

**Clonación y expresión de la enzima Nitrorreductasa Tipo I de *Trypanosoma rangeli*  
y *Trypanosoma cruzi***



Presentado por:  
MARÍA ISABEL OSPINA PATIÑO

---

*Claudia L. Cuervo P.*

---

*Directora: Claudia L. Cuervo Patiño, Ph.D.*

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA  
BOGOTA D.C**

Clonación y expresión de la enzima Nitrorreductasa Tipo I de *Trypanosoma rangeli*  
y *Trypanosoma cruzi*



**MARIA ISABEL OSPINA PATIÑO**

*Claudia L. Cuervo P.*

---

**Claudia L. Cuervo P, PhD.**  
Director

*José Salvador Montaña Lara*

---

**José Salvador Montaña Lara PhD(c)**  
Jurado

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
PROGRAMA DE PREGRADO  
BOGOTÀ, D.C.  
2013**

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

Artículo 23 de la resolución N° 13 de julio de 1946

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

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi directora de tesis, Dra. Claudia Cuervo por darme la oportunidad de trabajar este proyecto junto a ella, por las enseñanzas recibidas, la exigencia, paciencia y dedicación que tuvo durante todo el proceso, por creer en mí y por formarme cada día como una mejor profesional, por ayudarme y brindarme gran parte de su tiempo, mis mayores logros y conocimientos se los debo a ella.

Laboratorio de Parasitología Molecular y la Dra. Concepción Puerta, por darme la oportunidad de realizar mi trabajo de grado, por contar conmigo y creer en mí.

Marjorie Montenegro y Cesar Ramírez por toda la paciencia que tuvieron durante este largo proceso, por enseñarme, formarme y ayudarme incondicionalmente en todo momento.

Mis compañeros de Laboratorio, Mónica Ilano, Jose Mateus, Paola Lasso y Paola Nocua por haber creído siempre en mi, por motivarme, escucharme, alentarme, por permitirme conocer de ustedes y por su compañía constante.

Dra. Adriana Cuellar por siempre darme voz de aliento para creer que si podría lograrlo.

Mi madre querida y a mi hermana Laura Camila, por siempre estar junto a mí, por luchar conmigo, por regalarme esa voz de aliento que siempre necesite cuando sentía desfallecer por apoyarme y estar siempre seguras que podía lograrlo, ustedes son mi más profundo amor. A mi familia por que siempre se han sentido orgullosos de mí.

A mi padre por ser el mi mayor motivación, el hombre que más amo en la vida y por siempre estar orgulloso de mi, por permitirme llegar a hasta este punto, por crecer conmigo por formarme como soy ahora, gracias.

Mis amigas Erika Prada y Lina Montaña, por su motivación, su apoyo su interés y por siempre estar a mi lado, por sentir mis alegrías como alegrías de ustedes, gracias.

A todos mis compañeros que estuvieron acompañándome y alentándome en este proceso, ellos siempre se interesaron por mi progreso, por mis resultados, por siempre haber estado pendientes de mí.

## TABLA DE CONTENIDO

	Pag.
RESUMEN	8
1. Introducción	9
2. Justificación y planteamiento del problema	10
3. Marco teórico	12
3.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	12
3.2 Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	13
3.3 <i>Trypanosoma rangeli</i>	14
3.4 Ciclo de vida de <i>T. rangeli</i>	15
3.5 Nitrorreductasa tipo I	16
4. Objetivos	18
4.1 Objetivo general	18
4.2 Objetivos específicos	18
5. Materiales y métodos	19
5.1 Parásitos	19
5.2 Obtención de ADN genómico.	19
5.3 Clonación de la región codificante para la NTR de <i>T. cruzi</i> y <i>T. rangeli</i>	19
5.3.1 Amplificación del gen codificante para la NTR de <i>T.</i> <i>cruzi</i> y <i>T. rangeli</i>	19
5.3.2 Digestión del fragmento amplificado y el vector con las enzimas de restricción <i>BamHI</i> y <i>HindIII</i>	21
5.3.3 Defosforilación del vector pQE-30	21
5.3.4 Ligación del fragmento amplificado en el vector de expresión pQE-30 <i>T. cruzi</i> y <i>T. rangeli</i>	22
5.3.5 Transformación en células XL1-Blue	23
5.3.6 Secuenciación de los clones recombinante de <i>T.</i> <i>cruzi</i> y <i>T. rangeli</i>	24

5.4	Expresión de la proteína NTR recombinante de <i>T. cruzi</i> y <i>T. rangeli</i>	25
5.4.1	Ensayos de inducción de la proteína	25
5.4.2	Ensayo de solubilización de la proteína	26
6.	Resultados	27
6.1	Amplificación y clonación de la región codificante de la proteína NTR de las cepas 058 de <i>T. cruzi</i> y Tre de <i>T.</i> <i>rangeli</i>	27
6.2	Expresión de la proteína NTR recombinante de <i>T. cruzi</i> y <i>T. rangeli</i>	36
6.3	Solubilización de la proteína NTR de <i>T. cruzi</i> y <i>T. rangeli</i>	38
7.	Discusión	41
8.	Conclusiones	44
9.	Recomendaciones	45
10.	Referencias bibliográficas	46
11.	Anexos	47

## RESUMEN

*Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli* son dos parásitos filogenéticamente cercanos que comparten hospederos, vectores, distribución geográfica y antígenos, lo que complica su diagnóstico y diferenciación. Sin embargo, *T. rangeli* a diferencia de *T. cruzi* no produce infección y su capacidad de invadir células mamíferas es discutida, constituyendo un modelo interesante para el estudio de los procesos celulares asociados a la invasión celular. Por otra parte, se sabe que la nitrorreductasa (NTR) de *T. cruzi* participa en el establecimiento y mantenimiento de la infección por parte del parásito a la célula hospedera, pero su función aún es desconocida.

Dada la poca información que existe sobre esta proteína, el gen que codifica para la *ntr* de las cepas 058PUJ (*T. cruzi*) y Tre (*T. rangeli*) se amplificó, clonó y secuenció. Dichos genes tienen un tamaño de 944 pb en *T. cruzi* y 896 pb en *T. rangeli*, y presentan una identidad de 75% entre ellos. Estos genes fueron comparados con los previamente clonados y secuenciados por el laboratorio de parasitología molecular, y los resultados mostraron una identidad de 99% con la *ntr* de *T. cruzi* y de 99% con la *ntr* de *T. rangeli*.

Los genes *ntr* de *T. cruzi* y *T. rangeli* codifican para una proteína de 314 aa y 298 aa, respectivamente, con una identidad de 68% entre ellas. Estos genes fueron clonados en un vector de expresión y la proteína recombinante se indujo a una concentración de 0.02 mM de IPTG. Las proteínas recombinantes presentaron un tamaño molecular de 34,72 KDa para *T. cruzi* y 32,74 KDa para *T. rangeli*.



## 1. INTRODUCCIÓN

*Trypanosoma rangeli* es un parásito protozoario hemoflagelado causante de infección en mamíferos en distintas regiones de centro y sur de América, (Vallejo et al. 2003) donde hasta el momento no se ha demostrado ser patógeno para el hospedero humano; contrario a lo que sucede con *Trypanosoma cruzi* el agente causal de la enfermedad de Chagas. Ellos comparten morfología, reservorios, ubicación geográfica, vectores y antígenos lo cual confunde la identificación de las especies y por tanto el diagnóstico de la enfermedad (Vallejo et al. 1988). Nifurtimox y Benznidazol es el tratamiento actual para la enfermedad de Chagas, sin embargo este es limitado debido a su alto nivel de toxicidad y efectos secundarios, además estudios previos han reportado resistencia a los medicamentos por parte de algunas cepas de *T. cruzi* (Hall et al. 2011).

La NTR Tipo I de *T. cruzi* es una proteína de 314 aminoácidos. Su función biológica es poco conocida, pero se cree que está implicada en la resistencia del parásito a los medicamentos. Así mismo, parásitos carentes de los dos alelos que codifican para esta enzima son incapaces de diferenciarse a las formas infectivas y por tanto infectar nuevas células (Wilkinson et al. 2008). Teniendo en cuenta lo anterior se postula que la proteína NTR de los tripanosomátidos es vital para mantener la infección en la célula eucariota. Por lo cual, en este trabajo se pretende realizar la clonación y expresión de la proteína Nitrorreductasa Tipo I de *T. cruzi* y *T. rangeli* con el objetivo de usarla en futuros estudios de funcionalidad.

## 2. JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El parásito protozoo *Trypanosoma cruzi* es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, la cual es endémica en América Latina, donde la principal vía de transmisión es la vectorial por las heces de insectos del género *Rhodnius sp.*, principalmente (Bellini et al. 2011). A nivel mundial, cerca de 28 millones de personas en zonas tropicales están infectadas y 25 millones se encuentran en riesgo de adquirir la enfermedad. Para el año 2011 se reportó un número de 60.000 muertes, lo cual representa un problema de salud pública (Hall et al. 2011).

El tratamiento actual para esta enfermedad es limitado debido a que es tóxico. Además, estudios recientes han mostrado que cepas aisladas de *T. cruzi* han adquirido resistencia al medicamento, situación que ha progresado a través del tiempo (Hall et al. 2011).

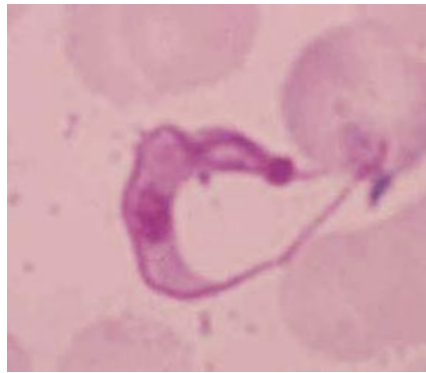
Por otra parte, *Trypanosoma rangeli* es un parásito filogenéticamente muy cercano al *T. cruzi*, se ha encontrado que puede infectar a los humanos, aunque no resulta patógeno para ellos. Y de manera importante comparte los mismos hospederos, distribución geográfica, reservorios e insectos vectores. *T. rangeli* presenta una morfología similar a la de *T. cruzi*, además comparte un gran número de antígenos con este y es por esta razón que el diagnóstico y diferenciación de ambos parásitos presenta dificultad (Vallejo et al. 2003). Sin embargo, y a diferencia de *T. cruzi*, *T. rangeli* no invade las células mamíferas, por tanto se vuelve importante como modelo para estudiar la funcionalidad de proteínas similares a las de *T. cruzi* que puedan estar participando en el proceso de interacción entre el hospedero y el parásito.

