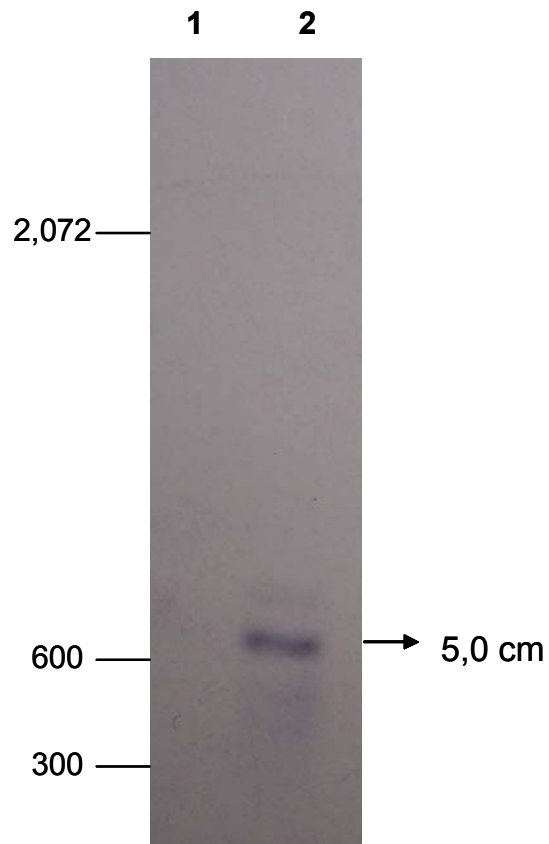


Figura 16: Ensayo de “Southern blot” para el producto de la PCR TrF1-TrR2. (1) Marcador de peso molecular de 100 pb y (2) H14 (16-VI-05).

7.3 Clonación de la agrupación génica CI de *T. rangeli*

Una vez obtenido el fragmento de amplificación de interés, se construyó la molécula de ADN recombinante, usando como vector de clonación el plásmido pGEM®-T easy, con el cual se transformaron células de *E. coli* JM109 mediante electroporación. Posterior a esta transformación se realizó una selección de colonias recombinantes, observándose tanto colonias blancas como azules, con un predominio de colonias blancas.

Se seleccionaron 4 colonias blancas, para analizar mediante PCR la presencia del inserto de interés (Anexo 13).

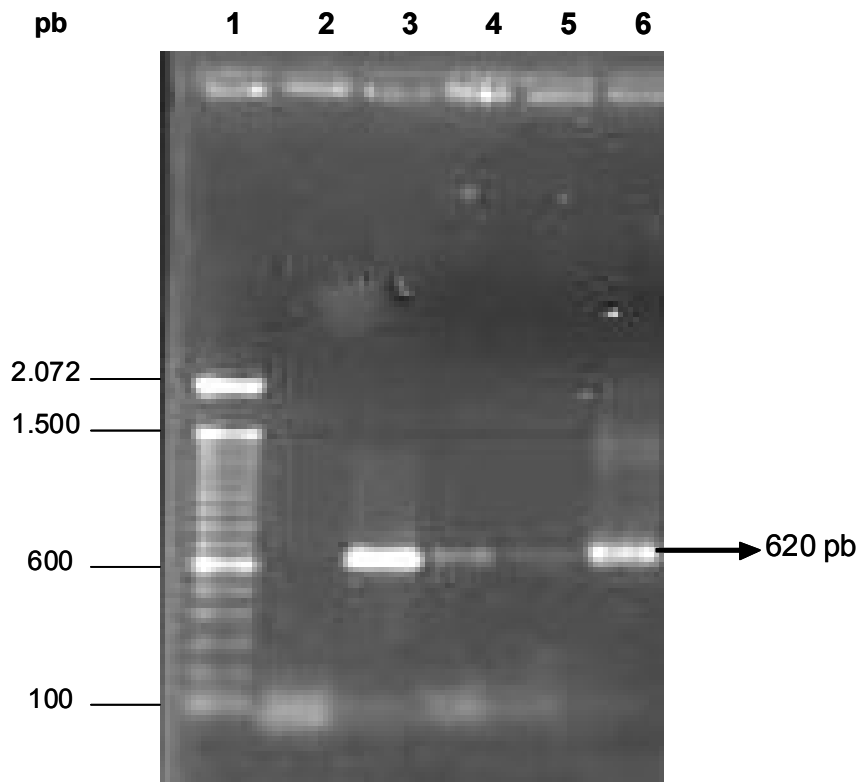


Figura 17: Presencia del fragmento de amplificación TrF1/TrR2 en las colonias examinadas. (1) Marcador de peso molecular de 100 pb, (2) Colonia de selección 1, (3) Colonia de selección 2, (4) Colonia de selección 3, (5) Colonia de selección 4 y (6) Colonia de selección 5.

Como se puede observar en la figura 17, el fragmento que muestra mayor señal de amplificación es el obtenido con la colonia 2, por lo cual, esta colonia fue la seleccionada. A continuación, esta colonia fue examinada mediante digestión con la enzima EcoRI, dando como resultado un fragmento liberado con un tamaño aproximado de 620 pb, coincidiendo con lo esperado (Figura 18).

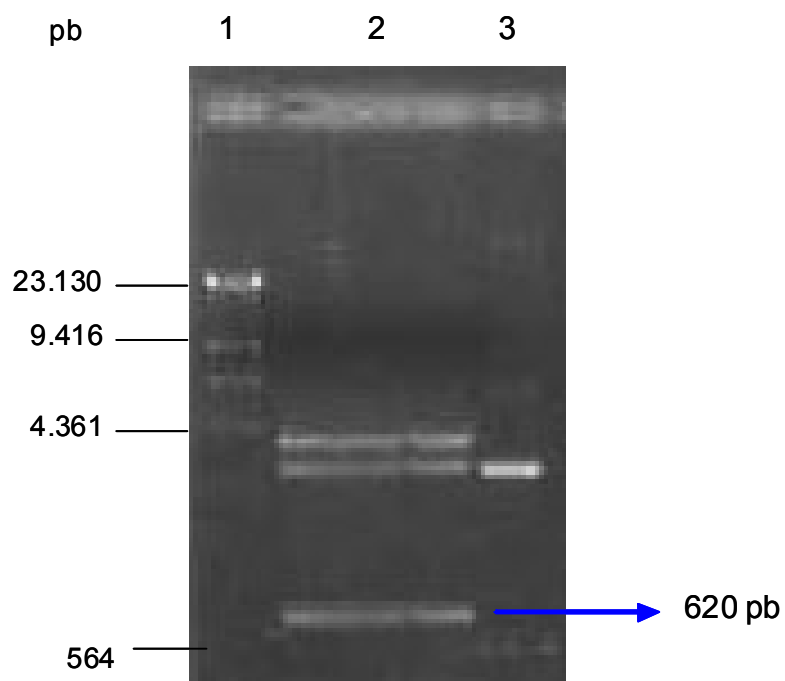


Figura 18: Digestión del ADN plasmídico de la colonia 2 con EcoRI. (1) Marcador de peso molecular λ HindIII, (2) ADN digerido del clon H14 (16-VI-05) y (3) ADN sin digerir de la colonia 2.

7.4 Ensayos de “Southern blot” para la detección de la agrupación génica codificante para snoARNs de *T. rangeli*

Con el fin de corroborar la identidad del fragmento clonado, este fue hibridado con una sonda de ADN de la cepa C23 correspondiente a la agrupación génica C1, marcada con biotina. Es así como en la figura 19 se observa una fuerte señal de hibridación, lo cual indica que la colonia 2 posee la secuencia codificante para la agrupación génica C1 de la cepa H14 de *T. rangeli*.

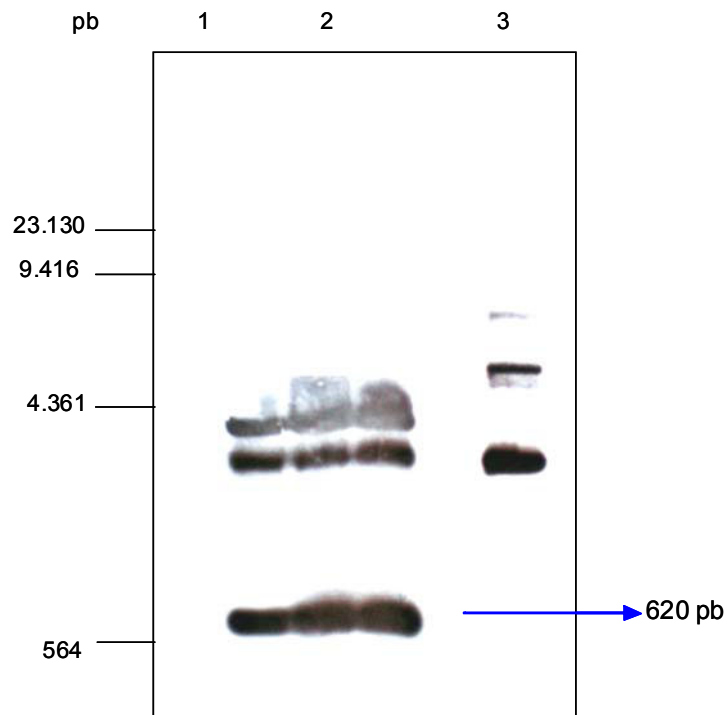


Figura 19: Ensayo de “Southern blot” para la detección de la agrupación génica codificante para snoARNs de la cepa H14 KP1(+) de *T. rangeli*. (1) Marcador de peso molecular, (2) ADN digerido de la colonia 2 de la cepa H14 (16-VI-05) y (3) ADN sin digerir de la colonia 2.

7.5 Análisis de la secuencia de la agrupación génica CI de *T. rangeli* H14

En primer lugar, se determinó la secuencia del inserto de la colonia 2, el cual posee un tamaño de 633 nts (Figura 20) y codifica para cinco snoARNs, organizados en tándem, como se muestra en la figura 21. Esta secuencia se publicó en el GenBank con el número de acceso EF100612 (Anexo 14).

```

1 CGCCCCGTCT TGCCCTGTCT GGCGCCCTGT CTGCGCACGC GGTCAGTGAC GGGTGCGCC
61 GAAAGCGCAA GAGAGAGATG GAGAGTGGGC AGGGCGGGGG TTGTGGTGGG TTTGCGCCGC
121 TGCTGATGGA AAAAAACAAC TGTTGTGCGC GAGGGCGCGC GAGCCCTGTG AGCGCCCTTG
181 CGTGATAGCC ATCTCAAAA CTCAACAGGT CTGACGGCCG CACCCCGCA CCCC CGCGC
241 GCCAGCAGAC AAGGCGCGCT CTGAGACCCA CCGCCTCGCA GCAGTGGGCG CGTGGGTGCA
301 TCAGCGCCCC GAGAAGTGAG TGATGGAGCT GAAGCGCAAC ATCCCTTGGG CCGGCGGCCT
361 GCTGTTGGTG CCGCGCGTGG CGCCCCTGTC CGATTGTGCG AGAGTTTGGG GCGAGGACGG
421 GCGAGAAGAC GCGAGAACGG GAGCAAGAGC GAAGAAGGCG GGGAGGAGAC GGCCGCGACG
481 CATGATGAGA TTTTGCGGTT TCCTGTCAGC CTGACGCCGA CAACGCGTGA CGACACAAC
541 TTCAACTCAG CTCACACTGA AACGACTTGC TTTCCCCCCT TCCCCCCTC TTTTTTTTCT
601 CTTCCTTCCC CCCTCCCTCC TGTCTTGCT GCG

```

Figura 20: Secuencia de la agrupación génica de la cepa H14, correspondiente al inserto de la colonia 2. Con número de acceso al GenBank EF100612.

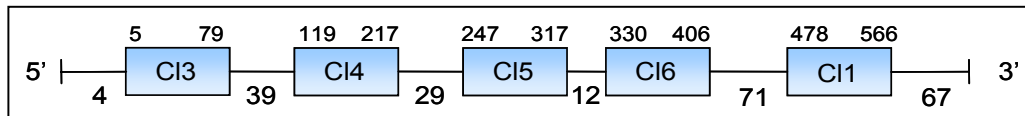


Figura 21: Representación esquemática de la agrupación génica CI de *T. rangeli* de la cepa H14 KP1(+). Las cajas representan la región que codifica para cada uno de los snoARN. Los números representan la posición de los nucleótidos en la agrupación.

Con el fin corroborar la identidad del fragmento secuenciado, se determinó el porcentaje de similitud con la secuencia codificante para la agrupación CI de la cepa C23 del parásito. Para ello, se realizó un alineamiento con el programa ALIGN global el cual mostró una identidad del 72%, resultado obtenido debido a que la secuencia amplificada de la cepa H14 no tiene los primeros 162 nt de la agrupación CI, ya que los cebadores utilizados para la amplificación de esta región anillan en las posiciones 163-180 y 763-782 de dicha secuencia. Por lo tanto, el inserto de la colonia 2, no contiene a la secuencia completa de la agrupación génica encontrada en C23.

