



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD. SEDE ARAGUA
AREA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS (BIOMED) “DR. FRANCISCO
J. TRIANA ALONSO”
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMEDICAS
MENCIÓN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DEL GEN CODIFICANTE DE LA PROTEÍNA DE
CHOQUE TÉRMICO Hsp85 DE *Trypanosoma cruzi*

Autor: Lcda. Ana Carolina Fernández Camacaro

Tutoras: Ph.D. Ana Rita de Lima

Ph. D. Elizabeth Ferrer

Maracay, 26 de Octubre de 2017



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD. SEDE ARAGUA
AREA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS (BIOMED) “DR. FRANCISCO
J. TRIANA ALONSO”
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMEDICAS
MENCIÓN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DEL GEN CODIFICANTE DE LA PROTEÍNA DE
CHOQUE TÉRMICO Hsp85 DE *Trypanosoma cruzi*

Autor: Lcda. *Ana Carolina Fernández Camacaro*

Trabajo presentado ante el Área de Estudios de Postgrado de la Universidad de Carabobo, para optar al título de Magíster en Ciencias Biomédicas, Mención Bioquímica y Biología Molecular.

Maracay, 26 de Octubre de 2017



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD. SEDE ARAGUA
AREA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS (BIOMED) “DR. FRANCISCO
J. TRIANA ALONSO”
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMEDICAS
MENCIÓN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



CLONACIÓN DEL GEN CODIFICANTE DE LA PROTEÍNA DE CHOQUE
TÉRMICO Hsp85 DE *Trypanosomacruzi*

Aprobado en el Área de Estudios de Postgrado de la Universidad de Carabobo por Miembros
de la Comisión Coordinadora del Programa:

_____ (Nombre, Apellido y Firma)

_____ (Nombre, Apellido y Firma)

_____ (Nombre, Apellido y Firma)

Maracay, Octubre de 2017



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD. SEDE ARAGUA
AREA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS (BIOMED) “DR. FRANCISCO
J. TRIANA ALONSO”**
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
MENCIÓN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

VEREDICTO

Nosotros, Miembros del Jurado designado para la evaluación del Trabajo de Grado Titulado:
“Clonación del gen codificante de la proteína de choque térmico Hsp85 de *Trypanosoma
cruzi*” presentado por: Lcda. Ana Carolina Fernandez Camacaro, para optar al Título de
Magister en Bioquímica y Biología Molecular, estimamos que el mismo reúne los requisitos
para ser considerado como: _____

Nombre, Apellido, C.I., Firma del Jurado:

Maracay 26 de Octubre de 2017

Dedicatoria

A todos los que creen en sus sueños.

Agradecimientos

A Dios por darme la fortaleza para seguir siempre hacia adelante.

Muy especialmente a mis queridas tutoras Ana Rita De Lima y Elizabeth Ferrer, por toda la orientación, dedicación, apoyo y cariño brindado durante la realización de este trabajo.

A mis padres por estar siempre allí brindándome todo el apoyo y amor, y por haberme proporcionado la mejor educación y lecciones de vida.

A Juan José Marquez por todo el apoyo incondicional y soporte que me ha brindado.

Al personal del Instituto BIOMED: Sra. María, Sr. José, “Cacique”, Emily, Jesús por la colaboración desinteresada prestada durante el desarrollo de este trabajo.

Al personal del Instituto BIOMOLP: Amanda De Lima, Diana Graterol, Oriana Mundaray, Jenny Mejías y Dairy Martínez por toda la ayuda y servicios prestados durante mi estancia en el Laboratorio.

A mis queridas compañeras de trabajo: Mailin Marvez, Patricia Oria y Johan Bell-Smythe por sus palabras de aliento.

A todas las personas que siempre me alentaron a no perder la fe y la confianza en mí misma.

Financiamiento Proyecto en red N° 2008000911-6, Misión Ciencia; FONACIT – 2011000470; Ayuda menor CDCH-012-2013, Proyecto CDCH-2014-003.

Este trabajo fue realizado en la Sección de Parasitología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Francisco J. Triana Alonso” (BIOMED) de la Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo Sede Aragua y en el Laboratorio de Protozoología del Instituto de Biología Molecular de Parásitos (BioMolP), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. Financiado por los Proyectos:

- Proyectos en Red N° 2007001442, Misión Ciencia, Ministerio de Ciencia y Tecnología FONACIT Misión Ciencia, Ministerio de Ciencia y Tecnología FONACIT.
- Proyectos en Red N° 2008000911-6, Misión Ciencia, Ministerio de Ciencia y Tecnología FONACIT Misión Ciencia, Ministerio de Ciencia y Tecnología FONACIT.
- Proyecto Estratégico en Red MPPS, UCV-UC-UDO FONACIT N° 2011000470. Ministerio de Ciencia y Tecnología FONACIT.
- Proyecto del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo, CDCH-UC-2014-003.
- Ayuda menor del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo, CDCH-012-2013.

ÍNDICE

	Página
CAPÍTULO I	
1.1 Introducción	1
1.2 Objetivos de la investigación	3
1.2.1 Objetivo general	3
1.2.2 Objetivos específicos	3
CAPÍTULO II	
2 Bases Teóricas	4
2.1 Aspectos generales de <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
2.1.1 Ubicación taxonómica	4
2.1.2 Morfología de los estadios de diferenciación de <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
2.1.3 Ciclo de vida	6
2.1.4 Situaciones de estrés durante el ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	8
2.1.5 Enfermedad de Chagas	9
2.1.5.1 Patología y sintomatología	9
2.1.5.2 Epidemiología y medidas de control	10
2.2 Proteínas de choque térmico	12
2.2.1 Definición y funciones de proteínas de choque térmico	12
2.2.2 HSP90 en células eucariotas y regulación de su expresión	15
2.2.3 Estructura y mecanismo de acción de la HSP90	19
2.2.4 Participación de la HSP90 en la vía de transducción de señales	23
2.2.5 Homólogos de HSP90 en tripanosomatídeos	24
2.2.5.1 Organización genómica	24
2.2.5.2 Regulación y expresión y diferencial de los homólogos de HSP90	25
CAPÍTULO III	
3 Materiales y métodos	29
3.1 Material biológico	29
3.1.1 Material parasitario	29
3.1.2 Vectores de clonación (Plásmidos)	29
3.1.3 Cepas bacterianas	30
3.1.4. Suero de conejo inmune	30
3.2 Medios de cultivo y soluciones	31

3.2.1 Medios de cultivo	31
3.2.2 Soluciones y tampones	31
3.3 Métodos	32
3.3.1 Obtención de masas de parásitos	32
3.3.2 Técnicas de análisis de ácidos nucleicos	33
3.3.2.1 Extracción de ácido ribonucleico (ARN)	33
3.3.2.2 Obtención de ADN complementario por RT-PCR	33
3.3.2.3 Electroforesis de ARN y ADN en geles de agarosa	34
3.3.2.4 Medida de la concentración y pureza del ADN y ARN	35
3.3.2.5 Purificación de las bandas de ADN en gel de agarosa	35
3.3.3 Técnicas de manipulación de sistema de clonación	35
3.3.3.1 Crecimiento y mantenimiento de bacterias	35
3.3.3.2 Preparación de células competentes	36
3.3.3.3 Clonación en el vector de mantenimiento	36
3.3.3.4 Transformación de células competentes	36
3.3.3.5 Verificación de la clonación	37
3.3.3.6 Extracción de ADN plasmídico	38
3.3.4. Subclonación en vectores de expresión	38
3.3.4.1 Digestión enzimática	38
3.3.4.2 Desfosforilación de vectores de expresión	39
3.3.4.3 Reacción de ligación	39
3.3.5 Inducción y expresión de Hsp85 en sistema procariota	40
3.3.6 Purificación de la proteína de fusión mediante cromatografía de Afinidad	40
3.3.7 Determinación de la concentración proteica	40
3.3.8 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)	41
3.3.9 Transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa y revelado inmunoenzimático (“ <i>Western blot</i> ”)	41
CAPÍTULO IV	
4 Resultados	43
4.1 Extracción del ARN de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	43
4.2 Obtención del ADN complementario codificante de Hsp85 mediante	44

RT-PCR	
4.3 Clonación del ADNc de <i>hsp85</i> en el vector de mantenimiento	45
4.4 Subclonación del ADNc de <i>hsp85</i> en diferentes sistemas de expresión pREST, pCITE, pTrcHis2, pGEX4T.	45
4.5 Subclonación del ADNc de <i>hsp85</i> en el vector de expresión pQE30	49
4.6 Subclonación del ADNc de <i>hsp85</i> “a ciegas” en pQE30	52
4.7 Expresión del gen codificante Hsp85 de <i>T. cruzi</i> en células <i>Escherichia Coli</i>	53
4.8 Purificación e identificación de la proteína recombinante Hsp85	54
CAPÍTULO V	
5.1 Discusión	58
5.2 Conclusiones	64
BIBLIOGRAFÍA	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Contenido	Página
1	Características morfológicas y propiedades biológicas de los diferentes estadios de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	5
2	Ciclo biológico de <i>T. cruzi</i> .	8
3	Mapa de Transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas 2014.	11
4	Características generales estructurales y regulatorias de los factores de choque térmico (HSFs).	17
5	Regulación de la respuesta de choque térmico y el ciclo HSF.	18
6	Representación esquemática y lineal de la estructura y dominios de enlace de las cochaperonas para HSP90 α humana.	20
7	Ciclo ATPasa de enlace al substrato de la HSP90.	22
8	ARN de <i>T. cruzi</i> extraído de masas de epimastigotas en gel de agarosa al 1,2% con bromuro de etidio (0,5 μ g/mL).	44
9	ADN complementario de <i>T. cruzi</i> en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (0,5 μ g/mL).	44
10	ADN plasmídico pGETM®T- <i>Easy-hsp85</i> y diferentes vectores de expresión en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (0,5 μ g/mL).	46
11	ADN plasmídico pGETM®T- <i>Easy-hsp85</i> y vector de expresión pGEX4-T en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (0,5 μ g/mL).	46
12	ADN plasmídico digerido con <i>EcoRI</i> en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (0,5 μ g/mL).	47
13	ADN plasmídico pGEM®T- <i>Easy-hsp85</i> en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (0,5 μ g/mL).	48
14	Productos de PCR Hsp85 en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (0,5 μ g/mL).	49
15	ADN plasmídico pGEM®T- <i>Easy-hsp85</i> y sus productos de PCR en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (0,5 μ g/mL).	50
16	HSP85 purificado y digerido con <i>BamHI</i> y <i>KpnI</i> en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (0,5 μ g/mL).	50

17	ADN plasmídico de las colonias obtenidas, digerido con <i>Bam</i> HI y <i>Kpn</i> I y sin digerir, en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (0,5µg/mL).	51
18	ADNc de <i>T. cruzi</i> con dianas para <i>Bam</i> HI y <i>Kpn</i> I en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (0,5µg/mL).	52
19	Inducción de la expresión del gen codificante de la proteína recombinante Hsp85 de <i>T. cruzi</i> en gel de policrilamida (SDS-PAGE 10%).	54
20	Purificación de la proteína recombinante Hsp85 de <i>T. cruzi</i> en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%).	55
21	Electroforesis (SDS-PAGE 10%) de las fracciones obtenidas de la purificación de la proteína recombinante HSP85 de <i>T. cruzi</i> teñido con Plata.	56
22	Inmunodetección de la proteína recombinante Hsp85 de <i>T. cruzi</i> en las fracciones obtenidas de la purificación.	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Contenido	Página
1	Cebadores empleados para la amplificación del gen <i>hsp85</i> de <i>T. cruzi</i> .	34
2	Programa de transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación del ADNc de Hsp85.	34
3	Cebadores empleados para la verificación de los insertos clonados celularmente.	37
4	Programa de amplificación de la PCR de colonias.	37
5	Cebadores empleados para la amplificación del inserto y que contienen las dianas para las enzimas de restricción <i>Bam</i> HI y <i>Kpn</i> I.	39
6	Densidades ópticas y concentraciones de muestras de ARN extraídas con diferentes estuches comerciales.	43
7	Número de colonias que crecieron en agar LB/ampicilina, después de la transformación de las células de <i>E. coli</i> con las construcciones en pGEM®T <i>Easy</i> .	45
8	Número de colonias que crecieron en agar LB/ampicilina, después de la transformación de las células de <i>E. coli</i> con las construcciones en los diferentes de vectores de expresión.	47
9	Número de colonias que crecieron en agar LB/ampicilina, después de la transformación de las células de <i>E. coli</i> con la mezcla de ligación pQE30- <i>hsp85</i> .	51
10	Número de colonias que crecieron en agar LB/ampicilina, después de la transformación de las células de <i>E. coli</i> con la mezcla de ligación pQE30- <i>hsp85</i> .	53
11	Número de colonias que crecieron en agar LB/ampicilina, después de la transformación de las células de <i>E. coli</i> con el ADN plásmidico purificado pQE30- <i>hsp85</i> (Subclonación en “ciego”).	53
12	Determinación de la concentración proteica de las fracciones de elución obtenidas de la purificación de HSP85 mediante cromatografía de afinidad.	55

RESUMEN

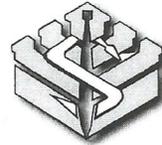
Trypanosoma cruzi, agente causal de la enfermedad de Chagas, es un parásito que presenta alternancia morfológica entre un hospedador invertebrado (triatomino) y vertebrado (mamífero). Se ha implicado la participación de las proteínas de choque térmico en los cambios morfológicos y funcionales durante situaciones de estrés en células eucariotas superiores. En particular las proteínas de choque térmico de 90 kDa (HSP90) se encuentran involucradas en numerosos procesos intracelulares en células eucarióticas. Estudios realizados recientemente han demostrado que en *T. cruzi* la Hsp85 (homóloga de HSP90) es esencial para la división celular y en control de la respuesta al estrés térmico. En el presente trabajo se logró clonar y expresar por primera vez el gen codificante de la proteína de choque térmico Hsp85 de *T. cruzi*. Se realizó la extracción de ARN de *T. cruzi*, a partir de masas de epimastigotas mediante el empleo de dos estuches comerciales: TRI[®]Reagent Sigma y *Viral NucleicAcid Extraction Kit* (FavorPrep[™]). Los resultados indicaron que el estuche comercial FavorPrep[™] permitió la obtención de ARN con mayor grado de pureza. Se obtuvo el ADNc codificante de la Hsp85, a partir del ARNm extraído, para ello se diseñaron los cebadores con base en la secuencia de *hsp85* de *T. cruzi* cepa CL Brener de 2115 pb (*T. cruzi strain CL Brener heat shock protein 85*) obtenida del GenBank (N° acceso XM_809799). Se obtuvo la amplificación de una banda con un tamaño aproximado de 2150 pb mediante RT-PCR. Se realizó la clonación en el vector de mantenimiento pGEM[®]T-*Easy*. Se subclonó en varios vectores de expresión, pRSET, pCITE, pTrcHis2 y pGEX4T los cuales no mantuvieron el ADNc *hsp85* de *T. cruzi*, quizás por ser sistemas complejos que puede hacer a la construcción plásmido-*hsp85* inestable para la célula bacteriana. Se realizó la estrategia de subclonación “en ciego” sin verificación, lo cual permitió obtener colonias recombinantes con el vector de expresión pQE30. Posterior a 3 horas de inducción con IPTG se obtuvo una proteína recombinante con un peso molecular (PM) aproximado de 82 kDa (PM esperado para la secuencia clonada), también se observaron otras dos bandas de menor tamaño, que pudiesen ser la misma molécula, pero truncada por degradación por parte de la célula bacteriana. Se purificó la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad, obteniendo bajo rendimiento. Sin embargo, la reacción de *immunoblotting* con el suero hiperinmune anti-epimastigota de *T. cruzi* permitió la identificación de una sola banda con un PM aproximado de 82 kDa, indicando en este caso una reacción específica con la proteína recombinante obtenida durante el presente trabajo.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi, causal agent of Chagas' disease, is a parasite that presents morphological alternation between an invertebrate (triatomino) and vertebrate (mammal) host. The involvement of heat shock proteins in morphological and functional changes during stress situations in eukaryotic cells has been implicated. In particular, 90 kDa heat shock proteins (HSP90) are involved in numerous intracellular processes in eukaryotic cells. Recent studies have shown that in *T. cruzi* Hsp85 (homolog of HSP90) is essential for cell division and control of the response to thermal stress. In the present work it was possible to clone and express for the first time the coding gene of the heat shock protein Hsp85 of *T. cruzi*. *T. cruzi* RNA extraction was performed from epimastigotes using two commercial kits: TRI® Reagent Sigma and Viral Nucleic Acid Extraction Kit 1 (FavorPrep™). The results indicated that the commercial FavorPrep™ kit allowed obtaining RNA with a higher degree of purity. The cDNA encoding Hsp85 was obtained from the extracted mRNA, for which the primers were designed based on the *hsp85* sequence of *T. cruzi* strain CL Brener of 2115 bp (*T. cruzi* strain CL Brener heat shock protein 85) obtained of GenBank (accession number XM_809799). Amplification of a band with an approximate size of 2150 bp was obtained by RT-PCR. Cloning was performed on the maintenance vector pGEM®T-Easy. It was subcloned into several expression vectors, pRSET, pCITE, pTrcHis2 and pGEX4T which did not allow keep *T. cruzi hsp85* cDNA, perhaps because they are complex systems that can make the plasmid-*hsp85* construct unstable for the bacterial cell. A "blind" subcloning strategy was performed without verification, which allowed to obtain recombinant colonies with the expression vector pQE30. After 3 hours of induction with IPTG a recombinant protein with an approximate weight of 82 kDa (expected PM for the cloned sequence) was obtained, also two other bands of smaller size were observed, that could be the same molecule, but truncated by degradation by the bacteria. The recombinant protein was purified by affinity chromatography, obtaining poor yield. However, the immunoblotting reaction with the hyperimmune anti-*T. cruzi* epimastigote serum allowed the identification of a single band with a molecular weight of approximately 82 kDa, indicating in this case a specific reaction with the recombinant protein obtained during the present work.



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DIRECCIÓN DE ASUNTOS ESTUDIANTILES
SEDE ARAGUA



ACTA DE DISCUSIÓN
TRABAJO DE GRADO

En atención a lo dispuesto en los Artículos 127, 128, 137, 138 y 139 del Reglamento de Estudios de Postgrado de la Universidad de Carabobo, quienes suscribimos como Jurado designado por el Consejo de Postgrado de la Facultad de Ciencias de la Salud, de acuerdo a lo previsto en el Artículo 29 literal "N" del citado Reglamento, para estudiar el Trabajo de Maestría titulado:

***"CLONACIÓN DEL GEN CODIFICANTE DE LA PROTEÍNA DE CHOQUE
TÉRMICO Hsp85 de Trypanosoma cruzi"***

Presentado para optar al grado de **MAGISTER EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
MENCIÓN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR** por la aspirante:

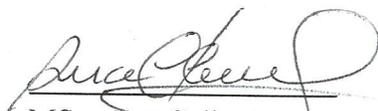
ANA CAROLINA FERNÁNDEZ CAMACARO
C.I. 17.620.712

Tutoras del Trabajo de Grado: Dra. Ana Rita De Lima C.I. 7.093.018
Dra. Elizabeth Ferrer C.I. 7.101.850

Habiendo examinado el Trabajo de Maestría presentado, decidimos que el mismo está

APROBADO

En Maracay, a los veintiséis días del mes de Octubre del año dos mil diecisiete.


MSc. Ana Celia Ferreras
C.I. 7.284.330


Dra. Ana Rita De Lima
C.I. 7.093.018


Dr. Víctor Contreras
C.I. 4.323.708

CAPITULO I

1.1 INTRODUCCIÓN

Trypanosoma cruzi, agente causal de la enfermedad de Chagas es un parásito digenético perteneciente a la familia *Trypanosomatidae* caracterizado por cumplir su ciclo vital en dos hospedadores: un invertebrado conocido como triatomino o “chipo” y un hospedador vertebrado representado por mamíferos incluyendo al hombre. Reportándose dos procesos de diferenciación en el huésped invertebrado (epimastigogénesis y metaciclogénesis), y dos en el vertebrado (amastigogénesis y tripomastigogénesis). Los cambios de morfología derivados de los procesos de diferenciación del parásito están asociados a cambios de microambiente que representan estrés para el parásito (Pan, 1978; Ucros y col., 1983; Deane y col., 1984; Adroher y col., 1988; Homsy y col., 1989; Krassner y col., 1990a y 1990b; Fraidenaich y col., 1993).

Actualmente es posible simular en el laboratorio, en condiciones axénicas, la mayoría de los procesos de diferenciación de *T. cruzi* que ocurren en la naturaleza. Esto ha permitido conocer algunos factores de estrés que disparan los procesos de diferenciación. En el invertebrado, el caso de la metaciclogénesis se produce debido a la escasez nutricional y al aumento de la temperatura (Contreras y col., 1985a). De igual forma ocurre en la epimastigogénesis, el proceso sobreviene por la caída de la temperatura desde 37 °C en el mamífero hasta la temperatura ambiente del insecto vector (Zaidenberg y col., 1995; De Lima y col., 2007; Barrios y col., 2008, Bern, 2015). A nivel del vertebrado, la amastigogénesis secundaria, se debe a la acidificación del medio (Kambara y col., 1990; Tomlinson y col., 1995; Navarro y col., 2003), mientras que en la amastigogénesis primaria, se da por el incremento de la temperatura desde 27 a 37°C en el paso del vector al vertebrado representando estos factores desencadenantes de estrés (Contreras y col., 1996, 2002b).

Para asegurar su viabilidad en la naturaleza, estos parásitos disponen de una serie de mecanismos que les permiten enfrentar estas condiciones adversas y permitir su transformación a un nuevo estadio con competencias que aseguren su sobrevivencia. Entre estos mecanismos de defensa se ha demostrado la expresión de proteínas de choque térmico (*Heat shock proteins* ó HSP, también denominadas proteínas de estrés).

Las proteínas de choque térmico han sido estudiadas en diferentes organismos demostrando su similitud en cuanto a función, estructura y propiedades. Se clasifican de

acuerdo a su peso molecular en proteínas de alto y bajo peso molecular (Hyunseok, 2016). Participan en procesos de plegamiento de proteínas y señalización celular, también juegan un papel importante en la respuesta inmune del hospedador y han sido identificadas como antígenos dominantes en enfermedades causadas por bacterias, protozoarios y helmintos (Markell y Voge, 1981; Young, 1990, De Andrade y col., 1992, Udon, 2012).

En particular, la HSP90 está implicada en la recuperación de proteínas mal plegadas, maduración y transporte intracelular de proteínas quinasas involucradas en el control de la traducción de proteínas y señalización celular, regulación de la actividad de receptores de hormonas nucleares y otros factores de transcripción (Jhonson, 2012). Por lo cual está involucrada en los cambios en las propiedades morfológicas y funcionales que ocurren durante ciertas etapas del desarrollo celular. La inhibición de HSP90 afecta múltiples etapas de la cascada de señales mitogénicas (Fisher y col., 2000), progresión del ciclo celular y la función del centrosoma durante la mitosis (Lange y col., 2000).

Existen evidencias en la bibliografía que indican que en *T. cruzi*, las Hsp se expresan constitutivamente y son inducidas por diferentes tipos de estrés (Martín y col., 1993). La inhibición de la Hsp85 de *T. cruzi* produce arresto en la proliferación, demostrando así la importancia en el control del ciclo celular (Graeffe y col., 2002). Vale destacar que varios genes que codifican proteínas Hsp hayan sido aislados por inmuno-selección (*immunoscreening*) de librerías de expresión de *T. cruzi* usando suero de pacientes chagásicos (Dragon y col., 1987; Kirchhoff y col., 1988; Engman y col., 1989).

A pesar de que se ha demostrado la sobreexpresión y sugerido la participación de la Hsp85 en los procesos de diferenciación de *T. cruzi*, hasta la fecha no se había reportado la clonación de esta molécula tan importante para el parásito y sólo se disponía de las proteínas recombinantes Hsp83 de *Leishmania chagasi* (Streit y col., 1996), Hsp83 de *L. donovani* (Ommen y col., 2010) y Hsp83 de *L. braziliensis* (Silva y col., 2013).

En el presente trabajo se logró la clonación del gen y la obtención de la proteína recombinante Hsp85 de *T. cruzi* (homólogo a HSP90 de mamíferos), la cual contribuirá a entender los procesos de adaptación del parásito a los diferentes microambientes a los cuales está expuesto durante su ciclo vital y esto puede llevar a la identificación de nuevos blancos terapéuticos o de proteínas de ese grupo que jueguen un papel inmunológico importante en la interacción parásito-hospedador en la enfermedad de Chagas.

1.2 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.2.1 Objetivo general

Clonar y expresar el gen codificante de la proteína Hsp85 de *Trypanosoma cruzi*.

1.2.2 Objetivos específicos

- 1.- Obtener el ARN de epimastigotes de *T. cruzi* cultivados en medio LIT.
- 2.- Obtener el ADN complementario (ADNc) codificante de Hsp85 mediante RT-PCR.
- 3.- Efectuar la clonación del ADNc de Hsp85 en el vector pGEM®-T-*Easy*.
- 4.- Realizar la subclonación del ADNc de Hsp85 en diferentes sistemas de expresión.
- 5.- Optimizar las condiciones para la expresión del ADNc de Hsp85 en células *Escherichia coli*.
- 6.- Optimizar las condiciones para la purificación e identificación de la proteína recombinante Hsp85 de *T. cruzi*.

CAPITULO II

2. BASES TEÓRICAS

2.1 Aspectos generales de *Trypanosoma cruzi*

2.1.1 Ubicación taxonómica

T. cruzi presenta la siguiente clasificación taxonómica:

Super-reino: *Eucariota*, Reino *Protistas*, Sub-reino *Protozoo*, Phylum *Sarcomastigophora*, Sub-phylum *Mastigophora*, Clase *Zoomastigophorea*, Orden *Kinetoplastida*, Sub-orden *Trypanosomatida*, Familia *Trypanosomatidae*, Género *Trypanosoma*, Sub-género *Schizotrypanum*, Especie *cruzi* (Cavalier-Smith, 1998).

T. cruzi pertenece a un taxón heterogéneo con múltiples hospedadores, vectores y rutas de infección y está actualmente clasificado en seis unidades discretas de tipificación (DTU, por sus siglas en inglés) TcI-VI, las cuales están diferentemente distribuidas en regiones endémicas y asociadas a los ciclos de transmisión y probablemente impacta diferentemente las manifestaciones clínicas y la severidad de la enfermedad (Zingales y col., 2012).

2.1.2 Morfología de los estadios de diferenciación de *Trypanosoma cruzi*

Las diferencias en cuanto a tamaño, forma y organización del parásito varían en función de la fase evolutiva (estadio) (Figura 1), el tipo de hospedador y las condiciones del medio en el que se encuentre (Vickerman, 1976).

Diversos estudios han demostrado que estos estadios pueden ser producidos en el laboratorio simulando *in vitro* las condiciones *in vivo* (Kimura, 1978). La producción masiva de estos estadios en condiciones semi-definidas y químicamente definidas permitieron estudiar los cambios proteicos, glicoproteicos y antigénicos que ocurren durante los eventos de diferenciación de epimastigotas en tripomastigotas metacíclicos (metaciclogénesis), de tripomastigotas sanguíneos en amastigotas (amastigogénesis secundaria) y de tripomastigotas metacíclicos en amastigotas (amastigogénesis primaria) (Contreras y col. 1985, Tomlinson y col., 1995, Contreras y col., 2002, Navarro y col., 2003).