La nitrorreductasa tipo I (NTR) de *T. cruzi* ha sido implicada en la resistencia del parásito a los medicamentos convencionalmente usados para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, adicionalmente parásitos carentes de los genes codificantes para esta enzima son incapaces de diferenciarse a las formas infectivas e infectar células de cultivos celulares, implicando que la actividad de la NTR es fundamental para establecer y mantener la infección en la célula eucariota (Wilkinson et al. 2008). Sin embargo, la función de esta enzima aún es desconocida tanto para *T. cruzi* como para *T. rangeli*, que siendo dos especies muy parecidas mantienen ciclos de vida diferentes en el hospedero mamífero. Por lo anterior, es importante evaluar el papel de esta enzima en ambas especies que a futuro nos permitan entender su posible función en el proceso de infección a la célula del hospedero. Teniendo en cuenta estos antecedentes, en este trabajo se realizó la clonación y expresión de la proteína Nitrorreductasa Tipo I de *T. cruzi* y *T. rangeli* con el objetivo de utilizarla en estudios comparativos de funcionalidad de las mismas.

### 3. MARCO TEORICO

#### 3.1 *Trypanosoma cruzi*

*T. cruzi* es un protozoo flagelado que pertenece al orden *kinetoplastida* el cual se caracteriza por presentar una única mitocondria que recorre toda la longitud del parásito. La zona definida de esta es conocida como cinetoplasto, lugar donde se encuentra el ADN mitocondrial, llamado también ADN cinetoplástico (Brack. 1968) (Figura 1).



**Figura 1.** Forma epimastigota de *T. cruzi*.

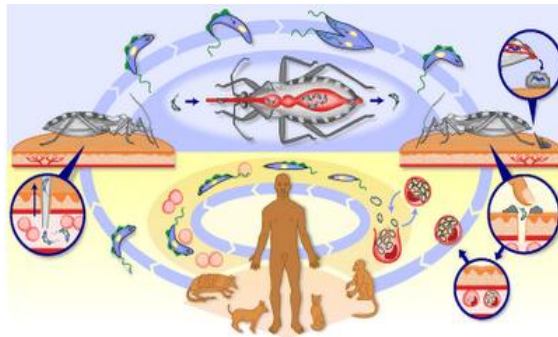
(<http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/periodico/chagas/cruzi.html>)

*T. cruzi* es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, infecta a más de 10 millones de personas en el mundo y es responsable de 60.000 muertes al año, lo cual representa un grave problema de salud pública. (Hall et al. 2011).

### 3.2 Ciclo de vida de *T. cruzi*

Es transmitido principalmente por insectos vectores. Cuando estos insectos hematófagos depositan en la piel del hospedero mamífero heces que contiene tripomastigotes metacíclicos, que corresponde a la forma infectiva del parásito (Yoshida N. 2006), estos ingresan al organismo del hospedero a través de lesiones cutáneas o de las membranas mucosas. Cuando las formas infectivas entran en una célula humana, se transforman en amastigotes, la forma replicativa del parásito. El amastigote finalmente se transforma en tripomastigote sanguíneo el cual estalla la célula y vuelven a infectar otras células repitiéndose el ciclo de replicación en el hospedero (Tanowitz, et al. 1992).

Cuando el insecto pica a un hospedero infectado, algunos tripomastigotes pasan a él a través de la sangre. En el intestino del insecto se transforman en epimastigotes, los cuales se van a replicar para luego diferenciarse en tripomastigotes metacíclicos en la parte final del intestino grueso, para finalmente ser evacuados a través de las heces del vector e iniciar nuevamente el ciclo. (Ajioka et al. 1996) (Figura 2).



**Figura 2.** Ciclo de vida de *Trypanosoma rangeli*.

(<http://manuelisidroxxi.blogspot.com/2013/01/venezuela-nuevo-perfil-y-nuevo.html>)

### 3.3 *Trypanosoma rangeli*

*T. rangeli* a diferencia de *T. cruzi* no es patógeno para el mamífero, sin embargo, tiende a confundirse con *T. cruzi* ya que comparten vectores, hospederos y distribución geográfica en un área terrestre extensa. Adicionalmente ambos parásitos han sido encontrados en infecciones mixtas y comparten un amplio número de antígenos, lo cual ha llevado a un diagnóstico equivocado de la infección por *T. cruzi*, generando importantes consecuencias prácticas en la epidemiología de la tripanosomiasis americana, ya que la presencia de *T. rangeli* en aquellas áreas que son endémicas para *T. cruzi* plantea la urgente necesidad de nuevas metodologías para garantizar el correcto diagnóstico de la enfermedad de Chagas (Grisard et al. 2010).

La forma sanguínea de *T. rangeli* mide aproximadamente 26 a 34 micras de longitud, posee un pequeño cinetoplasto redondo subterminal, el núcleo esta cerca de la parte media del cuerpo y tiene una membrana ondulante bien desarrollada (Vallejo et al. 1988) (Figura 3).



**Figura 3.** Forma epimastigota de *T. rangeli* K (Pavía, P. Laboratorio de Parasitología Molecular, PUJ)

### 3.4 Ciclo de vida de *T. rangeli*

*T. rangeli* es transmitido principalmente por la saliva de los triatomíneos del género *Rhodnius*. Los vectores se infectan al ingerir sangre de animales contaminados con *T. rangeli*, luego el parásito logra desarrollarse en la porción delgada del intestino del insecto transformándose allí en epimastigotes. Estas formas invaden la hemolinfa, donde se logran multiplicar intra y extracelularmente. Luego de 10 a 15 días de estar en la hemolinfa ascienden a las glándulas salivales, donde finalmente se transforman en las formas infectantes, los metatrimastigotes. Los hospederos vertebrados se infectan durante la picadura del insecto infectado al inocularle durante la mordida saliva rica en las formas metatrimastigotes infectantes (Vallejo et al. 2003) (Figura 4).

A pesar de que *T. rangeli* está bien estudiado dentro del insecto vector, la manera como estos tripomastigotes se mantienen en el mamífero se desconoce hasta el momento, existiendo una gran controversia acerca de las capacidades replicativas de los tripomastigotes y de su capacidad infectiva en la célula hospedera. (Vallejo et al. 2003).

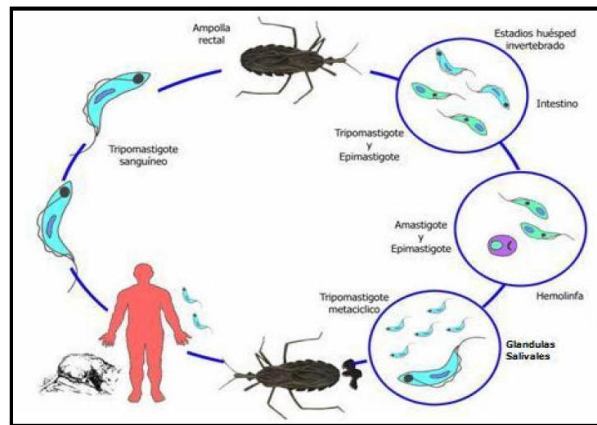


Figura 4. Ciclo de vida de *Trypanosoma rangeli*. (Pavía, P. Laboratorio de parasitología molecular, PUJ)

### 3.5 Nitrorreductasa Tipo I

La proteína nitrorreductasa tipo I de *T. cruzi*, es codificada por un gen de copia única con dos alelos de 939 pb (Tc00.1047053510611.60) y 942 pb (Tc00.1047053506791.70) ubicados en el cromosoma 28 y que codifican para una proteína de 312 aa y 313 aa, respectivamente (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>). Su función biológica es poco conocida pero se cree que es una proteína que pertenece a la familia de las nitrorreductasas Tipo I, encontradas con mayor frecuencia en bacterias y poco frecuentes en parásitos (Hall et al. 2011).

Existen dos clases de nitrorreductasas, las NTR tipo I y II, sin embargo solo las NTR Tipo I han sido identificadas en los tripanosomátidos. Las NTR Tipo I no son dependientes de oxígeno y son dependientes de NADH, median la reducción del grupo nitro para generar un intermediario nitroso que luego va a reducirse a hidroxilamina, lo que sugiere que la NTR es esencial para que el parásito logre cumplir las diferentes etapas para establecer y mantener la infección en el hospedero mamífero (Hall et al. 2011).

Adicionalmente se sabe, que la NTR Tipo I tiene la capacidad de reducir una amplia gama de fármacos nitroheterocíclicos y cuando esta está disminuida en *T. cruzi* le confiere una resistencia a estos agentes tripanosidas. La pérdida de una sola copia del gen en *T. cruzi*, es suficiente para causar resistencia cruzada a una amplia gama de compuestos nitroheterocíclicos (Wilkinson et al. 2008). Según Hall, 2003 las NTR Tipo I de *T. cruzi* catalizan la reducción de la droga nifurtimox generando cadenas de nitrilo insaturadas que resultan tóxicas para el parásito.

Por otra parte, Wilkinson y colaboradores 2008 demostraron que la proteína NTR es esencial para el crecimiento de las formas epimastigotas de *T. cruzi*; y adicionalmente que es necesaria para su diferenciación al estadio tripomastigote metacíclico, la forma infectiva del parásito. Así mismo, mutantes de esta proteína



no pudieron infectar células Vero, concluyendo que la NTR de *T. cruzi* tiene un rol esencial en el establecimiento y mantenimiento de la infección.

Teniendo en cuenta la importancia de estas proteínas en el parásito, el laboratorio de parasitología molecular de la PUJ previamente clonó y secuenció los genes codificantes para la proteína NTR tipo I de las cepas colombianas 058PUJ de *T. cruzi* y Tre de *T. rangeli*. Dichos genes presentaron un tamaño de 945 pb en *T. cruzi* y 897 pb en *T. rangeli* y codifican para una proteína de 313 aa y 298 aa, respectivamente (Montenegro et al. 2013, Manuscrito en preparación).

Basados en lo anterior, en este proyecto se pretende expresar la proteína nitrorreductasa tipo I recombinante de *T. rangeli* y *T. cruzi* con el objetivo de utilizarla en ensayos de funcionalidad que contribuyan a la generación de conocimientos acerca del funcionamiento de esta enzima en dos especies filogenéticamente similares que presentan mecanismos de invasión celular diferentes.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Expresar la proteína Nitrorreductasa Tipo I de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli*.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Amplificar y clonar la región codificante para la NTR Tipo I de *T. cruzi* y *T. rangeli*.
2. Expresar la proteína NTR recombinante de *T. rangeli* y *T. cruzi*

## 5. MATERIALES Y METODOS

### 5.1 Parásitos

Para la obtención del gen codificante para la proteína Nitrorreductasa Tipo I de *T. cruzi* y *T. rangeli* se trabajó con las cepas colombianas 058PUJ de *T. cruzi* (Pavia PX et al. 2012) y Tre de *T. rangeli* (Morales et al. 2002) las cuales fueron mantenidas en medio LIT líquido (NaCl 4 g/l, KCl 0,4 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 g/l, glucosa 2 g/l, triptosa 5 g/l, infusión de hígado 5 g/l, hemina 50 mg/l) suplementado con 15 % (v/v) de suero fetal bovino inactivado (SFB) en el Laboratorio de Parasitología Molecular de la PUJ, e identificadas mediante el perfil de los minicírculos (Vallejo et al. 2002).