Debido a lo anterior, se realizó un alineamiento con el programa L-ALIGN local para determinar el porcentaje de identidad con el fragmento obtenido en la secuenciación, con el cual se obtuvo un porcentaje del 96,5 % (Figura 22). Con lo cual se entiende que no hay una divergencia considerable entre las secuencias obtenidas de las cepas C23 y H14.

		10	20	30	40	50	60	
TrH14	CGCC	CCGTCTTGCCCTGTCTGGCGCCCTGTCTGCGCACGCGGTCAGTGACGGGTGCGCCC						
		::						
C23	CGCC	CCGTCTTGCCCTGTCTGGCGCCCTGTCTGCGCACGCGGTCAGTGACGGGTGCGCCC						
		170	180	190	200	210	220	
		70	80	90	100	110	120	
TrH14		GAAAGCGCAAGAGAGAGATGGAGAGTGGGCAGGGCGGGGTTGTGGTGGGTTTGCGCC					GC	
		::						
C23		GAAAGCGCAAGAGAGAGATGGAGAGTGGGCAGGGCGGGGTTGTGGTGGGTTTGCGCC					GC	
		230	240	250	260	270	280	
		130	140	150	160	170	180	
TrH14		TGCTGATGGAAAAAACAACACTGTTGTGCGCGAGGGCGCGGAGCCCTGTGAGCGC					CCTTG	
		::						
C23		TGCTGATGGAAAAAACAACACTGTTGTGCGCGAGGGCGCGGAGCCCTGTGAGCGC					ACTTG	
		290	300	310	320	330	340	
		190	200	210	220	230	239	
TrH14		CGTGATAGCCATCTCAAAAACCAACAGGTCTGACGG				CCGCACCCCCGCACCCCC	-GCGC	
		::						
C23		CGTGATAGCCATCTCAAAAACCAACAGGTCTGACGG				CCGCACCCCCGCACCCCC	GCGC	
		350	360	370	380	390	400	
		250	260	270	280	290	299	
TrH14	GGCCAGC	AGACAAGGCGCGCT	C	TGAGACCCACCGCCTCGCAGCAGTGGGCGCGTGGGTGC				
		::						
C23	GGCCAGC	AGACAAGGCGCGCT	T	TGAGACCCACCGCCTCGCAGCAGTGGGCGCGTGGGTGC				
		410	420	430	440	450	460	
		310	320	330	340	350	259	
TrH14	ATCAGCGCCCCGAGAAGT	GAGTGATGGAGC	TGAAGCGCAACATCCCTTGGGCGGCGGCC					
		::						
C23	ATCAGCGCCCCGAGAAGT	GAGTGATGGAGC	TGAAGCGCAACATCCCTTGGGCGGCGGCC					
		470	480	490	500	510	520	
		370	380	390	400	410	419	
TrH14		TGCTGTTGGTGCCGCGCGTGGCGCCCCTGTCCGATTGTGCGAGAGT				TGGGGCGAGGACG		
		::						
C23		TGCTGTTGGTGCCGCGCGTGGCGCCCCTGTCCGATTGTGCGAGAGT				TGGGGCGAGGACG		
		530	540	550	560	570	580	

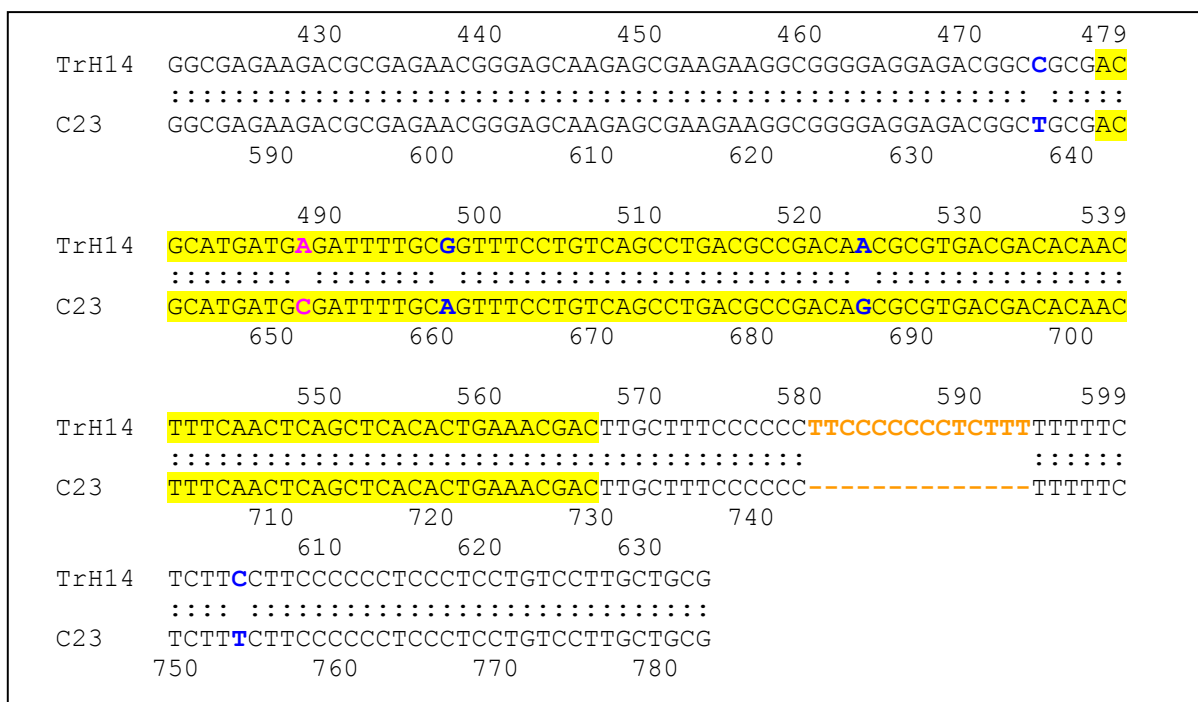


Figura 22: Alineamiento entre las secuencias de las cepas C23 KP1(-) y H14 KP1(+). En la secuencia se encuentran ubicados cada uno de los genes codificantes para los snoARNs, el color amarillo corresponde al snoARN CI1-H14, el aguamarina corresponde al snoARN CI3-H14, el verde al snoARN CI4-H14, el gris al snoARN CI5-H14 y el rojo el snoARN CI6-H14. En color morado se observan las transversiones, en azul las transiciones y en naranja las inserciones/delecciones.

Como se observa en la figura 22, la secuencia presenta mutaciones (señalados en diferentes colores) respecto a la secuencia de la cepa C23. Modificaciones que en su mayoría corresponden a transiciones siendo el gen con mayor cantidad de estas el codificante para el snoARN CI1 (Tabla 5). Así mismo se puede observar que las mutaciones ocurren tanto en las regiones codificantes para los snoARNs como en las no codificantes o intergénicas.

Tabla 5: Identificación de las mutaciones encontradas en la secuencia de H14.

Mutación	Posición H14/C23	Cambio H14/C23	Región Afectada		Tipo snoARN
			RC	RNC	
Transversión	176/338	C/A	x		CI4
Inserción/Delección	236/398	▲/C		X	CI4 – CI5
Transición	261/424	C/T	x		CI5
Transición	474/637	C/T		X	CI6 – CI1
Transversión	488/651	A/C	x		CI1
Transición	497/660	G/A	x		CI1
Transición	523/686	A/G	x		CI1
Transición	604/753	C/T		X	CI1- 3'
Inserción/Delección	580-593/743	△/▲		x	CI1-3'

RC: Región codificante

RNC: Región no codificante

▲: Delección.

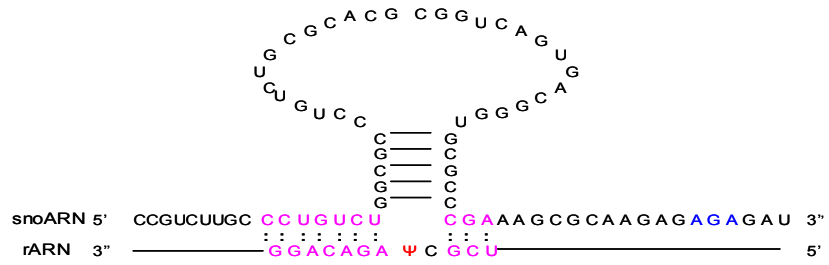
△: Secuencia TTCCCCCCTCTTT

Dentro de la secuencia analizada se encontraron 5 genes codificantes para snoARNs, tres de estos pertenecen a la familia H/ACA (CI3-H14, CI5-H14 y CI6-H14) y dos a la familia de los C/D snoARNs (CI1-H14, CI4-H14).

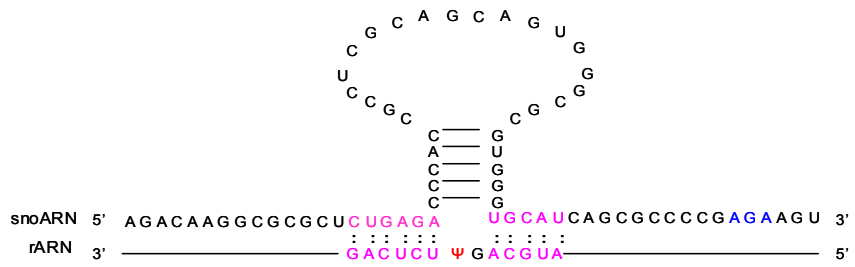
En cuanto a las secuencias de la familia H/ACA, se puede diferenciar en estos la presencia de la caja AGA, los sitios de complementariedad con el ARN que será modificado y el lugar de la pseudouridinilación (Figura 23A). En relación a los snoARNs pertenecientes a la familia C/D, se observa claramente la presencia de las cajas C y D, así como las cajas C' y D', el sitio de complementariedad con el ARN blanco y el sitio a metilar en este último (Figura 23B).

A.

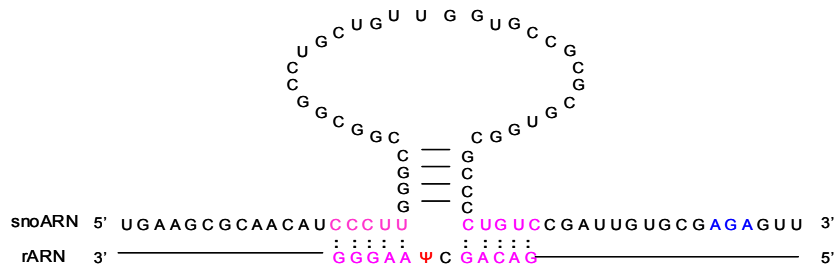
snoARN CI3-H14



snoARN CI5-H14



snoARN CI6-H14



Así mismo se muestra la interacción del ARN guía con el ARN a modificarse, donde se observa que en los snoARNs C/D estas interacciones son mucho más claras y fáciles de identificar.

7.6 Comparación de la agrupación génica CPH14 con otros tripanosomátidos

Teniendo en cuenta que la identidad de esta secuencia entre ambos grupos de *T. rangeli* {KP1(-) y KP1(+)}, es muy alta, se realizaron alineamientos locales con cada secuencia anteriormente reportada para cada snoARN en *L. collosoma* y se hicieron búsquedas de las secuencias ortólogas y en los proyectos genomas de *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. major*, para determinar el porcentaje de identidad de la secuencia estudiada con las diferentes especies de tripanosomátidos.

En primer lugar se encontró la presencia de los ortólogos para todos los snoARNs estudiados en *T. brucei* y *L. major* con porcentajes de identidad de 61,6% a 77,3% (Tabla 6).

Llamativamente en *T. cruzi*, aun cuando los porcentajes de identidad eran más altos, de 78,4% a 87,3% (Tabla 6) al compararse las secuencias de los snoARNs CI1, CI4 y CI6, no se encontró la presencia de los genes codificantes para los snoARNs CI3 y CI5 al hacer la hibridación *in silico* de la secuencia de la cepa H14 de *T. rangeli* con el proyecto genoma de *T. cruzi*.