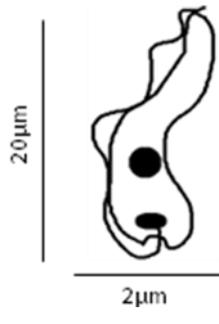
	Fase evolutiva ó Estadio	Epimastigota	Tripomastigotas (Metacíclicos/ Sanguícolas)	Amastigotas
Propiedades biológicas	Localización celular	Extracelular	Extracelular	Intracelular
	Capacidad replicativa	División Binaria	No posee	División Binaria
	Capacidad invasiva	Ausente	Presente	Ausente
	Sensibilidad a fagocitosis macrófaga	Sensible	Resistente	Resistente
	Sensibilidad a lisis mediada por complemento	Sensible	Resistente	Resistente
	Núcleo	Porción media del cuerpo	Pequeño en la porción media del cuerpo	Grande, redondo y excéntrico
	Citoplasma			Escaso
	Ubicación del cinetoplasto	Mitad anterior delante del núcleo	Posterior	Anterior
	Forma del cinetoplasto	Barra	Disco	Barra
	Dimensiones	20 - 30µm de longitud con 2µm de ancho	20µm de largo por 2µm de ancho.	2 - 4 µm de diámetro
Condiciones de vida	Hábitat	Invertebrado	Invertebrado (Metacíclico). Vertebrado (Sanguícola)	Vertebrado
	Temperatura	25°C	Metacíclico: 25°C Sanguícola: 37°C	37°C
	pH del medio	Ácido	Metacíclico: Ligeramente ácido Sanguícola: Ligeramente básico	Ligeramente básico
	Representación esquemática			

Figura 1: Características morfológicas y propiedades biológicas de los diferentes estadios de *Trypanosoma cruzi* (De Souza, 2002).

2.1.3 Ciclo de vida

En el ciclo de vida de *T. cruzi* se aprecian cuatro estadios con morfologías y propiedades biológicas diferentes: dos de estos estadios se localizan a 27°C en el hospedador invertebrados, el triatomino que pertenece a la familia de los *Reduviidae*, orden *Hemiptera* (Homez y col., 2004) y las otras dos en el hospedador vertebrado a 37°C (Figura 2).

En el hospedador invertebrado el ciclo ocurre a nivel del intestino posterior y está precedida de la adherencia de epimastigotas a la cutícula rectal, fundamentalmente a través del flagelo (Böker y Schaub, 1984). El ciclo se inicia cuando el insecto ingiere tripomastigotas sanguícolas presentes en la sangre periférica del vertebrado infectado (Figura 2, señalado con el número 5), y es posible que el desarrollo diferencial del parásito en las diferentes partes del tracto gastrointestinal esté afectado por la disponibilidad de nutrientes y/o acceso a diferentes propiedades de enlazamiento de las superficies (Kollien y col., 1998) lo que causa su transformación a epimastigotas, evento conocido como epimastigogénesis (Figura 2, señalado con el número 6).

Los epimastigotas representan la forma de división del parásito y se multiplican extracelularmente en el estómago del vector (Figura 2, señalado con el número 7), migran hacia la ampolla rectal y en un tiempo que oscila entre 8-15 días se transforman en tripomastigotas metacíclicos (Tyler y Engman, 2001), los cuales no se dividen, pero poseen capacidad invasiva. Estos últimos son excretados por las deposiciones fecales del insecto, y representan la forma infectante para el hospedador vertebrado (Figura 2, señalado con el número 8).

Cuando el insecto vector pica e ingiere sangre, a través de un mecanismo reflejo orina y defeca (Figura 2, señalado con el número 1), de modo que los tripomastigotas metacíclicos alcanzan el torrente sanguíneo del hospedador vertebrado a través del sitio de la picadura desencadenando la infestación parasitaria (Figura 2, señalado con el número 2) (Bern, 2015). Se han reportado casos de la ingesta de alimentos contaminados con las deposiciones del insecto, señalando que hay dos formas de infección del hospedador vertebrado por tripomastigotas metacíclicos (Rueda y col., 2014). En el torrente sanguíneo del hospedador vertebrado, invaden sus primeras células y se transforman en amastigotas (Figura 2, señalado con el número 3) (Ley y col., 1990). Este evento es reconocido como amastigogénesis primaria (Contreras y col., 2002).

Los amastigotas se multiplican por divisiones binarias sucesivas y en un período de aproximadamente cinco días, el citoplasma se llena de parásitos formando lo que se conoce como “nido” de amastigotas. A este nivel cesa el proceso de división y ocurre la diferenciación hacia tripomastigotas sanguícolas; al alcanzar este estadio, la motilidad de los parásitos contribuyen a la ruptura de la membrana plasmática de la célula huésped, conduciendo al estallido de la célula (Dvorak, 1975), donde son liberados al torrente sanguíneo y al poseer capacidad invasiva infectan nuevas células (Tyler y Engman, 2001). También se reporta que los parásitos pueden ser ingeridos por el hospedador vertebrado a través de un proceso referido como endocitosis directa del parásito (De Souza, 1984; Burleigh y Andrews, 1995) con la formación de vacuolas endocíticas, las cuales se fusionan con los lisosomas de las células del hospedador (Carvalho y De Sousa, 1989; Tardeieux y col., 1992). Luego de las dos horas posteriores a la infección, los tripomastigotas pueden dejar el ambiente ácido como un fagosoma antes de que su transformación a amastigotas este completada (Ley y col., 1990) y entra a un ambiente alcalino de el citoplasma, donde ellos se multiplican como amastigotas sin flagelo (Burleigh y Andrews, 1995), con la consecuente liberación de nuevos tripomastigotas sanguícolas (Figura 2, señalado con el número 4).

Existen diferencias morfológicas y moleculares entre los amastigotas derivados de tripomastigotas metacíclicos y de los sanguícolas, exponiendo la existencia de amastigotas primarios y secundarios, respectivamente (Navarro y col. 2003).

Por otra parte los tripomastigotas metacíclicos expresan en su superficie varias glicoproteínas que interactúan con las células de los mamíferos, los cuales no comparte con los tripomastigotas que se encuentran en la sangre (Mortara y col., 1992; Ruiz y col., 1993).

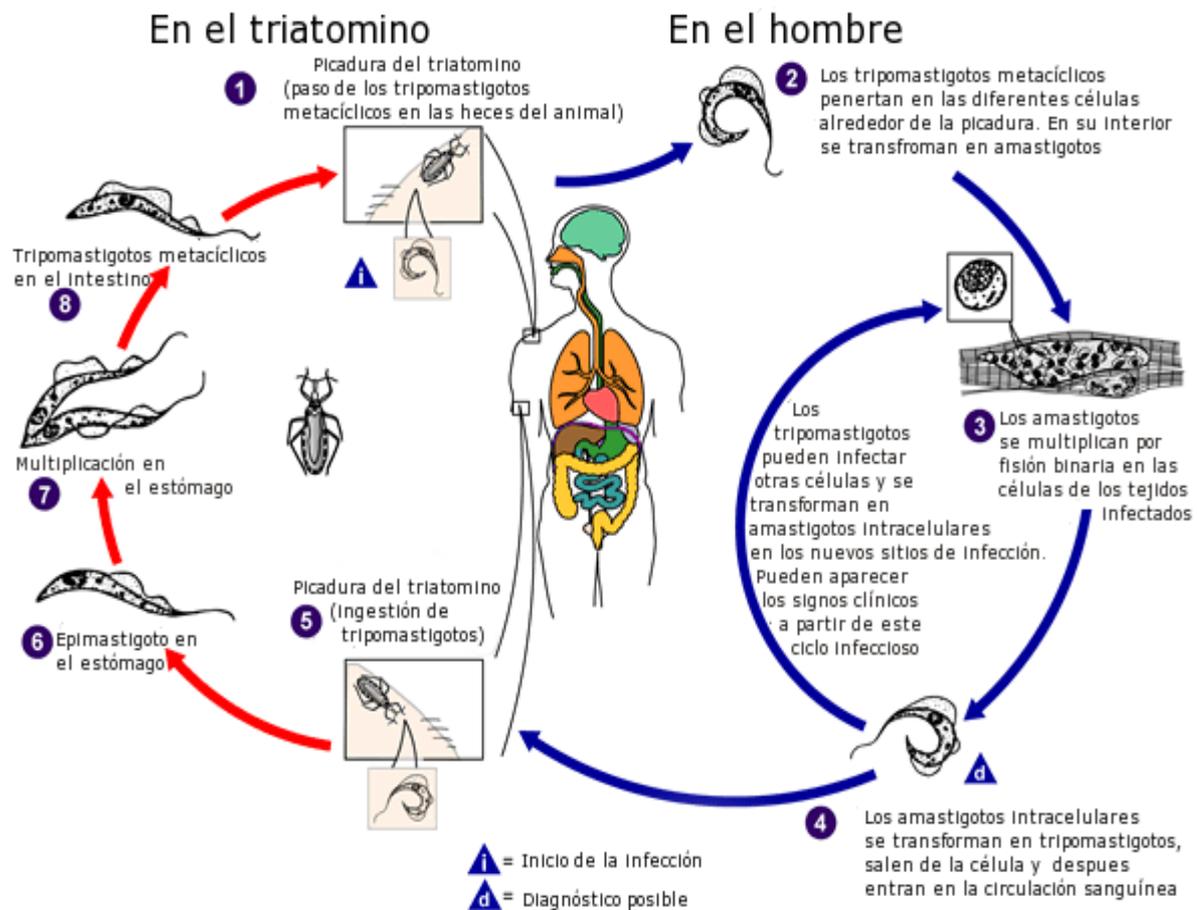


Figura 2. Ciclo biológico de *T. cruzi*. (Tomado de: http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/TrypanosomiasisAmerican_il.htm).

2.1.4. Situaciones de estrés durante el ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

Durante el ciclo de vida del parásito, cada una de las diferentes etapas de diferenciación requiere la superación de ambientes hostiles y está sometido a diferentes tipos de estrés (Requena y col., 1992). El parásito enfrenta diferentes valores de pH, temperatura, estrés oxidativo y disponibilidad de nutrientes, entre otros factores. Por lo tanto, *Trypanosoma cruzi* muestra una respuesta adaptativa (fisiológica, genética o epigenética) para contrarrestar estas condiciones de estrés.

El estadio epimastigota, localizado en el intestino del vector, se enfrenta a la presencia de la respuesta inmune del invertebrado y a una disminución de la temperatura de 37 a 28 ° C. Posteriormente a nivel de la ampolla rectal experimenta depleción de nutrientes que induce el

estrés. Este estrés nutricional en el vector inducirá diferentes etapas de desarrollo en el parásito; en particular, la falta de alimento inducirá la transformación del epimastigota en tripomastigota (Contreras y col., 1985, Kollien y Schaub, 1998). También dentro del intestino vector, el parásito se enfrenta con un pH variable de 5,7 a 8,9, dependiendo de la cantidad de alimento ingerido por el vector (Kollien y col., 2001). El estadio epimastigota también es sometido a un estrés oxidativo producido por los metabolitos de la hemoglobina ingerida por el vector durante sus comidas (Nogueira y col., 2015). Durante la multiplicación intracelular de amastigotas en el hospedador vertebrado, el parásito está localizado en un ambiente con pH ácido dentro de la vacuola parasitófora (Hall, 1993). Además, esta etapa intracelular tendrá que hacer frente al estrés oxidativo como resultado de los mecanismos inmunes de los macrófagos y otras células inmunitarias. El tripomastigota metacíclico, la forma infectante para los mamíferos, responde a la respuesta inmune del huésped y a un intervalo de temperatura de 36-38 ° C. El estrés oxidativo está presente en todas las etapas del ciclo de vida del parásito, ya que la respuesta inmune de los huéspedes vertebrados e invertebrados será el principal origen de este tipo de estrés. Los huéspedes mamíferos producen diferentes tipos de especies reactivas de oxígeno (ROS) como consecuencia de la activación de la enzima NADPH oxidasa dentro de los macrófagos activados. Durante la fagocitosis, esta enzima produce altas cantidades de radicales superóxido (O₂⁻), que se dismutan a H₂O₂ o reaccionan con óxido nítrico (NO) derivado de iNOS para producir peroxinitrito (ONOO⁻), una especie nitro reactiva (RNO), que es un oxidante fuerte y una potente molécula efectora citotóxica contra *T. cruzi*. Además, en presencia de iones metálicos, el H₂O₂ genera el radical hidroxilo (-OH) altamente reactivo (Piacenza y col., 2013).

2.1.5 Enfermedad de Chagas

2.1.5.1 Patología y sintomatología

La enfermedad de Chagas presenta dos fases bien diferenciadas. Al contraer la infección se presenta la fase aguda, en la cual circulan por el torrente sanguíneo una gran cantidad de parásitos. En la mayoría de los casos no hay síntomas o éstos son leves; un signo inicial característico puede ser una lesión cutánea con inflamación alrededor de sitio de inoculación o picadura del triatomino (chagoma de inoculación); también puede presentarse una hinchazón amoratada de un párpado (signo de Mazza Romanha). Además, pueden presentar fiebre, dolor de cabeza, agrandamiento de ganglios linfáticos, palidez, dolores musculares, dificultad para respirar, hinchazón y dolor abdominal o torácico.

Durante la fase crónica, los parásitos invaden principalmente el músculo cardíaco y digestivo, y por tanto se observan pocas formas parasitarias en frotis sanguíneos. Hasta un 30% de los pacientes sufren trastornos cardíacos y hasta un 10% presentan alteraciones digestivas (típicamente, agrandamiento del esófago o del colon), neurológicas o mixtas. Con el paso de los años, la infección puede causar muerte súbita o insuficiencia cardíaca por la destrucción progresiva del músculo cardíaco (Nunes y col., 2003).

En las personas con sistemas inmunitarios deprimidos (por ejemplo, debido al SIDA o a la quimioterapia), la enfermedad de Chagas puede reactivarse con los parásitos que se encuentran en el torrente sanguíneo. Esta situación puede potencialmente agravar la enfermedad.

2.1.5.2 Epidemiología y medidas de control

El hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* es el agente causal de la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas en honor al médico e investigador brasileño Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, que la descubrió en 1909, hoy en día es reconocida como una enfermedad potencialmente mortal.

Como se ha descrito previamente este parásito digénético y heteroxeno requiere de dos hospedadores para mantenerse en la naturaleza, siendo el vector de transmisión los insectos de la subfamilia *Triatominae* (Chinches, chipos, vichuncas) los cuales se distribuyen en el continente americano, con localización domiciliaria. Por lo general, éstos viven en las grietas y huecos de las paredes y los tejados de las casas mal construidas en las zonas rurales y suburbanas; suelen permanecer ocultos durante el día y por la noche entran en actividad alimentándose de sangre humana.

En la actualidad según el acta emitida en Marzo del 2016, la Organización Mundial de la Salud calcula que en el mundo hay entre 6 y 7 millones de personas infectadas por *T. cruzi* siendo la mayoría de América Latina mas no en las islas del Caribe. Sin embargo, existen datos que demuestran su propagación por otras regiones de América, como en los Estados Unidos, Canadá, muchos países europeos y algunos del Pacífico Occidental, esto debido a la movilidad de la población entre América Latina y el resto del mundo, colocando en riesgo a 28 millones de personas y posicionándola como una patología endémica en 21 países en todo América (OMS 2016).

géneros y especies circulantes en Venezuela: *Rhodnius prolixus*, *Triatoma. maculata* y *Panstrongylus geniculatus* (Homez y col., 2004).

Hoy en día se ha evidenciado la transmisión de la enfermedad no solo por la transmisión vectorial, sino a través de contaminación alimentaria, transfusiones de sangre, transmisión congénita (de la madre infectada a su hijo) y órganos donados, aunque estos modos de transmisión son menos frecuentes. Sin embargo, estas nuevas formas de transmisión afecta no solo a poblaciones rurales, sino que también representa un riesgo en las zonas urbanas. En Venezuela se ha reportado la aparición de 249 casos de transmisión oral de la enfermedad de Chagas entre los años 2007 y 2014 (Alarcón de Noya y col., 2015).

No hay vacuna contra la enfermedad de Chagas, siendo el método empleado para prevenir la enfermedad es el control vectorial; sin embargo, debido a la gran cantidad de personas infectadas por transfusiones sanguíneas, resalta la importancia de cribar la sangre del paciente donador, de esta forma se previene la infección por transfusión sanguínea y donación de órganos. Otra medida para controlar la transmisión es lograr que las personas infectadas y/o enfermas tengan acceso temprano a la asistencia sanitaria.

La Organización Mundial de la Salud recomienda el rociamiento de las casas y sus alrededores con insecticidas y mejora de las viviendas para prevenir la infestación por el vector. También sugiere medidas preventivas personales: empleo de mosquiteros, buenas prácticas higiénicas en la preparación, transporte, almacenamiento y consumo de los alimentos. Resalta la importancia del cribado de la sangre donada; pruebas de cribado en órganos, tejidos o células donados y en los receptores de estos; cribado de los recién nacidos y otros niños de las madres infectadas, para diagnosticar y tratar tempranamente el problema (OMS 2016).

2.2 Proteínas de choque térmico

2.2.1 Definición y funciones de proteínas de choque térmico

Las proteínas de choque térmico (*Heat shock proteins* ó HSP) constituyen una familia de polipéptidos ubicuos altamente conservados presentes en las células de todo organismo viviente, desde bacterias hasta mamíferos, incluyendo al hombre. Estos polipéptidos incrementan su expresión ante situaciones de estrés como aumento de temperatura, infecciones virales, presencia de radicales de oxígeno (H₂O₂), metales pesados, análogos de

aminoácidos o etanol. Muchos miembros de esta familia se expresan en forma constitutiva en condiciones basales dentro de la célula, ejerciendo una serie de funciones básicas como plegamiento de proteínas, así como su transporte a través de varios compartimientos celulares. Por tal motivo se les conoce como chaperonas moleculares (Hyunseok, 2016).

Las HSP se agrupan en siete clases: 1) chaperonas moleculares, que permiten que proteínas en estado de desnaturalización retornen a su conformación nativa; 2) componentes del sistema proteolítico, para la degradación de proteínas agregadas y/o irreversiblemente desnaturalizadas; 3) enzimas modificadoras de ácidos nucleicos (ADN y ARN), para la remoción de modificaciones inducidas por aumento de temperatura; 4) enzimas metabólicas, para reorganizar y estabilizar la disponibilidad de energía de la célula; 5) proteínas regulatorias, que inician o inhiben cascadas de señalización inducidas por stress; 6) proteínas estabilizadoras del citoesqueleto y 7) proteínas de transporte, enzimas detoxificantes y proteínas moduladoras de membrana que son requeridas para restaurar la estabilidad y función de la membrana (Ritcher y col., 2010). La mayoría de las Hsp corresponden a las chaperonas moleculares, las cuales se agrupan en familias en base a su peso molecular y a su vez se clasifican en dos grandes categorías: 1) Hsp de alto peso molecular: que abarca las familias HSP60, HSP70, HSP90 y HSP100 y 2) Proteínas de choque térmico de bajo peso molecular: que abarca polipéptidos cuyo peso oscila entre 15 y 40 Kilodaltons (kDa).

Las diferentes actividades y funciones biológicas involucran la participación de proteínas y complejos multiproteicos. Esto requiere que las proteínas sean capaces de plegarse en estructuras apropiadas y ensamblarse en complejos específicos para llevar a cabo su actividad. Este plegamiento adecuado de las proteínas se realiza a través de la participación de complejos proteicos denominados chaperonas moleculares y enzimas. Las principales familias de chaperonas son HSP70 (DnaK), HSP60 (chaperonina/GroEL/TCP1/TriC) y sus componentes asociados o cochaperonas (DnaJ, GroES, GrpE) (Georgopoulos y Welch, 1993). Se ha implicado la participación de HSP90 en el plegamiento de proteínas por un mecanismo diferente (Young y col., 1997). La actividad de las chaperonas se basa en su afinidad selectiva por proteínas que se hallan en condiciones no nativas, con exposición de secuencias de aminoácidos hidrofóbicos hacia el exterior. El enlace de las chaperonas moleculares a estos residuos impide la agregación intra e intermolecular de proteínas, evitando la formación de proteínas anómalas incapaces de cumplir su actividad biológica.

Los diferentes tipos de chaperonas varían en cuanto a la especificidad del sustrato y su función celular. HSP70 reconoce en forma preferencial conformaciones extendidas y actúa previamente a la HSP60 en el plegamiento de proteínas. Durante la traducción del ARNm, los polipéptidos nacientes interactúan con diferentes chaperonas moleculares presentes en el retículo endoplásmico para un adecuado plegamiento durante las diferentes secuencias de su biogénesis (Melnik y col., 1994).

Las chaperonas trabajan en conjunto con ciertas enzimas que catalizan cambios conformacionales que de no ocurrir representan obstáculos para el plegamiento adecuado de péptidos. Estos cambios conformacionales son la formación de puentes disulfuro, llevado a cabo por la proteína disulfuro isomerasa y la *cis-trans* isomerización del esqueleto proteico alrededor del enlace polipeptídico adyacente a los residuos prolina. Esta actividad es desarrollada por la peptidil *cis-trans* isomerasa (Stamnes y col., 1991).

Además de su participación en el plegamiento de proteínas, las chaperonas moleculares promueven asociaciones transitorias con sus sustratos. Estas asociaciones estables permiten que la proteína enlazada permanezca en una conformación competente para su ensamblaje con subunidades adicionales. Esto permite un papel muy particular de las chaperonas en el ensamblaje de grandes complejos proteicos. Entre las chaperonas que participan en este proceso destaca la HSP90, en la cual muchos de sus sustratos son moléculas de señalización, entre ellas: receptores de hormonas nucleares, factores de transcripción, proteínas quinasas, ciclinas, entre otros. Una característica de estas moléculas de señalización es su inestabilidad conformacional y la necesidad de una estructura adecuada para actuar como un “*switch*” o “intercambiador” molecular. En este sentido, HSP90 mantiene estas moléculas en una conformación inactiva mediante ciclos repetidos de enlace y liberación, hasta que la molécula sea estabilizada ante la presencia del estímulo adecuado (Rutherford y Zuker, 1994; Chiosis y col., 2004).

Cuando las células son expuestas a condiciones de estrés, como por ejemplo un incremento de temperatura, ocurre desestabilización de las estructuras terciaria y cuaternaria de las proteínas, conduciendo a la exposición de residuos hidrofóbicos altamente interactivos y susceptibles de agregación molecular. Por otra parte, ocurren alteraciones en el procesamiento de los precursores de los ARN mensajeros (mRNA *splicing*) sin afectar la transcripción del ADN, ni el proceso de traducción. Esto permite que los precursores de ARNm que contienen regiones no codificantes (intrones) sean transportados al citoplasma y

traducidos, con la consecuente producción de proteínas anormales (Yost y Lindquist, 1988) que incrementan la posibilidad de agregación intracelular. Ante estas condiciones, la célula aumenta la expresión de ciertas isoformas de chaperonas moleculares, conocidas como proteínas de choque térmico ó HSP, entre ellas HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 y las HSP de bajo peso molecular (Parsell y Lindquist, 1993; Morimoto, 1998).

En particular, HSP90 está involucrada en los cambios morfológicos y funcionales que ocurren durante ciertas etapas del desarrollo celular. La inhibición de HSP90 afecta múltiples etapas de la cascada de señales mitogénicas (Fisher y col., 2000), progresión del ciclo celular y la función del centrosoma durante la mitosis (Lange y col., 2000). Esto podría explicar el incremento de la HSP90 durante ciertas etapas del desarrollo celular como la embriogénesis (Bensaude y col., 1983), eritropoyesis y esporulación de levaduras (Picard, 2002), los cuales constituyen modelos de diferenciación celular terminal (Ferrari y col., 1992). No obstante, existen células que se caracterizan por presentar alternancia cíclica, donde el proceso de diferenciación no culmina y es constante. Generalmente en este caso estas transiciones están asociadas a situaciones de estrés como cambio de temperatura, depleción de nutrientes, cambio de pH y en donde es lógico pensar que las Hsp cumplen un papel fundamental. Entre las células que cumplen estos parámetros destacan los parásitos conocidos como tripanosomatídeos.

2.2.2 HSP90 en células eucariotas y regulación de su expresión

La familia de las HSP90 agrupa varios miembros, entre los cuales se encuentran la HSP90 citosólica en células eucarióticas superiores (que en humanos agrupa dos isoformas designadas como α y β), HSP86 y HSP84 (en ratones), Hsp83 en *Drosophila*, Hsc82 y Hsp82 (en levaduras), Grp94/gp96 (en retículo endoplásmico) (Argon y Simen, 1999), Hsp75/TRAP1 (en la matriz mitocondrial) (Wang y col., 2017). En procariotas se incluye la HtpG. Algunos miembros de esta familia están constitutivamente expresados a nivel celular, siendo una de las proteínas más abundantes y representan un 1% del total de proteínas citosólicas (Picard, 2002), entre ellos HSP90 β en humanos y Hsp96 en ratas (Csermely y col., 1998). A diferencia de los otros miembros de esta familia, cuya expresión se incrementa ante condiciones de choque térmico, Grp94 es inducido ante condiciones de estrés nutricional, disminución del calcio intracelular e inhibición de la glicosilación (Lee, 2001).

En células eucarióticas se describe la existencia de un solo gen que codifica HSP90 inducible, el cual es regulado por el enlace de factores de transcripción específicos (factores

de choque térmico ó HSF) a determinados sitios ubicados en la región promotora del gen HSP90 denominados elementos de choque térmico (HSE). La región promotora del gen HSP90 posee varios elementos regulatorios requeridos para su activación. Entre ellos destaca la secuencia consenso denominada HSE, que consiste en secuencias repetitivas de 5 nucleótidos con la secuencia 5'nGAAn3'ó su complemento inverso 5'nTTCn3'. Estas secuencias están dispuestas en orientaciones alternas separadas por dos nucleótidos y se hallan por delante (*upstream*) de la caja TATA. No obstante, una activación máxima de la transcripción de Hsp90 requiere la existencia de otras secuencias consenso como la secuencia GAGA, regiones de enlace de proteínas adaptadoras (*scaffold attachment regions: SARs*), la caja CCAAT y secuencias ricas en A y T (Santoro, 2000).

El factor de choque térmico (HSF) se transcribe como un monómero que se ubica a nivel citosólico y se describen varias isoformas que parecen cumplir funciones especializadas ante situaciones de estrés y permiten una expresión diferencial de las diferentes Hsp. Entre las diferentes isoformas se encuentran HSF1, HSF2, HSF3 y HSF4. En eucariotas se ha descrito la expresión ubicua de HSF1 y HSF2, las cuales muestran un 92% de homología entre diferentes especies. HSF3 se ha descrito sólo en aves y HSF4 parece tener una expresión específica en ciertos tejidos humanos como corazón, músculo esquelético y cerebro (Morimoto, 1993). HSF1 y HSF3 actúan como activadores de la respuesta de estrés (aumento de temperatura, depleción de nutrientes), mientras que HSF2 se activa durante el desarrollo embrionario y diferenciación celular (Prodomou, 2016).

Las HSF poseen cuatro dominios altamente conservados con diferentes funciones, entre ellos el dominio de enlace al DNA, ubicado en el extremo N-terminal. A continuación se localiza un dominio de oligomerización, que permite que HSF se agrupe en trímeros en un proceso que es regulado por HSP70 y HSP90. Se describe luego un dominio de activación transcripcional y finalmente una señal de localización nuclear (NLS) en el extremo C-terminal que promueve su translocación hacia el núcleo (Morimoto, 1998) (Figura 4). El dominio de oligomerización está caracterizado por tres secuencias repetitivas de aminoácidos hidrofóbicos separados entre sí por aminoácidos cargados. Dos de estas secuencias están muy próximas entre sí y a continuación del dominio de enlace al ADN, designadas como HR-A/B y una tercera secuencia repetitiva más distante adyacente al dominio de activación transcripcional ó HR-C. Entre HR-A/B y HR-C se encuentra una secuencia de aminoácidos que se encargan de inhibir la activación transcripcional y el enlace de HSF al ADN.