### 5.2 Obtención de ADN genómico

El ADN de los parásitos se obtuvo bajo los siguientes parámetros. La masa de parásitos en fase logarítmica de crecimiento se recolectó mediante centrifugación a 2.500 rpm durante 15 minutos (min), y se lavó con solución tampón PBS 1X. Tras la última centrifugación, los parásitos fueron resuspendidos en solución tampón de lisis a una concentración final de SDS al 1%. Luego, el ADN fue extraído (V:V) con fenol; fenol-cloroformo-isoamilico 1:24:1; cloroformo-isoamilico 24:1 y precipitado con 2,5 volúmenes de etanol absoluto. Finalmente, el ADN obtenido se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en 50 ul de agua destilada (Puerta et al. 2005).

### 5.3 Clonación de la región codificante para la NTR de *T. cruzi* y *T. rangeli*

#### 5.3.1 Amplificación del gen codificante para la NTR de *T. cruzi* y *T. rangeli*

Teniendo en cuenta que el Laboratorio de Parasitología Molecular de la PUJ ya había reportado previamente la secuencia del gen codificante para la NTR Tipo I de *T. cruzi* y *T. rangeli*, se diseñaron manualmente los oligonucleótidos específicos NTR2BamHIFw (5`-CTATAGGATCCATGAAGAGAAATGGCATAAAA-3`) y NTR2HindIIIrw (5`-CTATAAAGCTTTCAAACTTTCCCCACCGAA-3`), los cuales

amplifican la región codificante completa del gen (desde el codón de inicio hasta el codón de parada) y tienen las dianas de restricción para las endonucleasas *BamHI* y *HindIII*.

A partir de ADN genómico de *T. cruzi* y *T. rangeli*, y mediante PCR se amplificó la región codificante completa para los genes NTR tipo I de ambos parásitos bajo las condiciones mencionadas en la Tabla 1 y 2. Dichos fragmentos fueron separados en un gel de agarosa al 1 % y se purificaron haciendo uso del estuche comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

**Tabla 1.** Condiciones de reacción de la PCR para amplificar la región codificante de los genes NTR tipo I de *T. cruzi* y *T. rangeli*

Reactivo	Concentración final
Buffer	1 X
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
dNTPs	200 uM
BamHINTR2Fw	0,8 uM
HindIIINTR2Rw	0,8 uM
Platinum® Taq DNA Polymerase high fidelity (Roche)	1,3 U/rx

**Tabla 2.** Programa de PCR para amplificar la región codificante de los genes NTR tipo I de *T. cruzi* y *T. rangeli*

Número de ciclos	Programa	Temperatura (°C)	Tiempo
1	Denaturación inicial	95	5min
35	Denaturación	95	45s
	Anillaje	58	45s
	Extensión	72	1min
1	Extensión final	72	8min

### 5.3.2 Digestión del fragmento amplificado y el vector de expresión (pQE-30 (Qiagen)) con las enzimas de restricción *BamHI* y *HindIII*

Teniendo en cuenta que los oligonucleótidos diseñados tenían en sus extremos dianas de restricción para las endonucleasas *BamHI* y *HindIII*, los productos de PCR purificados se sometieron a restricción según las recomendaciones de la casa comercial (Tabla 3). De igual forma, el vector de expresión pQE-30 (Qiagen) fue digerido con las enzimas de restricción *BamHI* y *HindIII* (Figura 5). Luego de la digestión los fragmentos fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1% y purificados haciendo uso del estuche comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

**Tabla 3.** Condiciones de reacción de la Digestión con las enzimas de restricción *BamHI* y *HindIII* para los fragmentos amplificados de *T. cruzi* y *T. rangeli*.

Reactivo	Concentración final
H <sub>2</sub> O	-----
Buffer	1X
Enzima <i>BamHI</i>	12.000U
Enzima <i>HindIII</i>	12.000U
ADN (fragmento de PCR)	5.500ng/uL
4 horas a 37 <sup>0</sup> C	

### 5.3.3 Defosforilación del vector pQE-30

Luego de ser digerido con las enzimas de restricción *BamHI* y *HindIII* el vector de expresión pQE-30 fue defosforilado con el fin de evitar la religación de este. Las condiciones de reacción se observan en la tabla 4.

**Tabla 4.** Condiciones de reacción de la Defosforilación del vector pQE-30 digerido con las enzimas de restricción *BamHI-HindIII*

Reactivo	Concentración final
H <sub>2</sub> O	-----
Buffer	10X
Enzima fosfatasa alcalina CIP	1X
Vector pQE-30	13.2 ng/uL
10 minutos a 37 <sup>0</sup> C 5 minutos a 75 <sup>0</sup> C	

### 5.3.4 Ligación del fragmento amplificado en el vector de expresión pQE-30

Cada uno de los fragmentos purificados se ligó en el vector de expresión pQE-30 (Figura 5), en una relación inserto:vector de 4:1 (Tabla 5).

**Tabla 5.** Condiciones de reacción de la Ligación del plásmido pQE-30 y los fragmentos de la NTR de *T. cruzi* y *T. rangeli*

Reactivo	Concentración final
H <sub>2</sub> O	-----
Buffer	1X
Enzima "T4 DNA ligase"	3U /uL
Plásmido pQE-30	10.56 ng/uL
ADN	20 ng
2 horas a Temperatura Ambiente	

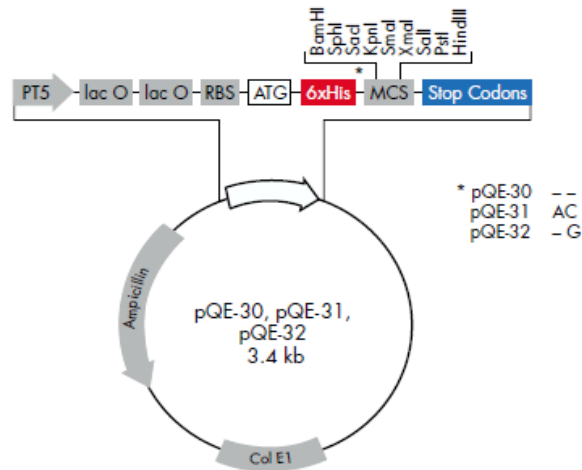


Fig 5. Plásmido pQE- 30. Mapa circular del vector y puntos de referencia de la secuencia.

### 5.3.5 Transformación en células M15 de *E. coli*

10 uL del producto de ligación fueron transformados en células competentes de *E. coli* M15 mediante choque térmico a 42 °C durante 1 min y 30 seg. Posteriormente, las bacterias se resuspendieron en 500 uL de medio Luria Bertani (LBA) suplementado con ampicilina 100 ug/mL (LB-Amp) y se incubaron 30 minutos a 37°C en agitación constante (Puerta & Urueña, 2005). Finalmente, 200 uL de las bacterias transformadas se plaquearon en cajas de agar LBA-Amp.

Se tomaron 4 colonias de la transformación con el gen NTR de *T. cruzi*, denominadas pQE/TcNTR-1; 2; 3 y 4. Y 6 colonias de la transformación con el gen NTR de *T. rangeli*, denominadas pQE/TrNTR-1; 2; 3; 4; 5 y 6. Para la evaluación de las colonias recombinantes, la fracción recombinante del plásmido fue amplificada mediante PCR empleando los primers pQE-F1 (5'-AAGTGCCACCTGACGTCTAAG-3') y pQE-R (5'-AGTTCTGAGGTCATTACTGGATC-3') (Ramirez, C. Laboratorio de Parasitología Molecular). Las condiciones de reacción de la PCR fueron las siguientes:

**Tabla 6.** Condiciones de reacción de la PCR para chequear las colonias recombinantes de la NTR de *T. cruzi* y *T. rangeli*

Reactivo	Concentración final
Buffer	1 X
MgCl	1,5 mM
dNTPs	200 uM
pQE-F1	0,8 uM
pQE-R	0,8 uM
Platinum® Taq DNA Polymerase high fidelity (Roche)	1,3 U/rx

**Tabla 7.** Programa de PCR para chequear los clones recombinantes de la NTR de *T. cruzi* y *T. rangeli*

Número de ciclos	Programa	Temperatura (°C)	Tiempo
1	Denaturación inicial	95	5min
35	Denaturación Anillaje Extensión	95 64 72	1min 45s 1min
1	Extensión final	72	8min

### 5.3.6 Secuenciación de los clones recombinantes de *T. cruzi* y *T. rangeli*

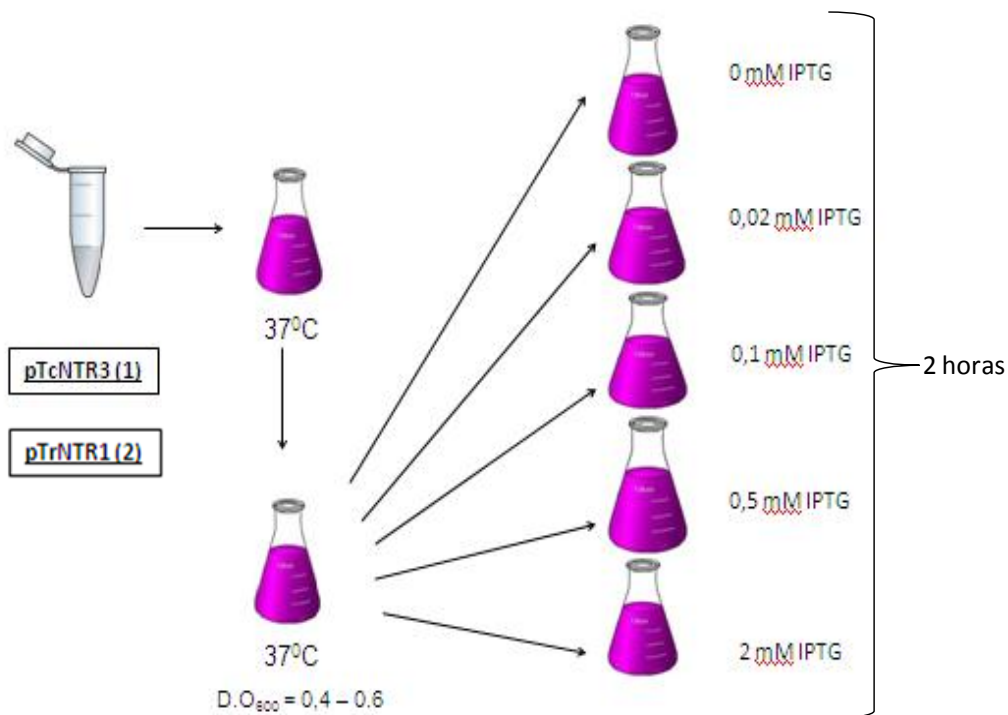
Los clones recombinantes obtenidos fueron secuenciados en ambas direcciones. La secuenciación de los clones se llevó a cabo mediante procedimientos estándares del servicio suministrado por la compañía Macrogen® (Corea), utilizando los primers universales pQE-F (5'-CCCGAAAAGTGCCACCTG3') y pQE-R (5'-GTTCTGAGGTCATTACTGG – 3').