Tabla 6: Porcentaje de identidad de alineamientos de cada snoARN con diferentes tripanosomátidos

snoARN de <i>T. rangeli</i> cepa H14	Ortólogo en tripanosomátidos		
	Nombre	Especie	Identidad
CI3	Tr C23_Ci3	<i>T. rangeli</i> C23	100%
	Tb11C4H1	<i>T. brucei</i>	71,4%
	Lm27C1H1	<i>L. major</i>	70,2%
CI4	Tr C23_Ci4	<i>T. rangeli</i> C23	99%
	Tc11C4C3	<i>T. cruzi</i>	83,7%
	Tb11Cs4C3	<i>T. brucei</i>	61,6%
	Lm27C1C3	<i>L. major</i>	77,3%
	TS2	<i>L. collosoma</i>	70,9%
CI5	Tr C23_Ci5	<i>T. rangeli</i> C23	98,6%
	Tb11Cs4H2	<i>T. brucei</i>	74,1%
	Lm27C1H3	<i>L. major</i>	72,7%
CI6	Tr C23_Ci5	<i>T. rangeli</i> C23	100%
	Tc11C4H3	<i>T. cruzi</i>	87,5%
	Tb11Cs4H3	<i>T. brucei</i>	74,3%
	Lm27C1H2	<i>L. major</i>	64,8%
	h6	<i>L. collosoma</i>	63,2%
CI1	TrC23_Ci1	<i>T. rangeli</i> C23	96,5%
	Tc11C4C1	<i>T. cruzi</i>	78,4%
	Tb11C4C1	<i>T. brucei</i>	73,3%
	Lm27C1C1	<i>L. major</i>	70,1%
	G2	<i>L. collosoma</i>	77,9%

Dado que el proyecto genoma de *T. cruzi* a la fecha no ha concluido su proceso de anotación, se procedió a analizar varios de los “contigs” (segmento de ADN contiguo) que contienen la secuencia de los snoARNs CI1, CI2, CI4 y CI6. Es así como alineamientos locales con los “contigs” 24854 y 20874 revelaron la presencia de los snoARNs CI3 y CI5 (Figuras 24 y 25) con identidad del 83,6% - 87,7% y 79,7% respectivamente, con los genes de la cepa H14 de *T. rangeli* para estos snoARNs (Tabla 7).

Tabla 7: Porcentaje de identidad entre los snoARNs CI3 y CI5 de la cepa H14 de *T. rangeli* comparados con diferentes contigs de *T. cruzi*.

CONTIGS	POSICIÓN	CI3	CI5
20874	269 - 341	87,7%	
	525 - 593		79,7%
12271	687 - 759	83,6%	
	58 - 126		79,7%
24854	469 - 541	83,6%	
	748 - 816		79,7%
20144	678 - 750	84,9%	
	49 - 117		79,7%
25645	842 - 914	84,9%	
	213 - 281		79,7%

```

1 TTGCGGTGAC GGTGCGCGCG TCGAGGCTCC CTCCCCAGTT CGGGAAACGA TGGGAAAAA
61 CAAAACCAA GAGGACGCGC ACGGGTGAGA GATGCGGCTG CGACGCGTGA TGAAATCCA
121 CAGTTTCCTG TCAGTCTGAC GACGAAAACG CGTGAGGACG CAATTCCCCG CTCAGCTCAC
181 ACTGAAAGTC TTTGCTTTAC ACCCCCATCT TTCTTTTTTT TTCTTTTTTCT TTTTTTCTTT
241 CTTTGTCCCT CTGCTCTCGC TCGCGGTTT TCGGGCCCAG CGACGCGCAC GCCCGCACAC
301 ACACACACGC GCTACGATGG AGACATGTTG TTCGAGGTCC AAACAGTTTG AGCGACGCAT
361 TGAGAACGGA ACAATAAAAA TCACCTTTCG GCTGAGCGCC CGCTCCCCTC CCTCCACTT
421 CCTGCTATTG TTGTCGTTTT TCTTTCTTGC GCAACGGCGC GCACGTAACA TCCTGCCCTG
481 TCTGGCGCCC TGCCTGTGCA AACGGTTGGT GGCGGGCCCG CCCAAAGCG CAAGAGAGAG
541 AAAGAGAAAG AGAGGGCCGA ATTGCCCAGA GGTGGGTTGT GGTGGGCGCA CGCCGCTGCT
601 GATGGAAGCA ACCAACTCTT GTGCGCGAGG GCGCGTGGCC CCGTGAACGC GCTTGCGTGA
661 TGGCCAAAAA CAAACCTCAC AGGTCTGACA GCCGCCCCGC CCGCCGCAAC CTCGCCGGCT
721 GGCCCCCGCG CCTCCCCTCG CATGGCCAGG AAAGGCGCGT CTGAGACCC ACCGCTCCGT
781 GACGCTGGGC GCTTGGGTGC ATCGGCGCCC CGAGAAAGAG ACACGCCGGT CGTGAAGCGC
841 AACAACCTT GGGCCGGTGG CGCGCTGTCG GTGCCGCGCG TGGCGCCACC GCCCGGTTGC
901 GCGAGAGTTT GCGGTGACGG TCGCGCGTC GAGGCT

```

Figura 24: Contig 24854 de *T. cruzi*. En color rojo y subrayado se observa el snoARN CI1, CI2, CI4 y CI6, respectivamente. En color verde se encuentra el snoARN CI3 y en color lila se encuentra el snoARN CI5.

```

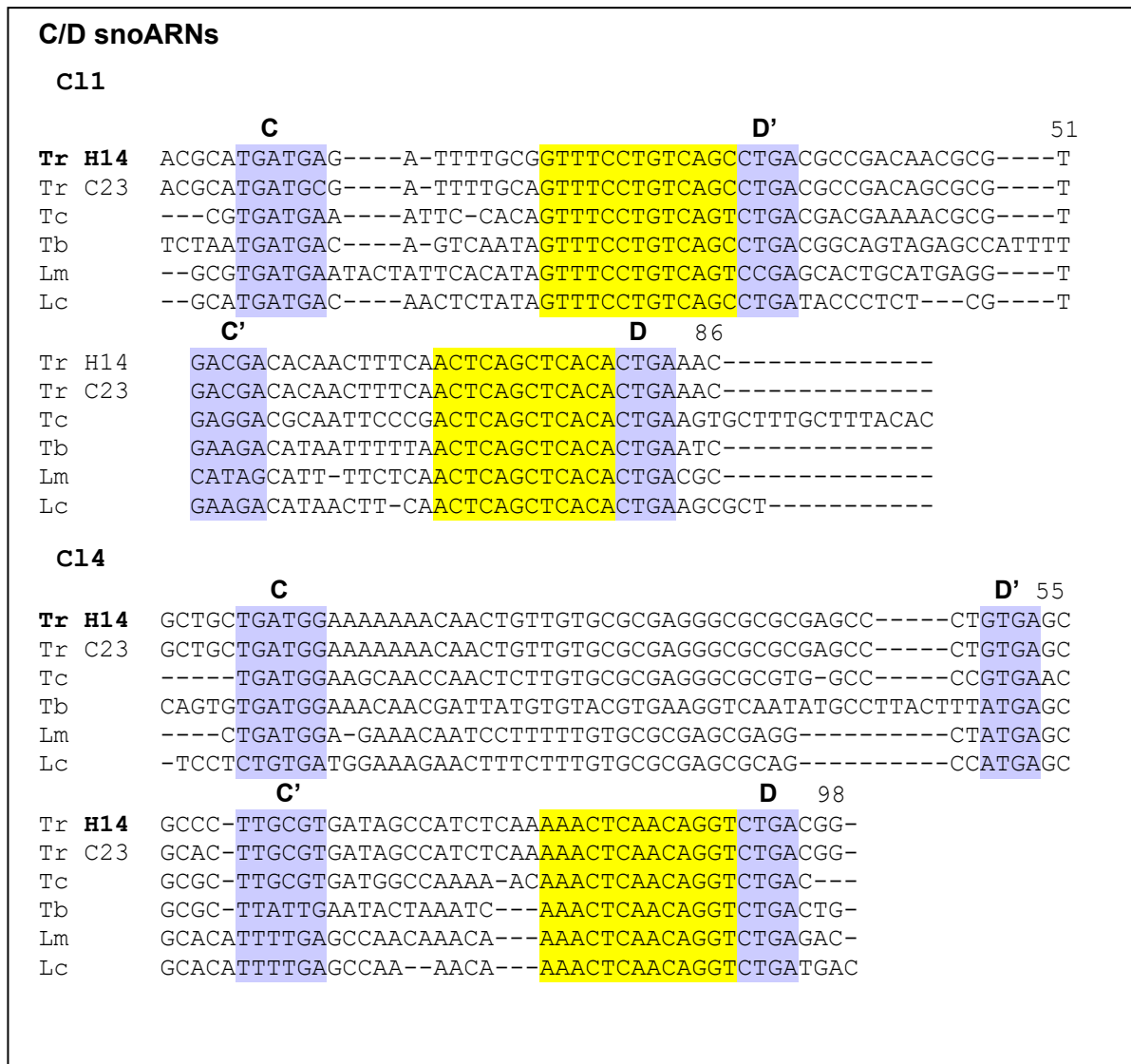
1 CACCCCACC TTTTTTTTTT TTTTCTTTG TTCCTTTGTT CTCGCCGCGC GGTTTTGCAG
61 CCCAACGACG CGCACGCCCA CACACACACA CACAAATACA CGCGCTACGA TGGAGACATG
121 TTGTTTCGAGG TCCAAACAGT TTGAGCGAGC CATTGAGAAC GGAACAATAA AAATCACCTT
181 TCGGCTGAGC GCCCGCTTCC CTCCACCCAC CCTCCCCTT CCTGCTATTG TTGTCGTTTT
241 TCTTTCTTGC GCAACGGCGC CCACGTAACA TCTTGCCCTG TCTGGCGCCC TGTCTGTGCA
301 AACGGTTGGT GGCGGGCCCG CCCGAAAGCG CAAGAGAGAG AAAGAGAAAG AGAGGGTTGA
361 ATTGCCCGGA GGTGGGTTGT GGTGGGCGCG CGCCGCTGCT GATGGAAGCA ACCAACTCTT
421 GTGCGCGAGG GCGCGTGGCC CTGTGAACGT GCTTGCGTGA TGGCCAAAAA CAAACCTCAC
481 AGGTCTGACA GCCGCCCCGC CCGCCGCGAC CTCGCCGGCT GGCCAGGAAA GGTGCCTCTT
541 GAGACCCACC GCCCGTGAC GCTGGGCGCT TGGGTGCATC GGCGCCCCGA GAAAGAGACA
601 CGCCGGTCGT GAAGCGCAAC AACCCTTGGG CCGGTGGCGC ACTGTCGGTG CCGCGCGTGG
661 CGCCCCCTGTC CAGTTGGGCG AGAGTTTGCG GTGACGGCGC GCGCGTGCAG GCTCCCTCCC
721 CAGTTTGGGA AACGATGGGA AAAAACAAAA CAAGAGGACC CGCACGGGTG AGAGATGCGG
781 CTGCGACGCG TGATGAAATT CACAGTTTCC TGTCAGTCTG ACG

```

Figura 25: Contig 20874 de *T. cruzi*. En color rojo y subrayado se observa el snoARN CI1, CI2, CI4 y CI6, respectivamente. En color amarillo se observa el snoARN CI3 y en color aguamarina se observa el snoARN CI5.

Por otra parte, en *L. collosoma* también se observó ausencia de los genes codificantes para los snoARN C13 y C15. Sin embargo no se puede descartar el hecho de que estas secuencias no hayan sido encontradas hasta el momento.

Con el fin de determinar las regiones consenso para la secuencia H14 con sus genes ortólogos en otros tripanosomátidos, se realizó un alineamiento múltiple mediante la utilización del programa CLUSTAL-W, con el cual se confirmaron los resultados obtenidos en el estudio de Puerta, (2005), donde se evidencia la conservación de estos motivos y la posición de los mismos (Figura 26).