En condiciones basales, HSF es expresado como monómero y se mantiene en el citoplasma bajo esta conformación mediante el enlace a la HSP70 y HSP90, las cuales

mantienen el monómero en un estado plegado con ocultamiento del dominio de oligomerización mediante interacción del dominio HR-C con HR-A/B (Figura 4). El incremento de temperatura provoca el desplazamiento de las Hsp a otras funciones celulares, con liberación del monómero y su agrupación en trímeros, el cual sufre cambios conformacionales en el dominio de enlace al DNA y su transferencia al núcleo enlazándose al HSE (Morimoto, 1998) (Figura 4).

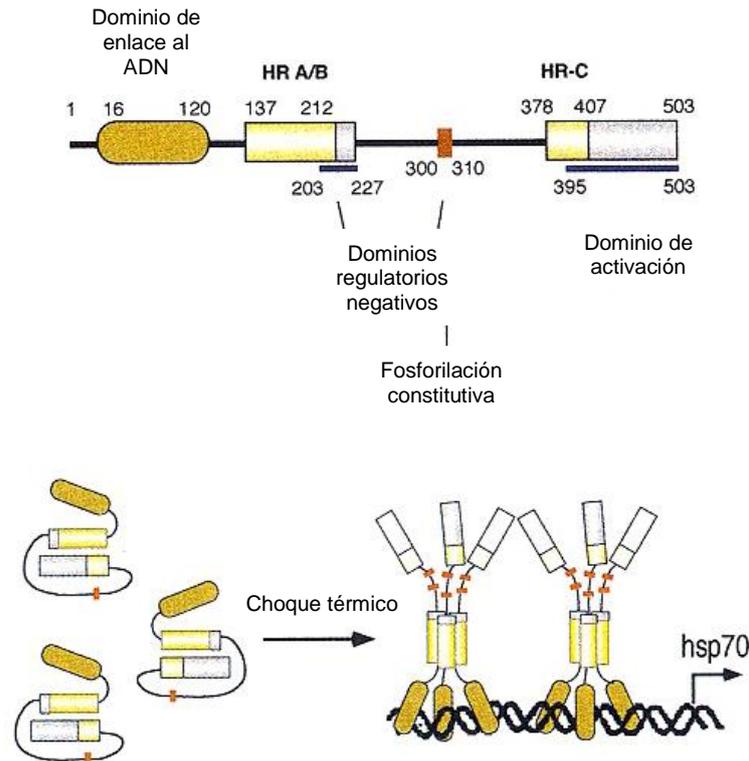


Figura 4. Características generales estructurales y regulatorias de los factores de choque térmico (HSFs). Representación esquemática de los motivos estructurales de HSF-1 que corresponden a las secuencias de aminoácidos hidrofóbicos (HR-A/B y HR-C), dominio de activación transcripcional y dominios regulatorios negativos que modifican la actividad de HSF-1. Las posiciones relativas de estos dominios se indican mediante residuos de aminoácidos. La porción inferior de la figura es una representación esquemática de la regulación intramolecular negativa que se activa bajo condiciones de estrés para formar homotrímeros con capacidad de enlace al DNA (Tomado de Morimoto, 1998).

No obstante, este trímero requiere fosforilación a nivel de varios residuos de serina en el dominio de activación transcripcional para que ocurra la expresión de HSP (Cotto y col., 1996). A medida que se incrementa la síntesis de Hsp y alcanza niveles proporcionales a la aparición de proteínas no nativas, la HSP70 y otras chaperonas se desplazan nuevamente al núcleo. En este caso se ha planteado el enlace de HSP70 y HSP40 al dominio de activación transcripcional, desfosforilación de los residuos de serina y disociación de los trímeros

mediante desestabilización del enlace intermolecular entre regiones HR-A/B de diferentes monómeros.

En este último paso se menciona la participación de la proteína enlazadora de HSF1 (HSBP1), que contiene una secuencia extendida de aminoácidos hidrofóbicos que compete por el enlazamiento a la secuencia HR-A/B de los monómeros (Morimoto, 1998) (Figura 5).

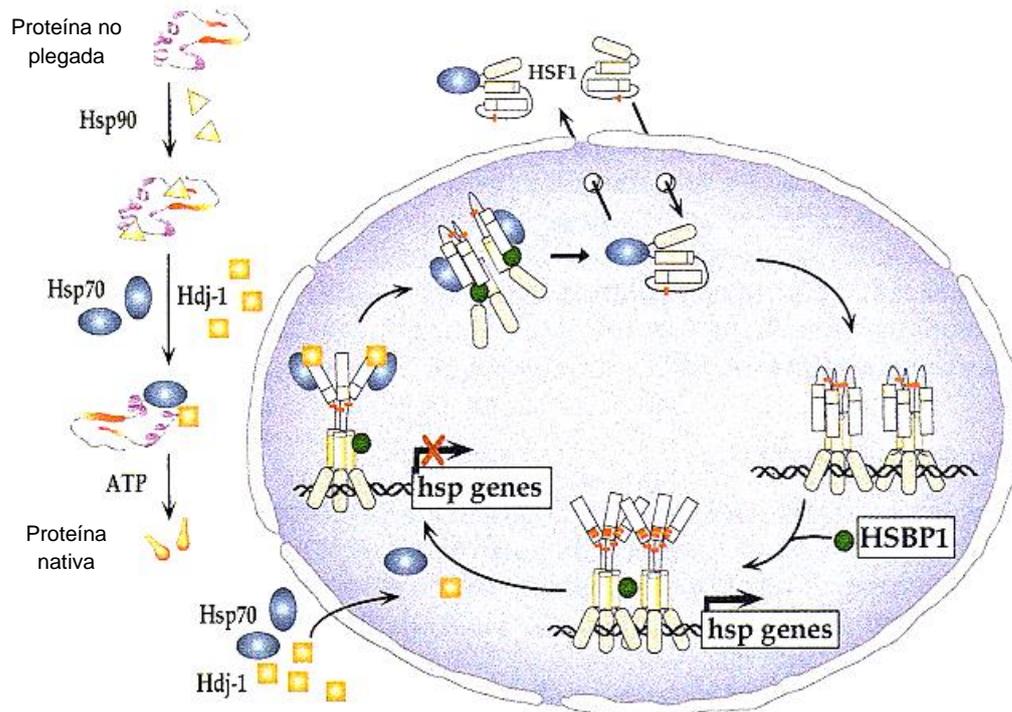


Figura 5. Regulación de la respuesta de choque térmico y el ciclo HSF. La aparición de proteínas no nativas provoca la activación de HSF1 y la participación de chaperonas moleculares (HSP90, HSP70 y Hdj1) para evitar la aparición de agregados moleculares. En condiciones basales HSF1 se localiza en el citoplasma o en el núcleo como un monómero inerte mediante interacciones temporales con chaperonas como HSP70 y HSP90. La activación de HSF1 ocurre en un solo paso, incluyendo su relocalización hacia el núcleo y adquisición de un estado competente para enlazarse al ADN pero que es transcripcionalmente inerte, hasta que es fosforilado y entonces induce la transcripción de genes de choque térmico. Durante la atenuación de la respuesta de choque térmico ocurre represión de la actividad transcripcional de HSF1 mediante enlace directo de HSP70 y Hdj1 y los trómeros son regulados en forma negativa por la proteína enlazadora de HSF1 (HSBP1) (Tomado de Morimoto, 1998).

Además de la regulación transcripcional, se incluyen mecanismos de regulación post-transcripcional que parecen intervenir tanto en la expresión de Hsp constitutivas como inducibles antes condiciones de estrés. Entre estos mecanismos figuran la fosforilación, acetilación, metilación, ubiquitinación y S-nitrosilación (Prodomou, 2016). La fosforilación no sólo regula en forma directa la actividad de la HSP90, sino también su habilidad de interactuar con chaperonas, nucleótidos y proteínas blanco. No obstante, este trímero requiere fosforilación a nivel de varios residuos de serina en el dominio de activación transcripcional para que ocurra la expresión de HSP (Cotto y col., 1996). A medida que se incrementa la síntesis de Hsp y alcanza niveles proporcionales a la aparición de proteínas no nativas, la HSP70 y otras chaperonas se desplazan nuevamente al núcleo. En este caso se ha planteado el enlace de HSP70 y HSP40 al dominio de activación transcripcional, desfosforilación de los residuos de serina y disociación de los trímeros mediante desestabilización del enlace intermolecular entre regiones HR-A/B de diferentes monómeros.

2.2.3 Estructura y mecanismo de acción de la HSP90

Las HSP90 interactúan con una gran variedad de proteínas citosólicas que actúan como proteínas accesorias o cochaperonas y forman complejos multiproteicos. La mayoría de las cochaperonas se enlazan a la HSP90 a través de un dominio modular característico de tres secuencias de 34 aminoácidos, conocidos como dominios tetratricopéptidos (TPRs) que conforman una estructura hélice-giro-hélice (Schopf y col., 2017).

Independientemente de su procedencia, todos los miembros de la familia HSP90 presentan una estructura básica común. Cada monómero posee un dominio N-terminal de 25 kDa y un dominio C-terminal de 12 kDa, separados entre sí por un dominio central de 35 kDa. Los dominios N-terminal y central se hallan conectados por una región de aminoácidos cargados. Los últimos aminoácidos del extremo C-terminal están representados por el pentapéptido MEEVD, los cuales representan el sitio de interacción para las cochaperonas que poseen la secuencia de tetratricopéptidos (TPRs). El dominio N-terminal posee aproximadamente 220 aminoácidos y es el sitio de enlace para nucleótidos (ATP/ADP) y posee actividad ATPasa débil (Li y Buchner, 2013). (Figura 6).

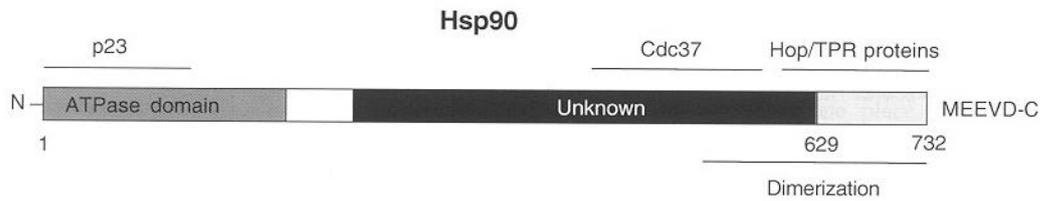


Figura 6. Representación esquemática y lineal de la estructura y dominios de enlace de las cochaperonas para HSP90 α humana. El motivo MEEVD C-terminal está involucrado en el enlace de proteínas que contienen dominios tetratricopéptidos (TPRs). Se indica el número de residuo aminoácido y los dominios ATPasa y de enlace a p23. (Tomado de Young y col., 2001).

A esta región se enlazan drogas antitumorales del tipo ansamicinas (geldanamicina, radicicol) que bloquean la actividad ATPasa y constituyen inhibidores altamente selectivos de los miembros de esta familia (Krukenberg y col., 2011). La geldanamicina tiene una afinidad nanomolar por HSP90 y se enlaza al bolsillo enlazador de nucleótidos del dominio N-terminal (Neckers y Workman, 2012). Los dominios N y C-terminales están implicados en el enlace de substratos peptídicos, en los cuales el enlace del substrato al extremo N-terminal es afectado por nucleótidos, geldanamicina y la secuencia adyacente cargada (Young y col., 1997). No obstante, se ha demostrado que el monómero no tiene actividad biológica y para ejercer su actividad HSP90 requiere su asociación con otros componentes, bien sea con otro monómero para la formación de homodímeros, o bien con otras proteínas dentro de la célula formando complejos heteromultiméricos.

Se propone que los homodímeros cumplen funciones generales de chaperonas moleculares, permitiendo un plegamiento adecuado de las proteínas dentro de las células. No obstante, esta chaperona carece de la habilidad de HSP70 de facilitar el replegamiento por sí sola de proteínas desnaturalizadas, así como tampoco participa en el plegamiento de *novo* de proteínas recién sintetizadas. HSP90 se enlaza a substratos que están muy próximos a su estado nativo y en una etapa avanzada de plegamiento (Jakob y col., 1995), pero que no presentan la conformación adecuada para su interacción con otras proteínas. Para facilitar el plegamiento adecuado de su substrato, HSP90 actúa en un complejo multiproteico con participación de HSP70, peptidilprolil isomerasas y otras cochaperonas (Bose y col., 1996). En este caso el enlace de estas chaperonas moleculares (HSP70, peptidilprolilisomerasa) a HSP90 se da a través de proteínas adaptadoras (*scaffold proteins*) que poseen dos o más dominios TPRs.

Además de su participación como chaperona molecular, se ha implicado la participación de HSP90 en funciones más especializadas dentro de la célula, mediante regulación del crecimiento y diferenciación celular (Mayer y Bukau, 1999). En este caso HSP90 está involucrado en la maduración, transporte intracelular y regulación de las actividades de factores de transcripción y proteínas quinasas involucradas tanto en la transducción de señales como en el control del inicio de la traducción de proteínas (Eckl y Richter, 2013). Para llevar a cabo estas funciones tan complejas, HSP90 es dirigida a su sustrato mediante cofactores específicos, como cdc37ó p23. Por ejemplo, HSP90 es enlazada a los receptores de hormonas esteroideas a través de p23; mientras que Cdc37 recluta HSP90 con proteínas quinasas como Raf-1, eIF-2 α (factor de iniciación de la traducción 2 α). Esta función de enlazamiento con estos sustratos específicos es sumamente importante, puesto que garantiza una asociación estable aún en condiciones de estrés celular, donde se acumulan proteínas anormales que podrían competir con HSP90 por sus sustratos. Por lo general, la asociación de HSP90 a sus sustratos específicos permite que éstos adquieran una conformación competente para su interacción con otros componentes dentro de la célula.

La zona de contacto para los homodímeros se localiza en los últimos 190 residuos del extremo C-terminal (Nemoto y col., 1995). El enlace de ATP a HSP90 induce dimerización del dominio N-terminal y favorece el enlace del sustrato, mientras que la hidrólisis de ATP promueve su liberación. Por tanto, cuando ejerce función de chaperona, HSP90 actúa por un mecanismo de abrazadera molecular (similar a la ADN girasa) en el cual la apertura y cierre del sitio de enlace del sustrato es mediado por una dimerización temporal del dominio N-terminal (Prodomou y col., 2000). Aún cuando el enlace del sustrato a HSP90 es independiente de ATP, su liberación requiere la actividad ATPasa del dominio N-terminal (Micklery col., 2009).

Este ciclo de enlazamiento y liberación del sustrato está regulado mediante interacciones secuenciales de HSP90 con proteínas accesorias o cochaperonas entre las cuales figuran Hop y p23. Hop (Sti1 en levaduras) es una proteína que posee un dominio tetratricopéptido (TPR) que se enlaza al dominio C-terminal del dímero de HSP90, particularmente a los residuos MEEVD de esta región. El enlace de Hop induce un cambio conformacional en el dominio N-terminal de HSP90, inhibiendo la actividad ATPasa mediante ocultamiento del sitio enlazador de nucleótidos de esta región (Prodomou y col., 1999). Esta acción facilita el enlace del sustrato peptídico al dominio N-terminal, actuando como un mecanismo de “cargado molecular”.

La disociación de Hop de HSP90 provoca cambios conformacionales en el dominio ATPasa que facilita el enlace de ATP y una dimerización del extremo N-terminal, causando secuestro del sustrato enlazado. Esta configuración HSP90-ATP favorece el enlace de otras cochaperonas, como p23 (Sba en levaduras) y miembros de la familia de las inmunofilinas (como FKBP51, FKBP52), las cuales se encargan de regular la actividad ATPasa. P23 se enlaza al extremo N-terminal de HSP90 y estimula la actividad ATPasa de esta región, ocasionando hidrólisis del ATP y apertura del gancho formado por la dimerización de los extremos N-terminales del homodímero, con la consecuente liberación del sustrato (Young y col., 2001; Mickler y col., 2009) (Figura 7).

El inhibidor geldanamicina compite con el ATP en el sitio de enlazamiento de nucleótidos e impide la conclusión del ciclo de enlazamiento y liberación del sustrato de HSP90.

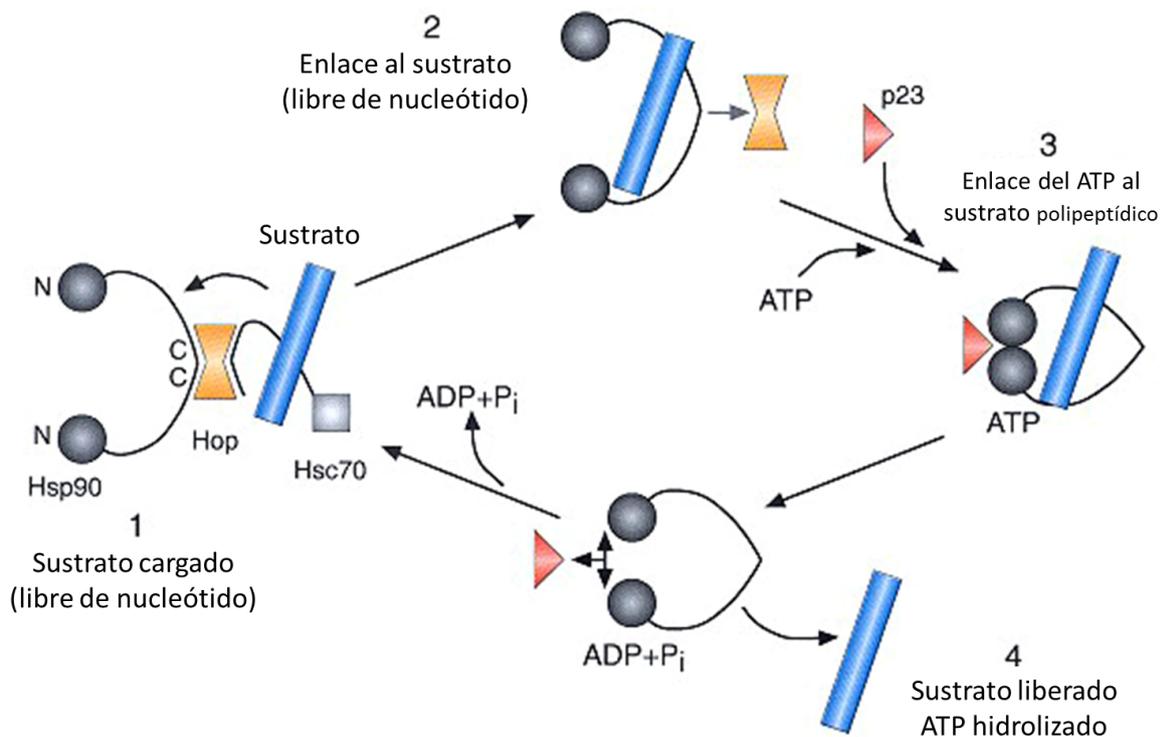


Figura 7. Ciclo ATPasa de enlace al sustrato de la HSP90. (1) El sustrato polipeptídico puede ser transferido desde Hsc70 al estado libre de nucleótidos de HSP90 inducido por Hop. (2) HSP90 en el estado abierto (libre de nucleótidos) puede enlazar el sustrato polipeptídico. (3) El enlace de ATP induce dimerización de los dominios N-terminales de HSP90 (círculos) y permite el enlace de p23; el sustrato es enlazado por un mecanismo de abrazadera. (4) La hidrólisis del ATP enlazado produce liberación del sustrato mediante apertura del gancho o mediante inducción de cambios conformacionales (Tomado de Young y col., 2001).

2.2.4 Participación HSP90 en la vía de transducción de señales

Entre los múltiples substratos para HSP90 figuran proteínas que participan en la transducción de señales (Buchner, 1999). Estas proteínas se caracterizan por su gran tamaño y configuración en múltiples dominios y requieren interacciones estabilizantes con otros factores para llevar a cabo su función, como por ejemplo el enlace de ligandos esteroideos al receptor de hormonas esteroideas, así como la unión de ciclinas a las quinasas dependientes de ciclinas. Bajo condiciones basales, la expresión constitutiva de HSP90 mantiene a estos substratos en una conformación competente para su interacción con ligandos específicos, y una vez ocurrido el enlace, se provocan cambios conformacionales que permiten continuar la cascada de señalización.

La vía de señalización con participación de la HSP90 mejor caracterizada es la activación del receptor de hormona esteroidea. El dominio enlazador del ligando del receptor es muy inestable y requiere un plegamiento apropiado. En una conformación inactiva, estos receptores se hallan en un complejo heteromérico con HSP90 y cochaperonas. Antes de que los receptores se enlacen a la HSP90, éstos pasan por varios procesos de plegamiento con participación de múltiples chaperonas y cochaperonas. Inicialmente el aporeceptor esteroideo interactúa con HSP70 y HSP40. Una vez enlazado, el aporeceptor es transferido a HSP90 mediante interacción con la cochaperona Hop, la cual promueve el enlace entre HSP70 y HSP90 (Chen y Smith, 1998). La liberación de Hop, el enlace de ATP y la cochaperona de HSP90, p23, conduce a la formación de un complejo aporeceptor final que contiene el dímero HSP90, p23 y las inmunofilinas. Una vez obtenido el plegamiento apropiado, ocurre enlazamiento del ligando específico (hormona), con disociación del aporeceptor y formación del dímero, el cual se dirige al núcleo para ejercer su actividad, o bien, en ausencia de hormona, reiniciar el ciclo de plegamiento.

HSP90 también está involucrado en la activación de varias proteínas quinasas, entre ellas tirosín quinasas (familia Src, Wee1), serín/treonín quinasas (Raf-1, Mek), quinasas dependientes de ciclinas (como CDK4) y la quinasa dependiente de grupos hemo (eIF-2 α quinasa) (Mayer y Bukau, 1999). Estas quinasas sufren cambios conformacionales inducidos por señales, las cuales en algunos casos involucra el rearrreglo de dominios. Esta flexibilidad conformacional involucra transiciones en el plegamiento y estados conformacionales que involucran la participación de chaperonas. Por otra parte, algunas quinasas necesitan

cofactores hidrofóbicos, y en este caso HSP90 mantiene la enzima en una conformación competente para su interacción.

La vía de señalización tirosín quinasas (familia Src, Wee1), serín/treonín quinasas (Raf-1, Mek), quinasas dependientes de ciclinas (como CDK4) y la quinasa dependiente de grupos hemo (eIF-2 α quinasa) juega un papel importante en la proliferación, diferenciación, arresto del crecimiento y muerte celular. En respuesta a señales extracelulares, Ras es activado mediante participación de receptores enlazados a membrana y una serie de moduladores. Una vez activado Ras, éste conduce al complejo heteromérico Raf-1 a la membrana, donde Raf-1 es activado por una gran cantidad de proteínas activadoras. Al activarse, la quinasa Raf-1 inicia una cascada de reacciones descendentes que conducen a la fosforilación de las quinasas reguladas por señales extracelulares ERK1 y ERK2, las cuales regulan factores de transcripción en el núcleo (Kolch, 2000).

La exposición prolongada de células de mamífero al inhibidor geldanamicina disocia los complejos Raf-1-HSP90, provocando disminución de la actividad de Raf-1 debido a un aumento en su degradación (Stancato y col., 1997). No obstante, exposiciones cortas con este inhibidor conducen a la activación de Raf-1, sugiriendo que la liberación temporal de HSP90 es esencial para su activación. Estos efectos dependientes del tiempo de exposición a la geldanamicina pueden interpretarse como que HSP90 es requerido para la maduración y mantenimiento de la estabilidad de Raf-1, pero que debe ocurrir la disociación de HSP90 para que Raf-1 sea activado por otros reguladores (Nollen y Morimoto, 2002). El enlace de HSP90 a Raf-1 está mediado por la cochaperona cdc37 y los complejos HSP90-cdc37 potencian la activación de Raf-1 mediante la adquisición de una conformación accesible a tirosín quinasas y otras moléculas regulatorias que promueven su fosforilación.

2.2.5 Homólogos de HSP90 en tripanosomatídeos

2.2.5.1 Organización genómica

En tripanosomatídeos se ha descrito la expresión constitutiva de homólogos de HSP90, llegando a representar el 2,8% del contenido total de proteínas citosólicas en parásitos como *Leishmania sp.*, *Trypanosoma brucei* y *T. cruzi*.

En *T. cruzi* los genes que codifican Hsp85 (homólogo de Hsp90 en mamíferos) están organizados en un arreglo en serie, con 4 a 10 copias idénticas dispuestas en forma consecutiva con una disposición cabeza-cola y separados entre sí por una región intergénica (Dragon y col., 1987; Folgueira y Requena, 2007). *L. mexicana amazonensis* Hsp83 (homólogo de HSP90 en eucariotas superiores), posee cuatro copias idénticas de 3.6 Kilobases cada una (Shapira y Pinelli, 1989). Esta organización genómica es compartida por *L. major* y *L. donovani* (Hübel y Clos, 1996), mientras que *T. brucei* (denominado Hsp83) posee 10 a 12 copias en serie del gen (Mottram y col., 1989).

También se ha descrito en tripanosomatídeos la presencia de la Grp94. Mientras que en *Leishmania major* se ha identificado una sola copia del gen codificante, en *T. cruzi* se ha demostrado la existencia de tres copias de este gen. En este caso esta proteína está localizada a nivel del retículo endoplásmico y parece ser regulada por los niveles de glucosa. Se ha demostrado su participación en la síntesis de lipofosfoglicanos que están implicados en la virulencia del parásito, pero no en los procesos de diferenciación.

El análisis de la secuencia de aminoácidos de Hsp85 de *T. cruzi* y Hsp83 de *T. brucei* muestra un 62% y 72% de homología con respecto a su homólogo Hsp83 en *Sacharomyces cerevisiae* (Dragon y col., 1987; Mottram y col., 1989). Esta proteína de choque térmico muestra un alto grado de conservación entre tripanosomatídeos, existiendo un 95 y 85% de homología de Hsp85 de *T. cruzi* con respecto a Hsp83 *T. brucei* y Hsp83 de *L. m. amazonensis*, respectivamente (Rondinelli, 1994). En todos los casos reportados el grado de conservación es mayor en el extremo N-terminal. En efecto, estudios de complementación genética empleando levaduras mutantes de *S. cerevisiae* han demostrado que Hsp85 de *T. cruzi* puede substituir la función de ambas isoformas de Hsp90 (Hsp82 y HSC82) (Palmer y col., 1995).

2.2.5.2 Regulación y expresión diferencial de los homólogos de HSP90

Al igual que ocurre en otras células eucarióticas, el incremento de temperatura en tripanosomatídeos provoca un aumento en los niveles de los homólogos de HSP90. Esto ha sido demostrado mediante marcación metabólica de los parásitos sometidos a incrementos de temperatura, tanto en epimastigotas de *T. cruzi* (Alcina y col., 1988), promastigotas de *L. mexicana amazonensis* (Shapira y col., 1988), promastigotas de *L. donovani* (Brandau y col., 1995; Wiesgigl y Clos, 2001) y promastigotas de *L. major* (Webb y col., 1997). Este incremento de los homólogos de HSP90 se inicia a los 30 minutos del choque térmico y es

temporal, alcanzando un máximo a las 4 horas y vuelve luego a sus niveles basales (Brandau y col., 1995).