## 5.4 Expresión de la proteína NTR recombinante de *T. cruzi* y *T. rangeli*

### 5.4.1 Ensayos de inducción de la proteína

Para lograr inducir la proteína NTR se tomó un inóculo del clon pQE-30/TcNTR3-1 y pQE-30/TrNTR1-2 recombinantes para la proteína NTR de *T. cruzi* y *T. rangeli*, respectivamente. Dichos clones se crecieron en medio LB-Amp (100 ug/ml) durante toda la noche a 37 °C y 250 rpm. Posteriormente, 1 ml de cultivo crecido se inóculo a 50 ml de medio nuevo y se incubó hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica entre 0,4 y 0,6, leída a 600 nm. La sobre-expresión de la proteína se realizó con concentraciones de IPTG de 0,02 mM; 0,1 mM; 0,5 mM y 2 mM durante 2 horas a 37°C y 250 rpm según lo recomendado en el manual de expresión (The QIAexpressionist) (Figura 6).



**Figura6.** Esquema del ensayo de inducción de la proteína NTR Tipo I de *T. cruzi* y *T. rangeli*.

Posterior a la inducción, los cultivos fueron centrifugados a 13.000 rpm durante 20 min y el botón celular se almacenó para evaluar las mejores condiciones de solubilización de la proteína inducida. Una alícuota de 10 ul de cada uno de los ensayos se corrió en geles denaturantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) y se coloreó con azul de Coomassie para su visualización y observación de los mejores parámetros de inducción.

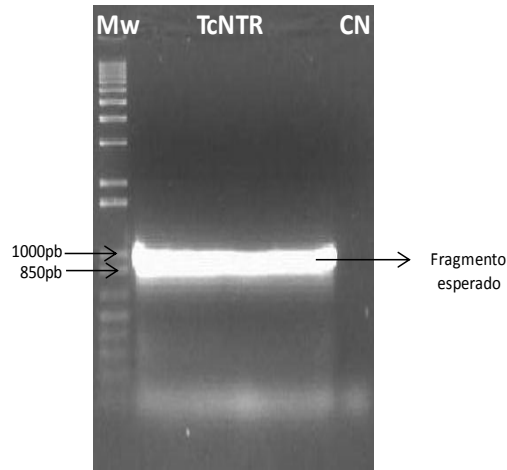
#### **5.4.2 Ensayo de solubilización de la proteína**

Para la solubilización de la proteína, los cultivos inducidos se resuspendieron en una solución de solubilización ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, NaCl 300 mM, pH8) con lisozima, y se dejó en agitación durante 1 hora a 4 °C, para su posterior sonicación por 8 ó 10 min de tiempo efectivo, amplitud del 20 %, 1 seg ON y 2 seg OFF. Luego de la sonicación, la solución se centrifugó a 5.000 rpm durante 30 min a 4 °C y el sobrenadante se guardó a -20 °C hasta su visualización en geles denaturantes de poliacrilamida. El botón de células fue resuspendido nuevamente en solución de solubilización con lisozima más SDS al 0,025 % y se dejó en agitación durante 1h a 4 °C, para ser sonicado una vez más bajo las mismas condiciones. Finalmente, una alícuota de 10 ul de cada solubilización y el pellet bacteriano restante fueron almacenados para su visualización mediante SDS-PAGE.

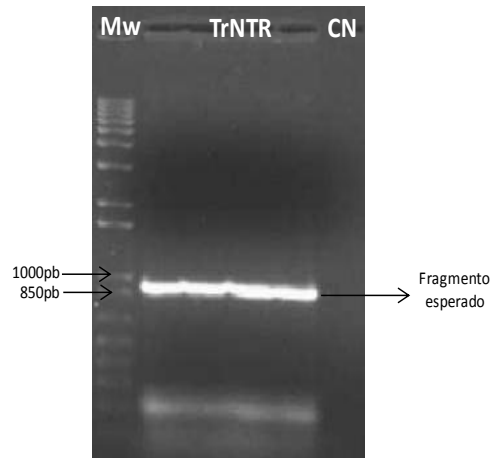
## 6. Resultados

### 6.1 Amplificación y clonación de la región codificante de la proteína NTR de las cepas 058PUJ de *T. cruzi* y Trede *T. rangeli*

A partir de ADN genómico de las cepas 058PUJ de *T. cruzi* y Tre de *T. rangeli* y usando la pareja de oligonucleótidos NTR2BamHIFw y NTR2HindIIIRw se amplificó un fragmento de aproximadamente 900 pb para *T. cruzi* (Figura 7) y *T. rangeli* (Figura 8). Dichos fragmentos se extrajeron del gel, se purificaron y clonaron en el plásmido de mantenimiento pCR 2.1 (Invitrogen) (Figura 9). Producto de su clonación se obtuvieron 2 clones positivos para *T. rangeli*, los cuales fueron denominados TrNTR clon 1 y TrNTR clon 2; y tres clones positivos para *T. cruzi* los cuales se denominaron TcNTR clon 1; TcNTR clon 2 y TcNTR clon 3. Estos clones fueron digeridos con la enzima de restricción *EcoRI*, la cual corta el vector en ambos lados del sitio de clonaje (Figura 9). Producto de la digestión todos los clones liberaron un fragmento de aproximadamente 900 pb (Figura 10A y B). Con este resultado, y para estar seguros de la amplificación del gen *ntr*, los clones TrNTR clon 1 y TcNTR clon 3 se sometieron a un análisis de restricción (Figura 11) (Tabla 7). Para este análisis se tuvieron en cuenta las secuencias de los genes *ntr* previamente obtenidas en el laboratorio de parasitología molecular.



**Figura 7. PCR para la cepa 058 de *T. cruzi* usando los oligonucleótidos NTR2BamHIFw y NTR2HindIIIrw.** Electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio conteniendo 100 $\mu$ l del producto de amplificación del ADN de la cepa 058PUJ de *T. cruzi*. La banda seleccionada para los ensayos de clonación se indica a la derecha, se utilizó el marcador de peso molecular 1 Kb plus (Invitrogen), cuyos pesos se indican a la izquierda.



**Figura 8. PCR para la cepa Tre de *T. rangeli* usando los oligonucleótidos NTR2BamHIFw y NTR2HindIIIrw.** Electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio conteniendo 100 $\mu$ l del producto de amplificación del ADN de la cepa Tre de *T. rangeli*. La banda seleccionada para los ensayos de clonación se indica a la derecha, se utilizó el marcador de peso molecular 1 Kb plus (Invitrogen), cuyos pesos se indican a la izquierda.

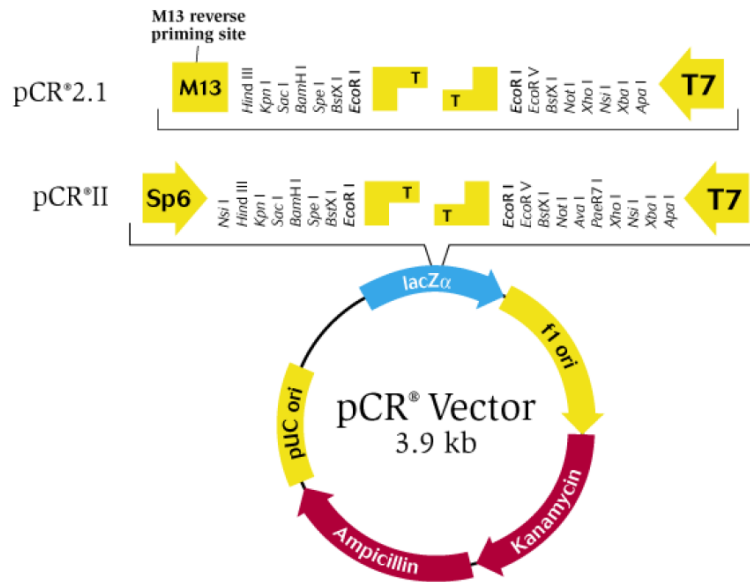


Figura 9. Plásmido pCR 2.1 (Invitrogen). Mapa circular del vector y puntos de referencia de la secuencia

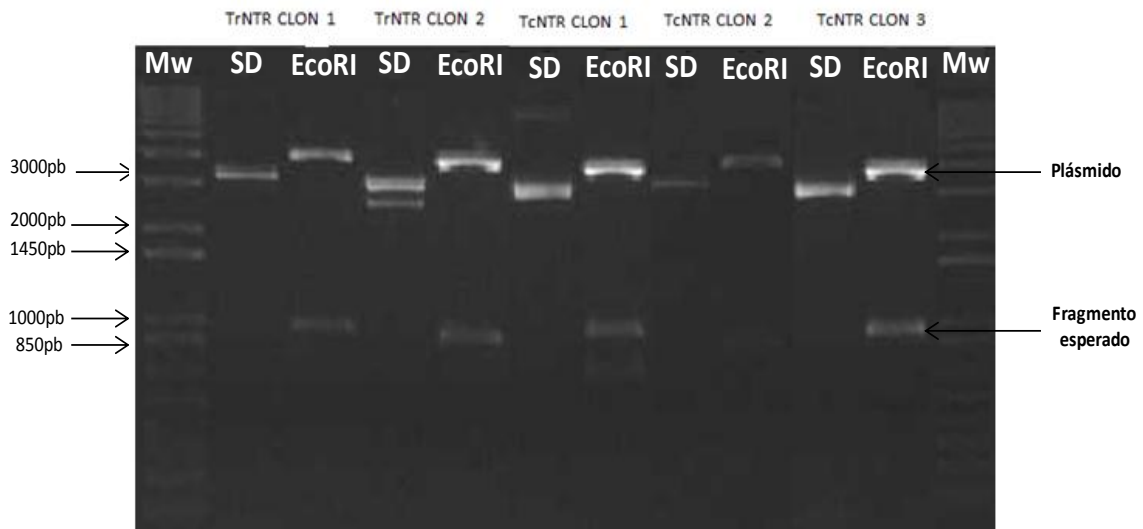
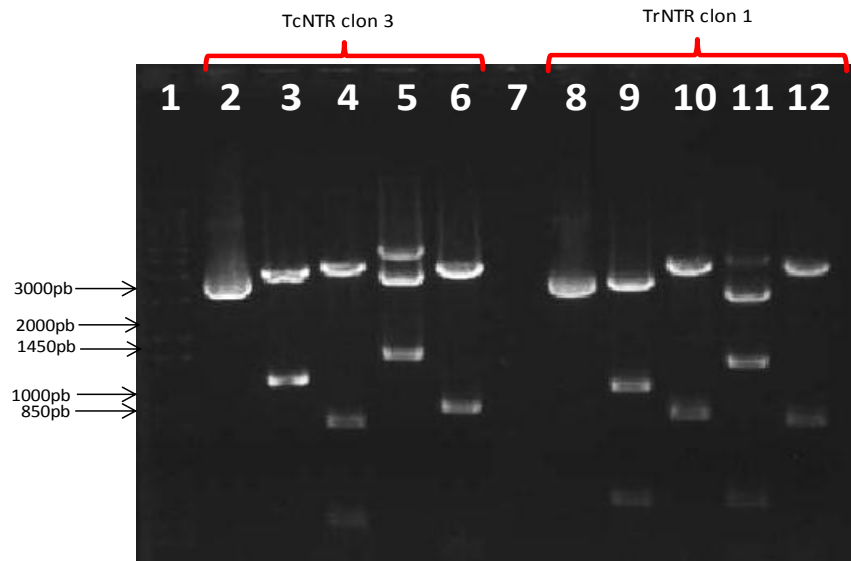