H/ACA snoARN

CI3

59

Tr C23	CCGTCTTGC	CCTGTCT	GGCGCCCTGTCTGCGCACGCGGTCAGTGACGGG-TGCGCC	CGAA
Tr H14	CCGTCTTGC	CCTGTCT	GGCGCCCTGTCTGCGCACGCGGTCAGTGACGGG-TGCGCC	CGAA
Tc_C13	-CATCCTGC	CCTGTCT	GGCGCCCTGCCTGTGCAAACGGTTGGTGGCGGG-CCC GCC	CAAA
Lm	-----A	CCTGTCT	GGCACC-TGTCTTTACAC-CTGTCAGTGACAGAACACGCC	CGAA
Tb	AAATCTTAC	CCTGTCT	GGCTGCCTGTCAGTATAC--TTTCGGTGACGGTATTGGCT	CGAA

AGA 75

Tr C23	AGCGCAAGAGAGAGAT
Tr H14	AGCGCAAGAGAGAGAT
Tc	AGCGCAAGAGAGAGA-
Lm	AGTTCAAGAGAGACAA
Tb	AGTGTAAGAGAGATC-

CI5

60

Tr C23	AGACAAGGCGCGC	TTTGAGA	CCCACCGCCTCGCAGCAGTGGGCGCGTGGG	TGCAT	CAGCG
Tr H14	AGACAAGGCGCGC	TCTGAGA	CCCACCGCCTCGCAGCAGTGGGCGCGTGGG	TGCAT	CAGCG
Tc	AGGAAAGGCGCGT	CTTGAGA	CCCACCGCTCCGTGACGCTGGGCGCTTGGG	TGCAT	CGGCG
Lm	--GAACGGAGTGC	ATTGAGT	CCCACCGCTCCCCACCAGTACGCGCGTGGG	AGCAT	CAACT
Tb	----GAGGTATGC	ATTGAGA	CCC ACTGC-CTTCATATGTAGGCGAGTGGG	AGCAT	CAGCA

AGA 71

Tr C23	CCCCGAGAAGT
Tr H14	CCCCGAGAAGT
Tc	CCCCGAGAA--
Lm	CTCCTAGATGC
Tb	TCCCGAGATAA

C16

58

Tr H14	TGAAGCGCAACAT	CCCTT	GGGCCGGCGGCCTGCTGTTGGTGCCGCGCG--TGCGCCCC	CT
Tr C23	TGAAGCGCAACAT	CCCTT	GGGCCGGCGGCCTGCTGTTGGTGCCGCGCG--TGCGCCCC	CT
Tc	---AGCGCAGCGA	CCCTT	GGGCCGGTGGCGCGCTGTCGGTGCCGCGCG--TGCGCCACT	
Tb	-ACAGCGCAGCAT	CCCTT	GGGCCAGTGGCAACCATTTAATGCCGTGGGGATGTGGCCCC	CT
Lm	----GCACAAC-T	CCCTT	GGAATGGTGG---GTGCCTCATCCCACGCA-----AGTCC	TT
Lc	-GCAACGCGCTAT	TGCTC	TC-CCGATGGCTTGTGTTTGGTGCCTCGAG----GAGATC	CT

AGA 75

Tr H14	GTC	CGATTGTGCGAGAGTT
Tr C23	GTC	CGATTGTGCGAGAGTT
Tc	GCC	CGTTGCGCGAGAG--
Tb	GTC	CTGTTGCGCGAGAGCC
Lm	GTC	CTGTTGTGCCAGAGCG
Lc	GAGC	----GCGTGAGAACG

Figura 26: Alineamiento múltiple para la secuencia de *T. rangeli* H14. En orden de aparición las secuencias corresponden a *T. rangeli* H14, *T. rangeli* C23 identificado con el número de acceso al GenBank AY028385, *T. cruzi* identificado con el número de GenBank NW 910964 para los C/D snoARNs, *T. brucei* y *L. major* se encuentran en la página web www.genedb.org y *L. collosoma*

identificado con el número de acceso al GenBank AF3316456 para los snoARNs TS2 y G2. Las cajas para cada uno de los snoARNs están subrayadas de color lila, mientras que las zonas de complementariedad con el ARN a modificar se encuentran subrayadas de color amarillo. Los números corresponden a la posición de los nucleótidos en la secuencia.

Finalmente se analizó la organización de la secuencia codificante para los snoARNs en los diferentes tripanosomátidos. Es así mismo como en *T. brucei* estos genes se ubican en el cromosoma 11 formando una agrupación de 32 snoARNs limitados por dos proteínas ESAG (proteínas de genes asociados a los sitios de expresión) hipotéticas y por una isovaleril CoA deshidrogenasa hipotética. Internamente, estos genes se organizan en forma ascendente de CI1 a CI6 (Figura 27).

En el caso de *L. major* los genes snoARNs estudiados se localizan en el cromosoma 27 formando dos agrupaciones. La primera de ellas limitada por una fosfatidil inositol kinasa y una proteína conservada hipotética seguida por 8 snoARNs. La segunda agrupación consta de 61 genes codificantes para snoARNs interrumpidos entre el octavo y noveno gen por una secuencia codificante para una proteína hipotética conservada. Está agrupación se limita por una fosfatidil inositol kinasa y una proteína conservada hipotética en un extremo y por una proteína hipotética de función desconocida seguida de una isovaleril CoA deshidrogenasa hipotética, una proteína conservada hipotética y un transportador ABC hipotético.

Internamente, estos genes presentan un patrón básico de organización de los snoARNs CI1, CI3 y CI6 por una parte y CI1, CI2, CI4 y CI5 por otra, los cuales se repiten varias veces en el genoma del parásito (Figura 27).

En *T. cruzi* por su parte, aun cuando, como se mencionó anteriormente el proceso de anotación del proyecto genoma no ha sido concluido, el análisis de los diferentes “contigs” muestra una organización similar a la de *T. brucei* en orden ascendente de CI1 a CI6 (Figura 27).

Por último, en *L. collosoma* se observa como los genes codificantes para los snoARNs CI6, CI4 y CI1 se intercalan con otros snoARNs diferentes a CI2, CI3 y CI5 (Figura 27).

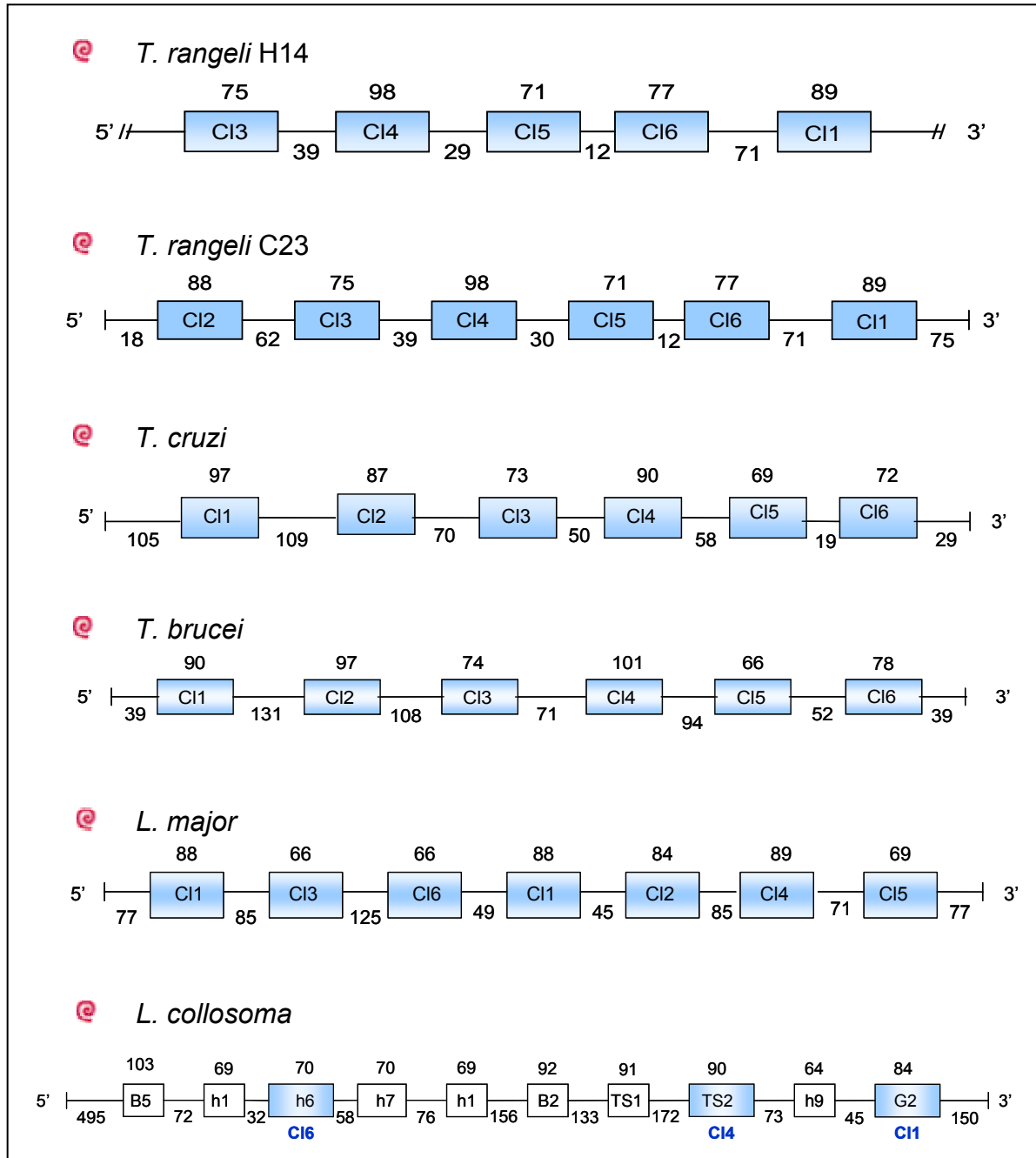


Figura 27: Comparación de la representación esquemática de la agrupación CI en tripanosomátidos. Las líneas finales en la figura representan la continuación de la secuencia.

8. DISCUSIÓN

En comparación con los ARN mensajeros, los ARN que no codifican para proteínas tienen diferentes funciones en diferentes compartimientos y estadios de desarrollo de la célula. Entre ellos, los ARNs nucleolares pequeños (snoARNs) guían modificaciones post-transcripcionales de otros ARNs, los cuales son importantes para el plegamiento apropiado del ARN como también en la interacción ARN-ARN y ARN-proteínas (Zemann et al., 2006).

Sorpresivamente, organismos como *Euglena* y tripanosomátidos, los cuales divergieron de forma temprana de la línea evolutiva de los eucariotes, presentan un ARN ribosomal hipermodificado. Estimándose el número de metilaciones de 95-100 en tripanosomátidos (Gray, 1979) y de 150 en *Euglena* (Russell et al., 2006), cercano al número encontrado en plantas y vertebrados (Brown et al., 2003).

Esta extensiva metilación del rARN parece relacionarse con la necesidad de preservar la actividad ribosomal bajo condiciones adversas, como lo son el cambio de temperatura que sufren los parásitos durante su ciclo de vida al pasar del hospedero invertebrado al vertebrado y los cambios de temperatura a los que se ve expuesta *Euglena* en la naturaleza (Uliel et al., 2004).

Por lo general, se ha visto que la eliminación de una sola metilación en la molécula del ARN no tiene un efecto dramático en la función del ribosoma, pero la eliminación de varias de ellas y mutaciones en la proteína fibrilarina de levaduras, la cual hace parte de la ribonucleopartícula de los C/D snoARNs, causa alteraciones significativas en la biogénesis del ribosoma (Jansen et al., 1991).

La pseudouridinilación por su parte, aporta un donador de puente de hidrógeno potencial y por lo tanto la pseudouridina modificada se encuentra presente en la molécula de ARN cuya estructura terciaria es de vital importancia para su función, siendo su principal efecto la estabilidad de la estructura terciaria del ARN (Charette y Gray., 2000).

En relación a los efectos de la pseudouridinilación, King et al., (2003) demostraron que la eliminación de un residuo de pseudouridina conservado en el centro peptidil-transferasa del rARN afecta la traducción de proteínas. Adicionalmente, el silenciamiento del gen codificante para la pseudouridina sintasa de *T. brucei*, enzima encargada del proceso de pseudouridinilación que además hace parte de la ribonucleopartícula de los H/ACA snoARNs, tienen los siguientes efectos: (i) Desestabilización de todos los snoARNs pertenecientes a la familia H/ACA snoARNs, (ii) defectos en el procesamiento del rARN como acumulación de precursores e inhibición del clivaje para la generación del rARN maduro y (iii) defectos en el proceso de “*trans-splicing*”, mecanismo esencial para la generación de los ARN mensajeros maduros (Barth et al., 2005).

Hallazgos en cuanto al proyecto genoma humano muestran como los genes codificantes para productos proteicos corresponden solo al 1,5% del genoma, los cuales además no presentan variaciones significativas con otros mamíferos. Con lo cual, las diferencias con las otras especies puede residir en el 98,5% restante del genoma, porcentaje dentro del cual se sitúan los ARNs que no codifican para proteínas. Dentro de la población de estos snoARNs, el estudio de las moléculas de snoARNs ha cobrado gran interés dado los hallazgos recientes que sugieren que estos ARNs están implicados en mecanismos de regulación epigenética (Mattick y Makunin, 2005).

Teniendo en cuenta lo anterior, en este trabajo se realizó la caracterización de los genes codificantes para la agrupación génica CI en una cepa KP1(+) de *T. rangeli*, encontrándose que a semejanza de lo presentado para la cepa C23, esta agrupación codifica para 5 snoARNs, tres pertenecen a la familia H/ACA snoARN y dos a la C/D snoARN.

Es de resaltar que en la estrategia de amplificación de dicha agrupación se utilizó una *Taq* polimerasa con actividad correctora, con lo cual se soporta la confiabilidad de los datos presentados. Adicionalmente, vale la pena resaltar que al clonarse los fragmentos de amplificación, las secuencias obtenidas representan una de las copias presentes en el genoma del parásito.