Este aumento de la expresión de los homólogos de HSP90 está asociado a un incremento en los niveles de ARNm. Análisis de *Northern blot* muestran un aumento del ARNm directamente proporcional al incremento de temperatura en diferentes especies del género *Leishmania* (Shapira y col., 1988; Shapira y Pinelli, 1989; Brandau y col., 1995) y *Trypanosoma brucei* (Mühich y col., 1989) y en donde este efecto es más acentuado en promastigotas de fase exponencial (Shapira y col., 1988).

No obstante, a diferencia de lo que ocurre en la mayoría de las células eucarióticas, este aumento en la expresión de los homólogos de HSP90 es de naturaleza post-transcripcional. Esto ha sido demostrado mediante análisis de transcripción nuclear (*nuclear run-on analysis*), donde se aprecia que la tasa de transcripción de Hsp83 de *Leishmania* sp. en condiciones basales (25° C) es bastante elevada, y en donde el aumento de temperatura no tuvo un efecto significativo en la síntesis de ARNm (Argaman y col., 1994; Brandau y col., 1995).

Estos resultados han sido confirmados realizando ensayos de marcación metabólica en ausencia y presencia de inhibidores de la síntesis de ARNm. En este caso la marcación metabólica de epimastigotas de *T. cruzi* en presencia de actinomicina D no impidió la síntesis de Hsp70 y Hsp85 (Carvalho y col., 1990).

La regulación post-transcripcional de la expresión de los homólogos de HSP90 está asociada a un aumento en la estabilidad de los ARNm. En efecto, análisis de *Northern blot* de parásitos sometidos a choque térmico en presencia de Actinomicina D durante largos períodos de tiempo muestran que el incremento de temperatura favorece la conservación de ARNm preexistentes, con su correspondiente degradación a temperaturas basales (Argaman y col., 1994).

En células de eucariotas superiores la transcripción de los genes que codifican proteínas de choque térmico generan pre-ARNm monocistrónicos que contienen tanto secuencias codificantes (exones) como regiones no traducibles (intrones). El procesamiento de estos pre-ARNm involucra la remoción de intrones en una reacción llevada a cabo por ARN polimerasa II (*cis-splicing*) para generar ARNm maduros. Sin embargo, en tripanosomatídeos, la transcripción de genes es policistrónica, generando pre-ARNm que codifican múltiples proteínas y cuya secuencia carece de intrones. La maduración de estos

pre-ARNm involucra su clivaje para generar ARNm monocistrónicos en una reacción bimolecular (*trans-splicing*), con adición de una secuencia guía de 39 nucleótidos o mini-exón en el extremo 5' (SL: *spliced leader*) y poliadenilación en el extremo 3' (cola de poli A). (Graham, 1995).

Se ha demostrado que el choque térmico no afecta el procesamiento (*trans-splicing*) de los pre-ARNm que codifican los homólogos de HSP90 en tripanosomatídeos. Cuando formas procíclicas de *T. brucei* fueron sometidos a choque térmico, los análisis de *Northern blot* mostraron acumulación de transcriptos policistrónicos que codifican α y β tubulina, con disminución de ARNm maduros. No obstante, en el caso de Hsp70 y Hsp83 (el homólogo de HSP90) se registró un incremento significativo en la proporción de ARNm maduros, con ausencia de transcriptos de mayor tamaño (Mühich y col., 1989). Esto indica que existe un procesamiento preferencial de Hsp en condiciones de estrés.

Además del aumento de la estabilidad de los ARNm y su procesamiento preferencial a altas temperaturas, se propone una acumulación selectiva a nivel polisomal de los ARNm que codifican los homólogos de HSP90. Esto fue demostrado para los homólogos de HSP90 HSP70 en epimastigotas de *T. cruzi* (Carvalho y col., 1990) y explica la expresión de Hsp85 a altas temperaturas.

El aumento significativo en la expresión de los homólogos de HSP90 respecto al resto de las proteínas sintetizadas mediante ensayos de marcación metabólica indica una traducción preferencial de los ARNm que codifican Hsp a altas temperaturas. Se ha demostrado que la adición de secuencias no codificables presentes en el extremo 3' de los ARNm que codifican Hsp83 de *Leishmania* sp. (*3' unstralated regions: 3' UTR*) aumenta la tasa de traducción de genes reporteros a altas temperaturas (Shapira y col., 2001; Zilka y col., 2001).

Todos estos resultados indican que aún cuando los tripanosomatídeos muestran un incremento en la expresión de los homólogos de HSP90 similar al resto de las células eucarióticas, presentan algunas variaciones con respecto a los mecanismos de regulación. Mientras la mayoría de las células eucarióticas muestran una regulación fundamentalmente transcripcional, los tripanosomatídeos la regulación de la HSP90 ocurre mediante mecanismos post-transcripcionales, los cuales son ejercidos a diferentes niveles.

Se ha demostrado cambios en la expresión del gen que codifica a los homólogos de HSP90 en tripanosomatídeos asociado a la fase del crecimiento y estadio del parásito.

Análisis de *Northern blot* muestran un incremento significativo de los ARNm que codifican Hsp83 en tripomastigotas sanguíneas de *T. brucei* respecto a las formas procíclicas localizadas a nivel del insecto (Van Der Ploeg y col., 1985). Epimastigotas de *T. cruzi* muestran mayor expresión de Hsp85 en parásitos de fase logarítmica y el aumento de temperatura en esta etapa tiene poca incidencia en los niveles de esta proteína de choque térmico (Alcina y col., 1988). No obstante, cuando epimastigotas de fase estacionaria son sometidos a choque térmico, se evidencia un aumento significativo de Hsp85. Por el contrario, promastigotas de *Leishmania* muestran un efecto contrario, donde a 26° C la expresión es mayor en fase estacionaria y el choque térmico incrementa significativamente los niveles de Hsp83 en fase logarítmica (Shapira y col., 1988).

Esta mayor expresión de Hsp83 en *L. mexicana* se correlaciona con un aumento en los niveles totales de esta proteína. El análisis mediante *immunoblot* de promastigotas de *L. chagasi* sometidos a choque térmico muestra un aumento significativo de Hsp83 (Streit y col., 1996) que se mantiene a lo largo del tiempo. Este aumento en Hsp83 parece tener un papel fundamental en la transformación inicial del parásito hacia la forma amastigota, con disminución significativa a las 140 horas posterior a la infección de líneas celulares de mamíferos. En efecto, se ha demostrado la existencia de ARNm que codifican Hsp83 tanto en amastigotas de lesión (Van Der Ploeg y col., 1985; Shapira y col., 1988) como de cultivo axénico (Van Der Ploeg y col., 1985). Al igual que se ha demostrado una mayor expresión basal de Hsp85 en epimastigotas de fase logarítmica de *T. cruzi*, la incubación de tripomastigotas metacíclicos de este parásito a altas temperaturas muestra un incremento significativo en la síntesis de esta proteína (Alcina y col., 1988).

CAPITULO III

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material biológico

3.1.1 Material parasitario

Se trabajó con el clon EPm6 de *T. cruzi* obtenido por plaqueo en agar blando según la técnica de Tanuri y col., (1981) a partir de la cepa MHOM/VE/2007/Elpidio Padrón 6c de *T. cruzi* aislada de un caso humano fatal en 1967 por el Dr. José W. Torrealba. El clón fue mantenido desde su aislamiento en N₂ líquido hasta 1996 desde entonces, y hasta la actualidad se mantiene por pases trimestrales alternos chipo/ratón (Contreras y col., 1994).

3.1.2 Vectores de clonación (Plásmidos)

-*pGEM[®]-T Easy* (Promega): Es un vector diseñado para el clonaje directo de productos de PCR. Contiene los promotores T7 y SP6, delimitando la región de policlonaje. Presenta un tamaño de 3015 pb y como marcador el gen de resistencia a ampicilina.

-*pRSET A, B, C* (Invitrogen): Es un vector diseñado para la expresión procariota de los genes de interés, controlado por el promotor del bacteriófago T7. Rinde una proteína de fusión con una cola de seis histidinas, que permite la purificación de la proteína por cromatografía de afinidad mediante columnas de níquel, así como la detección de la proteína expresada mediante el anticuerpo antihistidina a través del epítopo His. Presenta como marcador el gen de resistencia a ampicilina y su tamaño es de 2900 pb.

-*pCITE-4a(+), 4(+), b, 4 c(+)* (Novagen): Plásmidos utilizados en la expresión de los genes de interés. Rinden una proteína de fusión con la enzima glutatión transferasa (GST) de *Schistosoma japonicum*, que posibilita su purificación por cromatografía de afinidad mediante columnas de glutatión agarosa. Contienen el promotor T7 y presentan un tamaño de 3700 pb. Tienen como marcador el gen de resistencia a ampicilina.

-*pTrcHis 2A, 2B, 2C* (Invitrogen): Es un vector diseñado para la expresión de los genes de interés. Rinde una proteína de fusión con una cola de seis histidinas, que permite la purificación de la proteína por cromatografía de afinidad mediante columnas de níquel, así como la detección de la proteína expresada mediante el anticuerpo antihistidina a través del epítopo His, y el epítopo c-myc que permite la detección de proteínas de fusión con un anticuerpo anti-c-myc. Contiene el promotor tcr, y el operon *lacO* y *lacIq* para la regulación

transcripcional de cualquier cepa de *E. coli*. Presentan un tamaño de 4414 pb. Tienen como marcador el gen de resistencia a ampicilina.

-*pGEX-4T-1, 4T-2, 4T-3* (Amersham): Plásmidos utilizados en la expresión de los genes de interés. Rinden una proteína de fusión con la enzima glutatión transferasa (GST) de *Schistosoma japonicum*, que posibilita su purificación por cromatografía de afinidad mediante columnas de glutatión agarosa, así como también la detección de la proteína mediante el anticuerpo policlonal anti-GST (Amersham). Contienen el promotor T7 y presentan un tamaño de 4900 pb. Tienen como marcador el gen de resistencia a ampicilina.

-*pQE30* (Qiagen): Es un vector diseñado para la expresión de los genes de interés. Rinde una proteína de fusión con una cola de seis histidinas, que permite la purificación de la proteína por cromatografía de afinidad mediante columnas de níquel, así como la detección de la proteína expresada mediante el anticuerpo antihistidina (Quiagen) a través del epitopo His. Contiene el promotor T5. Presenta un tamaño de 3400 pb. Tiene como marcador el gen de resistencia a ampicilina.

3.1.3 Cepas bacterianas

Se emplearon las cepas de *Escherichia coli* que se describen a continuación

-*E. coli XLI-Blue MRF⁺* (Stratagene): $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)$ 173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac*[*F'proAB lacI^q ZΔM15Thn10 (tet^r)*]. Esta cepa se utilizó para la propagación y mantenimiento de todos los plásmidos recombinantes.

-*E. coli BL21 (DE3)* (Stratagene): *F⁻, ompT, rB⁻, mB⁻*. Se utilizó para la expresión de los genes subclonados en los vectores de expresión pGEX-4T, pRSET, pCITE, pTrcHis2.

-*E. coli M15* (Qiagen): *NaI^s, Str^s, Rif^s, Thi⁻, Lac⁻, Ara⁺, Gal⁺, Mtl⁻, F⁻, RecA⁺, Uvr⁺, Lon⁺*. Esta cepa bacteriana fue empleada en la expresión de los genes subclonados en el vector de expresión pQE30.

3.1.5. Suero de conejo inmune

Se utilizó para la identificación de la proteína recombinante. Este suero fue producido contra epimastigotas del clon EPm6 de *Trypanosoma cruzi* según lo descrito por Contreras y col. (1998). Para la inmunización se empleó una masa de 20 mg de epimastigotas, la cual se

resuspendió en 2 mL de adyuvante completo de Freund y se administró mediante 20 punciones subcutáneas en el cuello y lomo de un conejo tipo Nueva Zelanda con un peso aproximado de 3 Kg. Quince días después, se inoculó vía intramuscular una masa de 20 mg de epimastigotas resuspendidos en 2 mL de adyuvante incompleto de Freund, proceso que se repitió nuevamente a los ocho días. Luego de 15 días de descanso, se le administró tres dosis intravenosas de 2 mg de epimastigotas disueltas en solución de Hanks con una frecuencia interdiaria. Quince días después de la última dosis intravenosa, se procedió a evaluar la respuesta inmune mediante reacción indirecta de anticuerpos fluorescentes (RIAF) utilizando el antígeno homólogo. Una vez obtenido un título superior a 1/640, se procedió a la obtención del suero hiperinmune, el cual fue titulado mediante RIAF, ELISA e *immunoblotting* y distribuidos en alícuotas a -70° C hasta el momento de su uso.

3.2 Medios de cultivo y soluciones

3.2.1 Medio de cultivo

El medio empleado para el crecimiento de los parásitos fue LITB, cuya composición es KCl 5,4 mM, NaCl 150 mM, glucosa 22 mM, extracto hígado 5% (v/v), hemina 0,02% (p/v), extracto levadura 2% (p/v), triptosa 1,5% (p/v), SFB 10% (Goitia-Aular y Boiso, 1982).

El medio utilizado para el cultivo de las bacterias transformadas fue LB (Luria-Bertani) (Sambrook y col., 1989) suplementado con el antibiótico de selección adecuado. La composición de los medios se describe a continuación:

-Medio LB líquido: triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 5 g/L, pH 7,5 (Sambrook y col., 1989).

-Medio LB sólido: La misma composición del medio LB líquido a la que se le añade agar 15 g/L (Sambrook y col., 1989).

3.2.2 Soluciones y tampones

-Tampón de lisis: Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 10 mM, SDS 1%.

-Tampón MOPS 10X: MOPS 200 mM, acetato de sodio 20 mM, EDTA 10 mM.

- Tampón de muestra de ARN: Formaldehído al 37% en tampón MOPS.
- Tampón de carga de ARN 10X: Glicerol 50%, EDTA 1 mM, azul de bromofenol 0,4%.
- TAE: Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8,0 (Sambrook y col., 1989).
- Tampón de carga de ADN 10X: azul de bromofenol 0,42%, xileno-cianol 0,42%, glicerol 50%.
- PBS: NaCl 79,6 mM, Na₃PO₄ 57 mM, KH₂P0₄ 18 mM.
- Tampón de muestra 2X: Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8 SDS 2%, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0,005% (Laemmli, 1970).
- Tampón de electroforesis: Tris 15 g/L, glicina 72 g/L, SDS 5 g/L, pH 8,3 (Laemmli, 1970).
- Solución fijadora: Metanol 50%, ácido acético 10%.
- Azul de Coomassie-Plata: Coomassie blue tipo G250 0,25%, metanol 50%, ácido tricloroacético 12,5%, nitrato de plata 0,1%.
- Tampón de transferencia: Glicina 192 mM, Tris 25 mM, SDS 0,1%, metanol 20% pH 8,3 (Maizels y col., 1991).
- Solución de bloqueo: PBS 0,15 M pH 7,2, leche descremada 7,5%.
- Solución de lavado: PBS 0,15 M pH 7,2, Tween 20 0,1%.
- Solución de reacción: PBS 0,15 M pH 7,2, NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,4.
- Solución de revelado: Na₂CO₃ 3,75%, formaldehído 0,03%.
- Solución de revelado: *Super Signal® West pico stable peroxide solution* 50%, *Super Signal® West pico stable luminol/enhacer solution* 50%.

3.3 Métodos

3.3.1 Obtención de masas de parásitos

Las masas de parásitos se obtuvieron mediante cultivo de epimastigotas de *T. cruzi* en medio LITB a 27° C (Goitia-Aular y Boiso, 1982), los cuales fueron recolectados en la fase final del crecimiento exponencial (6 días de cultivo).

Las masas de parásitos fueron ajustadas a $1,5 \times 10^9$ epimastigotas/mL mediante contaje en cámara de Neubauer y visualización en microscopio de contraste de fases (Nikkon, Optiphot). Posteriormente los parásitos fueron sedimentados mediante centrifugación a 8.000 rpm durante 15 minutos a 4°C (Centrífuga IEC, B22M) y lavados dos veces en tampón salino fosfato (PBS) 0,15 M pH 7.2 (Na₂HP0₄ 57 mM, KH₂P0₄ 18 mM, NaCl 76,9 mM) a fin de eliminar los restos del medio de cultivo. Estas masas de parásitos fueron mantenidas a -20°C hasta el momento de su uso.

3.3.2 Técnicas de análisis de ácidos nucleicos

3.3.2.1 Extracción de Ácido Ribonucleico (ARN)

La extracción de ARN se realizó a través de dos técnicas diferentes. La primera se realizó con el estuche FavorPrep™ *Viral Nucleic Acid Extration Kit* (Favorgene), donde las masas de parásitos fueron previamente tratadas con tampón de lisis suplementado con Proteinasa K (0,45 mg/mL) y ARNasa (80 u/μL), para luego seguir con las instrucciones descritas en el estuche comercial. La segunda metodología de extracción se realizó con el estuche comercial TRI® Reagent (Sigma) acatando el procedimiento descrito por el fabricante. Finalmente la muestra se resuspendió en tampón A (Tris-HCl 500 mM pH 8,0, KCl 750 mM, MgCl₂ 30 mM).

3.3.2.2 Obtención del ADN complementario por RT-PCR

La obtención del ADN complementario (ADNc) se realizó mediante la técnica de Transcripción reversa acoplada a reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR, por sus siglas en inglés *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*), con el uso del estuche comercial *Access RT-PCR System* (Promega) para ello se emplearon cebadores específicos para la secuencia, los cuales fueron diseñados manualmente utilizando el Software BioEdit® v7.1.11 (Hall T., 2013) y como secuencia molde la de HSP85 de *T. cruzi* cepa CL Brener de 2115 pb (*Trypanosoma cruzi strain CL Brener heat shock protein 85*) obtenida del GenBank (N° acceso XM_809799) cepa empleada en el proyecto genoma de *T. cruzi* (El-Sayed y cols., 2005). No existen otros reportes, ya que esta molécula no aparece clonada en el GenBank. Dichos cebadores muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Cebadores empleados para la amplificación del gen *hsp85* de *T. cruzi*.

Cebador	Secuencia
Directo TcHSP85D	5´- ATG ACC GAG ACA TTC GCA -3´
Reverso TcHSP85R	5´- CTA GTC AAC CTG CTC CAT - 5´

La mezcla de reacción estuvo compuesta por tampón de reacción *AMV/Tfl*, desoxinucleótidos trifosfatos (0,2 mM), cebadores directo y reverso (1 µM) cada uno, MgSO₄ (1 mM), Transcriptasa Reversa *AMV* (0,1 U/L), *Thermus flavus* (*Tfl*) ADN polimerasa (0,1 U/µL), 10 µL de la muestra de ARN extraída, resultando un volumen final de reacción de 50 µL. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador automático C1000™ *Thermal Cycler* (BioRad), siguiendo el programa de amplificación que se describe a continuación en la tabla 2.

Tabla 2. Programa de transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación del ADNc de Hsp85.

Evento	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Transcripción reversa	45	45	1
Desnaturalización	94	2	1
Desnaturalización	94	1	
Hibridación	60	1	30
Extensión	68	2	
Extensión final	68	7	1

3.3.2.3 Electroforesis de ARN y de ADN en geles de agarosa

Se llevó a cabo según el procedimiento descrito por Sambrook y col., (1989). La electroforesis se realizó en geles de agarosa (Scientific Trade Corp) de 1-1,2%, de acuerdo con el tamaño de las moléculas a examinar, utilizando Tampón MOPS para los geles de ARN y el tampón TAE para geles de ADN y un sistema de electroforesis horizontal Minicell® EC 370M, para geles pequeños y Midicell® Primo™ EC 330 *Thermo Electron Corporation* para geles medianos y grandes. Se empleó un voltaje de 60-100V en función del tamaño del gel. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0,5 µg/mL). Las bandas de ARN y de ADN se visualizaron con luz ultravioleta mediante el sistema transiluminador GelDoc 1000 (BioRad). El tamaño de las bandas se estimó comparándolas con los marcadores de ARN ribosomal de *Escherichia coli* y de ADN 1 kb *DNA Ladder* (Bioneer), respectivamente. Los geles de

agarosa para los productos de las diferentes reacciones de PCR se realizaron de la misma forma y se emplearon como marcadores 100 bp *DNA Ladder* (Promega) y 100 bp *DNA Ladder* (Axygen).

3.3.2.4 Medida de la concentración y pureza del ADN y ARN

La concentración y pureza de los ácidos nucleicos se determinaron por los métodos descritos por Sambrook y col., (1989). Además de la cuantificación por comparación con los marcadores. La concentración de ADN y ARN se estimó en un espectrofotómetro UV/Visible Beckman DU[®] 650 *Spectrophotometer*, midiendo la absorbancia a 260nm y 280nm y empleando las siguientes fórmulas:

[ADN]= Absorbancia 260_{nm} x Factor de Dilución x 50 µg/mL. FD: Factor de dilución

[ARN]= Absorbancia 260_{nm} x Factor de Dilución x 40 µg/mL.

El grado de pureza se calculó dividiendo la absorbancia a 260nm entre la absorbancia a 280nm.

3.3.2.5 Purificación de bandas de ADN en gel de agarosa

Las muestras de ADN a purificar y eluir se fraccionaron en geles de agarosa preparado en el tampón TAE y las bandas se visualizaron en el transiluminador de luz ultravioleta. Se cortó con bisturí estéril la fracción de interés y se eluyó el ADN con el estuche comercial Wizard[®]SV *Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), según las instrucciones del fabricante.

3.3.3 Técnicas de manipulación de sistema de clonación

3.3.3.1 Crecimiento y mantenimiento de bacterias

Para la clonación se emplearon cepas de *Escherichia coli* XL1 Blue MRF^ˆ para el mantenimiento del plásmido, y cepas de *E. coli* M15 y BL21 para la expresión del gen, preparando a las células según el protocolo descrito por Sambrook y Russel (2001).

Para el crecimiento se partió de alícuotas de bacterias de *E. coli* cepa XL1 Blue MRF^ˆ preservadas en glicerol, las cuales se sembraron en medio LB agar con tetraciclina (12,5µg/mL), la cepa M15 en medio LB agar con kanamicina (25 µg/mL), y la cepa BL21 en

LB agar. A partir de una colonia de cada cepa se hicieron cultivos en LB líquido que se incubaron a 37°C en agitación moderada a 200 rpm hasta alcanzar la DO requerida para cada uso. Para la conservación de las diferentes cepas bacterianas utilizadas y células transformadas, se prepararon alícuotas de 80% de cultivo bacteriano y 20% de glicerol y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

3.3.3.2 Preparación de células competentes

La preparación de las células competentes se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Hanahan (1986). Se cultivaron las células como se describió anteriormente, hasta una DO_{600nm} de 0,5-1. Después se centrifugaron a 3000 rpm por 15 min a 4 °C, y el sobrenadante se resuspendió en $CaCl_2$ 100 mM y se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones anteriores, finalmente se resuspendió el sedimento en $CaCl_2$ 100 mM, glicerol 15% y se dispensaron 200 μ L de células competentes en microtubos, los cuales se congelaron rápidamente a -80 °C hasta su uso.

3.3.3.3 Clonación en el vector de mantenimiento

El vector pGEM[®]-T *Easy* (Promega) permite la clonación directa de los productos de PCR. La secuencia de ADNc a clonar se obtuvo por RT-PCR, a partir del gel de agarosa se purificó el correspondiente ADN y se ligó con el vector en las proporciones 1:3 y 1:5 (vector: inserto), con una unidad de T4 ligasa (Promega). La mezcla se incubó a 4 °C toda la noche. Posteriormente, las células XL1-Blue MRF[®] fueron transformadas con la mezcla de ligación.

3.3.3.4 Transformación de células competentes

Las células competentes preparadas como se describió previamente, se descongelaron en hielo y se transfirieron 100 μ L de células a un tubo cónico de 15 mL estéril, se añadió 10 μ L de la mezcla de ligación descrita anteriormente, y se incubó en hielo por 30 min e inmediatamente en baño de María a 42 °C por un min, culminando con otra incubación en hielo por 2 min. Seguidamente se añadió 900 μ L de medio LB líquido precalentado a 42 °C y se incubó a 37 °C en agitación moderada a 200 rpm por una hora. Finalmente se sembró 100 μ L de la células transformadas en placas de Petri con agar LB con elantibiótico de selección (ampicilina 100 μ g/mL), y se incubó a 37 °C toda la noche. En los casos de transformación con ADN plasmídico se siguió el mismo protocolo solo que en vez de transformar con mezcla de ligación, se transformó con 1 μ L de ADN plasmídico puro.

3.3.3.5 Verificación de la clonación

Se realizó una PCR de colonias (Sheu y col., 2000) empleando como ADN molde colonias recombinantes crecidas en medio LB-Ampicilina, y cebadores específicos de la molécula (Tabla 1) y del vector de mantenimiento pGEM[®]-T *Easy* (Tabla 3), con la finalidad de verificar la incorporación del gen al vector. EL volumen final de reacción fue de 50 µL, y se realizó con la polimerasa *GoTaq[®] Flexi DNA polymerase* (Promega) la mezcla estuvo compuesta por: tampón de reacción *Green o Colorless GoTaq[®] Flexi Buffer* (Tris-HCl pH 9,0 50 mM; NaCl 50 mM), MgCl₂ (2 mM), desoxinucleótidos trifosfatos (0,2 mM), cebadores directo y reverso (1 µM) de cada uno, *GoTaq[®]* ADN polimerasa (1 U). Se tomó con una punta estéril el contenido de una colonia recombinante crecida en la plaga con agar LB y ampicilina, la cual se sumergió varias veces en la mezcla de reacción. Posteriormente con esta misma punta se sembró en una placa “máster” (agar LB/Ampicilina 100 µg/mL) para el mantenimiento de las células.

Tabla 3. Cebadores empleados para la verificación de los insertos clonados celularmente.

Cebador	Secuencia
Directo D	5´- GTA AAA CGA CGG CCA GT -3´
Reverso SP6	5´- GAT TTA GGT GAC ACT ATA G - 5´

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador automático C1000 *Thermal Cycler* (BioRad), siguiendo el programa que se describe a continuación en la tabla 4.

Tabla 4. Programa de amplificación de la PCR de colonias.

Evento	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	5	1
Desnaturalización	94	0,5	
Hibridación	50	0,5	30
Extensión	72	2	
Extensión final	72	7	1

Los productos de PCR fueron analizados por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (0,5 µg/mL), como se describió anteriormente.

3.3.3.6 Extracción de ADN plasmídico

Para la extracción del ADN plasmídico se empleó el método de precipitación salina – lisis alcalina (modificado de Qiagen). Se realizaron cultivos de las colonias recombinantes identificadas por PCR, en medio LB, incubados toda la noche a 37°C y en agitación continua a 200 rpm. Los cultivos fueron centrifugados a 14000 rpm durante 3 min, el sobrenadante obtenido se resuspendió en tampón 1 (Tris-HCl pH 8,0 50 mM; EDTA 10 mM, ARNasa 100 µg/mL) se mezcló en vortex y se incubó por 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió tampón 2 (NaOH 200 mM, SDS 1%) mezclando por inversión e incubando por 5 min a temperatura ambiente, seguidamente se añadió Tampón 3 (CH₃CO₂K pH 5,5 3M) se mezcló por inversión e incubó en hielo por 5 min. Inmediatamente, se centrifugó a 14.000 rpm por 10 min, se recuperó el sobrenadante y se precipitó en ADN con 0,7 volúmenes de isopropanol y un décimo de CH₃CO₂Na 3M pH 7, se mezcló en vórtex y nuevamente se centrifugó a 14.000 rpm por 30 min a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y se lavó el ADN con etanol al 70% centrifugando por 3 min a 14.000 rpm. Se descartó el sobrenadante, se dejó secar y se resuspendió el ADN en 25 µL de agua libre de nucleasas, se almacenó a -20°C hasta su uso.