Figura 10. Digestión con la enzima de restricción *EcoRI* del ADN plásmidico de los clones TrNTR y TcNTRsin digerir (SD) y digeridos con *EcoRI*. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % del ADN plásmidico.Mw (1), TrNTR clon 1 Sin digerir (2), TrNTR clon 1 *EcoRI* (3), TrNTR clon 2 Sin digerir (4), TrNTR clon 2 *EcoRI* (5), TcNTR clon 1 Sin digerir (6), TcNTR clon 1 *EcoRI* (7), TcNTR clon 2 Sin digerir (8), TcNTR clon 2 *EcoRI* (9), TcNTR clon 2 Sin digerir (10), TcNTR clon 2 *EcoRI* (11), Mw (12).

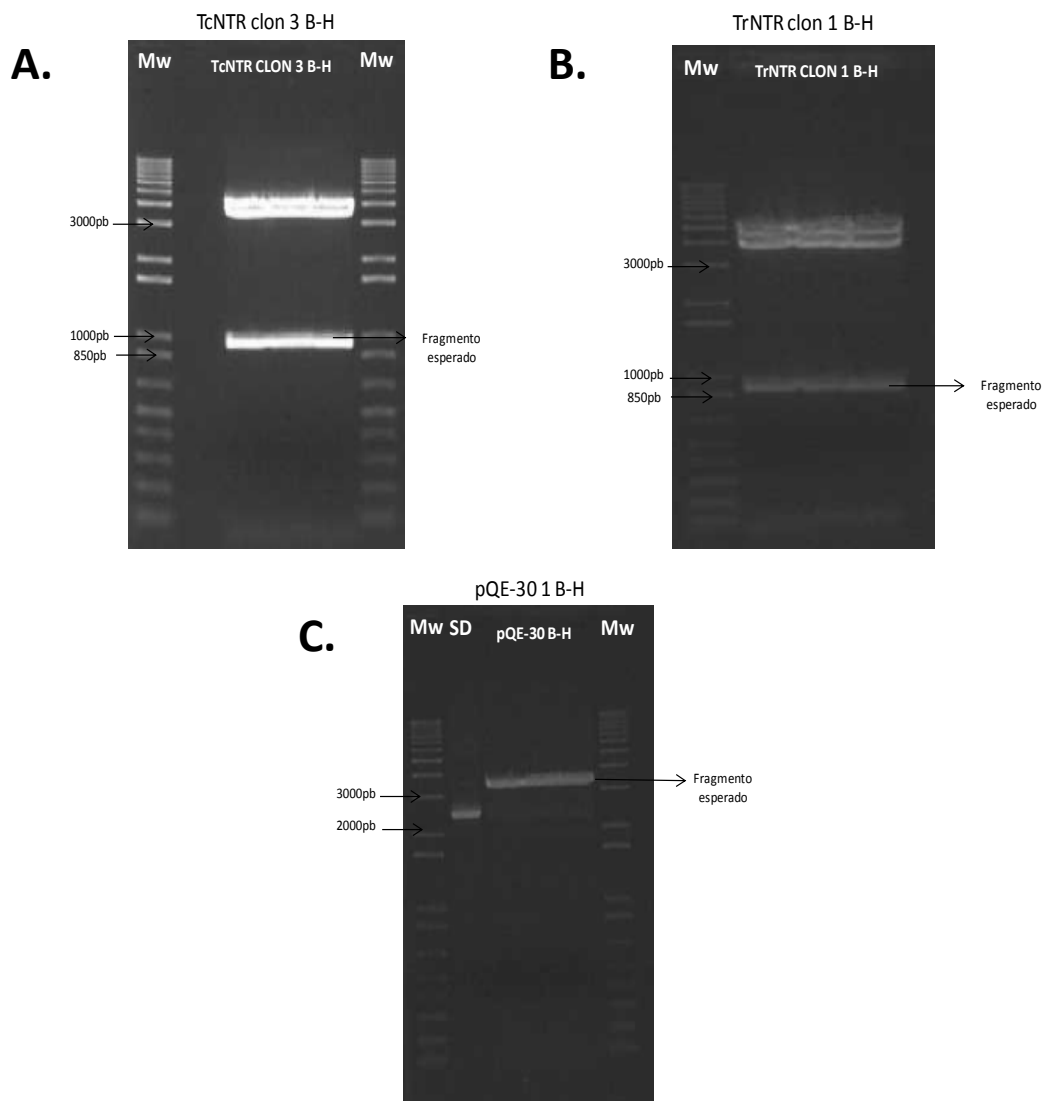
**Tabla 7. Análisis de restricción de la NTR de TcNTR clon 3 y TrNTR clon 1.** Las columnas muestran las diferentes enzimas que se utilizaron para realizar el análisis y las filas muestran los sitios de corte de estas enzimas en el vector, los sitios de corte en el gen *ntr* de *T. cruzi* y *T. rangeli* y las bandas esperadas respecto al análisis de ambos genes.

Enzimas	<i>Trypanosoma cruzi</i>				<i>Trypanosoma rangeli</i>			
	<i>PstI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>SphI</i>	<i>BamHI-HindIII</i>	<i>PstI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>SphI</i>	<i>BamHI-HindIII</i>
Sitios de corte en el vector	1248pb 2438pb	1239pb 238pb	2790pb 1281pb	40pb 56pb	1248pb 2438pb	1239pb 238pb	2790pb 1281pb	40pb 56pb
Sitios de corte en el fragmento	-----	460pb	-----	-----	700pb	----	756pb 395pb	-----
Fragmentos esperados	Vector lineal 1190pb	Vector lineal 779pb 177pb	Vector lineal 1509pb	Vector lineal 938pb 96pb 56pb	Vector lineal 1190pb 345pb	Vector lineal 890pb	Vector lineal 2401pb 1509pb 361pb	Vector lineal 890pb 56pb 96pb



**Figura 11. Análisis de restricción de TcNTR clon 3 y TrNTRclon 1.** Mw (1), TcNTR CLON 3SD (2), TcNTR CLON 3*PstI* (3), TcNTR CLON 3*EcoRI* (4), TcNTR CLON 3*sphI* (5), TcNTR CLON 3 *BamHI-HindIII* (6), TrNTR CLON 1SD (8), TrNTR CLON 1*PstI* (9), TrNTR CLON 1 *EcoRI* (10), TrNTR CLON 1*sphI* (11), TrNTR CLON 1*BamHI-HindIII* (12).

Como se observa en la Tabla 7 y figura 11, el patrón de restricción esperado coincide con el obtenido, especialmente para las enzimas de restricción *EcoRI*, *PstI* y *SphI* las cuales cortan al interior del gen *ntr* de *T. cruzi* y *T. rangeli* y revelan patrones distintivos. Con esta evidencia se realizó una digestión del ADN plasmídico de los clones TcNTR clon 3, TrNTR clon 1 y el plásmido pQE30 con las enzimas de restricción *BamHI* y *HindIII*, como se observa en la figura 14, para su clonación en el vector de expresión.

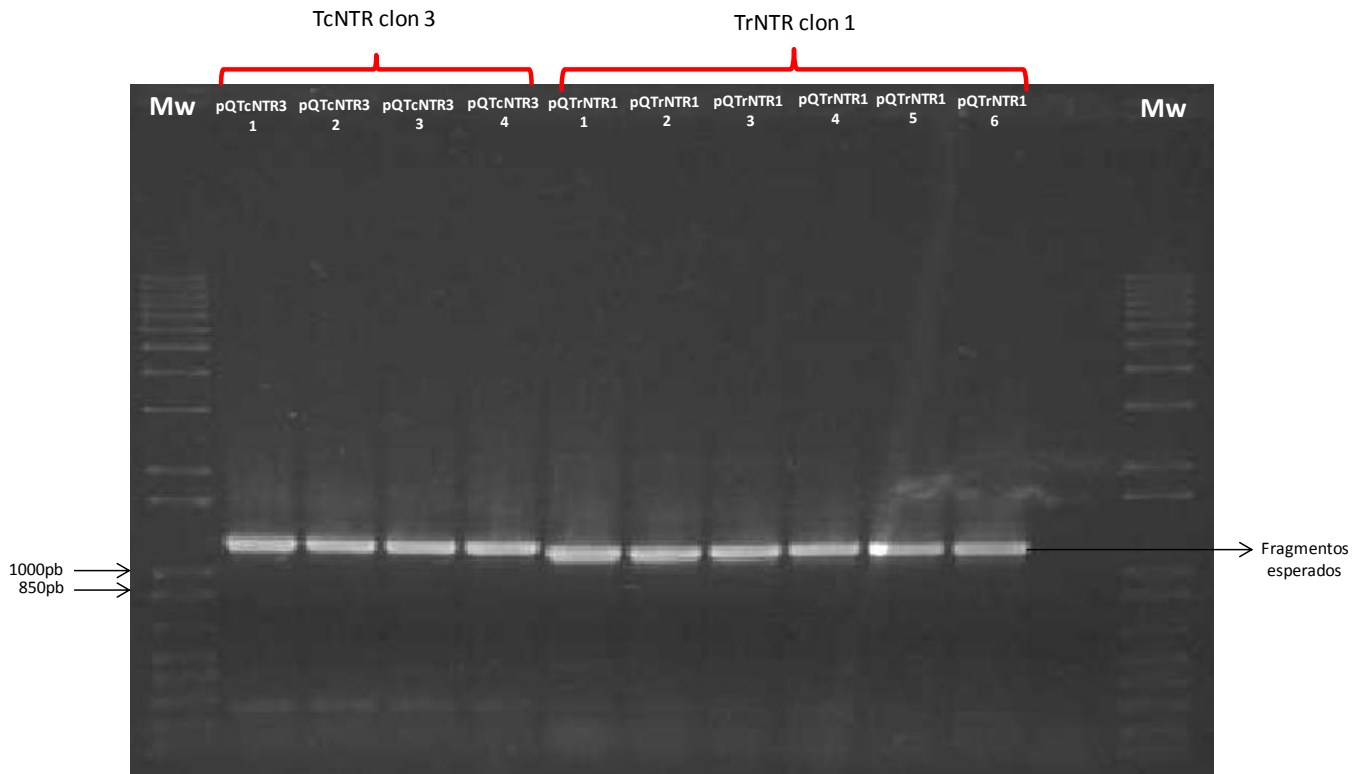


**Figura 14. Digestión de los clones TcNTR clon 3, TrNTR clon 1 y del plásmido pQE-30 con las enzimas de restricción *BamHI* y *HindIII*.** A. Mw (1), Digestión de TcNTR clon 3 con las enzimas de restricción *BamHI* y *HindIII* (2), Mw (3). B. Mw (1), Digestión de TrNTR clon 1 con las enzimas de restricción *BamHI* y *HindIII* (2). C. Mw (1), Digestión del plásmido pQE-30 con las enzimas de restricción *BamHI* y *HindIII* (2), Mw (3).