El análisis de las características de la agrupación CI en la cepa H14 de *T. rangeli* en primer lugar muestra que esta conserva tanto el número de snoARNs como el orden de los mismos, comparados con los genes de la cepa C23 del parásito. Es más, las distancias entre los snoARNs se mantienen con una excepción referente a la región espaciadora entre los snoARNs CI4 y CI5 en donde, o bien en la cepa H14 ocurrió una delección de una C ó en la cepa C23 ocurrió la inserción de una C. Llamativamente, la misma organización y orden de estos genes se encuentra en la agrupación TB11Cs4 de *T. brucei*. (Liang et al., 2005; Puerta, 2005).

Dado que los genes en tripanosomátidos se encuentran repetidos en tándem y se transcriben en forma policistrónica, encontrándose los puntos de control de expresión génica a nivel post-transcripcional y traduccional en su mayoría; es posible que la conservación en la organización en cuanto a número y orden de los genes de esta agrupación génica, se relacione con los requerimientos existentes para su transcripción y procesamiento.

Además vale la pena mencionar que la organización que muestran estos snoARNs en *T. rangeli*, es semejante a la de otros tripanosomátidos y plantas, ya que los genes se encuentran organizados en agrupaciones que contienen tanto H/ACA como C/D snoARNs, siendo estos transcritos de forma policistrónica (Brown et al., 2003).

En cuanto a la estructura de cada uno de los C/D snoARN, se puede observar que las cajas C y D son altamente conservadas, mientras que las cajas C' y D' muestran variaciones en sus secuencias. Sin embargo comparado con otros organismos, estas secuencias son bastante conservadas y pueden distinguirse fácilmente como ocurre en el caso de *Euglena gracilis* (Russell et al., 2006).

De igual forma para los H/ACA snoARNs la caja AGA se encuentra bastante conservada en estas especies. Por el contrario, no fue posible determinar el domino H para estos, al encontrarse variaciones en la secuencia. Como consecuencia, estos snoARNs muestran porcentajes menores de identidad entre ellos comparado con los C/D snoARNs (Liang et al., 2005).

Contrario a la estructura primaria de los H/ACA snoARNs, la estructura secundaria de estos es altamente conservada, ya que los tres H/ACA snoARNs mostraron una sola horquilla como se había reportado para otros tripanosomátidos (Liang et al., 2005).

A semejanza de *E. gracilis*, la mayoría de los C/D snoARNs en tripanosomátidos presentan heterogeneidad en la longitud de sus extremos 5'; de manera que la caja C se localiza a partir del primer, segundo, tercer, cuarto ó quinto nucleótido. En el caso de los snoARNs de las cepas estudiadas de *T. rangeli*, este extremo esta conformado por 5 nts, a diferencia de *T. cruzi*, *Leishmania* y *Leptomonas*, organismos en los cuales la

caja C se localiza a cero, uno, dos, tres y cuatro nucleótidos del extremo 5' de la molécula (Figura 26).

Característicamente, los C/D snoARNs de metazoarios presentan estructuras secundarias en sus extremos 5' y 3' las cuales interactúan formando un motivo "Kink-turn", el cual se ha visto es importante para la estabilidad, ensamblaje y procesamiento de estos ARNs (Szewczak et al., 2005). Llamativamente, tanto el CI1 como el CI4 y los C/D snoARNs de otros tripanosomátidos, carecen de estas extensiones. Adicionalmente el motivo "K-turn" interacciona con la proteína Snu13p (15,5KD), dirigiendo la localización nucleolar y ensamblaje de la ribonucleopartícula de snoARNs (Watkins et al., 2002); siendo de especial interés el hecho de que ortólogos de esta proteína no han sido encontrados en el genoma de *T. brucei* (Uliel et al., 2004). También cabe anotar que los C/D snoARNs de *Euglena* carecen de estos extremos 5' y 3' (Russell et al., 2006).

Es de especial interés el snoARN CI1, ya que este puede guiar dos metilaciones, perteneciendo al grupo de los snoARNs doble guía descritos por Liang et al., (2005). Este comportamiento ha sido descrito en *Archaea*, *L. collosoma* y *Arabidopsis*, en los se encuentran un alto porcentaje de estos snoARNs. (Liang et al., 2005).

Estudios de Russell et al., (2006) en *E. gracilis* demuestran como la distancia existente entre las cajas C y D' y C' y D determinan la ocurrencia de la modificación en el ARN. Es decir que aun cuando un snoARN dado tenga la región de complementariedad al ARN a modificar, la metilación no sucede a menos que estos elementos conservados se encuentren separados por distancias de alrededor de 23-24 nts. En este sentido, llama la atención que dicha distancia en el snoARN CI1 es de 23 nts en ambos casos, mientras que en el snoARN CI4, la distancia entre las cajas C y D' se aumenta a 39

nts; razón por la cual este snoARN solo tiene el potencial de metilar una molécula de rARN en la zona de complementariedad entre las cajas C' y D, las cuales se encuentran separadas por una diferencia de 27 nts.

Por otra parte, analizando las mutaciones o cambios ocurridos en la agrupación génica Cl entre las dos cepas de *T. rangeli*, estas ocurren tanto en la región codificante (5) como en las espaciadoras (4). Sin embargo es de notar que las mutaciones ocurridas en las regiones codificantes no afectan las secuencias altamente conservadas implicadas en la funcionalidad de estos genes. También llama la atención que la mayoría de las mutaciones se concentran en la mitad 5' de la molécula de ARN tal como ha sido descrito tanto entre copias de un mismo gen en *T. brucei* (Liang et al., 2005) como en *E. gracilis* (Russell et al., 2006).

En cuanto a las mutaciones también es de especial interés el hecho de que en *T. brucei* se ha encontrado que algunos snoARNs difieren en un pequeño porcentaje en la secuencia de nucleótidos entre las distintas copias de una misma cepa (Liang et al., 2005) y más aun, cada una de estas copias, las cuales difieren en tan solo 3 nts, generan transcritos distintos, de los cuales se desconoce si tienen funciones diferentes.

Estudios anteriores revelaron la presencia de secuencias codificantes para snoARNs en diferentes especies de tripanosomátidos, razón por la cual se quiso evidenciar la conservación de las secuencias de C/D y H/ACA snoARNs en diferentes especies de estos como *T. brucei*, *T. cruzi*, *L. major* y *L. collosoma* (Figura 26), confirmándose con un alto porcentaje de identidad entre estas especies como se muestra en las tablas 6 y 7.

Llamativamente, tanto en *T. brucei* como en *L. major* se encontraron los ortólogos para todos los snoARNs estudiados. Sin embargo, análisis Blast/n

con el proyecto genoma de *T. cruzi* no evidenciaron la presencia de los snoARNs CI3 y CI5, a pesar de que los snoARNs CI1, CI4 y CI6 presentaban los mayores porcentajes de identidad con esta especie en comparación con los otros tripanosomátidos.

Como era de esperarse, dado la mayor proximidad filogenética existente entre *T. rangeli* y *T. cruzi* que entre *T. rangeli* y *T. brucei* reportada por algunos autores (Maia da Silva et al., 2004), análisis de alineamientos locales entre diversos “contigs” de *T. cruzi* que contenían los snoARNs CI1, CI2, CI4 y CI6 con la secuencia de los snoARNs CI3 y CI5 evidenciaron la presencia de estos en *T. cruzi*.

Dada la controversia existida acerca de la posición taxonómica de *T. rangeli*, por cuanto este parásito puede ser transmitido mayoritariamente a través de la saliva, como es el caso de *T. brucei* este presenta una mayor cercanía filogenética con *T. cruzi*, parásito transmitido por las heces; es importante resaltar los hallazgos de este trabajo en donde se encontró una mayor identidad en las secuencias de los snoARNs entre *T. rangeli* y *T. cruzi* que entre *T. rangeli* y *T. brucei*. Es así como otros estudios desarrollados en el Laboratorio de Parasitología Molecular de la Pontificia Universidad Javeriana evidenciaron los mismos resultados al analizar los genes codificantes para la proteína KMP_11 (Diez et al, 2005), histona H2A (Cuervo et al., 2006; Puerta et al., 2000) y la proteína de choque térmico HSP70 (Cuervo et al., 2004).

Por otra parte, análisis de la organización genómica de secuencias codificantes para estos snoARNs muestran como mientras en *L. collosoma* los snoARNs CI1, CI4 y CI6 (G2, TS2 y h6) respectivamente, se encuentran agrupados con otros snoARNs diferentes (Liang et al., 2003); en *Leishmania* y tripanosomas todos los snoARNs estudiados se ubican en una sola agrupación que no incluye otros snoARNs.

Adicionalmente, es de destacar que las distancias o regiones espaciadoras entre las regiones codificantes son más similares entre *T. rangeli* y *T. cruzi* que entre *T. rangeli* y *T. brucei* (Figura 27). Hechos que en conjunto reflejan la relación filogenética entre estos parásitos.

Dada la elevada identidad entre las secuencias de los snoARNs de *T. rangeli* con los reportados en *T. brucei*, se puede asumir que las modificaciones guiadas por los snoARNs de *T. brucei*, estudiadas recientemente por Liang et al., (2005), también se llevan a cabo por sus ortólogos en *T. rangeli* (Tabla 7) y que los C/D snoARNs analizados, cumplen con la regla del +5, encontrándose el nucleótido a modificar en el ARNr 5 nts corriente arriba de la caja D o D'.

Tabla 8: Modificaciones del rARN guiadas por los snoARNs ortólogos de la agrupación CI de *Trypanosoma rangeli*.

rARN	CI	<i>T. brucei</i>		Levaduras		Plantas		Humanos	
		snoARN	Sitio	snoARN	Sitio	snoARN	Sitio	snoARN	Sitio
LSU	CI1	TB11Cs4C1	Am1326			AtsnoR18	Am 2924		
		TB11Cs4C1	Am1338	SnR71	Am2943	AtU29	Am 2936	U29	Am 4493
LSU	CI4	TB11Cs4C3	Um611			AtsnoR53	Um 2400		
LSU	CI3	TB11Cs4H1	Ψ1357						
SSU	CI5	TB11Cs4H2	Ψ61 Ψ1907						
LSU	CI6	TB11Cs4H3	Ψ566						

Tomado de Liang et al., (2005).

Es de especial interés el hecho de que ortólogos de CI2 han sido encontrados en levaduras, plantas y humanos, sugiriendo que este C/D snoARN puede representar una secuencia ancestral conservada en el dominio Eukarya.

También llama la atención como 2 de los 5 snoARNs estudiados tienen su contraparte en plantas y 3 modifican sitios únicos presentes en tripanosomátidos, siendo estos últimos snoARNs del tipo H/ACA. No obstante, dada la dificultad en encontrar los H/ACA snoARNs en los distintos genomas por su menor tamaño y menor número de secuencias conservadas; no se puede descartar el hecho de que los ortólogos de Cl3, Cl5 y Cl6 existan en otros organismos.

Recientemente, han sido descritos por Vallejo et al., (2003), la existencia de dos grupos de *T. rangeli*: Los grupos 1 y 2 asociados a diferentes vectores triatomínicos. Siendo las cepas del grupo 2, las que se encuentran en el vector *Rhodnius prolixus* y poseen los tres tipos de minicírculos (KP1, KP2 y KP3). Mientras que el grupo 1 se encuentran cepas aisladas de *Rhodnius colombiensis* y no poseen el minicírculo KP1.

El descubrimiento de estos dos grupos del parásito ha impulsado el desarrollo de diversos estudios con el fin de obtener marcadores moleculares eficientes para la diferenciación de estos, dentro de los cuales se encuentra la caracterización de los genes codificantes para el extremo amino terminal de la proteína de choque térmico HSP70 (Cuervo et al., 2004). En este caso, las regiones génicas estudiadas de la cepa KP1(+) H14 y de la cepa KP1(-) Tre de *T. rangeli* mostraron una identidad del 99%, demostrando que no hay diferencias significativas en la secuencia de nucleótidos y por ende tampoco en la de aminoácidos, por lo cual se confirmó que estas secuencias poseen un alto grado de conservación entre tripanosomátidos como con otras especies, y que al menos su extremo N-terminal no constituye un marcador diferencial entre estas dos poblaciones del parásito.

En otro estudio realizado por Cuervo et al., (2006) se caracterizó el gen H2A de la cepa H14 KP1(+). La comparación de este gen con la secuencia

previamente reportada para una cepa KP1(-) del parásito (Puerta et al., 2000), demostró la ausencia de diferencias significativas entre ambos grupos en cuanto a tamaño y número de copias, así como en la secuencia de aminoácidos de la proteína. Los cambios significativos se encontraron en la región intergénica donde se observó un 5% de divergencia; constituyendo así, esta región un marcador diferencial de las subpoblaciones del parásito, según los estudios de secuenciación y filogenia de un mayor número de cepas y de “Low-Stringency Single Specific Primer PCR” (LSSP-PCR) (Cuervo et al., 2006; Suárez et al., 2006).