3.3.4 Subclonación en vectores de expresión

3.3.4.1 Digestión enzimática

Para la subclonación de la secuencia en los diferentes vectores de expresión, se realizó una digestión con la finalidad de linealizar al vector de mantenimiento recombinante (pGEM[®]-T *Easy*-TcHSP85) y a los diferentes vectores de expresión a emplear (vector pRSET A, B, C; vector pCITE+4 a, b, c; vector pTrcHis2 A, B, C; vector pGEX-4T 1, 2, 3) y (Sambrook y col., 1989). Siguiendo el protocolo descritos por la casa comercial, se empleó 1µL (10U) de la enzima *EcoRI*, con su tampón correspondiente incubando en bloque térmico (Bioer Technology) a 37 °C durante toda la noche, la mezcla de reacción tuvo un volumen final de 20µL. En el caso del vector pQE30 fue necesario introducir a la secuencia las dianas para las enzimas de restricción *Bam*HI y *Kpn*I.

La inserción de las dianas se realizó mediante PCR usando como molde el ADN plasmídico pGEM[®] T-*Easy*-TcHSP85, y cebadores que contienen la diana para las enzimas de restricción (Tabla 5). La reacción de PCR y posterior purificación de las bandas de la secuencia con las dianas introducidas se realizó en las condiciones que fueron descritas anteriormente. La reacción de digestión de pQE30 y de la secuencia con las dianas para las

enzimas *Bam*HI y *Kpn*I se realizo empleando 1µL (10U) de cada enzima con su tampón correspondiente y bajo las mismas condiciones descritas anteriormente.

Tabla 5. Cebadores empleados para la amplificación del inserto y que contienen las dianas para las enzimas de restricción *Bam*HI y *Kpn*I.

Cebador	Secuencia
Directo TcHSP85DEF1	5'-GAG AGA <u>GGA TCC</u> ATG ACC GAG ACA TTC GCA TTC-3'
Reverso TcHSP85REF1	5'-GAG AGA <u>GGT ACC</u> CTA GTC AAC CTG CTC CAT GCT-3'

3.3.4.2 Desfosforilación de vectores de expresión

Para evitar la recirculación de los vectores de expresión se realizó la reacción de desfosforilación, empleando la enzima fosfatasa alcalina de intestino de carnero (CIAP) (Promega). Se empleó 20 µL de los vectores digeridos (volumen completo de digestión), 1 U de enzima en su tampón de reacción (Tris-HCl pH 9,3 50mM; MgCl₂ 1mM, ZnCl₂ 0,1mM, Espermidina 1mM), para un volumen final de 100µL se incubó en un bloque térmico (Bioer Technology) a 37°C por 30min.

3.3.4.3 Reacción de ligación

Una vez realizadas las reacciones de digestión y desfosforilación de todos los vectores de expresión estos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, con la objeto de verificar la linealización de los plásmidos y se purificaron las bandas obtenidas en los geles de agarosa siguiendo el protocolo descrito anteriormente. De igual manera se purificó el inserto digerido.

Luego de la purificación se procedió a ligar el inserto con los vectores de expresión en las proporciones inserto:vector 3:1, y 5:1. La ligación se realizó con una unidad de T4 ligasa (Promega). La mezcla se incubó a 4 °C toda la noche. Posteriormente, las células XL1-Blue MRF⁺ fueron transformadas con la mezcla de ligación.

Las células transformadas con las mezclas de ligación de los diferentes vectores fueron cultivadas en medio LB suplementado con el antibiótico de selección según el plásmido empleado. A las colonias obtenidas se les realizó PCR de colonias como fue descrito

anteriormente para verificar la presencia del inserto. Finalmente se realizó extracción de ADN plasmídico a las colonias positivas, siguiendo el metodología descrita previamente.

Adicionalmente, se realizó la misma metodología de subclonación pero en ciego, es decir, sin verificar por PCR la presencia del inserto, eso solo en el caso del inserto con las dianas *BamHI* y *KpnI*, empleando el vector de expresión pQE30. Esto se realizó con la finalidad de disminuir el tiempo del proceso de subclonación, que en el caso de construcciones (plásmido-inserto) inestables, mientras mayor es el tiempo, las probabilidades de eliminación de la construcción por parte de la bacteria son mayores.

3.3.5. Inducción y expresión de TcHsp85 en sistema procariota

Se partió de colonias de células de expresión transformadas, se cultivaron en medio LB con el antibiótico de selección para el plásmido y se dejaron crecer a 37 °C en agitación moderada 200 rpm por 4 horas (DO_{600nm} 0,5-1). Una vez alcanzada la densidad celular deseada se tomó una alícuota de control de cultivo no inducido, y seguidamente se añadió el agente inductor IPTG a una concentración de 1 mM. Luego se incubó por 3 horas bajo las mismas condiciones tomando una alícuota a cada hora transcurrida del cultivo inducido. El resto del cultivo y las alícuotas fueron centrifugados a 14000 rpm por 3 min, y los sedimentos se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

3.3.6 Purificación de la proteína de fusión mediante cromatografía de afinidad

La purificación de la proteína recombinante TcHSP85 se realizó en condiciones nativas a partir de los sedimentos celulares lisados. Para ello los sedimentos fueron resuspendidos en PBS, realizando lisis celular mediante tres ciclos de congelación/descongelación (N₂ líquido ó -80 °C/37 °C) y sonicación (3 ciclos de 20 segundos durante 3 min, pulsos discontinuos) (Sonicador Fisher Scientific). Posteriormente, se centrifugó el lisado celular a 3000 rpm por 15 min a 4 °C. El sobrenadante se purificó por cromatografía de afinidad utilizando una columna de níquel (Ni-NTA Spin kit, Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las proteínas de fusión se eluyeron con tampón de elución (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 300 mM).

3.3.7 Determinación de la concentración proteica

La determinación de la concentración de la proteína recombinante TcHSP85 se realizó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) por reacción colorimétrica basada en el empleo de *Coomassie Blue* (Pierce, *Protein Assay Kit*), se usaron patrones de seroalbúmina bovina con concentraciones de 50, 100, 125 y 200 µg/mL para realizar la curva de calibración, se empleó solución salina como blanco, se realizaron lecturas de las absorbancias a una longitud de onda de 595 nm.

3.3.8 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)

Las alícuotas de controles no inducidos e inducidos fueron analizadas en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 10% para comprobar la expresión del gen.

La electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) se realizó en condiciones desnaturalizantes según Laemmli (1970) en gel de fraccionamiento al 10% y gel de empaquetamiento al 4,5% a 15 mA. Tras fraccionar la muestra, el gel se tiñó con *Comassie blue*- Plata (De Moreno y col., 1985) durante 45 min, luego se colocó en solución de desteñido hasta la visualización de las bandas nítidas. Se comparó el peso molecular (PM) de las proteínas expresadas con el marcador de PM *Broad Range Proteina Molecular Weigth Markers* (Promega).

3.3.9 Transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa y revelado inmunoenzimático (“Western blot”)

-Transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa

Después de separadas las proteínas mediante electroforesis, estas fueron transferidas a membrana de nitrocelulosa según Towbin y col., (1979) empleando un sistema húmedo y el equipo Mini Trans-Blot® Cell (BioRad). Para ello, se colocaron dos esponjas y dos papeles de filtro del tamaño del gel, impregnado en tampón de transferencia y la membrana de nitrocelulosa, y el gel se colocó sobre la membrana. Luego se dispusieron de igual forma dos papeles de filtro y una esponja igualmente impregnados con el tampón y se transfirió a 100 mA durante una hora a 4 °C.

-Inmunodetección de proteínas sobre membrana de nitrocelulosa

Luego de haber transcurrido la transferencia, la membrana de nitrocelulosa se incubó en solución de bloqueo (PBS 0,15M pH 7,2, leche descremada 7,5%) durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente se incubó con el suero hiperinmune de conejo Anti-Epi (contra epimastigotes de *T. cruzi*) en una dilución 1/1500 en solución de reacción (PBS 0,15M pH 7,2, NaCl 150mM, Tris-HCl 10mM pH 7,4) durante 90 min a 37 °C, seguidamente se realizaron ocho lavados de 5 min cada uno con la solución de lavado (PBS 0,15M pH 7,2, Tween 20 0,1%) y posteriormente se incubó con el conjugado anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa a una dilución de 1/3000 en solución de reacción (PBS 0,15M pH 7,2, NaCl 150mM, Tris-HCl 10mM pH 7,4) y bajo las mismas condiciones antes descritas, luego se repitieron los lavados.

-Revelado

La visualización de los complejos inmunes se realizó mediante quimioluminiscencia incubando la membrana con la mezcla proporcionada por el estuche comercial Super Signal® West pico (Pierce) durante un minuto en oscuridad y revelado empleando placa fotográfica según instrucciones del fabricante con un tiempo de exposición de tres minutos.

CAPITULO IV

4. RESULTADOS

El propósito del presente estudio fue clonar el gen codificante de la proteína de choque térmico Hsp85 de *T. cruzi*. Debido al tamaño de la molécula y por ser muy conservada en la escala evolutiva se tuvieron que emplear diferentes estrategias en la subclonación y expresión del gen. A continuación se presentan los resultados de cada estrategia.

4.1 Extracción del ARN de epimastigotes de *T. cruzi*

Se obtuvo el ARN de *T. cruzi* a partir de masas de epimastigotas de la cepa MHOM/VE/2007/EPm6 cultivados en medio LITB, se realizaron cuatro extracciones a partir de masas de epimastigotas de $1,5 \times 10^9$ parásitos: dos extracciones con el estuche comercial Sigma, y dos con el estuche comercial de FavorPrep™ resultando ser mejor la extracción con el estuche comercial *Viral Nucleic Acid Extraction Kit 1* (FavorPrep™) Modificado, como se evidencia por el grado de pureza (A260/280) (Tabla 6), y las bandas visualizadas en la figura 8.

Tabla 6. Densidades ópticas y concentraciones de muestras de ARN extraídas con diferentes estuches comerciales.

Método de Extracción	Muestra	Absorbancia 260	Absorbancia 280	A260/280	Concentración (µg/mL)
TRI® Reagent (Sigma)	ARN 1	0,2583	0,1824	1,4	516,6
	ARN 2	0,1997	0,1601	1,24	399,4
Viral Nucleic Acid Extraction Kit (FavorPrep™)	ARN 3	0,1853	0,0959	1,93	370,6
	ARN 4	0,1783	0,896	1,98	356,6

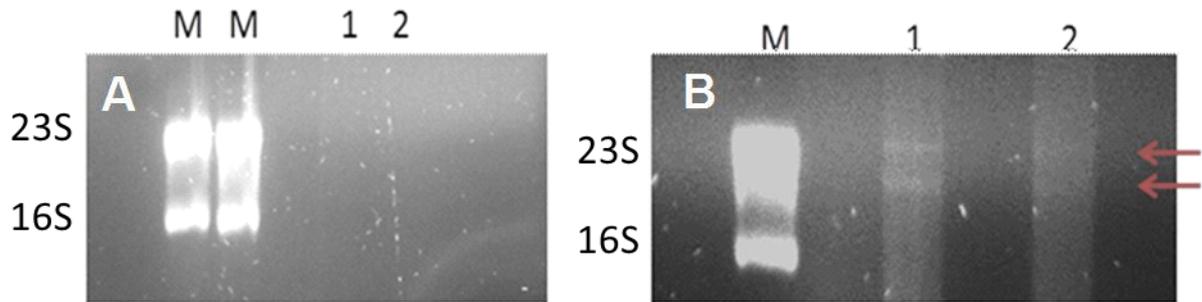


Figura 8. ARN de *T. cruzi* extraído de masas de epimastigotas en gel de agarosa al 1,2% con bromuro de etidio (0,5µg/mL). **A** con el Kit TRI[®]Reagent (Sigma) Modificado. (**M**: Marcador ARN ribosomal de *E. coli*, **1**: Muestra de ARN 1, **2**: Muestra ARN 2) **B** con *Viral Nucleic Acid Extraction Kit 1* (FavorPrep[™]) Modificado. (**M**: Marcador de *E. coli*, **1**: Muestra de ARN 3, **2**: Muestra de ARN 4).

4.2 Obtención del ADN complementario (ADNc) codificante de Hsp85 mediante RT-PCR

Mediante RT-PCR se obtuvo el ADNc con un tamaño aproximado a 2150 pb la cual se corresponde con el tamaño esperado de la molécula *hsp85* de *T. cruzi*. La figura 9 muestra las bandas obtenidas mediante RT-PCR a partir de las muestras de ARN extraídas con los diferentes estuches comerciales. Se demuestra no solo la amplificación de una banda con tamaño aproximado a la molécula de *hsp85* de *T. cruzi*, sino que además, se puede observar una banda con un tamaño aproximado de 700 pb (canales 1,2 ,6 y 9), que pudiese ser una molécula truncada.

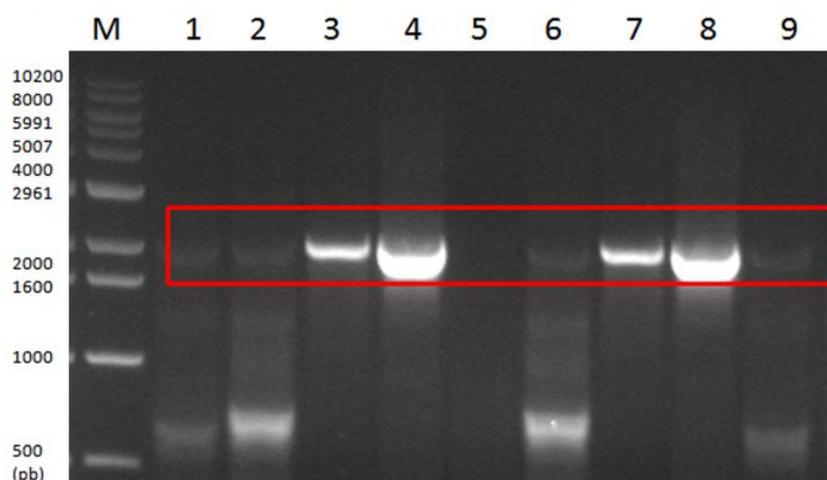


Figura 9. ADN complementario de *T. cruzi* en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (0,5µg/mL). (**M**: Marcador de 1Kb DNA Ladder Bioneer, **1 y 9**: Productos de RT-PCR (*ARN1*), **2 y 6**: Productos de RT-PCR (*ARN2*), **3 y 7**: Productos de RT-PCR (*ARN3*), **4 y 8**: Productos de RT-PCR (*ARN4*) **5**: Control negativo).

4.3 Clonación del ADNc de *hsp85* en el vector de mantenimiento

Las bandas de ADNc fueron cortadas del gel y purificadas, se determinó su concentración espectrofotométricamente. La clonación del ADNc codificante de Hsp85 se realizó mediante la estrategia de ligación del vector de mantenimiento pGEM[®]T *Easy* con el ADNc purificado ya que este es un vector para la clonación directa de productos de PCR.

Luego de la reacción de ligación con el vector de mantenimiento pGEM[®]T-*Easy* y posterior transformación de células competentes XL1 Blue-MRF⁺, se obtuvieron 8 colonias (Tabla 7), las cuales se verificaron por PCR de colonias empleando los cebadores del vector de mantenimiento (datos no mostrados).

Tabla 7. Número de colonias que crecieron en agar LB/ampicilina, después de la transformación de las células de *E. coli* con las construcciones en pGEM[®]T *Easy*.

Células	Ligación (Inserto/Vector)	Nº de colonias
XL1B MRF ⁺	pGEM [®] T <i>Easy</i> -ADNc 3/1	05
XL1B MRF ⁺	pGEM T <i>Easy</i> -ADNc 5/1	03
Total de colonias recombinantes		8

4.4 Subclonación del ADNc de *hsp85* en diferentes sistemas de expresión (pREST, pCITE, pTrcHis2, pGEX4T)

Para la subclonación en los diferentes vectores de expresión se realizaron las extracciones de ADN plasmídico de las colonias recombinantes con el vector de mantenimiento pGEM[®]-T *Easy* donde está clonado *hsp85* (pGEM[®]-T *Easy-hsp85*) y de las colonias recombinantes que contienen los vectores de expresión pRSET A, B, C, pCITE 4a, 4b, 4c, pTrcHis 2A, 2B, 2C (Figura 10) y pGEX4 T1, T2, T3 (Figura 11) en donde se evidencian bandas características de ADN plasmídico en sus formas superenrollada y relajada.

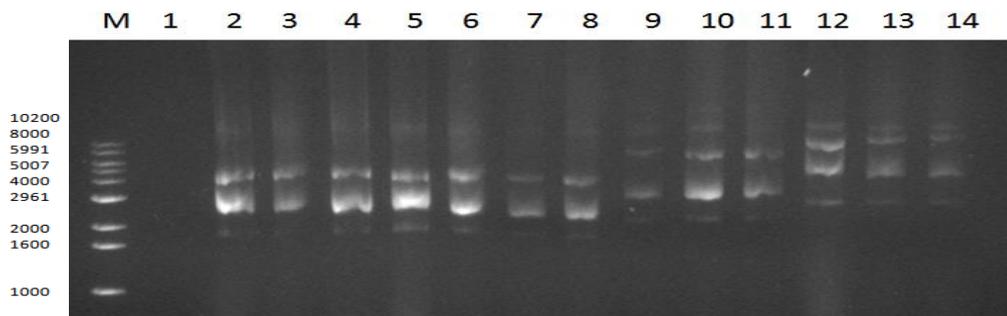


Figura 10. ADN plasmídico pGETM[®]T- *Easy-hsp85* y diferentes vectores de expresión en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (0,5µg/mL). (M: Marcador de 1Kb DNA Ladder Bioneer, 2-6: pGEM[®]-T *Easy-hsp85*, 7: pREST A, 8: pRSET B, 9: pCITEa, 10: pCITEb, 11: pCITEc, 12: pTrcHis2A, 13: pTrcHis2B, 14: pTrcHis2C).

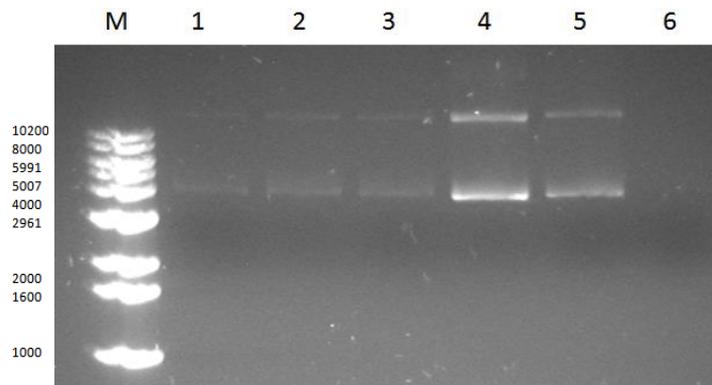


Figura 11. ADN plasmídico pGETM[®]T- *Easy-hsp85* y vector de expresión pGEX4-T en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (0,5µg/mL). M: Marcador de 1Kb DNA Ladder Bioneer, 1: pGEX 4T-1, 2: pGEX4T-2, 3: pGEX4T-3, 4-6: pGEM T *Easy-hsp85*.

Posterior a la extracción del ADN plasmídico, se sometió a digestión con la enzima *EcoRI* (Figura 12) que permite liberar el inserto de 2150 pb en el caso de pGEM[®] T- *Easy-hsp85* (por tener dos dianas *EcoRI* en el sitio de policlonaje, delimitando el inserto) y permite linealizar los diferentes vectores de expresión.

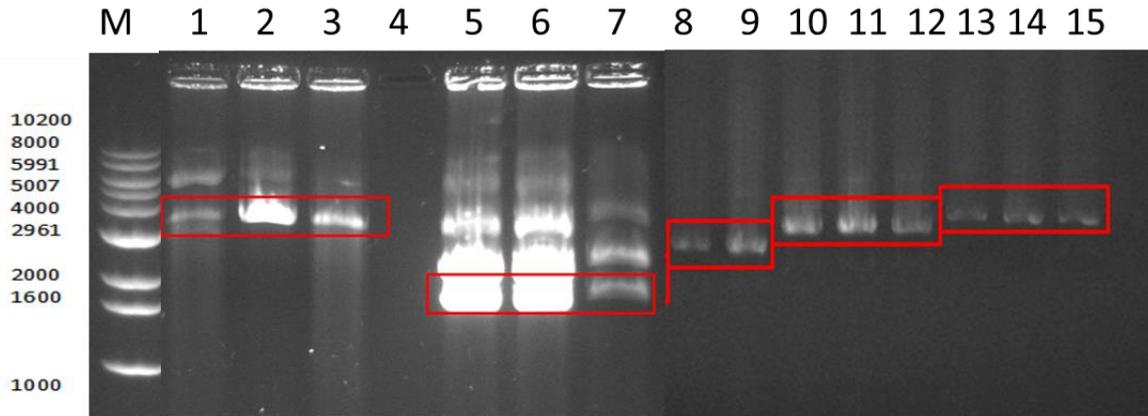


Figura 12. ADN plasmídico digerido con *EcoRI* en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (0,5µg/mL). **M:** Marcador de 1Kb DNA Ladder Bioneer, **1:** pGEX 4T-1, **2:** pGEX 4T-2, **3:** pGEX 4T-3, **5-7:** pGEM T Easy-*hsp85*, **8:** pREST A, **9:** pRSET B, **10:** pCITEa, **11:** pCITEb, **12:** pCITEc, **13:** pTrcHis2A, **14:** pTrcHis2B, **15:** pTrcHis2C.

Los vectores digeridos y desfosforilados fueron ligados con el inserto digerido, y con estas mezclas de ligación se transformaron células competentes XL1 Blue-MRF^r, obteniendo un total de 15 colonias recombinantes (Tabla 8).

Tabla 8. Número de colonias que crecieron en agar LB/ampicilina, después de la transformación de las células de *E. coli* con las construcciones en los diferentes de vectores de expresión

Células	Plásmido	Nº de colonias
XL1B MRF ^r	pRSET A- <i>hsp85</i>	3
XL1B MRF ^r	pRSET B- <i>hsp85</i>	3
XL1B MRF ^r	pCITEa- <i>hsp85</i>	0
XL1B MRF ^r	pCITEb- <i>hsp85</i>	0
XL1B MRF ^r	pCITEc- <i>hsp85</i>	0
XL1B MRF ^r	pTrcHis2A- <i>hsp85</i>	3
XL1B MRF ^r	pTrcHis2B- <i>hsp85</i>	3
XL1B MRF ^r	pTrcHis2C- <i>hsp85</i>	3
XL1B MRF ^r	pGEX4T1- <i>hsp85</i>	0
XL1B MRF ^r	pGEX4T2- <i>hsp85</i>	0
XL1B MRF ^r	pGEX4T3- <i>hsp85</i>	0
	Total	15

Las colonias recombinantes fueron verificadas mediante PCR de colonias (resultado no mostrado), y a partir de ellas se extrajo el ADN plasmídico sin embargo, en ningún caso se obtuvo. Se sospecha que las bacterias pudieron haber eliminado el plásmido de su interior por ser inestable. Por lo tanto no se llegó a realizar la transformación de las células de expresión BL21 (DE3).

En vista de los resultados obtenidos, se realizó nuevamente extracción de ADN plasmídico del vector de mantenimiento pGEM[®]-T *Easy- hsp85*, para corroborar la ligación del inserto con el vector de mantenimiento. En la figura 13 se observa el ADN plasmídico pGEM[®]-T *Easy- hsp85*, en buena cantidad en todos los casos.

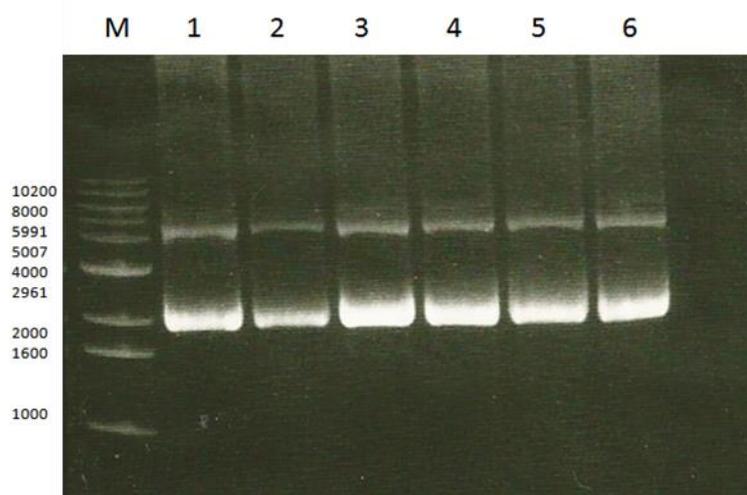


Figura 13. ADN plasmídico pGEM[®]-T-*Easy- hsp85* en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (0,5µg/mL). (M: Marcador de 1 Kb DNA Ladder Bioneer, 1-6: pGEM[®]-T-*Easy- hsp85*).

Con el propósito de verificar la presencia del inserto, se realizó una PCR empleando como molde los ADN plasmídicos extraídos y cebadores correspondientes a *hsp85*, evidenciando que si hubo ligación del inserto con el vector de mantenimiento por la visualización de una banda con un tamaño aproximado de 2150 pb en todos los casos (Figura 14).

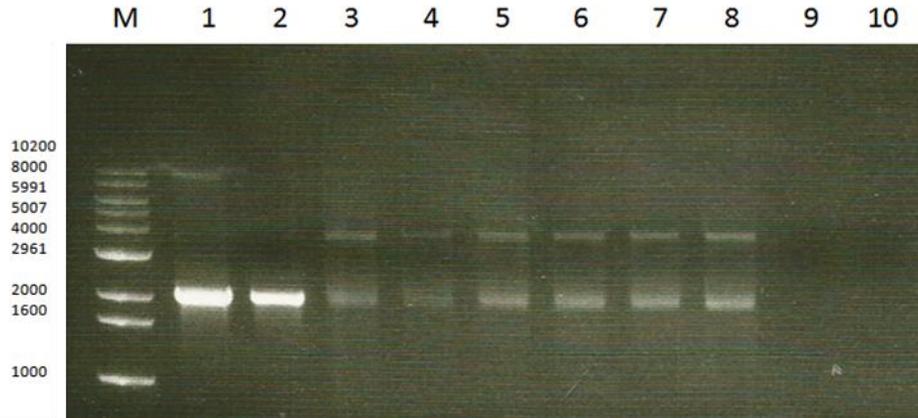


Figura 14. Productos de PCR Hsp85 en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (0,5µg/mL). (**M:** Marcador de 1Kb DNA Ladder Bioneer, **1-2:** ADNc *hsp85* purificados controles, **3-8:** ADN plasmídico pGEM[®]T-*Easy-hsp85*, **9-10:** Controles negativos).

4.5 Subclonación del ADNc de *hsp85* en el vector de expresión pQE30

Debido a que los plásmidos de expresión comerciales utilizados anteriormente son modernos y complejos, por tener muchas secuencias adicionales (para múltiples fines) a los plásmidos mas tradicionales, quizás la construcción con un inserto grande como *hsp85* (2150 pb) sea inestable para la célula y por eso pudo haber eliminado el plásmido. Se decide utilizar un plásmido comercial antiguo (tradicional) y sencillo como pQE30, además, de ser el plasmido utilizado en la expresión de la molécula Hsp85 de *Leishmania infantum* (Angel y col., 1996).