Los fragmentos obtenidos de la digestión digeridos con las enzimas de restricción *BamHI* y *HindIII* de los clones TcNTR clon 3 y TrNTR clon 1 fueron extraídos del gel de agarosa y utilizados para ligar en el plásmido pQE30 y posteriormente transformar en células de *E. coli* M15.

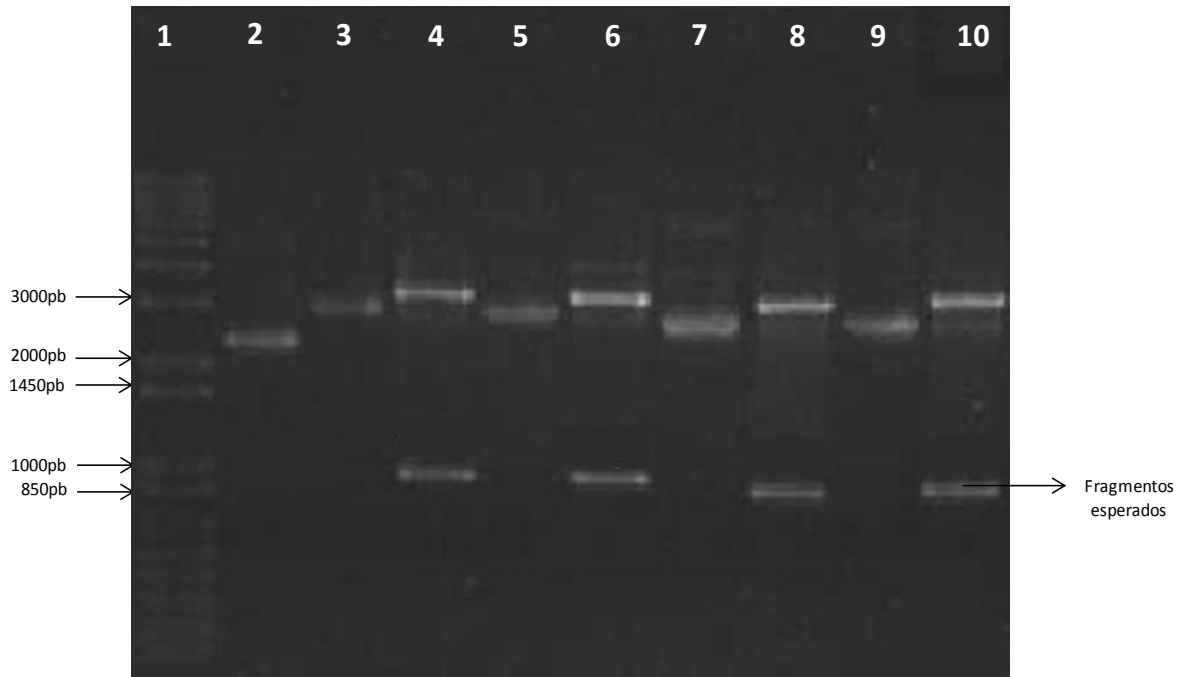
Producto de la ligación se obtuvieron 4 colonias para *T. cruzi* (denominados pQTcNTR3-1; pQTcNTR3-2; pQTcNTR3-3; pQTcNTR3-4) y 6 colonias para *T. rangeli* (denominados pQTrNTR1-1; pQTrNTR1-2; pQTrNTR1-3; pQTrNTR1-4; pQTrNTR1-5; pQTrNTR1-6). La recombinación de estas colonias fue verificada mediante PCR. Para los 4 clones de *T. cruzi* se observó la banda esperada de aproximadamente 1300 pb. Y para *T. rangeli* la banda esperada de 1200 pb en los 6 clones (Figura 15).





**Figura 15.** PCR de las colonias obtenidas de la transformación. Mw (1), pQTcNTR3-1 (2), pQTcNTR3-2 (3), pQTcNTR3-3 (4), pQTcNTR3-4 (5), pQTrNTR1-1 (6), pQTrNTR1-2 (7), pQTrNTR1-3 (8), pQTrNTR1-4 (9), pQTrNTR1-5 (10), pQTrNTR1-6 (11), Mw (12).

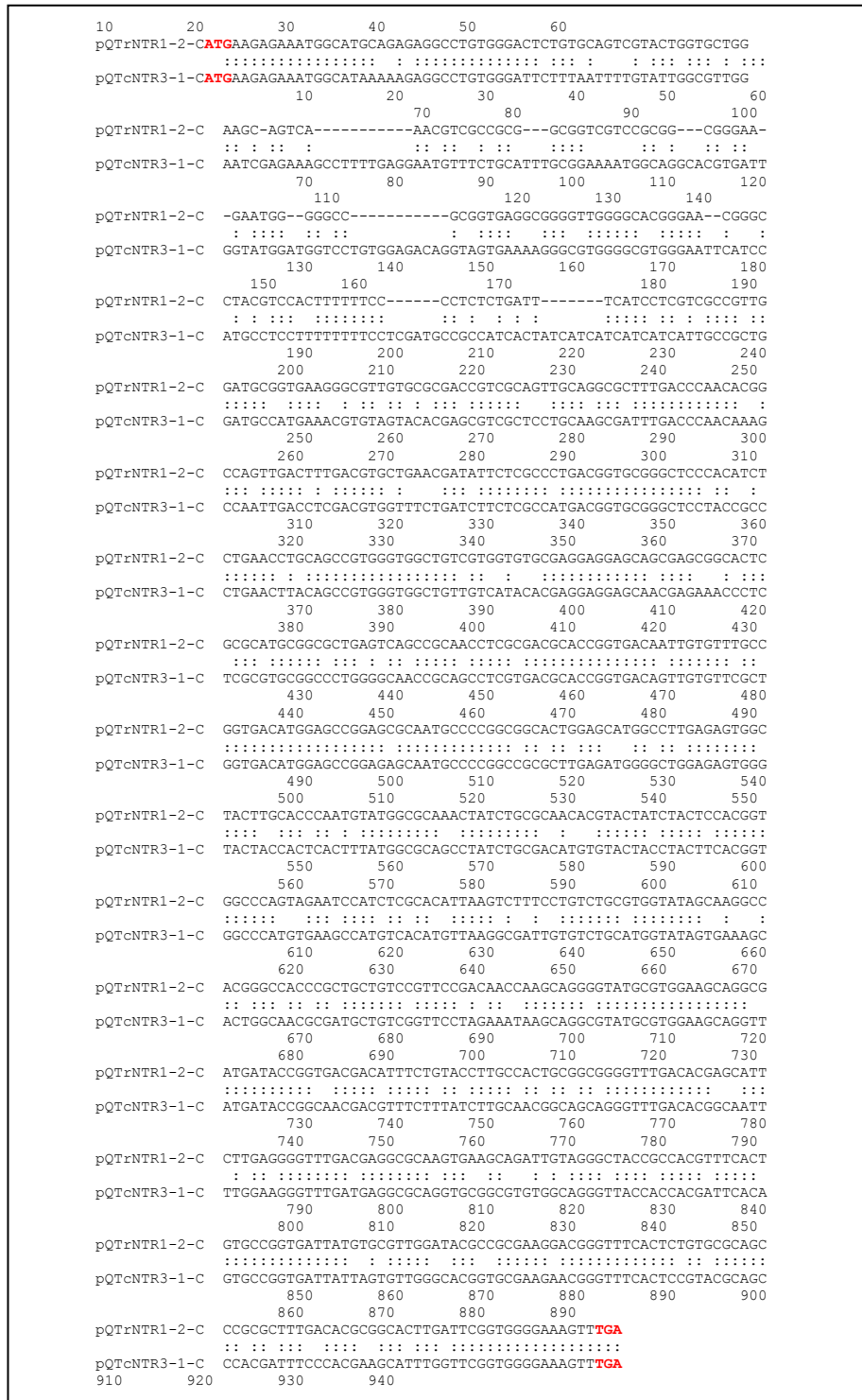
Igualmente, estos clones fueron sometidos a digestión con las endonucleasas de restricción *Bam*HI y *Hind*III. Todos los clones evaluados liberaron el fragmento esperado (Figura 16).



**Figura 16.** Digestión de los clones recombinantes pQTcNTR3-1, pQTcNTR3-2 y pQTrNTR1-1, pQTrNTR1-2 con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III. Mw (1), pQE-30 vacío- circular (2), pQTcNTR3-1 SD (3), pQTcNTR3-1 B-H (4), pQTcNTR3-2 SD (5), pQTcNTR3-2 B-H (6), pQTrNTR1-1 SD (7), pQTrNTR1-1 B-H (8), pQTrNTR1-2 SD (9), pQTrNTR1-2 B-H (10).