Teniendo en cuenta la importancia de los snoARNs en el procesamiento no solo del ARNr sino también de diversos ARNs de transferencia, así como también la plasticidad génica de los mismos (Zemann et al., 2006); en este estudio se compararon las secuencias de la agrupación génica C1 entre las cepas H14 KP1(+) y C23 KP1(-) del parásito; encontrándose una divergencia del 3,5% entre las mismas. Resultados que en principio no resultan alentadores para el uso de estos genes como marcador diferencial de las subpoblaciones KP1(+) y KP1(-) del parásito.

El bajo porcentaje de divergencia encontrado en la agrupación génica C1 entre las cepas estudiadas de *T. rangeli* puede obedecer al hecho de que la misma está conformada por regiones codificantes y regiones espaciadoras cortas las cuales deben estar sometidas a una presión selectiva para conservar tanto su secuencia como longitud, de forma que se de el correcto procesamiento de cada uno de los snoARNs.

9. CONCLUSIONES

1. Se amplificó, clonó y secuenció un fragmento de 633 pb correspondiente a una parte de la agrupación génica CI, la cual codifica para dos C/D snoARNs y tres H/ACA snoARNs en la cepa H14 KP1(+) de *Trypanosoma rangeli*.
2. La agrupación génica CI de las cepas C23 KP1(-) y H14 KP1 (+) no presenta diferencias significativas en cuanto a su organización y secuencia de nucleótidos.
3. Se resaltan las características de los snoARNs CI1 y CI2, los cuales representan un snoARN doble guía de una parte y un snoARN ancestral por otra.
4. Los snoARNs estudiados presentan mayor identidad con *T. cruzi* que con *T. brucei*, lo cual apoya la proximidad filogenética entre *T. cruzi* y *T. rangeli*.
5. La secuencia de los snoARNs de la agrupación génica CI de la cepa H14 de *T. rangeli* presenta un alto porcentaje de identidad con la de otras especies de kinetoplastidos, lo que confirma el carácter conservado de la misma y sugiere que los snoARNs codificados modifican las mismas posiciones en el rARN.
6. La organización genómica de los snoARNs al ser muy similar entre las diferentes especies de tripanosomas pero distinta a la presentada en *Leishmania* y *Leptomonas* refleja la cercanía evolutiva existente entre estos parásitos.

7. Se identificaron las secuencias codificantes para los snoARNs CI3 y CI5 en el genoma de *T. cruzi*; los cuales a la fecha no se encuentran anotados en el proyecto de este parásito.

10. PERSPECTIVAS

- ✓ Diseñar oligonucleótidos externos para lograr obtener la secuencia completa de la agrupación génica Cl.

- ✓ Determinar la funcionalidad de los snoARNs estudiados.

- ✓ Ampliar el estudio, buscando nuevos snoARNs exclusivos de tripanosomátidos, que puedan en un futuro en conjunto con sus proteínas asociadas constituir blancos potenciales para el diseño de fármacos.

- ✓ Continuar la caracterización molecular de las subpoblaciones de *Trypanosoma rangeli*, contribuyendo así al conocimiento del genoma del parásito.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Añez, N. 1982. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. IV A reconsideration of its systematic position. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 77. 405-415.
- Aya, 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 de ciclos de transmisión doméstica y silvestre en áreas endémicas de Colombia. Memorias del XXXVI Congreso Nacional de Ciencias Biológicas.
- Bachellerie, J.P., Michot, B., Nicoloso, M., Balakin, A., Ni, J., Fournier, M.J. 1995. Antisense snoARNs: a family of nucleolar RNAs with long complementarities to rRNA. Trends Biochem Sci. 20: 261-264.
- Balakin, A.G., Smith, L., Fournier, M.J. 1996. The RNA world of the nucleolus: two major families of small RNAs defined by different box elements with related functions. Cell. 86: 823-834.
- Barth, S., Hury, A., Liang, X.H., Michaeli, S. 2005. Elucidating the role of H/ACA-like RNAs in trans-splicing and rRNA processing via RNA interference silencing of the *Trypanosoma brucei* CBF5 pseudouridine synthase. J Biol Chem. 14:280:34558-34568.
- Basseri, H.R., Tew, I.F., Ratcliffe, N.A. 2002. Identification and distribution of carbohydrate moieties on the salivary glands of *Rhodnius prolixus* and their possible involvement in attachment/ invasion by *Trypanosoma rangeli*. Exp Parasitol. 100: 226-234.

- Bernal, M., Vallejo, G., Guhl, F y Cornelis, J.M. 2001. Afinidad por lectinas, sensibilidad a la 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.
- Brown, J.W., Echeverria, M. y Qu, L.H. 2003. Plant snoRNAs: functional evolution and new modes of gene expression. *Trends Plant Sci.* 8: 42–49.
- 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 miniexón. Memorias del XXXVI Congreso Nacional de Ciencias Biológicas.
- Charette, M y Gray, M.W. 2000. Pseudouridine in RNA: what, where, how, and why. *IUBMB Life.* 49: 341-351.
- Corpet, F. 1988. Multiple sequence alignment which hierarchical clustering. *Nucleic Acid Res.* 16:10881-10890.
- Cuba, C.A. 1998. Review of biological and diagnostic aspects of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. *Rev. Soc. Bras. Med Trop.* 31: 207-220.
- Cuervo, C., Mayorga, D., Pavía, P., López, M., Puerta, C. 2004. Caracterización parcial de los genes codificantes para la proteína de choque térmico HSP70 de *Trypanosoma rangeli*. *Infectio.* 8: 268-278.

- Cuervo, C., Lopez, M.C., Puerta, C. 2006. The *Trypanosoma rangeli* histone H2A gene sequence serves as a differential marker for KP1 strains. *Infect Genet Evol.* 6:401-409.
- D'Alessandro, A. y Saravia, N. 1992. *Trypanosoma rangeli*. En *Parasitic Protozoa*, Vol V. Academic Press, Inc., New York. 1-54.
- De Santa-Izabel, A., Vermelho, A.B., Branquinha, M.H. 2004. Proteolytic activities in *Trypanosoma rangeli* and stercorarian trypanosomes: taxonomic implications. *Parasitol Res.* 94: 342-348.
- Diez, H., Thomas, M.C., Uruena, C.P., Santander, S.P., Cuervo, C.L., Lopez, M.C., Puerta, C.J. 2005. Molecular characterization of the kinetoplastid membrane protein-11 genes from the parasite *Trypanosoma rangeli*. *Parasitology.* 130:643-51.
- Dunbar, D.A., Chen, A.A., Wormsley, S., Baserga, S.J. 2000a. The genes for small nucleolar RNAs in *Trypanosoma brucei* are organized in clusters and are transcribed as a polycistronic RNA. *Nucleic Acids Res.* 28: 2855-2861.
- Dunbar, D.A., Wormsley, S., Lowe, T.M., Baserga, S.J. 2000b. Fibrillarin-associated box C/D small nucleolar RNAs in *Trypanosoma brucei*. *The J Biol Chem.* 275: 14767-14776.
- Ebert, F. 1986. Isoenzymes of *Trypanosoma rangeli* stocks and their relation to other trypanosomes transmitted by triatome bugs. *Top Med Parasitol* 37:251-254.
- Gomes, S., Feder, D., Thomas, N., García, E., Azambuja, P. 1999.

Rhodnius prolixus infected with infected with *Trypanosoma rangeli*: *In vivo* and *in vitro* experiments. J Invertebr Pathol. 73: 289-293.

- Gray MW. 1979. The ribosomal RNA of the trypanosomatid protozoan *Crithidia fasciculata*: physical characteristics and methylated sequences. Can J Biochem. 7: 914-26.
- Grisard, E.C., Campbell, D.A., Romanha, A.J. 1999. Mini-exon gene sequence polymorphism among *Trypanosoma rangeli* strains isolate from distinct geographical regions. Parasitology. 375-382.
- Grisard, E.C. 2002. Salivaria or Stercoraria? The *Trypanosoma rangeli* dilemma. Kinetoplastid Biol Dis. 1: 1-2.
- Guhl, F., Jaramillo, C., Carranza, J.C., Vallejo, G.A. 2002. Molecular Characterization and Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. Arch Med Res. 33: 362-370.
- Guhl, F., Vallejo, G.A., 2003. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920 - An Updated Review. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 98: 435-442.
- Hecker, H., Schwarzenbach, M., Rudin, W. 1990. Development and interactions of *Trypanosoma rangeli* in and with reduviid bug *Rhodnius* in and with reduviid bug *Rhodnius prolixus*. Parasitol Res. 76: 11-18.
- Hoare CA. 1972. *Herpetosoma* from man and other mammals. In *The Trypanosomes of Mammals: A Zoological Monograph*, Blackwell Scientific Publications, Oxford. 288-314.

- Hughes, A.L., Piontkivska, H. 2003. Molecular phylogenetics of Trypanosomatidae: contrasting results from 18s rRNA and protein phylogenies. *Kinetoplastid Biol Dis.* 2: 1-10.
- Jansen, R.P., Hurt, E.C., Kern, H., Lehtonen, H., Carmo-Fonseca, M., Lapeyre, B., Tollervey, D. 1991. Evolutionary conservation of the human nucleolar protein fibrillarin and its functional expression in yeast. : *J Cell Biol.* 113:715-729.
- King, T.H., Liu, B., McCully, R.R., Fournier, M.J. 2003. Ribosome structure and activity are altered in cells lacking snoRNPs that form pseudouridines in the peptidyl transferase center. *Mol Cell.* 11:425-435.
- Kiss-László, Z., Henry, Y., Bachellerie, J.P., Caizergues-Ferrer, M., Kiss, T. 1996. Site-Specific ribose methylation of preribosomal RNA: A novel function for small nucleolar RNAs. *Cell.* 85: 1077-1088.
- Koerich, L.B., Emmanuelle-Machado, P., Santos, K., Grisard, E.C., y Steindel, M. 2002. Differentiation of *Trypanosoma rangeli*: high production of infective trypomastigote forms in vitro. *Parasitol Res.* 88:21-25.
- Kreutzer, R.D y Souza, O.E. 1981. Biochemical characterization of *Trypanosoma* spp. by isoenzyme electrophoresis. *Am J Med Hyg.* 30: 308-317.
- Levitan, A., Xu, Y., Ben-Dov, C., Ben-Shlomo, H., Zhang, Y., Michaeli, S. 1998. Characterization of a novel trypanosomatid small nucleolar RNA. *Nucleic Acids Res.* 26: 1775-1783.

- Liang, X.H., Liu, L., Michaeli, S. 2001. Identification of the first Trypanosome H/ACA RNA that guides pseudouridine formation on rRNA. *J Biol Chem.* 276: 40313-40318.
- Liang, X.H., Xu, Y.X., Michaeli, S. 2002. The spliced leader-associated RNA is a trypanosome-specific sn(o) RNA that has the potential to guide pseudouridine formation on the SL RNA. *RNA.* 8: 237-246.
- Liang, X.H., Ochaion, A., Xu, Y.X., Liu, Q., Michaeli, S. 2003. Small nucleolar RNA clusters in Trypanosomatid *Leptomonas collosoma*. *J Biol Chem.* 279: 5100- 5109.
- Liang, X.H., Uliel, S., Hury, A., Barth, S., Doniger, T., Unger, R., Michaeli, S. 2005. A genome-wide analysis of C/D and H/ACA-like small nucleolar RNAs in *Trypanosoma brucei* reveals a trypanosome-specific pattern of rRNA modification. *RNA.* 11: 619-645.
- Maia da Silva, F.M., Noyes, H., Campaner, M., Junqueira, A.C., Coura, J.R., Añez, N., Shaw, J.J., Stevens, J.R., Teixeira, M.M. 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.
- Mangrich, I.E., Oliveira, M.A., Grisard, E.C., Souza, W., Steindel, M. 2001. Interaction of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 with different cell lines in vitro. *Parasitol Res.* 87: 505 – 509.
- Mattick, J.S y Makunin, I.V. 2005. Small regulatory RNAs in mammals. *Hum Mol Genet.* 14: 121-132.

- Mejía, A.J., Paláu, M.T., Zúñiga, C.A. 2004a. Protein Profiles of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. Parasitol Latinoam. 59: 142-147.
- Mejía, A.J., Paláu, M.T., Zúñiga, C.A. 2004b. *Trypanosoma rangeli*: Lo que se conoce y el impacto de su presencia. MedUNAB. 7: 166-171.
- Morales, L., Romero, I., Diez, H., Portillo, P., Montilla, M., Nicholls., Puerta, C. 2002. Characterization of a candidate *Trypanosoma rangeli* small nucleolar RNA gene and its application in a PCR-based parasite detection. Exp Parasitol. 102: 72-80.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2000. Control de la Enfermedad de Chagas. Informe de un Comité de Expertos. Serie de Informes Técnicos. Ginebra.
- Paláu, M.T., Montilla, M., Zúñiga, C.A. 2001. Estudio del comportamiento de dos cepas de *Trypanosoma rangeli*. Medunab. 4: 161-167.
- Pereira, E.E.A y Moss, D. 1985. Neuraminidase activity in *Trypanosoma rangeli*. MOI Biochem Parasitol. 15:95:103.
- Puerta, C., Cuervo, P., Thomas, M.C., López, M.C. 2000. Molecular characterization of the histone H2A gene from the parasite *Trypanosoma rangeli*. Parasitol Res. 86(11):916-922.
- Puerta, C.J. 2005. Identificación de una agrupación génica que codifica para ARN pequeños de nucleolo en *Trypanosoma rangeli*. Infectio. 9: 171-179.