Considerando los resultados de la PCR de verificación realizado al ADN plasmidico pGEM[®]T *Easy-hsp85*, se realizó una amplificación de *hsp85* introduciendo las dianas *Bam*HI y *Kpn*I, para ello se empleó como molde el ADN plasmídico pGEM[®]T *Easy-hsp85*, empleando 10 y 20 ng y se obtuvieron bandas correspondientes al tamaño esperado de 2150 pb (Figura 15).

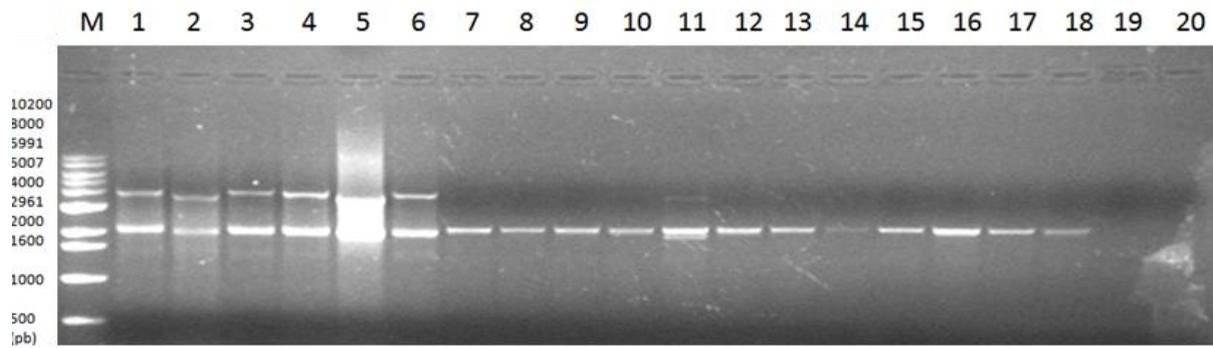


Figura 15. ADN plasmídico pGEM[®]T-*Easy-hsp85* y sus productos de PCR en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (0,5µg/mL). (M: Marcador de 1Kb DNA Ladder Bioneer, **1-6:** pGEM[®]T-*Easy-hsp85*, **7-12:** Productos de PCR utilizando como molde pGEM[®]T-*Easy-hsp85* 10 ng, **13-18:** Productos de PCR utilizando como molde pGEM[®]T-*Easy-hsp85* 20 ng, **19-20:** Controles negativos).

Dichos productos fueron cortados del gel y purificados, posteriormente concentrados y reunidos en cuatro alícuotas, las cuales fueron digeridas con *Bam*HI y *Kpn*I para su ligación a pQE30 (Figura 16).

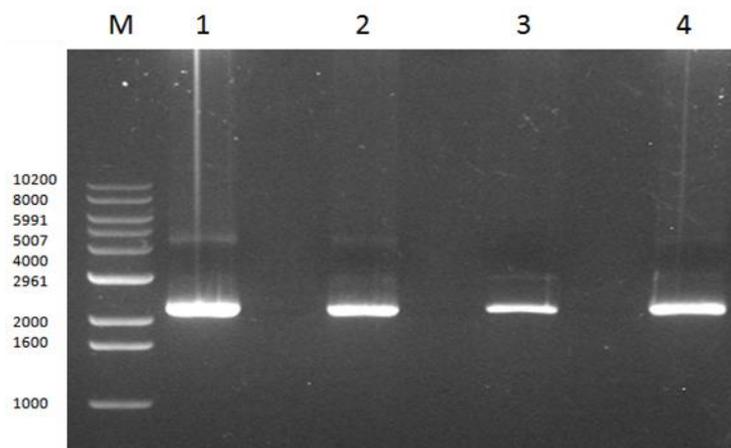


Figura 16. HSP85 purificado y digerido con *Bam*HI y *Kpn*I en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (0,5µg/mL). (M: Marcador de 1Kb DNA Ladder Bioneer, **1-4:** *hsp85* digerido con *Bam*HI y *Kpn*I).

Con el inserto *hsp85* digerido y purificado y el vector de expresión pQE30 digerido desfosforilado y purificado se realizó la reacción de ligación. Posteriormente, se transformaron las células competentes XL1 Blue-MRF[™] con las mezclas de ligación (2 reacciones, 1 y 2) y se sembraron en placas de LB/ampicilina, obteniéndose 10 colonias recombinantes (Tabla 9).

Tabla 9. Número de colonias que crecieron en agar LB/ampicilina, después de la transformación de las células de *E. coli* con la mezcla de ligación pQE30- *hsp85*.

Células	Plásmido	Nº de colonias
XL1B-MRF ⁺	pQE30- <i>hsp85</i> -1	6
XL1B-MRF ⁺	pQE30- <i>hsp85</i> -2	4
Total de colonias		10

Para verificar la ligación de pQE30 con el inserto, se realizó una PCR de colonias con los cebadores del vector, de la cual no se obtuvo amplificación del inserto en ninguna de las colonias, solamente se obtuvo amplificación en el control positivo de la molécula H11b de *Taenia solium* clonada en pQE30 (datos no mostrados), por lo tanto no se obtuvieron colonias recombinantes.

Para tratar de confirmar este resultado, se hizo la extracción del ADN plasmídico de las colonias obtenidas y se realizó un ensayo de digestión con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Kpn*I, y mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% se comparó el ADN plasmídico digerido y sin digerir, comprobando que no hubo presencia del inserto en ningún caso (Figura 17).

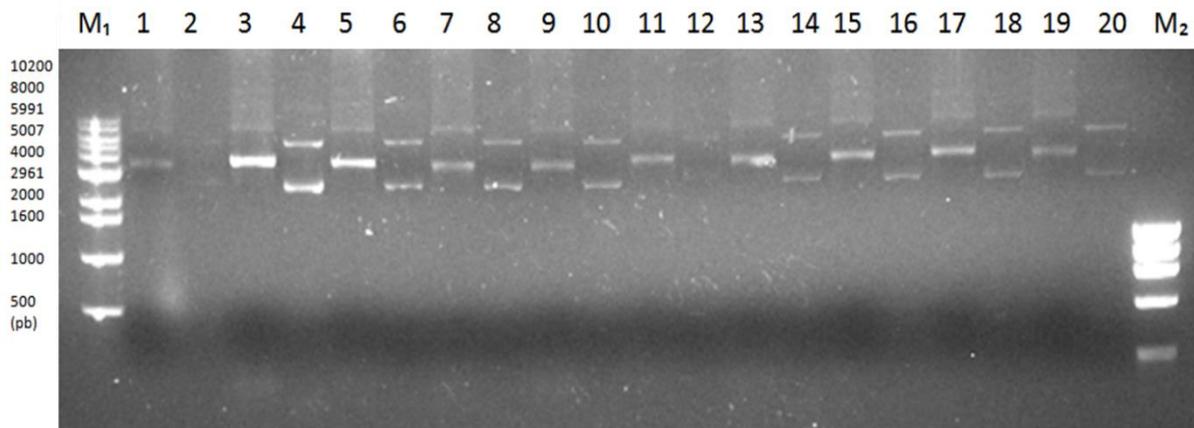


Figura 17. ADN plasmidico de las colonias obtenidas, digerido con *Bam*HI y *Kpn*I y sin digerir, en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (0,5µg/mL). (**M₁**: Marcador de 1Kb *DNA Ladder* Bioneer. Carriles **1,3,5,7,9,11,13,15,17,19**: ADN plasmídicos digeridos con *Bam*HI y *Kpn*I, carriles **2,4,6,8,10,12,14,16,18,20**: ADN plasmídicos sin digerir. **M₂**: Marcador *DNA Molecular Weight Marker IX* 72-1353 bp (Roche).

4.6 Subclonación del ADNc de *hsp85* “a ciegas” en pQE30

Con la premisa de que quizás la construcción de un plásmido con un inserto grande como *hsp85* (2150 pb) aún en pQE30 sea inestable para la célula y por eso pudo haber eliminado el inserto, en este caso, se decide hacer la subclonación en el mismo plásmido pero “en ciego”, sin verificar los pasos de subclonación, de manera de no darle tiempo a la bacteria de expulsar el inserto o el plásmido.

Para ello, se realizó una nueva RT-PCR con cebadores de TcHsp85 para introducir las dianas para las enzimas de restricción *Bam*HI y *Kpn*I a partir del ARN extraído con el estuche comercial FavorPrep™ y se obtuvo un ADNc con tamaño aproximado de 2150 pb en todos los casos (Figura 18).

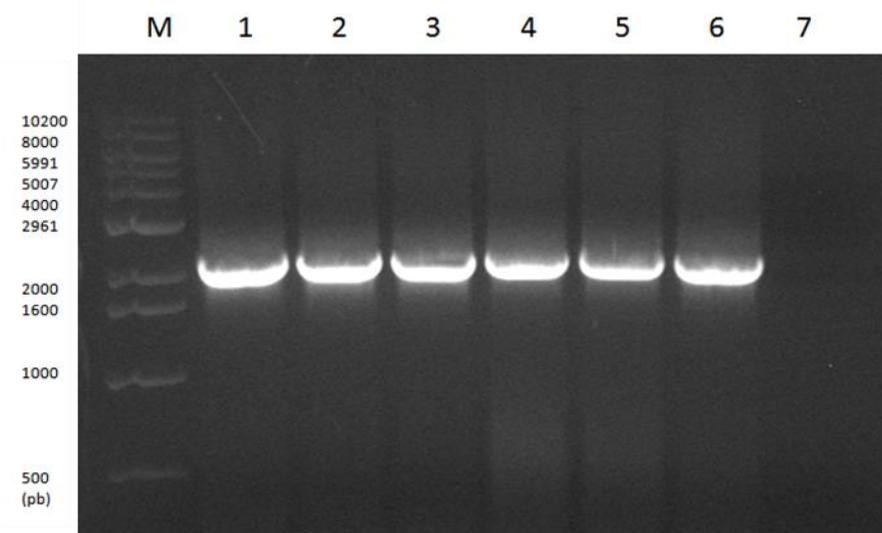


Figura 18. ADNc de *T. cruzi* con dianas para *Bam*HI y *Kpn*I en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (0,5µg/mL). (M: Marcador de 1Kb DNA Ladder Bioneer (500µL/130ng/µL), 1-6: Productos de RT-PCR (ARN extraído con *Viral Nucleic Acid Extraction Kit 1* (FavorPrep™) Modificado, 7: Control negativo).

Por tratarse de una estrategia en ciego, se purificaron los productos obtenidos de la RT-PCR, se digirieron y se ligaron con el vector pQE30 previamente digerido, desfosforilado y purificado, y con la mezcla de ligación se transformaron células competentes XL1Blue-MRF⁺, obteniéndose 2 colonias (Tabla 10).

Tabla 10. Número de colonias que crecieron en agar LB/ampicilina, después de la transformación de las células de *E. coli* con la mezcla de ligación pQE30- *hsp85* (Subclonación en “ciego”).

Células	Plásmido	Nº de colonias
XL1B-MRF ⁺	pQE30- <i>hsp85</i> -1	1
XL1B-MRF ⁺	pQE30- <i>hsp85</i> -2	1
Total de colonias		2

Estas colonias no fueron verificadas por PCR y se les realizó extracción de ADN plasmídico (Resultado no mostrado) y se transformaron células competentes de expresión *E. coli* M15 con estos ADN plasmídicos (“pQE30-*hsp85*”) obteniendo un total de 160 colonias (Tabla 11).

Tabla 11. Número de colonias que crecieron en agar LB/ampicilina, después de la transformación de las células de *E. coli* con el ADN plasmídico purificado pQE30-*hsp85*.

Células	Plásmido	Nº de colonias
M15	pQE30-TcHSP85-1	80
M15	pQE30-TcHSP85-2	80
Total de colonias		160

4.7 Expresión del gen codificante de Hsp85 de *T. cruzi* en células *E. coli*

Para la expresión del gen se indujeron las células transformadas M15 con IPTG, se tomaron alícuotas de control de células no inducidas y posteriores a 1, 2 y 3 horas de inducción, y se analizaron en gel de acrilamida teñido con Coomassie – Plata. El tamaño esperado de la proteína recombinante según la secuencia aminoacídica deducida es de 80,7 kDa + 1 kDa de la cola de histidinas, por lo que se esperaría un peso molecular de casi 83 kDa. En la figura 21 se evidencia en la muestra dos la expresión discreta de una proteína de aproximadamente 83 kDa, a la segunda y un poco mayor a la tercera hora. Adicionalmente, se observan bandas que no están en el control sin inducir y que aparecen a la segunda y tercera hora post-inducción, quizás se trate de formas truncadas de la proteína, que la bacteria tienda a eliminar.

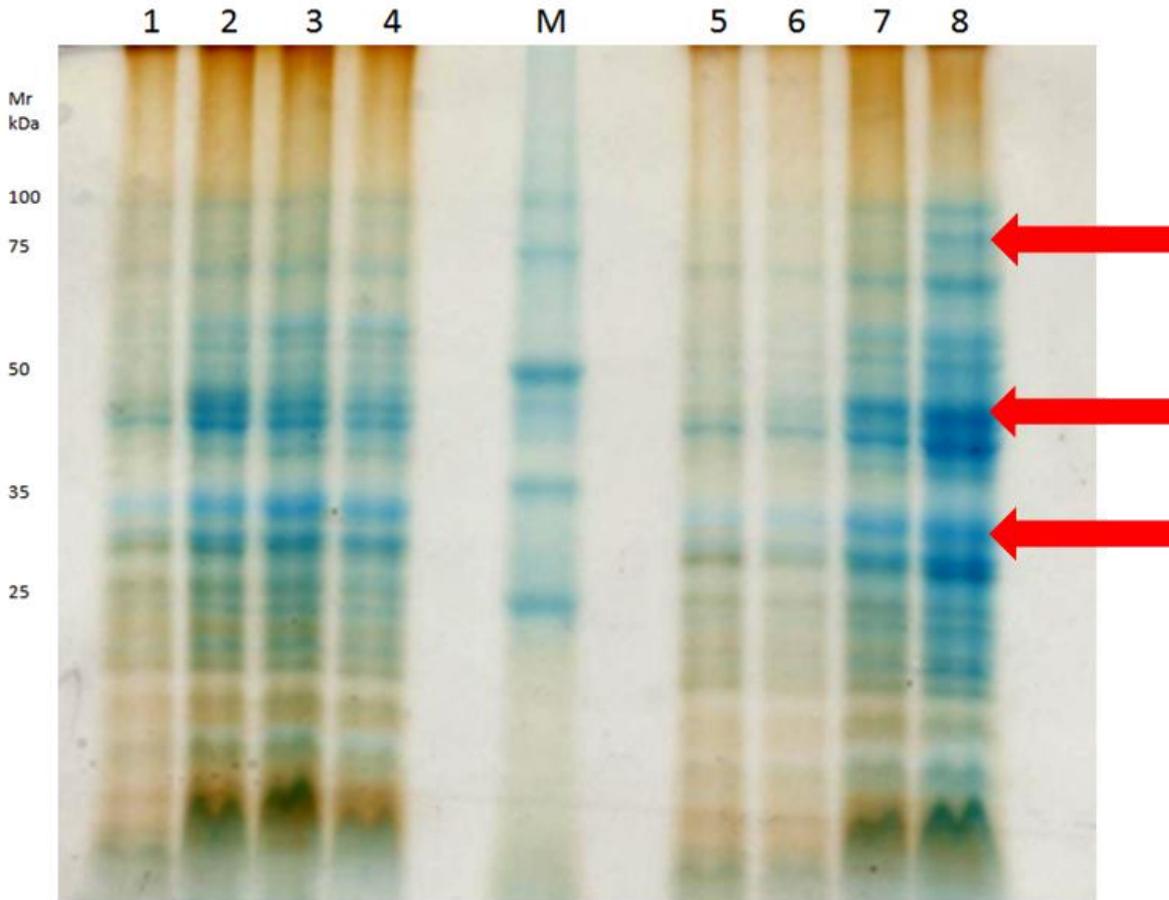


Figura 19. Inducción de la expresión del gen codificante de la proteína recombinante Hsp85 de *T. cruzi* en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%). El gel fue teñido con Coomassie – Plata. (1-4: Muestra 1 Sin inducción, 1h de inducción, 2h de inducción, 3h de inducción, respectivamente M: Marcador *Broad Range Protein Molecular Weight Markers* (Promega), 5-8: Muestra 2 Sin inducción, 1h de inducción, 2h de inducción, 3h de inducción, respectivamente).

4.8 Purificación e identificación de la proteína recombinante Hsp85

La proteína recombinante fue purificada por cromatografía de afinidad, a partir de los cultivos inducidos a las 3 horas con IPTG. Se analizó mediante gel de poliacrilamida, cada una de las fracciones obtenidas por cromatografía así como el sedimento, y el sobrenadante antes y después de pasar por la columna de níquel Ni-NTA. Como se observa en la figura 22 la proteína esperada se evidencia de forma discreta en las muestras previas (sedimento, sobrenadante antes y después de pasar por la columna y lavado). En las fracciones de elución no se observa de forma nítida, sin embargo, aparece numerosas bandas que pudiese ser formas truncadas de la molécula o proteínas de la bacteria arrastradas en la elución.

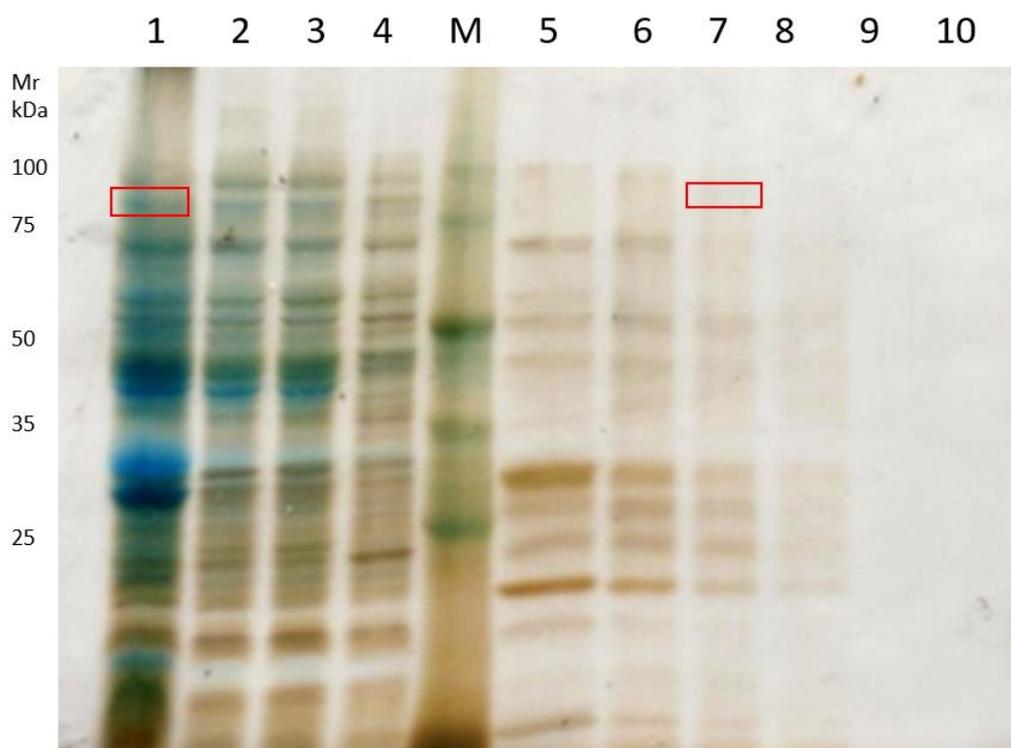


Figura 20. Purificación de la proteína recombinante Hsp85 de *T. cruzi* en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%). El gel fue teñido con Coomassie – Plata. (**1:** Sedimento, **2:** Sobrenadante antes de pasar por la columna, **3:** Sobrenadante después de pasar por columna, **4:** Lavado, **M:** Marcador *Broad Range Protein Molecular Weight Markers* (Promega), **5:** Fracción 1, **6:** Fracción 2, **7:** Fracción 3, **8:** Fracción 4, **9:** Lavado 1, **10:** Lavado 2.

De todos modos, aunque no notable, se confía en que haya aunque poca, algo de la proteína, por lo que se decide hacer *Wester blot* para lo cual se hizo la determinación de la concentración proteica de las fracciones de elución, como se muestra en la tabla 12.

Tabla 12. Determinación de la concentración proteica de las fracciones de elución obtenidas de la purificación de HSP85 mediante cromatografía de afinidad.

Muestra	Dilución	Lectura	Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
Blanco	-	0,626	-
Patrón 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	-	0,047	-
Patrón 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	-	0,107	-
Patrón 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$	-	0,129	-
Patrón 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$	-	0,165	-
Fracción 1 Muestra 1	1:2	0,083	0,17
Fracción 1 Muestra 2	1:2	0,071	0,148
Fracción 1 Muestra 3	1:2	0,078	0,162
Fracción 1 Muestra 4	1:2	0,065	0,135

Para la identificación de la proteína recombinante se hizo electroforesis (SDS-PAGE 10%) de las fracciones obtenidas de la purificación de la proteína recombinante Hsp85 de *T. cruzi* teñido con Plata (Figura 21) y posteriormente se realizó electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa de las fracciones obtenidas en la purificación por cromatografía de afinidad.

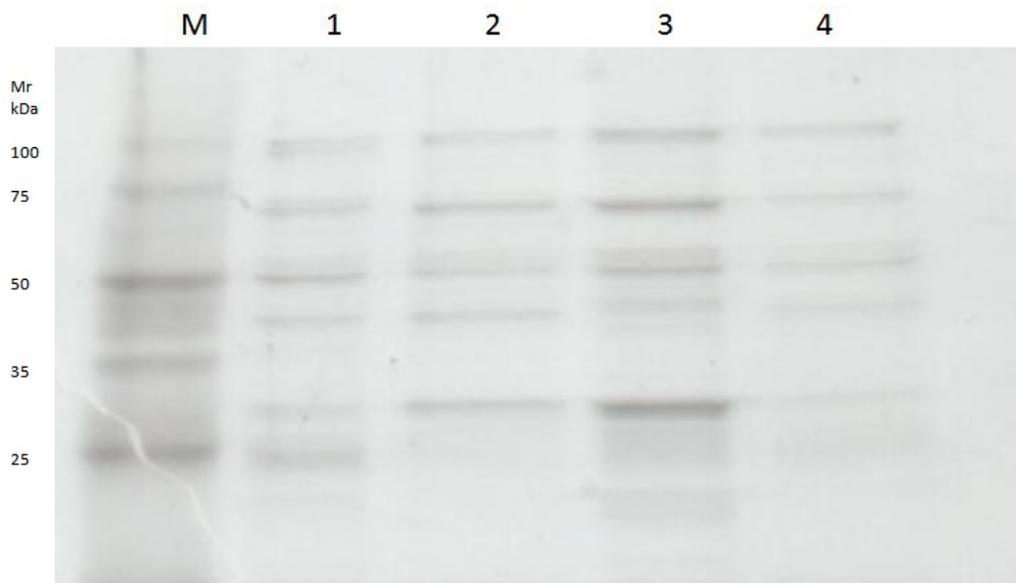


Figura 21. Electroforesis (SDS-PAGE 10%) de las fracciones obtenidas de la purificación de la proteína recombinante HSP85 de *T. cruzi* teñido con Plata. (**M**: Marcador *Broad Range Protein Molecular Weight Markers* (Promega), **1-4**: Fracciones de elución).

La membrana de nitrocelulosa fue incubada con suero hiperinmune de conejo anti-Epiastigotes de *T. cruzi*, posterior al revelado con luminol se evidencia una reacción específica con la proteína recombinante (Figura 22)

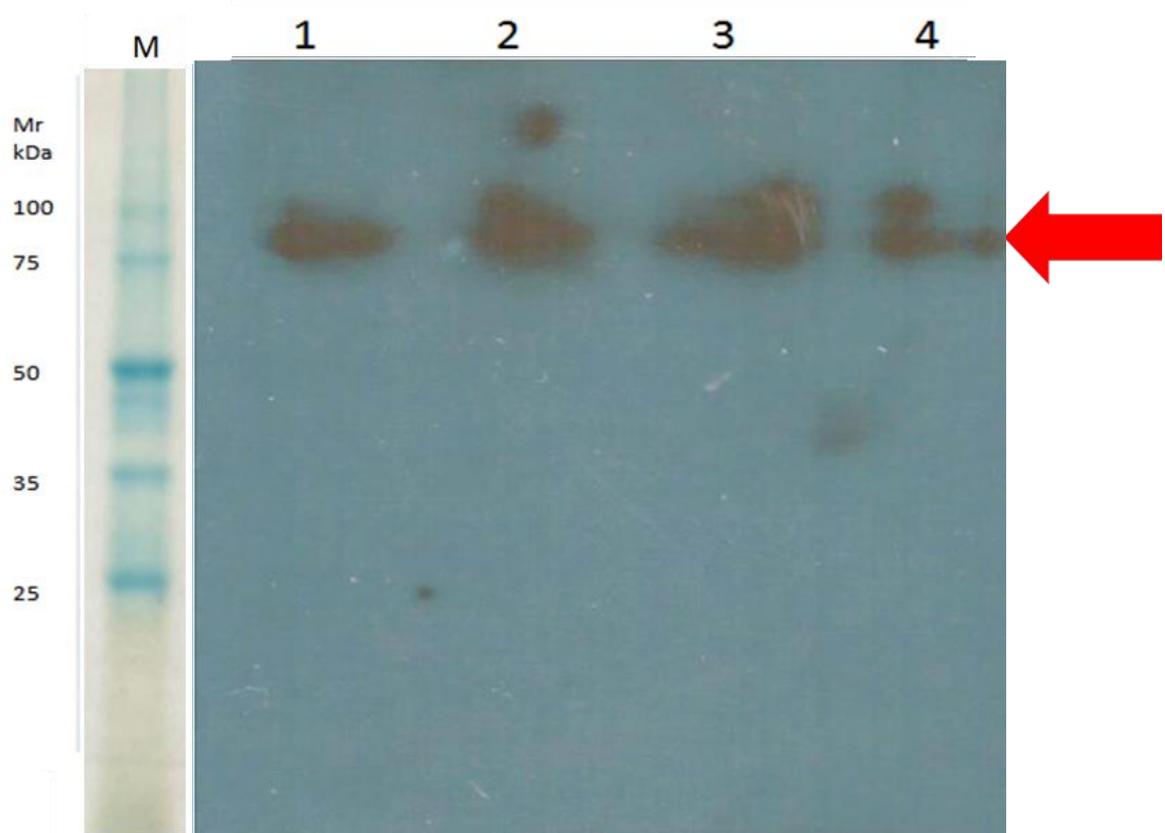


Figura 22. Inmunodetección de la proteína recombinante Hsp85 de *T. cruzi* en las fracciones obtenidas de la purificación. Revelado con luminol, tiempo de exposición 3min (**M**: Marcador *Broad Range Protein Molecular Weight Markers* (Promega), **1-4**: Fracciones).

CAPITULO V

5.1. DISCUSION

La clonación de genes y su expresión como proteínas recombinantes permite el estudio tanto de dichos genes como de las proteínas que codifican y su utilización como herramientas en ensayos que permitan dilucidar los mecanismos celulares en los cuales estén involucrados. En el presente trabajo se logró clonar y expresar por primera vez el gen codificante de la proteína de choque térmico Hsp85 de *T. cruzi*. Hasta la fecha, sólo se había reportado en tripanosomatídeos la clonación y expresión del gen codificante de Hsp83 en *Trypanosoma brucei* (Mottram y col., 1989), Hsp83 de *Leishmania mexicana amazonensis* (Shapira y Pinelli, 1989), Hsp83 de *Leishmania infantum* (Angel y col., 1996) y Hsp83 de *Leishmania braziliensis* (Silva y col., 2013; Menezes-Souza y col., 2014).