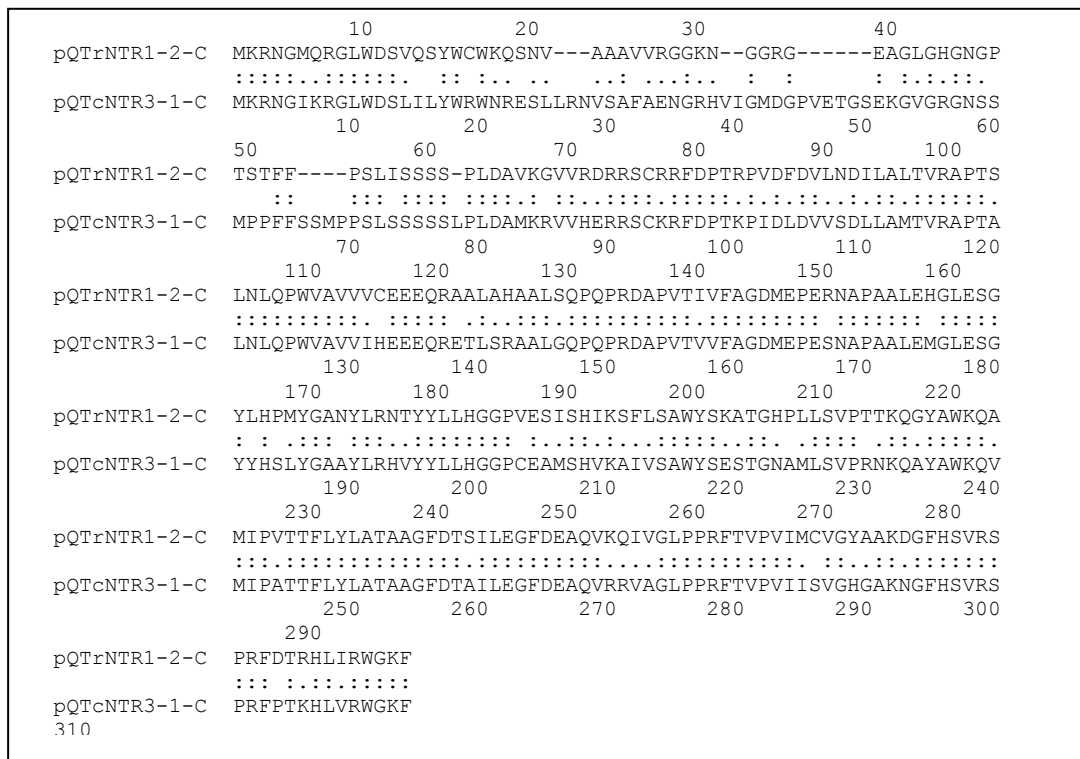
Con esta evidencia, los clones pQTcNTR3-1, pQTcNTR3-2 y pQTrNTR1-1, pQTrNTR1-2 fueron secuenciados y la secuencia fue confirmada. Los resultados de la secuenciación mostraron que la región codificante completa del gen *ntr* de *T. cruzi* tiene un tamaño de 944 pb y una identidad del 99 % cuando se compara con la secuencia previamente clonada y secuenciada en el Laboratorio de Parasitología Molecular de la PUJ. Para *T. rangeli* el gen *ntr* mostró un tamaño de 896 pb y mostró una identidad de 99 % comparado con la NTR de *T. rangeli* que igualmente había sido clonada y secuenciada en el Laboratorio de Parasitología Molecular de la PUJ. Entre *T. cruzi* y *T. rangeli* la identidad de los genes *ntr* fue de 75%. (Figura 12).

*Clonación y expresión de la enzima Nitrorreductasa Tipo I de Trypanosoma cruzi y Trypanosoma rangeli*



**Figura 13. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de la región codificante para la proteína NTR de *T. cruzi* y *T. rangeli*. Los números indican la posición de los nucleótidos en la secuencia**

*T. cruzi* el gen *ntr* origina una proteína de 314 a.a con un tamaño molecular calculado de 34720,81 Da y un punto isoeléctrico de 9,41. Para *T. rangeli* el gen *ntr* origina una proteína de 298 a.a con un tamaño molecular de 32743,38 Da y un punto isoeléctrico de 9,28. La identidad entre las proteínas de *T. cruzi* y *T. rangeli* fue de 68% (Figura 13).

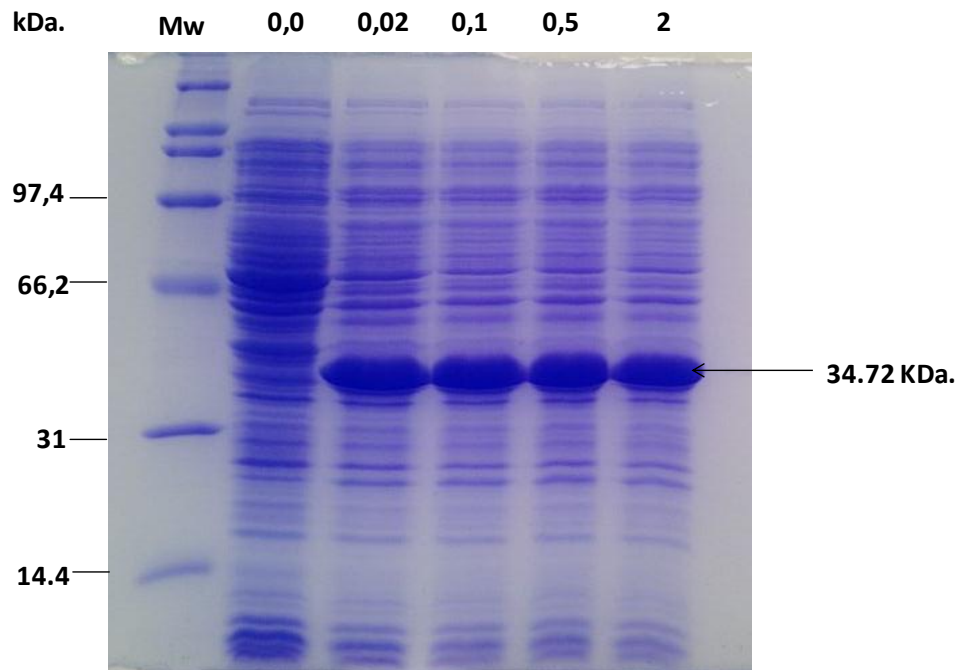


**Figura 13. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína NTR de *T. cruzi* y *T. rangeli*.** Secuencia de aminoácidos de la proteína NTR de *T. cruzi* y *T. rangeli* codificada por la copia del gen en las cepas Tre y 058PUJ.

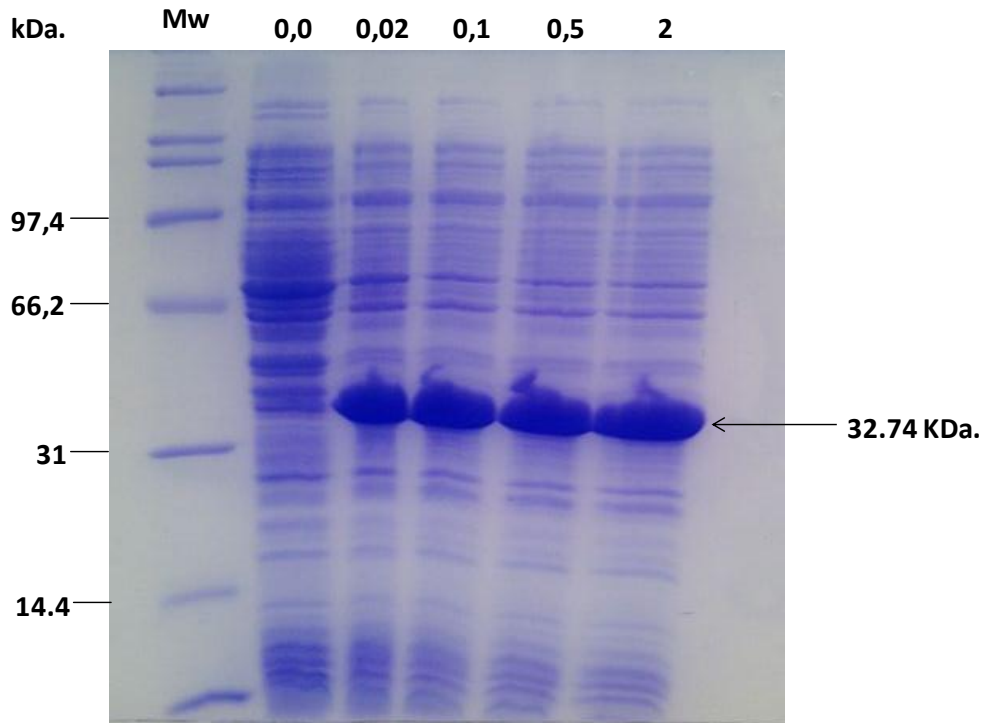
## 6.2 Expresión de la proteína NTR recombinante de *T. cruzi* y *T. rangeli*

Basados en los resultados anteriores, se seleccionaron los clones denominados pQTcNTR3-1 y pQTrNTR1-2 para los ensayos de expresión y purificación de la proteína NTR recombinante.

Para establecer las mejores condiciones de expresión se realizaron ensayos con diferentes concentraciones del inductor IPTG (0,02 mM; 0,1 mM; 0,5 mM y 2mM) (Figura 6). Como se observa en la figura 17 y 18, para la inducción de la proteína de *T. cruzi* y *T. rangeli* todas las concentraciones de inductor usadas resultaron en una fuerte expresión de la proteína recombinante. Con estos resultados se decidió usar una concentración de 0.02 mM de IPTG para continuar los ensayos.



**Figura 17. Ensayo de inducción de la proteína NTR de *T. cruzi* a diferentes concentraciones de IPTG.** Tinción con azul de Coomassie del SDS-PAGE del ensayo de inducción de la proteína NTR de *T. cruzi*. A la derecha se indica el peso molecular de la proteína NTR recombinante obtenida.

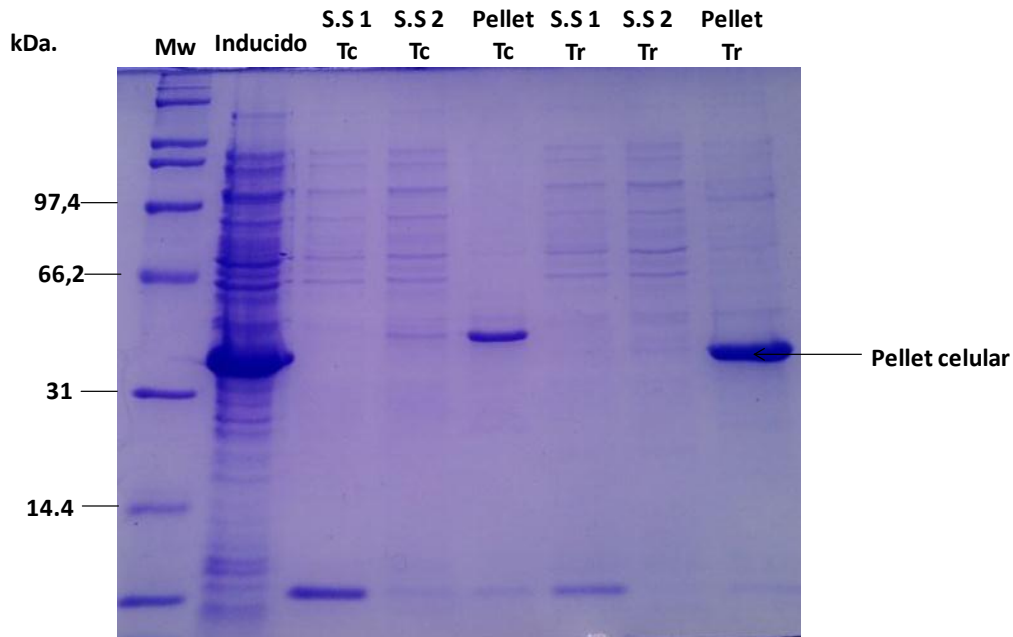


**Figura 18. Ensayo de inducción de la proteína NTR de *T. rangeli* a diferentes concentraciones de IPTG.** Tinción con azul de Coomassie del SDS-PAGE del ensayo de inducción de la proteína NTR de *T. rangeli*. A la derecha se indica el peso molecular de la proteína NTR recombinante obtenida.