- Puerta, C.J, y Urueña, C.P. 2005. Prácticas de biología molecular. 1^{ra} ed. Editorial Pontificia Universidad Javeriana.
- Roberts, T.G., Sturm, N.R., Yee, B.K., Yu, M.C., Hartshorne, T., Agabian, N., Campbell, D.A. 1998. Three small nucleolar RNAs identified from the spliced leader-associated RNA locus in kinetoplastid protozoans. *Mol Cell Biol.* 18: 4409-4417.
- Rodríguez-González, I., Marín, C., Hitos, A.B., Rosales, M.J., Gutiérrez-Sánchez, R., Sánchez-Moreno, M. 2004. Biochemical characterization of new strains of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* isolates from Peru and Mexico. *Parasitol Res.* 94: 294-300.
- Russell, A.G., Murray, N.S; Gray, M.W. 2006. A Large Collection of Compact Box C/D snoRNAs and their Isoforms in *Euglena gracilis*: Structural Functional and Evolutionary Insights. *J. Mol. Biol.* 357:1548–1565.
- Samarsky, D.A., Fournier, M.J., Singer, R.H., Bertrand, E. 1998. The snoRNA box C/D motif directs nucleolar targeting and also couples snoRNA synthesis and localization. *EMBO J.* 17: 3747-3757.
- Sambrook, J., Russell, D.W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold spring Harbor Laboratory press, Cold spring Harbor, New York: USA).
- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A. 1977. DNA sequencing with chain terminanting inhibitors. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 74: 5463-5546.
- Steindel, M., Dias-Neto, E., Carvalho-Pinto, C.J., Grisard, E., Menezes

C., Murta, S.M.F., Simpson, A.J.G., Romanha, A.J. 1994. Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and isoenzyme analysis of *Trypanosoma rangeli* strains. J.Euk Microbiol. 41: 261-267.

- Stephen, A., Madden, T., Schaffer, A., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search program. Nuc Acid. Res. 25: 3389-3402.
- Suárez, B.A., Cuervo, C., Puerta, C. 2006. Comparación de la secuencia intergénica del gen Codificante para la Histona H2E en Cepas KP1(-) y KP1(+) de *Trypanosoma rangeli*. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá Colombia.
- Szewczak, L.B., Gabrielsen, J.S., Strobel, S.A., Steitz, J.A. 2005. Molecular basis for RNA kink-turn recognition by the h15.5K small RNP protein. RNA.11:1407-1419.
- Tejera, E. 1920. Un nouveau flagella de *Rhodnius prolixus*. *Trypanosoma* (ou *Crithidia*) *rangeli* sp. Bull Soc Pathol Exot. 13:527-530.
- Thomas, M.c., Fernández, A., Moro,A., García, J.A y González, A. 1993. Biología Molecular de tripanosomátidos. Nuevas tendencias, Parasitología Molecular 135-143.
- Uliel, S., Liang, X.H., Unger, R., Michaeli, S. 2004. Small nucleolar RNAs that guide modification in trypanosomatids: repertoire, targets, genome organisation, and unique functions. Int J Parasitol. 34: 445-454.
- Urrea, D.A., Carranza, J.C., Cuba, C.A., Gurgel-Goncalves, R., Guhl, F., Schofield, C.J., Triana, O., 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. *Infect Genet Evol.* 5: 123-129.

- Vallejo, G.A., Marinkelle, C.J., Guhl, F., de Sanchez, N. 1988. Behavior of the infection and morphologic differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the intestine of the vector *Rhodnius prolixus*. *Rev Bras Biol.* 48: 577-587.
- Vallejo, A.G., Macedo, A.M., Chiari, E., Pena, D.D.J. 1994. Kinetoplast DNA from *Trypanosoma rangeli* contains two distinct classes of minicircle with different size and molecular organization. *Mol Bioch Parasitol.* 67:245-253.
- Vallejo, A.G. 1998. Estudios comparativos entre las secuencias de kDNA de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli* y su aplicación en el diagnóstico molecular de la Tripanosomiasis Americana. *Actual Biol.* 20: 43-56.
- Vallejo, G.A., Jaramillo, C.J., Carranza, J.C., Sanchez, J.L., Lozano, L.H., Gualtero, D., Guayara, F., Cuervo, L.A., Mojica, M.T., Jaramillo, C.A., Guhl, F. 2000. La biología molecular y sus aplicaciones en el estudio de la tripanosomiasis Americana. *Revista Medicina.* 22: 105-112.
- Vallejo, G.A., Carranza, J.C., Guhl, F. 2001. Epidemiología molecular de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli* en Colombia y en América. *Entornos* 13: 9-16.
- Vallejo, G.A., Guhl, F., Carranza, J.C., Marinkelle, C.J. 2002a CIMPAT.

Caracterización Biológica, Bioquímica, Molecular y Genética de *Trypanosoma rangeli* en Colombia y en América. Memorias Curso Taller Internacional-CIMPAT. Corcas Editores Ltda Bogotá. p.13 – 31.

- Vallejo, G.A., Guhl, F., Carranza, J.C., Lozano, L.E., Marinkelle, C.J. 2002b. Evolución clonal o especiación en *Trypanosoma rangeli*. Memorias Curso Taller Internacional. Corcas Editores Ltda. Bogotá D.C. p.79 – 89.
- Vallejo, G.A., Guhl, F., Carranza, J.C., Moreno, J., Triana, O., Grisard, E.C. 2003. Parity between kinetoplast DNA and mini-exon gene sequences supports either clonal evolution or speciation in *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius colombiensis*, *R. pallescens* and *R. prolixus* in Colombia. *Infect Genet Evol.* 3: 39-45.
- Watkins, N.J., Dickmanns, A., Luhrmann, R. 2002. Conserved stem II of the box C/D motif is essential for nucleolar localization and is required, along with the 15.5K protein, for the hierarchical assembly of the box C/D snoRNP. *Mol Cell Biol.* 22:8342-8352.
- Xu, Y., Liu, L., Lopez-Estraño, C., Michaeli, S. 2001. Expresión studies on clustered trypanosomatid box C/D small nucleolar RNAs. *J Biol Chem.* 276: 14289-14298.
- Zemann, A., Anja op de Bekke., Kiefmann, M., Brosius, J., Schmitz, J. 2006. Evolution of small nucleolar RNAs in nematodes. *Nucleic Acids Res.* 34: 2676–2685.

12. ANEXOS

ANEXO 1: Extracción de ADN de parásitos

1. Partir de aproximadamente 100 ml de cultivo en fase logarítmica de crecimiento.
2. Centrifugar los parásitos a 4.000 revoluciones por minuto (rpm) durante 20 minutos (min) a 4°C.
3. Resuspender el botón de parásitos en 40 ml de solución amortiguadora de fosfato (PBS) frío en un tubo de 50 ml y centrifugar a 4.000 rpm durante 20 min a 4°C.
4. Resuspender el precipitado en 1 ml de PBS frío y centrifugar a 6.000 rpm durante 5 min a 4°C.
5. Repetir el paso anterior dos veces.
6. Resuspender el botón en 1 ml de PBS frío y centrifugar a 13.000 rpm durante 15 min.
7. Resuspender el precipitado en 1 ml de PBS frío y adicionar 100 µl de NP40 al 10% en agua, mezclar y centrifugar a 13.000 rpm durante 15 min a 4°C.
8. Resuspender el botón en 2 ml de PBS, dividir en cuatro tubos y adicionar 50 µl de SDS al 10% a cada tubo.

9. Adicionar 1 volumen de fenol equilibrado (550 μ l), mezclar, centrifugar por 10 min a 10.000 rpm y recuperar la fase acuosa en otro tubo.
10. Extraer con un volumen de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (25:24:1, 275 μ l de fenol y 275 μ l de cloroformo-álcohol isoamílico), centrifugar a 10.000 rpm durante 10 min y recuperar la fase acuosa.
11. Extraer con un volumen de cloroformo-álcohol isoamílico (24:1, 550 μ l), centrifugar a 10.000 rpm durante 10 min y recoger la fase acuosa.
12. Precipitar con 2 volúmenes y medio de etanol absoluto (1,375 ml), mezclar hasta visualizar la madeja de ADN, tomar la madeja y pasarla a otro tubo.
13. Lavar la madeja de ADN con 1 ml de etanol al 70%, centrifugar a 10.000 rpm por 5 min y descartar el sobrenadante.
14. Secar el ADN a temperatura ambiente (TA) o por incubación corta a 37°C.
15. Resuspender en 200 a 300 μ l de agua destilada y des-ionizada, según la cantidad de madeja obtenida.
16. Comprobar en gel de agarosa la calidad de ADN y cuantificarlo mediante espectrofotometría a 260 nanómetros (nm).

ANEXO 2: Preparación de geles de agarosa

1. Pesar la cantidad de agarosa requerida según el porcentaje del gel. Por ejemplo, para preparar 100 ml de un gel de agarosa al 1 %, pesar 1 g de agarosa.
2. Adicionar 100 ml de amortiguador TAE 1X (98 ml de agua destilada y 2 ml de amortiguador TAE 50X).
3. Calentar la solución con el fin de disolver por completo la agarosa, dejar enfriar un poco y servir en el soporte del el colocando los peines adecuados.
4. Esperar de 40 a 60 min para la gelificación de la agarosa, colocar en la cámara de electroforesis y llenar la misma con el amortiguador 1X.
5. Sembrar las muestras usando amortiguador de muestra 1X. Por ejemplo, si la muestra tiene 10 μ l se le adiciona 2 μ l de amortiguador de muestra 6X.
6. Conectar los electrodos y correr a 100 Voltios (V).

ANEXO 3: Coloración con bromuro de etidio

1. Sumergir el gel en una solución de bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/ml.
2. Colorear durante 40 min con agitación suave.
3. Descartar la solución de bromuro de etidio.
4. Retirar el exceso de bromuro de etidio del gel, sumergiendo el mismo en agua destilada por 15 min y agitación suave.
5. Observar el gel en el transiluminador UV (302 nm). Así se puede observar el complejo ADN-bromuro de etidio.

ANEXO 4: Protocolo para la Extracción de ADN del Gel con QIAquick

Este protocolo está diseñado para extraer y purificar ADN de 70 pb a 10 Kb de geles de agarosa normales o de baja fusión en TAE o buffer TBE.

1. Cortar el fragmento de ADN del gel de agarosa con unas pinzas limpias.
2. Pesar el gel de agarosa en un tubo eppendorf estéril. Adicionar 3 volúmenes del buffer QG por 1 volumen de gel (100 mg - 100 μ l). Por ejemplo, añadir 300 μ l de buffer QG por cada 100 mg de gel de agarosa. Para geles de agarosa > 2%, añadir 6 volúmenes de buffer QG. La cantidad máxima de gel de agarosa para una QIAquick column es de 400 mg.
3. Incubar a 50°C durante 10 minutos (hasta observar que el gel se ha disuelto completamente). Para ayudar a disolver el gel, mezclar con vórtex durante 2-3 min.
4. Después de disolver el gel completamente, revisar que el color de la mezcla sea amarillo (similar al color del buffer QG sin el gel de agarosa disuelto). Si el color de la mezcla es naranja o violeta, añadir 10 μ l de Acetato de Sodio 3M a pH 5.0, y mezclar. El color debe tornarse amarillo. La adsorción del ADN a la membrana QIAquick es eficiente solo a pH \leq 7.5. El buffer QG contiene un indicador de pH que es amarillo a pH \leq 7.5 y naranja o violeta a pH más altos.
5. Añadir 1 volumen de isopropanol a la muestra y mezclar.
Por ejemplo, si el gel de agarosa pesa 100 mg, añadir 100 μ l de isopropanol. Este paso incrementa el rendimiento de los fragmentos de

ADN < 500 pb y > 4Kb. Para fragmentos de ADN entre 500 pb y 4 Kb, la adición de isopropanol no tiene efecto en el rendimiento.