En vista de que se ha reportado que la HSP85 es una proteína altamente expresada por *T. cruzi*, aún en condiciones basales (Dragon y col., 1987), y dada su importancia en los mecanismos del metabolismo celular del parásito y la necesidad de ampliar los estudios en esta área se decidió abordar la estrategia de clonación utilizando como muestra de partida el ARNm y la amplificación de la región codificante mediante la técnica de RT-PCR. Se diseñaron los cebadores con base en la secuencia de Hsp85 de *T. cruzi* cepa CL Brener de 2115 pb (*Trypanosoma cruzi* strain CL Brener heat shock protein 85) obtenida del GenBank (N° acceso XM_809799) cepa empleada en el proyecto genoma de *T. cruzi* (El-Sayed y cols., 2005) ya que como se mencionó anteriormente, no hay reportes ni en la bibliografía, ni en el GenBank, de que esta molécula haya sido clonada en *T. cruzi*. Gracias a la información del proyecto Genoma de *T. cruzi* se pudo disponer de esta secuencia para poder diseñar la estrategia de clonación. En primer lugar, se procedió a optimizar la técnica de purificación del ARN a partir de masas de epimastigotas mediante el empleo de dos estuches comerciales: el TRI[®] Reagent Sigma y el *Viral Nucleic Acid Extraction Kit 1* (FavorPrep[™]). Los resultados indicaron que el estuche comercial FavorPrep[™] permitió la obtención de ARN con mayor grado de pureza, así como el análisis electroforético del mismo mostró dos bandas con mayor cantidad y menor grado de degradación con respecto al estuche comercial Sigma (Figura 8). Esto puede ser debido a que en el protocolo del estuche comercial FavorPrep[™] la muestra fue previamente tratada con Proteinasa K y con inhibidores de RNAasa, contribuyendo a una menor contaminación con proteínas y menor degradación del ARN

obtenido. Con el ARN extraído por duplicado con ambos procedimientos, se procedió a realizar la amplificación de la región codificante de la proteína Hsp85 de *T. cruzi* según lo descrito en la metodología. En todos los casos se obtuvo la amplificación de una banda con un tamaño aproximado de 2150 pb (2115, el tamaño exacto esperado, según la secuencia del GenBank). Sin embargo, con el ARN extraído a partir del estuche comercial Sigma, se observó la amplificación de una banda de aproximadamente 700 pb (Figura 9, canales 1, 2, 6 y 9). Esto podría corresponder a una isoforma truncada de la Hsp85 en *T. cruzi*, que podría haberse amplificado a partir de ARNm parcialmente degradado. En este sentido, para que haya ocurrido la amplificación de estas bandas podría indicar la existencia de secuencias repetidas dentro del marco de lectura que permitieran la hibridación de los oligonucleótidos empleados en el proceso de amplificación del ADNc. O podría deberse a secuencias de otras HSP de bajo peso molecular cuya secuencia fuese similar, por lo menos la correspondiente a los cebadores, para permitir su unión (Pérez-Morales y cols., 2009). En este sentido, sería interesante realizar la secuenciación de esta banda para verificar estas hipótesis.

El siguiente paso fue la clonación del ADNc de Hsp85 en el vector de mantenimiento pGEM[®]T *Easy*. En este caso se utilizó el ADNc sintetizado a partir de ARN obtenido por ambos estuches comerciales (Sigma y FavorPrep[™]) y una vez transformadas las células XL1B MRF⁺ con el vector, se procedió a verificar mediante PCR las colonias recombinantes obtenidas. La verificación mediante PCR utilizando los cebadores para la región codificante de la Hsp85 permitió la amplificación de una banda de aproximadamente 2150 pb en 8 de 19 colonias analizadas, independientemente del método de extracción, por lo que no hubo ningún problema en la clonación del ADNc.

Para la expresión del ADNc se procedió a su subclonación en diferentes vectores de expresión (pRSET A, B, C, pCITE 4a, 4b, 4c, pTrcHis 2A, 2B, 2C y pGEX4 T1, T2, T3), ya que al ser una molécula grande, mayor de 2000 pb, puede presentarse dificultades en algunos sistemas de expresión (Maizels y cols., 1991). En este caso se procedió a la extracción del ADN plasmídico de colonias recombinantes obtenidas y a partir de allí hacer la subclonación según la metodología descrita. Sin embargo, aunque en la subclonación reciente se pudo verificar la presencia del inserto, al tratar de expresar se pudo observar que en algunos casos desaparecía la secuencia *hsp85* o el plásmido completo. Esto hace pensar que la construcción Hsp85-plásmido pudiese ser inestable en estos plásmidos complejos y las bacterias pudieron degradar el plásmido (con la pérdida de la secuencia *hsp85*) o incluso eliminarlo (Maizels y cols., 1991).

En vista de que el proceso de subclonación en los vectores de expresión se produjo varios meses después de la inserción del ADNc en el vector de mantenimiento (pGEM[®]-T *Easy-hsp85*), se evaluó la presencia y amplificación del mismo, obteniéndose resultados satisfactorios.

Debido a lo antes expuesto, considerando la complejidad de los vectores de expresión modernos utilizados (pRSET, pCITE, pTrcHis2 y pGEX4T), que poseen muchas secuencias adicionales para diversidad de usos, se decidió realizar el proceso de subclonación en el vector pQE30, el cual es un vector más sencillo y fue utilizado para la clonación y expresión de la *hsp83* de *Leishmania infantum* (Angel y col., 1996). No obstante, sucedió lo mismo, en principio se lograba la subclonación y luego se perdía. Lo cual refuerza la hipótesis de que el plásmido recombinante es expulsado de la bacteria, quizás debido a que la secuencia de *hsp85* al ser evolutivamente conservada pudiese interferir con el metabolismo de la célula y ésta tienda a eliminarla (Huynh y col. 1985).

En vista de que se ha reportado una alta similitud entre las secuencias de *hsp85* de *T. cruzi* con *hsp83* de *T. brucei* y *hsp83* de *L. m. amazonensis*, siendo de un 95 y 85%, respectivamente (Rondinelli, 1994), y se ha reportado la expresión de Hsp83 de *L. infantum* en células transformadas con pQE30 (Angel y col., 1996), y pensando que el problema pueda ser el tiempo de permanencia en la célula, se decidió la clonación directa en este último vector, sin esperar a los procesos de verificación de la presencia del inserto, es decir, una estrategia “en ciego”. De esta forma se reduciría el tiempo de permanencia en la bacteria, con lo cual se podría evitar su expulsión antes de la respectiva expresión. En este caso sí fue factible obtener resultados positivos, con la aparición de una proteína de aproximadamente 82 kDa en las fracciones eluidas mediante cromatografía de los sobrenadantes de los lisados de células competentes transformadas *E. coli* M15 (Figura 20).

La revisión de los artículos publicados con respecto a la clonación de genes codificantes de proteínas de choque térmico Hsp90 en diferentes modelos parasitarios, bien sea a partir de ADN genómico o a partir de ARNm indican que fue posible la expresión de proteínas de la familia Hsp90 de Tripanosomatídeos mediante subclonación en vectores de expresión, tales como la Hsp83 de *L. braziliensis* con el vector pET28a-TEV (Menezes-Souza y col., 2014), Hsp90 de *T. evansi* con el vector pRSETA (Pallavi y col., 2010), Hsp83 de *Leishmania braziliensis* a partir de pET28a (Silva y col., 2013) y Hsp83 en *Leishmania infantum* con pQE30 (Angel y col., 1996). De los vectores de expresión utilizados en estos trabajos, solo

pRSETA es moderno y más complejo y fue utilizado en el presente trabajo, pero sin obtener resultados satisfactorios, quizás debido a que los lapsos de tiempo entre la subclonación en los vectores de expresión y la expresión fueron de varias semanas, es posible que durante ese tiempo las bacterias hayan expulsado el plásmido recombinante debido a su inestabilidad. Tal vez empleando la estrategia de subclonación directa “en ciego” se hubiese obtenido buenos resultados en estos vectores. O bien, que se trate de una característica particular de la Hsp85 de *T. cruzi*, ya que resulta extraño que una molécula tan importante, de un parásito que causa un problema de salud pública tan grave, no haya sido clonada, quizás se deba a lo difícil de su expresión en los sistemas procariotas. En este sentido, llama la atención que en la revisión del procedimiento de clonación y expresión de la Hsp90 de *Plasmodium falciparum*, se verificó que clonaron directamente en el vector de expresión pET-23a y que obtuvieron la proteína recombinante mediante la utilización de células competentes *E. coli* BL21 (Kumar y col., 2003). Aún cuando los autores no mencionan nada al respecto, es posible que hayan experimentado circunstancias similares a las presentadas en este trabajo.

En cuanto a la expresión de la proteína recombinante se pudo observar que ésta es baja y que además se observan algunas bandas de menor tamaño, que pudiesen ser formas truncadas de la misma, posiblemente debido a que la bacteria trate de degradar a la proteína recombinante la cual quizás por similitud de secuencia pueda interferir con su metabolismo (Huynh y col. 1985). Esta podría ser la razón de que se observe tan poca cantidad de la proteína recombinante.

El tamaño esperado de la proteína recombinante según la secuencia aminoacídica deducida es de 80,7 kDa + 1 kDa de la cola de histidinas, por lo que se esperaría un peso molecular de casi 82 kDa, lo cual fue observado en los resultados. Es importante resaltar que Hsp85 fue llamada así ya que la proteína nativa tiene 85 kDa. La pequeña diferencia de tamaño de aproximadamente 3 kDa puede deberse a que la proteína nativa esté glicosilada, ya que el análisis de predicción de posibles modificaciones postraduccionales de la secuencia mediante Motif Scan de ISB-ISREC (Pagni y col., 2001), evidenció 3 sitios potenciales de N-glicosilación. Se puede pensar que uno de esos sitios sea funcional, ya que se estima que una N-glicosilación aporta 3 kDa adicionales al peso molecular de la proteína (Obregon-Henao, y col., 2001).

Como era de esperarse en la purificación de la proteína también se presentaron problemas debido a que se trata de una molécula grande de aproximadamente 82 kDa y que por su

mismo peso sea difícil de fijarse a la resina de la columna solo por una cola de 6 histidinas, quizás sea conveniente utilizar otro protocolo de purificación o subclonar el ADNc en un vector que permita la unión de una molécula de fusión de mayor tamaño que le sirva de soporte y luego esta pueda ser eliminada, por ejemplo GST o MBP (Ferrer, 2003).

En vista de que no fue posible la secuenciación de la región amplificada y expresada por las células competentes, era necesario confirmar que la banda de aproximadamente 82 kDa cuya expresión se incrementaba con el tiempo de inducción correspondía a la proteína Hsp85 del parásito. Para ello disponíamos de un suero hiperinmune preparado en conejo contra epimastigotas de *T. cruzi* del mismo aislado utilizado en el presente trabajo. Este suero ha sido utilizado en varios protocolos experimentales, con reconocimiento de antígenos con pesos moleculares aproximados de 85, 80, 65, 62, 52, 38, 35, 34, 30 y 27 kDa en epimastigotas de la cepa EP (Contreras y col., 1998; Graterol y col, 2013).

El análisis mediante inmunoblotting de las fracciones obtenidas mediante cromatografía en columna de níquel Ni-NTA mediante la utilización del suero hiperinmune anti-epimastigota permitió la identificación de una sola banda con un peso molecular aproximado de 82 kDa, indicando en este caso una reacción con la proteína recombinante obtenida durante el presente trabajo.

Debido a la baja concentración de la proteína recombinante utilizada en la técnica de inmunoblotting, se decidió utilizar un sistema de revelado altamente sensible como la luminografía, en particular con el sistema Super Signal® West pico, el cual permite detectar complejos inmunes en el orden de los picogramos. Esto explica la fuerte señal de la banda obtenida en la película de rayos X utilizada como registro de la reacción.

Previamente en el Laboratorio de Protozoología del Instituto de Biología Molecular de Parásitos de la Universidad de Carabobo se inmunizaron gallinas con péptidos sintéticos de las regiones cuyas secuencias presentaron 100% de identidad entre las proteínas HSP 85 expresadas por *T. cruzi*, Hsp83 por *L. infantum* y Hsp 83 *L. amazonensis*, representadas por Cr1 (aminoácidos 355 al 373) y Cr2 (aminoácidos 685 al 704). Mediante inmunoblotting los anticuerpos Cr1 y Cr2 reconocieron una proteína de peso molecular aproximado de 85 kDa en epimastigotas de *T. cruzi*, registrándose señales más intensas con IgY anti-Cr2 (Navarro y col., 2005). En efecto, se ha reportado que las proteínas de choque térmico son altamente inmunogénicas y que estimulan una fuerte respuesta inmune (Kaufman, 1990; Schlesinger, 1990; Young, 1990; Skeiky y col., 1995). Llama la atención que varios genes que codifican

proteínas HSP hayan sido aislados por inmuno-selección (*immunoscreening*) de librerías de expresión de *T. cruzi* usando suero de pacientes chagásicos (Dragon y col., 1987; Kirchhoff y col., 1988; Engman y col., 1989). Previo a la realización del inmunobloting empleando las fracciones purificadas eluídas de la columna de purificación con el suero hiperinmune Anti-Epimastigota, se emplearon los anticuerpos preparados IgYanti-Cr1 y IgY-anti-Cr2, no obteniendo se en este caso señal luminográfica (resultados no mostrados). Esto pudiera deberse a que los resultados previos del Laboratorio se realizaron empleando altas concentraciones de proteínas totales del parásito (20 µg/canal), mientras que en el presente trabajo, dada la baja concentración de proteína recombinante obtenida, sólo se pudo utilizar una concentración de aproximadamente 2 µg/canal.

Las proteínas de choque térmico han mostrado ser inmunogénicas en muchos modelos parasitarios (Polla, 1991) y la mayoría son antígenos importantes reconocidos por los sueros de pacientes. Además se ha reportado, que la respuesta inmune está dirigida a las zonas menos conservadas de la proteína, asegurando la especificidad de la respuesta (Skeiky y col., 1995; Angel y col., 1996; Quijada y col., 1996). Por ejemplo anticuerpos específicos anti HSP90 se han descrito en esquistosomiasis (Johnson y col., 1989), leishmaniasis (de Andrade y col., 1992) y malaria (Zhang y col., 2001), también se ha reportado como antígeno inmunodominante HSP70 en pacientes con hidatidosis (Colebrook y col., 1997), esquistosomiasis (Moser y col., 1990), oncocercosis (Rothstein y col., 1989), leishmaniasis (de Andrade y col., 1992; Wallace y col., 1992; Skeiky y col., 1995; Quijada y col., 1996, 1998; Zurita y col., 2003), enfermedad de Chagas (Engman y col., 1990; Requena y col., 1993; Krautz y col., 1998) y malaria (Kumar y col., 1990) y HSP60 en el caso de leishmaniasis (Rey-Ladino y col., 1997). En cuanto a las HSP de bajo peso molecular se ha estudiado y confirmado su valor diagnóstico en esquistosomiasis (Nene y col., 1986).

Es importante destacar que no se observó reactividad del suero hiperinmune anti-epimastigota de *T. cruzi* con ninguna otra banda, de ningún tamaño, solo la de 82 kDa, lo que indicaría que las posibles moléculas truncadas carecen de los epítomos reconocidos por estos anticuerpos o se trata de proteínas bacterianas que podría estarse induciendo por la presencia de esta “molécula extraña” para la célula. Sería interesante usar la proteína completa para inmunizar conejos y obtener sueros hiperinmunes que permitan hacer ensayos de mapeo de epítomos.

Esta proteína recombinante Hsp85 de *T. cruzi*, aún a bajas concentraciones, podrá ser empleada para la elaboración de un anticuerpo policlonal mono-específico, el cual constituye una herramienta muy valiosa para estudiar la participación de esta proteína de estrés en los procesos de diferenciación del parásito, tales como epimastigogénesis, metacicloogénesis, amastigogénesis y tripomastigogénesis.

5.2. CONCLUSIONES

- 1.- Se obtuvo ARN de epimastigotes de *T. cruzi* en cantidad y calidad adecuada, que permitió la transcripción reversa de *hsp85*.
- 2.- Mediante RT-PCR se evidenció una banda de 2115 pb correspondiente al ADNc codificante de *hsp85* de *T. cruzi*.
3. Se clonó el ADNc *hsp85* de *T. cruzi* en el vector de mantenimiento pGEM[®]T Easy y el mismo se mantuvo estable.
- 4.- Los sistemas de expresión pRSET, pCITE, pTrcHis2 y pGEX4T no permitieron la subclonación del ADNc *hsp85* de *T. cruzi*.
- 5.- En el vector de expresión pQE30 se logró la subclonación y expresión de *hsp85* de *T. cruzi*, pero sólo en la estrategia “en ciego”, siendo un proceso mas rápido, que podría evitar la expulsión del plásmido por parte de la bacteria.
- 6.- Se expresó el ADNc codificante de Hsp85 en células de *E. coli* por inducción con IPTG, evidenciando una banda de apropiadamente 82 kDa mediante electroforesis en gel de poliacrilamida.
- 7.- El rendimiento de la purificación Hsp85 de *T. cruzi*, fue muy bajo y se evidenciaron otras proteínas que pudiese ser moléculas truncadas o proteínas bacterianas arrastradas en la purificación.
- 8.- Se evaluó el reconocimiento antigénico de la proteína recombinante Hsp85 de *T. cruzi*, mediante *Western blot* empleando suero policlonal específico Anti-Epimastigotas de *T. cruzi* y el sistema luminol, y sólo se evidenció una banda del peso molecular esperado y no se observó reacción de ninguna otra proteína.

BIBLIOGRAFIA

- Adroher, F.J., Lupiáñez, J.A. y Osuna, A. (1988). Influence of saccharides and sodium chloride on growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Cell Differentiation*, 22: 165-170.
- Alarcón de Noya B, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Muñoz-Calderón A, Noya O (2015). Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela: epidemiological, clinical and diagnostic approaches. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 110:377-86.
- Alcina, A., Urzainqui, A. y Carrasco, L. (1988). The heat-shock response in *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Biochem*, 172:121-127.
- Angel, S.O., Requena, J.M., Soto, M., Criado, D., Alonso, C. (1996). During canine leishmaniasis a protein belonging to the 83-kDa heat-shock protein family elicits a strong humoral response. *Acta Tropica*, 62(1): 45-56.
- Argaman, M., Aly, R. y Aspira, M. (1994). Expression of heat shock protein 83 in *Leishmania* is regulated Post-Transcriptionally. *Mol Biochem Parasitol*, 64: 95-110.
- Argon, Y. y Simen, B.B. (1999). Grp94, and AR chaperone with protein and peptide binding properties. *Semin Cell Dev Biol*, 10: 495-505.
- Barrios, J.G., Contreras, O., Graterol, D., Navarro, M.C., Arteaga, R., Contreras, V.T. y De Lima, A.R. (2008) *Trypanosoma cruzi*: Epimastigogénesis en condiciones axénicas. Cambios Morfológicos, peptídicos, glicopeptídicos y antigénicos. *Acta Científica Venezolana*, 59(1): 1-11.
- Bensaude, O., Babinet, C., Morange, M. y Jacob, F. (1983). Heat shock proteins, first major products of zygotic gene activity in mouse embryo. *Nature*, 305: 331-333.
- Bern, C. (2015). Chagas Disease. *N Engl J Med*, 373:456-466.
- Böker, C.A. y Schaub, G.A. (1984). Scanning electron microscopic studies of *Trypanosoma cruzi* in the rectum of its vector *Triatoma infestans*. *Z Parasitkn*, 70: 459-469.
- Bose, S., Weikl, T., Bügl, H. y Buchner, J. (1996). Chaperone function of Hsp90-associated proteins. *Science*, 274:1715-1717.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensivity method for quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*, 72:248-254.

- Brandau, S., Dresel, A. y Clos, J. (1995). High constitutive levels of heat-shock proteins in human-pathogenic parasites of the genus *Leishmania*. *Biochem J*, 310: 225-232.
- Buchner, J. (1999). Hsp90 & Co. A holden for folding. *Trends Biochem Sci*, 24: 136–141.
- Burleigh, B.A. y Andrews, N.W. (1995). The mechanism of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annu Rev Microbiol*, 49: 175-200.
- Carvalho, E., De Castro, F.T., Rondinelli, E., Soares, C.M.A. y Carvalho, J.F. (1990). Hsp70 gene expression in *Trypanosoma cruzi* is regulated at different levels. *J Cell Physiol*, 143: 439-444.
- Carvalho, T.M.U. y De Sousa, W. (1989). Early event related with the behaviour of *Trypanosoma cruzi* within an endocytic vacuole in mouse peritoneal macrophages. *Cell Struct Funct*, 14: 383-392.
- Cavalier-Smith, T. (1998). A revised six-kingdom system of life. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 73(3): 203-266.
- Center for Disease Control and Prevention. Última revisión: Marzo, 2016. http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/TrypanosomiasisAmerican_ilm.htm. Consultado 18 de Noviembre 2016.
- Chen, S. y Smith, D.F. (1998). Hop as an adaptor in the heat shock protein (HSP70) and HSP90 chaperone machinery. *J Biol Chem*, 273: 35194-35200.
- Chiosis, G., Caldas Lopes, E. y Solit, D. (2006). Heat shock protein-90 inhibitors: a chronicle from geldanamycin to today's agents. *Curr Opin Investig Drugs*. 7 (6): 534-41.
- Colebrook, A. y Lightowlers, M., (1997). Serological reactivity to heat shock protein 70 in patients with hydatid disease. *Parasite Immunology*, 19: 41-46.
- Contreras, V.T., Araque, W. y Delgado, V. (1994). *Trypanosoma cruzi*: Metacyclogenesis in vitro. I. Changes in the properties of Metacyclic Tripomastigotes maintained in the laboratory by different methods. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 98: 253-359.
- Contreras, V.T., De Lima, A.R., Zorrilla, G. (1998). *Trypanosoma cruzi*: Maintenance in Culture Modify Gene and Antigenic Expression of Metacyclic Trypomastigotes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 93:753-60.
- Contreras, V.T., De Lima, A.R., Arteaga, R., Flores, G., Zorrilla, G., Garboza, R., Pineda, W., Delgado, V. y Araque, W. (1996). Inducción *in vitro* del estadio amastigota de *Trypanosoma cruzi*. XLVI. *Act Cient Venezol*, 47: 216.
- Contreras, V.T., Navarro, M.C., De Lima, A.R., Duran, F., Arteaga, R. y Franco, Y. (2002). Early and late molecular and morphologic changes that occur during the in vitro

- transformation of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes to amastigotes. *Biol Res*, 35: 21-32.
- Contreras, V.T., Salles, J.M., Thomas, N., Morel, C.M. y Goldenberg, S. (1985). In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol Biochem Parasitol*, 16(3):315-27.
- Cotto, J.J., Kline, M. y Morimoto, R.I. (1996). Activation of heat shock factor I DNA binding precedes stress-induced serine phosphorylation. Evidence for a multistep pathway of regulation. *J Biol Chem*, 271: 3355-3358.
- Csermely, P., Scheneider, T., Soti, C., Prohaszka, Z. y Nardai, G. (1998) "In Vitro" differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol Biochem Parasitol*, 16: 315-327.
- de Andrade, C.R., Kirchhoff, L.V., Donelson, J.E., Otsu, K. (1992) Recombinant *Leishmania* Hsp90 and Hsp70 are recognized by sera from visceral leishmaniasis patients but not Chagas' disease patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(2): 330-335.
- De Lima, A.R., Aparicio, A., Berrocal, A., Navarro, M.C., Graterol, D. y Contreras, V. (2007). Epimastigogénesis de *Trypanosoma cruzi* en medio axénico: cambios peptídicos, glicopeptídicos y enzimáticos. *Salus*, 11(2): 39-47.
- De Moreno, M.R., Smith, J.F. y Smith, R.V. (1985). Silver staining of proteins in polyacrilamide gels: increased sensitivity through a combined blue-silver stain procedure. *Anal Biochem*, 151: 466-470.
- De Souza, W. (1984). Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Int Rev Cytol*, 86: 197-285.
- De Souza, W. (2002). Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Design*, 8: 269-285.
- Deane, M.P., Moriearty, P.L. y Thomaz, N. (1984). Cell differentiation in trypanosomatids and other parasitic protozoa. En C.M. Morel. (Ed. 2da), *Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual* (pp. 11-21). Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz.
- Dragon, E.A., Sias, S.A., Kato, E.A. y Gabe, J.D. (1987). The genome of *Trypanosoma cruzi* contains a constitutively expressed arranged multicopy gene homologous to major heat shock protein. *Mol Cell Biol*, 7: 1271-1275.

- Dvorak, J.A. (1975). New in vitro approach to quantitation of *Trypanosoma cruzi*-Vertebrate cell interaction. En: *New Approaches in American Trypanosomiasis Research. Proceedings of an International Symposium. P.A.H.O. S.P.*, 318: 109-120.
- Eckl, J.M. y Richter, K. (2013). Functions of the Hsp90 chaperone system: lifting client proteins to new heights. *Int J Biochem Mol Biol*, 4(4):157-65.
- El-Sayed, N.M., Myler, P.J., Bartholomeu, D.C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A.N., Ghedin, E., Worthey, E.A., Delcher, A.L., Blandin, G., Westenberger, S.J., Caler, E., Cerqueira, G.C., Branche, C., Haas, B., Anupama, A., Arner, E., Aslund, L., Attipoe, P., Bontempi, E., Bringaud, F., Burton, P., Cadag, E., Campbell, D.A., Carrington, M., Crabtree, J., Darban, H., da Silveira, J.F., de Jong, P., Edwards, K., Englund, P.T., Fazelina, G., Feldblyum, T., Ferella, M., Frasch, A.C., Gull, K., Horn, D., Hou, L., Huang, Y., Kindlund, E., Klingbeil, M., Kluge, S., Koo, H., Lacerda, D., Levin, M.J., Lorenzi, H., Louie, T., Machado, C.R., McCulloch, R., McKenna, A., Mizuno, Y., Mottram, J.C., Nelson, S., Ochaya, S., Osoegawa, K., Pai, G., Parsons, M., Pentony, M., Pettersson, U., Pop, M., Ramirez, J.L., Rinta, J., Robertson, L., Salzberg, S.L., Sanchez, D.O., Seyler, A., Sharma, R., Shetty, J., Simpson, A.J., Sisk, E., Tammi, M.T., Tarleton, R., Teixeira, S., Van Aken, S., Vogt, C., Ward, P.N., Wickstead, B., Wortman, J., White, O., Fraser, C.M., Stuart, K.D. y Andersson, B. (2005). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*; 309(5733):409-15.
- Engman, D.M., Dragon, E.A., Donelson, J.E. (1990). Human humoral immunity to hsp70 during *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Immunology*, 144(10):3987-3991.
- Engman, D.M., Kirchhoff, L.V. y Donelson, J.E. (1989). Molecular cloning of Hsp70 mitochondrial member of the Hsp70 family. *Mol Cell Biol*, 9: 5163-5168.
- Ferrari, S., Grande, A., Manfredini, R. y Torelli, U. (1992). Terminal differentiation. *Ann N Y Acad Sci*, 663:180-186.
- Ferrer E. (2003). Caracterización Molecular de Antígenos de *Taenia Solium/T. saginata* relevante en el inmunodiagnóstico de cisticercosis. (Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España).
- Fisher, D.L., Mandart, E. y Dorée, M. (2000). Hsp90 is required for c-Mos activation and biphasic MAP kinase activation in *Xenopus* oocytes. *EMBO J*, 19:1516-1524.
- Folgueira, C. y Requena, J.M. (2007). A post genomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. *FEMS. Microbiol Rev*, 31: 359-377.