6. Tomar la columna QIAquick spin y colocarla en un tubo eppendorf nuevo.
7. Para ligar el ADN, añadir la muestra a la columna QIAquick y centrifugar por 1 min. El volumen máximo que le cabe a la columna es de 800 µl.
8. Descartar el sobrenadante y añadir nuevamente muestra.
9. (Opcional) Añadir 0.5 ml de buffer QG a la columna QIAquick y centrifugar durante 1 min. Este paso remueve las trazas de agarosa. Solo se requiere cuando el ADN va a ser empleado para secuenciarlo directamente.
10. Para lavar, añadir 0.75 ml de buffer PE a la columna QIAquick y centrifugar durante 1 min. Si el ADN va a emplearse posteriormente para aplicaciones sensible a las sales, como secuenciación directa, es necesario dejar la columna por 2 – 5 min después de la adición del buffer PE y antes de la centrifugación.
11. Descartar el sobrenadante y centrifugar la columna QIAquick por 1 min a 13000 rpm. El etanol residual del buffer PE no es completamente removido por lo tanto se puede hacer una centrifugación adicional.
12. Colocar la columna QIAquick dentro de un tubo eppendorf nuevo de 1.5 ml.

13. Añadir 50 µl de buffer EB (10mM Tris-Cl, pH 8.5) o agua en el centro de la columna QIAquick y centrifugar durante 1 min. Alternativamente, para incrementar la concentración de ADN, añadir 30µl de buffer de elusión en el centro de la columna QIAquick, centrifugar por 1 min.

ANEXO 5: Sistema Vector pGEM®-T Easy

El vector pGEM®-T Easy es un sistema conveniente para la clonación de productos de PCR. El vector tiene un corte con EcoR V y esta adicionado con timiditas en ambos extremos del corte.

El vector contiene dos regiones promotoras T7 y SP6 de la ARN polimerasa y un sitio múltiple de clonación en la región codificante de la enzima β -galactosidasa

1. Brevemente centrifugar el pGEM®-T Easy.
2. En un tubo eppendorf nuevo X μ l del producto de PCR, 1 μ l del vector pGEM®-T Easy, 5 μ l de buffer de ligación para la T4 DNA ligasa, 1 μ l de la enzima T4 DNA ligasa.
3. Si es necesario, agregar agua desionizada hasta alcanzar un volumen final de 10 μ l.
4. Mezclar la reacción mediante pipeteo. Incubar la reacción por 1 h a temperatura ambiente.
5. Almacenar a 4 °C durante toda la noche.

ANEXO 6: Electroporación

1. Descongelar alícuotas de 40 μ l de células electrocompetentes en hielo.
2. Adicionar 1 μ l del producto de ligación.
3. Mezclar y adicionar a las celdas de electroporación (0,1 cm) previamente enfriadas, evitando la formación de burbujas.
4. Colocar en el dispositivo del electroporador y dar un pulso a 2,5 kv, 25 μ F y 200 Ω .
5. Inmediatamente después, adicionar 1 ml de medio Soc o LB en su defecto y mezclar evitando la formación de espuma.
6. Transferir a un tubo de microcentrífuga estéril e incubar a 37 °C durante 1 h con agitación.
7. Sembrar por lo menos 100 μ l del cultivo en LBA, X-gal e IPTG, realizando una siembra masiva.
8. Adicionar al resto del cultivo glicerol al 30 %, hacer alícuotas y guardar a -20 °C.

ANEXO 7: Prueba de Transformación (Test de blancas y azules)

1. Agregar sobre una caja de LBA, 100 μ l del inductor del operón de la lactosa IPTG 0,1 M (solución 1) y 50 μ l del cromógeno X-gal al 2,5% (solución 2).
2. Expandir con rastrillo previamente sumergido en alcohol, flameado y enfriado, bajo condiciones de esterilidad.
3. Incubar por 30 min a 37°C.
4. Colocar un filtro de nitrocelulosa sobre la placa que contiene las bacterias transformadas hasta que éste se humedezca completamente. Marcar en tres lugares asimétricos la orientación del filtro en relación con la caja de cultivo, con una aguja embebida en tinta china.
5. Retirar el filtro y colocarlo con las bacterias hacia arriba sobre la caja de LBA con IPTG y X-gal e incubar a 37°C durante 4 a 5 h y guardar a 4°C por otras 2 h.
6. Al final, las bacterias transformadas recombinantes tendrán un color blanco debido a que la inserción del ADN foráneo interrumpe el marco abierto de lectura del péptido α de la β -galactosidasa, inactivándolo. Por su parte, las no recombinantes (transformadas sólo con el plásmido sin inserto) tendrían un color azul debido a que ocurre el fenómeno de α complementación entre el péptido α del plásmido y el péptido omega de la bacteria, de manera que se produce la enzima β -galactosidasa, la cual degrada el sustrato X-gal, el cual al degradarse toma un color azul.

ANEXO 8: Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System

➤ Producción de un lisado limpio

1. Centrifugar el medio de cultivo crecido durante toda la noche a 10.000 rpm por 5 min.
2. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 250 µl de la solución de resuspensión celular.
3. Añadir 250 µl de solución de lisis celular a cada muestra, invertir en 4 tiempos para mezclar.
4. Añadir 10 µl de solución Proteasa Alcalina, invertir en 4 tiempos para mezclar. Incubar durante 5 min.
5. Añadir 350 µl de solución de neutralización, invertir en 4 tiempos para mezclar.
6. Centrifugar durante 10 min.

➤ Concentración del ADN plasmídico:

7. Insertar la columna “spin” dentro del tubo.
8. Decantar el lisado dentro de la columna “spin”.
9. Centrifugar durante 1 min, descartar el sobrenadante y colocar la columna en un nuevo tubo.

➤ Lavado:

10. Añadir 750 μ l de solución de lavado (con etanol). Centrifugar durante 1 min. Descartar el sobrenadante y reinsertar la columna en un nuevo tubo.

11. Repetir el paso anterior con 250 μ l de solución de lavado.

12. Centrifugar durante 2 min.

➤ Elución:

13. Transferir la columna "spin" a un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml, cuidando de no transferir la solución de lavado. Si la columna "spin" contiene solución de lavado adherida, centrifugar por 1 min y transferir la columna a un nuevo tubo eppendorf estéril.

14. Añadir 100 μ l de agua libre de nucleasas a la columna "spin". Centrifugar durante 1 min.

15. Descartar la columna y guardar a -20°C.

ANEXO 9: Transferencia Alcalina de ADN a un soporte sólido

1. Visualizar las bandas de ADN en el gel a la luz UV una vez finalizada la electroforesis y tomar la foto correspondiente.
2. Anotar las distancias corridas por cada una de las bandas del patrón de tamaño molecular.
3. Depurinar el gel mediante inmersión del mismo en una solución 0,25 N de HCl (solución 1) durante 10 min a TA con agitación suave.
4. Enjuagar brevemente con agua destilada.
5. Sumergir el gel en la solución de denaturación (solución 2), durante 1 h a TA con agitación suave.
6. Enjuagar brevemente con agua destilada.
7. Sumergir el gel en la solución de neutralización (solución 3) durante 1 h a TA.
8. Hacer un recambio de la solución a los 30 min.
9. Ambientar el gel durante 30 min en una solución de citrato de amonio y cloruro de sodio (SSC) 2 X (solución 4).
10. Armar la pirámide de transferencia de la siguiente manera: sobre una cubeta que contiene el amortiguador de transferencia NaOH 0,4 N colocar un vidrio a manera de puente. Sobre éste, colocar una tira de papel whatman 3MM, de manera que haga contacto con la solución

amortiguadora y que sea lo suficientemente ancha para que el gel quede en total contacto con ella. Sobre esta tira colocar el gel y sobre él ubicar cuidadosamente el filtro de *nylon* (del mismo tamaño del gel) previamente humedecido en el amortiguador o en agua. Hacer rodar una pipeta sobre la membrana para sacar las burbujas de aire que estén atrapadas. Sobre el filtro colocar tres papeles whatman 3MM del mismo tamaño del gel, el primero de ellos debe estar humedecido en el amortiguador. Luego, colocar un colchón de papeles absorbentes de igual tamaño que pueden ser papel periódico o papel de cocina. Finalmente, colocar un vidrio encima y un objeto que haga peso y permita que el amortiguador ascienda por capilaridad. 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 intermedios toda la noche.

11. Una vez cumplido el tiempo de transferencia marcar los pozos de la membrana o filtro con lápiz, colocar la fecha en la parte inferior y cortar la esquina inferior derecha.
12. Desarmar la pirámide cuidadosamente.
13. Neutralizar el filtro durante 10 min en una solución de SSC 2 X. Tener cuidado de colocar el filtro con la cara donde ésta el ADN hacia arriba.
14. Observar el gel en el transiluminador de luz UV con el fin de chequear si la transferencia fue completa.
15. Dejar secar a TA sobre el papel filtro y fijar el ADN a luz UV (312 nm) por 5 min y guardar a TA dentro de una bolsa o sobre nuevo y limpio.

ANEXO 10: Marcaje con biotina por Random primer

1. Diluir el ADN a marcar en un volumen final (vf) de 24 μ l. Se inicia con 25 a 500 ng de ADN.
2. Denaturar el ADN mediante calentamiento en baño de María durante 5 min.
3. Colocar inmediatamente en hielo.
4. Agregar los siguientes reactivos del estuche comercial de marcaje (Gibco-BRL): 5 μ l de la solución de dNTPs 10 X y 20 μ l de la solución *Random primer* 2,5 X.
5. Mezclar muy bien.
6. Adicionar 1 μ l de la enzima, mezclar y dar un pulso en la microcentrífuga.
7. Incubar a 37°C por 1 h.
8. Agregar 5 μ l de solución de parada, mezclar y guardar a -20°C hasta su utilización.

ANEXO 11: Prueba de la Sonda

1. Diluir la sonda purificada en TBS-T a partir de una dilución 1/10 (1 μ l de sonda y 9 μ l de TBS-T) hasta 1/10.000.
2. Marcar los pozos a utilizar sobre una membrana de *nylon* tomando como guía una placa de ELISA, presionando suavemente sobre los pozos.
3. Sembrar en cada pozo 5 μ l de la dilución correspondiente, sembrando cada muestra por duplicado y en dos pozos, adicionar TBS-T como control negativo.
4. Dejar secar la membrana para luego fijar el ADN a la misma con luz UV durante 5 min.
5. Bloquear los sitios de la membrana libres de ADN con leche descremada al 5% por 30 min a TA.
6. Adicionar el conjugado de estreptavidina unido a fosfatasa alcalina, diluido en TBS-T e incubar por 30 min a TA con agitación suave.
7. Retirar el conjugado y hacer tres lavados con TBS-T de 10 min cada uno a TA y con agitación suave.
8. Finalmente, adicionar amortiguador final de lavado (Tris-MgCl₂, pH 9,0) e incubar a TA durante 10 min con agitación suave.
9. Adicionar la solución de revelado e incubar a TA durante 30 min en oscuridad, con agitación suave.

10. Lavar el filtro con agua destilada, secarlo sobre un papel absorbente y mantenerlo completamente seco y protegido de la luz para evitar que se pierda la señal.

ANEXO 12: Hibridación

1. Colocar el filtro en una caja a la medida con el ADN mirando hacia arriba.
2. Agregar la solución de prehibridación (solución 1) precalentada a 42°C, de tal manera que quede cubierto el filtro (aproximadamente 150 µl/cm²).
3. Incubar con agitación a 42°C durante 1 a 4 h.
4. Descartar la solución de prehibridación y adicionar la solución de hibridación precalentada a 42°C (aproximadamente 150 µl/cm²). Incubar con agitación a 42°C durante 24 a 48 h.
5. Retirar cuidadosamente el filtro y proceder a lavarlo para retirar el exceso de sonda no unida. Guardar la sonda a 0°C (puede ser reutilizada hasta 3 veces).
6. Lavar la membrana 1 vez con SSC 2X -SDS 0,5 % a TA durante 5 min, con agitación suave (aproximadamente 150 µl/cm²).
7. Lavar 15 min con SSC 1X, SDS 0,5 % a 42°C con agitación suave.
8. Lavar 15 min con SSC 0,5X, SDS 0,5% a 42°C-65°C, con agitación suave.
9. Lavar 15 min con SSC 0,1X, SDS 0,1 % a 65°C, con agitación suave.
10. Enjuagar con SSC y guardar a TA hasta su revelado.

ANEXO 13: PROTOCOLO PARA ANÁLISIS DE COLONIAS BLANCAS POR PCR

1. Tomar una colonia blanca y homogenizarla en 500 µl de agua destilada o agua miliQ.
2. Tomar de la solución anterior 150 µl y adicionarlos a 500 µl de LB-Ampicilina e incubar a 37°C por 3h.
3. Por otra parte, tomar 2 µl de la muestra del paso 1 para realizar la PCR.
4. La colonia que de cómo resultado positivo en la PCR, tomar el eppendorf que ese estaba incubando en el paso 2 y colocarlo en 5 ml de LB-Ampicilina, incubar a 37°C durante toda la noche.
5. Realizar la Miniprep de la colonia y confirmar nuevamente por PCR.