- Fraidenraich, D., Pena, C., Isola, E. L., Lammel, E. M., Coso, O., Anel, A. D., Pongor, S., Baralle, F., Torres, H. N. y Flawia, M. M. (1993). "Stimulation of *Trypanosoma cruzi* adenylyl cyclase by an alpha Dglobin fragment from *Triatoma hindgut*: effect on differentiation of epimastigote to trypomastigote forms." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(21): 10140-4.
- Georgopoulos, C.Y. y Welch, W.J. (1993). Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annu Rev Cell Biol*, 9: 601-934.
- Goitia – Aular, M. y Boisso, J.F. (1982). Cultivo del *Trypanosoma cruzi* (cepa Elpidio Padrón) en medio semidefinido. Efecto de algunas variaciones en la composición y condiciones del mismo. *Act Cient Venezol*, 33: 488-496.
- Graefe, S.E.B., Wiesgigl, M., Gaworski, I., Macdonald, A. y Clos J. (2002). Inhibition of Hsp90 in *Trypanosoma cruzi* induces a stress response but no stage differentiation. *Eucaryot Cell*, 11: 936-943.
- Graham, S.V. (1995). Mechanism of state-regulated gene expression in Kinetoplastida. *Parasitol Today*, 11: 217-223.
- Graterol, D., Ramírez, D., Ramos, A., Arteaga, R., Mundaray, O., Pineda, W., Navarro, M., Domínguez, M., De Lima, A. y Contreras, V. (2013). Epimastigogénesis de *Trypanosoma cruzi* Dm28c en medio ML15HA: análisis proteico, glicoproteico y antigénico. *Salus*. 17:12-18.
- Hall, B.F. (1993). *Trypanosoma cruzi*: mechanisms for entry into host cells. *Semin Cell Biol*, 4(5):323-33.
- Hall, T. (2013) BioEdit (v7.1.11). [<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>]
- Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation of *E. coli*. En: (Vol. 1) Glover, D.M. DNA cloning: a practical approach. (pp. 109-135). Oxford, United Kingdom: IRL Press.
- Homez, J., Soto, R., De Soto, S., Mendez, H., y Marmol, P. (Ed. 10ma). (2004). *Parasitología*. (pp. 148-228). Maracaibo, Venezuela: Ediluz.
- Homsy, J.J., Granger, B. y Krassner, S.M (1989). Some factors inducing formation of metacyclic stages of *Trypanosoma cruzi*. *J Protozool*, 36: 150-153.
- Hübel, A. y Clos, J. (1996). The genomic organization of the HSP83 gene locus is conserved in three *Leishmania* species. *Exp Parasitol*, 82: 225-228.
- Huynh, T.V., Young, R., Davis, R.W. (1985). En: DNA cloning: a practical approach (Glover, D.M., de.). IRL Press. Oxford, Vol 1, p. 49-78.

- Hyunseok, J. (2016). Size dependent classification of heat shock proteins: a mini-review. *J Exerc Rehabil*, 12(4): 255–259.
- Jakob, U., Lilie, H., Meyer, I. y Buchner, J. (1995). Transient interaction of Hsp90 with early unfolding intermediates of citrate synthase. Implications for heat shock *in vivo*. *J Biol Chem*, 270:7288-7294.
- Jhonson, J.L. (2012) Evolution and function of diverse Hsp90 homologs and cochaperone proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1823: 607–613.
- Johnson, K.S., Wells, K., Bock, J.V., Nene, V., Taylor, D.W., Cordingley, J.S. (1989). The 86-kilodalton antigen from *Schistosoma mansoni* is a heat-shock protein homologous to yeast HSP-90. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 36(1): 19-28.
- Kambara, H., Uemura, H., Nakazawa, S. y Fukama, T. (1990). Effect of low pH on transformation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote. *Japanese J. Parasitology*, 39: 226-228.
- Kaufman, S. H. E. (1990). Heat shock proteins and the immune response. *Immunol Today* 11:129-136.
- Kimura, E., Lay, W. y Fernández, J. (1978). Extracelular in Vitro evolution of metacyclic trypomastigotes isolated from *Trypanosoma cruzi* culture. *Rev Inst Med Trop*, 20: 133-138.
- Kirchhoff, L.V., Kim, K.S., Engman, D.M. y Danelson, J.E. (1988). Ubiquitin genes in *Trypanosomatidae*. *J Biol Chem*, 263: 12698-12704.
- Kolch, W. (2000). Meaningful relationships: The regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J*, 351: 289-305.
- Kollien, A.H. y Schaub, G.A. (1998). *Trypanosoma cruzi* in the rectum of the bug *Triatoma infestans*: effects of blood ingestion by the starved vector. *Am J Trop Med Hyg*, 59(1):166-70.
- Kollien, A.H., Grospietsch, T., Kleffmann, T., Zerst-Boroffka, I. y Schaub, G.A. (2001). Ionic composition of the rectal contents and excreta of the reduviid bug *Triatoma infestans*. *J Insect Physiol*, 47(7):739-747.
- Kollien, A.H., Schmidt, J. y Schaub, G.A. (1998). Modes of association of *Trypanosoma cruzi* with the intestinal tract of the vector *Triatoma infestans*. *Acta Trop*, 70: 127-141.
- Krassner, S.M., Granger, B., Lee, P., Guerra, C., Le, T. y Luc, K. (1990a). Action of exogenous potassium and calcium ions on *in vitro* metacyclogenesis in *Trypanosoma cruzi*. *J Protozool*, 38: 602-608.

- Krassner, S.M., Granger, B., Phermsangngnam, P., Le, T. y Linden, V. (1990b). Further studies on substrates inducing metacyclogenesis in *Trypanosoma cruzi*. *J Protozool*, 37: 128-132.
- Krautz, G.M., Peterson, J.D., Godsel, L.M., Krettli, A.U., Engman, D.M. (1998). Human antibody responses to *Trypanosoma cruzi* 70-kD heat-shock proteins. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 58(2): 137-143.
- Krukenberg, K.A., Street, T.O., Lavery, L.A. y Agard D.A. (2011). Conformational dynamics of the molecular chaperone Hsp90. *Q Rev Biophys*, 44(2):229-55.
- Kumar, N., Zhao, Y., Graves, P., Perez Folgar, J., Maloy, L., Zheng, H. (1990). Human immune response directed against *Plasmodium falciparum* heat shock-related proteins. *Infection and Immunity*, 58(5): 1408-1414.
- Kumar, R., Musiyenko, A. y Barik, S. (2003). The heat shock protein Hsp90 of *Plasmodium falciparum* and antimalarial activity of its inhibitor, geldanamycin. *Malaria J*, 2:30-40.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural Proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lange, B.M.H., Bachi, A., Wilm, M., y Gonzales, C. (2000) Hsp90 is a core centrosomal component and is required at different stages of the centrosome cycle in *Drosophila* and vertebrates. *EMBO J*, 19:1252–1262.
- Lee, A.S. (2001). The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem Sci*, 26:504-510.
- Ley, V., Robbins, E.S., Nussenzweig, V. y Andrews, N.W. (1990). The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. *J Exp Med*, 171: 401-413.
- Li, J. y Buchner, J. (2013). Structure, function and regulation of the hsp90 machinery. *Biomed J*, 36 (3);106-17.
- Maizels, R.M., Blaxter, M.L., Robertson, B.D. y Selkirk, M.E. (1991). *Parasite antigens. Parasite genes: a laboratory manual for Molecular parasitology*. Cambridge, United States of America: University Press.
- Markell, E.K y Voge, M. (Ed.5ta). (1981). *Medical Parasitology* Missouri: USA: Elsevier Inc.
- Mayer, M.P. y Bukau, B. (1999). Molecular chaperones: the busy life of Hsp90. *Curr Bio*, 9: R322-R325.

- Melnik, J., Dul, J.L. y Argon, Y. (1994). Secuential interaction of the chaperones BiP and GRP94 with immunoglobulin chains in the endoplasmic reticulum. *Nature*, 370: 373-375.
- Menezes-Zouza, D., de Oliveira, T., de Souza, M., Reis-Cunha, J., Pinto, R., Martins, C., Ferraz, E., da Cunha, L., Toshio, R. y Castanheira, D. (2014). Epitope mapping of the Hsp83.1 protein of *Leishmania braziliensis* discloses novel targets for immunodiagnosis of tegumentary and visceral clinical forms of leishmaniasis. *Clinical and Vaccine Immunology*. 21(7):949-959.
- Mickler, M., Hessling, M., Ratzke, C., Buchner, J. y Hugel, T. (2009). The large conformational changes of Hsp90 are only weakly coupled to ATP hydrolysis. *Nat Struct Mol Biol*, 16(3):281-6.
- Morimoto, R.I. (1998). Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes & Dev*, 12: 3788-3796.
- Morimoto, R.I. (1993). Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science*. 259:1409-1410.
- Mortara, R.A., da Silva, S. Araguth, M. F., Blanco, S.A. y Yoshida, N. (1992). Polymorphism of the 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes. *Infect. Immun.*, 60 (11):4673-4678.
- Moser, D., Doumbo, O., Klinkrt, M., (1990). The humoral response to heat shock protein 70 in human and murine *Schistosomiasis mansoni*. *Parasite Immunology*, 12: 341-352.
- Mottram, J.C., Murphy, W.J., y Agabian, N. (1989). A transcriptional analysis of the *Trypanosoma brucei* Hsp83 gene cluster. *Mol Biochem Parasitol*, 37:115-128.
- Mühich, M.L., Hsu, M.P. y Boothroyd, J.C. (1989). Heat-shock disruption of *trans*-splicing in trypanosomes: effect on Hsp70, Hsp85 and tubulin mRNA synthesis. *Gene*, 82:169-175.
- Navarro, M.C., De Lima, A.R., Askue, J. y Contreras, V.T. (2003). Morphological Comparison of Axenic Amastigogenesis of Trypomastigotas and Metacyclic of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 98(1):83-91
- Navarro, M.C., Farías, M., Guzmán, F., Graterol, D., De Lima, A.R., Arteaga, R., Pineda, W., y Contreras, V.T. (2005) Producción de anticuerpos IgY anti-Hsp90 de *Trypanosoma cruzi* usando péptidos sintéticos. LV Convención Anual de AsoVAC. (Resumen).

- Neckers, L. y Workman, P. (2012). Hsp90 molecular chaperone inhibitors: are we there yet?. *Clin Cancer Res*, 18 (1): 64-76.
- Nemoto, T., Ohara-Nemoto, Y., Ota, M., Takagi, T. y Yokoyama, K. (1995). Mechanism of dimer formation of the 90-kDa heat-shock protein. *Eur J Biochem*, 233(1):1-8.
- Nene, V., Dunne, D.W., Johnson, K.S., Taylor, D.W. y Cordingley, J.S, (1986). Sequence and expression of a major egg antigen from *Schistosoma mansoni*. Homologies to heat shock proteins and alpha-crystallins. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 21: 179-188.
- Nogueira, N.P., Saraiva, F.M., Sultano, P.E., Cunha, P.R., Laranja, G.A., Justo, G.A., Sabino, K.C., Coelho, M.G., Rossini, A., Atella, G.C. y Paes, M.C. (2015). Proliferation and differentiation of *Trypanosoma cruzi* inside its vector have a new trigger: redox status. *PLoS One*, 10(2):e0116712.
- Nollen, E.A.A. y Morimoto, R.I. (2002). Chaperoning signalling pathways: molecular chaperones as stress-sensing heat shock proteins. *J Cell Sci*, 115: 2809-2816.
- Nunes, M. C. P., Dones, W., Morillo C. A., Encina, J.J., y Ribeiro, A. L. (2013). Chagas Disease: An overview of clinical and epidemiological aspects. *J Am Coll Cardiol*, 62 (9): 767-776.
- Obregon-Henao, A., Gil, D.L., Gómez, D.I., Sanzón, F., Teale, J.M. y Restrepo, B. (2001). The role of N-linked carbohydrates in the antigenicity of *Taenia solium* metacestode glycoproteins of 12, 16 and 18 kD. *Molecular and Biochemical Parasitology* 114: 209-215.
- Ommen, G., Chrobak, M. y Clos, J. (2010). The co-chaperone SGT of *Leishmania donovani* is essential for the parasite's viability. *Cell Stress Chaperones*, 39:541-546.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). (2016) (340). Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>
- Pagni, M., Iseli, C., Junier, T., Falquet, L., Jongeneel, V., Bucher, P. (2001) TrEST, trGEN and Hits: Access to databases of predicted protein sequences. *Nucleic Acids Research* 29: 148-151.
- Pallavi, R., Roy, N., Nageshan, R.K., Talukdar, P., Pavithra, S.R., Reddy, R., Venketesh, S., Kumar, R., Gupta, A.K., Singh, R.K., Yadav, S.C. y Tatu, U. (2010). Heat shock protein 90 as a drug target against protozoan infections: biochemical characterization of HSP90 from *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma evansi* and evaluation of its inhibitor as a candidate drug. *J Biol Chem*, 285(49):37964-75.

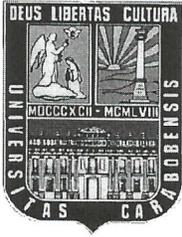
- Palmer, G., Louvion, J., Tibbetts, R., Engman, D.M. y Picard, D. (1995). *Trypanosoma cruzi* heat-shock protein 90 can functionally complement yeast. *Mol Biochem Parasitol*, 70:199-202.
- Pan, C.H.T. (1978). *Trypanosoma cruzi*: Intracellular Stages Grown in a Cell-free Medium at 37 C. *Exp Parasitol*, 45: 215-224.
- Parsell, D.A. y Lindquist, S. (1993). The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet*, 27:437-496.
- Pérez-Morales, D., Ostoa-Saloma, P. y Espinoza, B. (2009). *Trypanosoma cruzi* SHSP16: Characterization of an alpha-crystallin small heat shock protein. *Exp Parasitol*, 123(2):182-9.
- Piacenza, L., Peluffo, G., Alvarez, M.N., Martínez, A. y Radi, R. (2013). *Trypanosoma cruzi* antioxidant enzymes as virulence factors in Chagas disease. *Antioxid Redox Signal*, 19(7):723-34.
- Picard, D. (2002). Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cell Mol Life Sci*, 59: 1640-1648.
- Polla, B., (1991). Heat shock proteins in host-parasite interactions. *Immunology Today*. 12: A38-A41.
- Prodomou, C., Roe, S.M., O'Brien, R., Ladbury, J.E., Piper, P.W. y Peral, L.H. (1997). Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell*, 90: 65-75.
- Prodomou, C., Siligardi, G., O'Brien, R., Ladbury, J.E., Piper, P.W. y Peral, L.H. (1999). Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeats (TPR) domain co-chaperones. *EMBO J*, 18:754-762.
- Prodomou, C.B., Panaretou, B., Chochan, S., Siligardi, G., O'Brien, R., Ladbury, J.E., Roe, S.M., Piper, P.W. y Pearl, L.H. (2000). The ATPase cycle of Hsp90 drives a molecular "clamp" via transient dimerization of the N-terminal domains. *EMBO J*, 19:4383-4392.
- Prodomou, C. (2016) Mechanisms of Hsp90 regulation. *Biochem J*, 473: 2439-2452.
- Quijada, L., Requena, J.M., Soto, M., Gomez, L.C., Guzmán, F., Patarroyo, M.E., Alonso, C. (1996). Mapping of the linear antigenic determinants of the *Leishmania infantum* hsp70 recognized by leishmaniasis sera. *Immunology Letters*, 52(2-3):73-79.

- Requena, J.M., Jimenez-Ruiz, A., Soto, M., Assiego, R., Santarén, J.F., Lopez, M.C., Patarroyo, M.E. y Alonso, C. (1992). Regulation of hsp70 expression in *Trypanosoma cruzi* by temperature and growth phase. *Mol Biochem Parasitol*, 53(1-2):201-11.
- Requena, J.M., Soto, M., Guzmán, F., Maekelt, A., Noya, O., Patarroyo, M.E., Alonso, C. (1993). Mapping of antigenic determinants of the *T. cruzi* hsp70 in chagasic and healthy individuals. *Molecular Immunology*, 30(12): 1115-21.
- Rey, L. (1991). Flagelados parásitos do sangue e dos tecidos: *Trypanosomatidae*. En (Ed. 2da) *Parasitologia* (pp. 115-127) Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan S.A.
- Rey-Ladino, J.A., Joshi, P.B., Singh, B., Gupta, R. y Reiner, N.E. (1997). *Leishmania major*: molecular cloning, sequencing, and expression of the heat shock protein 60 gene reveals unique carboxy terminal peptide sequences. *Experimental Parasitology*, 85(3): 249-63.
- Richter, K., Halsbeck, M. y Buchner, J. (2010). The heat shock response: life on the verge of death. *Mol. Cell*, 40: 253-266.
- Rondinelli, E. (1994). Conservation of heat-shock proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today*, 10:172-176.
- Rothstein, N., Yates, J., Higashi, G. y Rajan, T. (1989). *Onchocerca volvulus* heat shock protein 70 is a major immunogen in amicrofilaremic individuals from a filariasis-endemic zone. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 33: 229-236.
- Rueda, K., Trujillo, J.E., Carranza, J.C. y Vallejo, G.A. (2014). Oral transmission of *Trypanosoma cruzi*: a new epidemiological scenario for Chagas' disease in Colombia and other South American countries. *Biomedica*, 34(4):631-641.
- Ruiz, R.C., Rigoni, V.L., Gonzalez, J. y Yoshida, N. (1993). The 35/50 kDa surface antigen of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote, an adhesion molecule involved in host cell invasion. *Parasit Immunol*, 15: 121-125.
- Rutherford, S.L. y Zuker, C.S. (1994). Protein folding and the regulation of signaling pathways. *Cell*, 79:1129-1132.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (Ed. 2da). (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. United States of America: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook, J., y Russell, D. (Ed.3ra). (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. United States of America: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santoro, M.G. (2000). Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochem Pharmacol*, 59:55-63.

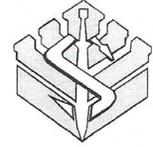
- Schlesinger, M. J. (1990). Heat shock proteins. *J Biol Chem* 265:12111-12114.
- Schopf, F. H., Biebl, M. M., and Buchner, J. (2017). The HSP90 chaperone machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 18(6):345-360.
- Shapira, M. y Pinelli, E. (1989). Heat-shock protein 83 of *Leishmania mexicana amazonensis* is an abundant cytoplasmic protein with a tandemly repeated genomic arrangement. *Eur J Biochem.* 6;185 (2):231-6.
- Shapira, M., McEwen, J.G. y Jaffe, C.L. (1988). Temperature effects on molecular processes which lead to stage differentiation in *Leishmania*. *EMBO J*, 7: 2895-2901.
- Shapira, M., Zilka, A., Garlapati, S., Dahan, E., Dahan, I. y Yavesky, V. (2001). Post transcriptional control of gene expresión in *Leishmania*. *Med Microbiol Immunol*, 190:23-26.
- Sheu, D.S., Wang, Y.T. y Lee, C.Y. (2000). Rapid detection of polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria isolated from the environment by colony PCR. *Microbiology*, 146:2019-2023.
- Silva, K.P., Seraphim, T.V. y Borges, J.C. (2013). Structural and functional studies of *Leishmania braziliensis* Hsp90. *Biochim Biophys Acta*, 1834(1):351-61.
- Skeiky, Y.A., Benson, D., Guderian, J.A., Whittle, J.A., Bacelar, O., Carvalho, E.M., y Reed, S.G. (1995). Immune responses of leishmaniasis patients to heat shock proteins of *Leishmania* species and humans. *Infection and Immunity*, 63 (10): 4105-4114.
- Stamnes, M.A., Shieh, B.H., Chuman, L., Harris, G.L. y Zuker, C.S. (1991). The cyclophilin homolog ninaA is a tissue-specific integral membrane protein required for the proper synthesis of a subset of *Drosophila* rhodopsins. *Cell*, 65:219-227.
- Stancato, L.F., Silverstein, A.M., Owens-Grillo, J.K., Chow, Y.H., Jove, R. y Pratt, W.B. (1997) The Hsp90-binding antibiotic geldanamycin decreases Raf levels and epidermal growth factor signaling without disrupting formation of signaling complexes or reducing the specific enzymatic activity of Raf kinase. *J Biol Chem*, 272: 4013-4020.
- Streit, J.A., Donelson, J.E., Agey, M.W. y Wilson, M.E. (1996). Developmental changes in the expression of *Leishmania chagasi* gp63 and heat shock proteins in a human macrophage cell line. *Infection and Immunity*, 64:1810-1818.
- Tanuri, A., Andrade, P.P. y Almeida, D.F. (1981). A simple, highly efficient plating method for tripanosomatids. *J Protozool*, 28: 360-362.

- Tardieux I, Webster P, Ravesloot J, Boron W, Lunn JA, Heuser JE, Andrews NW (1992) Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. *Cell* 71:1117-1130
- Tomlinson, S., Vandekerchove, F., Frevert, U. y Nussenzweig, V. (1995). The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH. *Parasitol*, 110: 547-554.
- Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(9):4350-4354.
- Tyler, K.M. y Engman, D.M. (2001): The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol*, 31: 472-481.
- Ucros, H., Granger, B. y Krassner, S.M. (1983). *Trypanosoma cruzi*: Effect of pH on in vitro formation of metacyclic trypomastigotes. *Act Trop*, 40: 105-112.
- Udono, H. (2012). Heat shock protein and immune system. *J Leukoc Biol*, 85: 905-910.
- Urdaneta-Morales S. (2014) Chagas' disease: an emergent urban zoonosis. The Caracas Valley (Venezuela) as an epidemiological model. *Front Public Health* 2:265
- Van Der Ploeg, L.H.T., Giannini, S.H. y Cantor, C.R. (1985). Heat shock genes: regulatory role for differentiation in parasitic protozoa. *Science*, 228: 1443-1446.
- Vickerman, K. (1976). The Diversity of the kinetoplastid flagellates. En Lumsden, W.H.R. y Evans, D.A. *Biology of the Kinetoplastida* (pp. 1-34) London/New York/San Francisco: Academic Press.
- Wallace, G.R., Ball, A.E., MacFarlane, J., el Safi, S.H., Miles, M.A. y Kelly, J.M. (1992). Mapping of a visceral leishmaniasis-specific immunodominant B-cell epitope of *Leishmania donovani* Hsp70. *Infection and Immunity*, 60(7): 2688-2693.
- Wang Y, Jin F, Li F, Wu Y, Kitazato K y Wang Y (2017). HSP: a promising broad-spectrum antiviral drug target. *Arch Virol* 162:3269-3282
- Webb, J.R., Campos-Neto, A., Skeiky, Y.A.W. y Reed, S.G. (1997). Molecular characterization of the heat-inducible LmSTII protein of *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol*, 89:179-193.
- Wiesgigl, M. y Clos, J. (2001). Heat Shock Protein 90 homeostasis controls stage differentiation in *Leishmania donovani*. *Mol. Biol. Cell*. 12:3307-3316.
- Yost, H.J. y Lindquist, S. (1988). Translation of unspliced transcripts after heat shock. *Science*, 242:1544-1548.

- Young, J.C., Moarefi, I. y Ulrich, F. (2001). Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *J Cell Biol*, 154:267-273.
- Young, J.C., Schneider, C. y Hartl, F.U. (1997). *In vitro* evidence that Hsp90 contains two independent chaperone sites. *FEBS Lett*, 418:139-143.
- Young, R. A. (1990). Stress proteins and immunology. *Annu. Rev Immunol*, 8:401-420.
- Zaidenberg, A.M, Tournier, H., Schinella, G. y Buschiazzo, H. (1995). *Trypanosoma cruzi*: Influencia del plasma humano en la morfogenesis de tripomastigotas sanguineos en un medio de cultivo acelular. *Rev Lat-Amer Microbiol*, 37: 71-77.
- Zhang, M., Hisaeda, H., Kano, S., Matsumoto, Y., Hao, Y.P., Looaresuwan, S, Aikawa, M. y Himeno, K. (2001). Antibodies specific for heat shock proteins in human and murine malaria. *Microbes and Infection*, 3(5): 363-367.
- Zilka, A., Garlapati, S., Dahan, E., Yaolsky, V. y Shapira, M. (2001). Developmental Regulation of Heat Shock Protein 83 in *Leishmania*. 3' processing and mRNA stability control transcript abundance, and translation is directed by a determinant in the 3'-untranslated region. *J Biol Chem*, 276: 47922-47929.
- Zingales B., Miles, M.A., Campbell, D.A., Tibayrenc, M., Macedo, A.M., Teixeira, M.M.G., Schijman, A.G., Llewelly, M.S., Lages-Silva, E., Machado, C.R., Andrade, S.G. y Sturm, N.R. (2012). The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol* 12: 240-253.
- Zurita, A.I., Rodríguez, J., Pinero, J.E., Pacheco, R., Carmelo, E., del Castillo, A. y Valladares B. (2003). Cloning and characterization of the *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* Hsp70 gene. Diagnostic use of the C-terminal fragment rLb70 (513-663), *Journal of Parasitology*, 89(2): 372-378.



Universidad de Carabobo
Facultad de Ciencias de la Salud
Dirección de Asuntos Estudiantiles
Postgrado- Sede Aragua



ACTA DE VEREDICTO TRABAJO DE GRADO

Siendo hoy jueves 26 de Octubre de 2017 a las 9:30 am se realizó la presentación pública del Trabajo de Grado titulado: **“Clonación del gen codificante de la proteína de choque térmico Hsp85 de *Trypanosoma cruzi*”** presentado por la Licenciada: **ANA CAROLINA FERNÁNDEZ CAMACARO**, Cédula de identidad: 17.620.712, para optar al Título de: **Magister en Ciencias Biomédicas mención Bioquímica y Biología Molecular. Tutoras del Trabajo de Grado:** Dra. Ana Rita De Lima C.I. 7.093.018 y Dra. Elizabeth Ferrer C.I. 7.101.850

Una vez leído el trabajo por cada miembro del jurado y evaluada la presentación pública, se estimó que el mismo cumple con lo establecido en el Capítulo X, Sección Cuarta en su artículo 130 del Reglamento de los Estudios de Postgrado de la Universidad de Carabobo, el cual reza: “El trabajo de grado es el resultado del estudio que demuestra la capacidad crítica, analítica, constructiva en un contexto sistémico y de dominio teórico y metodológico de la investigación aplicada en la respectiva área del conocimiento del cursante”, por lo cual el mismo está: **APROBADO.**

Los miembros del jurado consideran que este trabajo representa aportes muy importantes e inéditos en el desarrollo de herramientas moleculares para el abordaje de estudios de proteínas de choque térmico de *Trypanosoma cruzi*, y abre nuevas estrategias para el estudio de mecanismos de morfogénesis del parásito y diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Por lo que el Jurado decide otorgar **MENCIÓN HONORÍFICA.**

En Maracay, a los 26 días del mes de Octubre de 2017

MSc. Ana Celia Ferreras

C.I. 7.284.350
UNIVERSIDAD DE CARABOBO
Facultad de Ciencias de la Salud
Dirección de Postgrado
Sede Aragua

Miembro del Jurado

Dra. Ana Rita De Lima

C.I. 7.093.018
UNIVERSIDAD DE CARABOBO
Facultad de Ciencias de la Salud
Dirección de Postgrado
Sede Aragua

Presidente del Jurado

Dr. Víctor Contreras

C.I. 4.323.708
Jurado Externo

Maestría en *de una tierra inmortal*
CIENCIAS BIOMÉDICAS MENCIÓN
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Final Av. Leonardo Ruiz Pineda, la Morita II / Sede Aragua
Teléfono: (0243) 2710569-2710296 Ext. 207