Es importante resaltar que la proteína obtenida presenta el tamaño molecular esperado y no se observa la sobre-inducción de otras proteínas de menor o mayor tamaño.

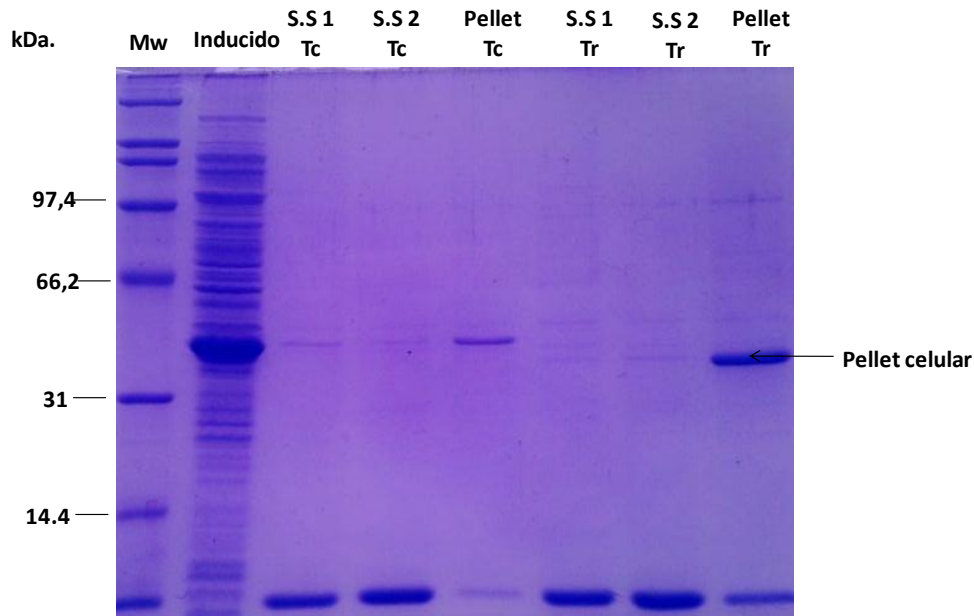
### **6.3 Solubilización de la proteína NTR de *T. cruzi* y *T. rangeli***

Para los ensayos de solubilización, el pellet celular del cultivo inducido con 0.02 mM de IPTG se resuspendió en una solución con lizozima, 0,025% de SDS y se sonicó (10 min de tiempo efectivo, amplitud del 20 %, 1 seg ON y 2 seg OFF) para favorecer la lisis celular y la liberación de la proteína. Como se observa en la figura 19, la proteína NTR de *T. cruzi* y *T. rangeli* no fue solubilizada a pesar de ensayar diferentes soluciones de solubilización (con lizozima ó lizozima + 0,025 % de SDS).



**Figura 18. Ensayo de solubilización de la proteína NTR de *T. cruzi* y *T. rangeli*.** Tinción con azul de Coomassie del SDS-PAGE del ensayo de solubilización de la proteína NTR de *T. cruzi* y *T. rangeli* inducida con 0.02 mM de IPTG. Mw(SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range, Bio-Rad) (1); Cultivo inducido con 0.02 mM de IPTG (2); sobrenadante para la proteína de *T. cruzi* de la primera solución de solubilización (con lisozima) (3); sobrenadante para la proteína de *T. cruzi* de la segunda solución de solubilización (lisozima + 0,025 % de SDS) (4); pellet celular para la proteína de *T. cruzi* (5); sobrenadante para la proteína de *T. rangeli* de la primera solución de solubilización (con lisozima) (6); sobrenadante para la proteína de *T. rangeli* de la segunda solución de solubilización (lisozima + 0,025 % de SDS) (7); pellet celular para la proteína de *T. rangeli* (8).

Basados en los resultados anteriores, se realizó un segundo ensayo de solubilización cambiando las condiciones de sonicación. Se aumentó el tiempo efectivo de sonicación a 10 minutos y se continuó usando la solución de solubilización que contenía lisozima más SDS al 0,025 %. El pellet celular producto de esta sonicación se resuspendió nuevamente y sónico una segunda vez bajo las mismas condiciones. Como se observa en la figura 19, los resultados de la sonicación muestran que la proteína sigue quedando en el pellet celular, de forma insoluble.



**Figura 19. Segundo ensayo de solubilización de la proteína NTR de *T. cruzi* y *T. rangeli*.** Tinción con azul de Coomassie del SDS-PAGE del ensayo de solubilización de la proteína NTR de *T. cruzi* y *T. rangeli* inducida con 0.02 mM de IPTG. Mw (1); Cultivo inducido con 0.02 mM de IPTG (2); sobrenadante para la proteína de *T. cruzi* de la primera sonicación (3); sobrenadante para la proteína de *T. cruzi* de la segunda sonicación (4); pellet celular para la proteína de *T. cruzi* (5); sobrenadante para la proteína de *T. rangeli* de la primera sonicación (6); sobrenadante para la proteína de *T. rangeli* de la segunda sonicación (7); pellet celular para la proteína de *T. rangeli* (8).

Los resultados anteriores permitieron concluir que la proteína NTR de *T. cruzi* y *T. rangeli* es insoluble.



## 7. Discusión

Las nitrorreductasas Tipo I son un tipo de enzimas que se encuentran principalmente en bacterias, usan Flavin mononucleótido como cofactor y reducen una amplia gama de compuestos nitroaromáticos y sustratos de quinona en una reacción independiente de oxígeno. Recientemente, se ha demostrado que los protozoos parásitos *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei* expresan este tipo de enzimas, las cuales juegan un papel clave en la activación de profarmacos usados comúnmente para el tratamiento de las enfermedades ocasionadas por ellos. Así mismo, cepas de *T. cruzi null* para esta enzima son incapaces de diferenciarse a formas infectivas e infectar células de mamífero, mientras que parásitos *null* de *T. brucei* no pueden ser generados implicando que la actividad de las nitrorreductasas es esencial para los tripanosomas y que es requerida para establecer y mantener la infección en la célula eucariota, por parte de *T. cruzi* (Wilkinson et al. 2008; Hall et al. 2012). Pese a lo anterior, la función biológica de las nitrorreductasas de los tripanosomas se mantiene desconocida.

Por esta razón, el objetivo del presente trabajo fue expresar la proteína nitrorreductasa tipo I recombinante de *T. cruzi* y *T. rangeli* con el propósito de realizar ensayos de actividad enzimática; que a futuro nos permitan dilucidar el papel de esta enzima en este grupo de organismos.

Los genes que codifican las nitrorreductasas tipo I de *T. cruzi* y *T. rangeli*, mostraron una identidad de 75% entre ellos, sin embargo estos genes pudieron ser amplificados con un solo juego de oligonucleótidos y con las mismas condiciones de PCR, ya que sus regiones 5' y 3' mostraron ser altamente conservadas entre ambas especies. Producto de esta amplificación y posterior secuenciación se observó que el gen *ntr* de *T. rangeli* (896 pb) es más pequeño que el que codifica para esta misma proteína en *T. cruzi* (944 pb), resultados concordantes con los previamente obtenidos en el laboratorio de Parasitología Molecular (Montenegro et al. 2013, manuscrito en preparación). Adicionalmente,

este gen en *T. cruzi* mostró un tamaño similar al de los dos alelos reportados (939 pb y 942 pb) en el proyecto de secuenciación del genoma de este organismo (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>).

El gen *ntr* de *T. rangeli* codifica para una proteína de 298 aa, la cual tiene un peso molecular calculado de 32 kDa, más pequeña que la generada por el gen *ntr* de *T. cruzi*, la cual tiene un tamaño molecular de 314 aa, con un peso molecular calculado de 34 kDa. Resultados concordantes con los obtenidos en los ensayos de inducción de la proteína, ya que estas proteínas recombinantes mostraron un tamaño levemente mayor al calculado debido a la inserción de las 6 histidinas adicionadas para su purificación. La proteína NTR recombinante de *T. rangeli* presentó un peso molecular de 32,74 kDa, mientras que esta misma proteína en *T. cruzi* presentó un tamaño de 34,72 kDa. Al realizar un análisis de identidad de las secuencias de aminoácidos de las proteínas NTR obtenidas para ambas especies y previamente reportadas para *T. cruzi*, se encontró que esta proteína es altamente conservada entre las diferentes secuencias reportadas para *T. cruzi*, mostrando una identidad de aproximadamente 96% entre ellas; mientras que la identidad entre las proteínas NTR de *T. cruzi* y *T. rangeli* fue de 68%, la cual se podría considerar baja teniendo en cuenta la identidad reportada para otras proteínas entre estas dos especies. La HSP70 y la histona H2A presentan una identidad de 94% y la proteína KMP11 presenta una identidad de 98% entre estas dos especies (Cuervo et al. 2013; 2006; Diez et al. 2005). Sin embargo, la baja identidad encontrada para la proteína NTR de *T. rangeli* y *T. cruzi* no es determinativa de una función diferencial.

Por otra parte, las condiciones de expresión de la proteína de interés fueron establecidas con cultivos a pequeña escala. Los resultados obtenidos en el ensayo de expresión a pequeña escala mostraron que hubo una fuerte expresión de la proteína con todas las concentración de IPTG utilizadas, lo que demuestra

que la proteína NTR no es toxica para la bacteria *E. coli* luego de ser sobre expresada.

B. Hall y col 2012 realizaron ensayos de sobre inducción de la NTR de *T. cruzi* con una concentración de 100 mM de IPTG. En este trabajo se logró inducir la NTR de *T. cruzi* y de *T. rangeli* con una concentración de 0.02 mM de IPTG durante dos horas a 37 °C, a diferencia de lo realizado por Hall quien indujo la expresión durante 20 hrs a 16 °C.

Por otra parte, las proteínas recombinantes de *T. cruzi* y *T. rangeli* no fueron identificadas en el sobrenadante y se localizaron en la fracción insoluble, haciendo referencia al pellet obtenido después de centrifugar el lisado celular. Estas agregaciones proteicas se denominan cuerpos de inclusión que generalmente suelen formarse cuando los niveles de expresión de proteína son muy altos, la formación de estos cuerpos se ve influida por la naturaleza de la proteína, por la célula huésped, y por el nivel de expresión resultante de la elección del vector y las condiciones de crecimiento e inducción.

## 8. Conclusiones

- Se clonó la región codificante completa del gen que codifica la proteína nitrorreductasa tipo I de *T. cruzi* y *T. rangeli*.
- La proteína nitrorreductasa tipo I de *T. cruzi* mostró una identidad del 68 % respecto a su homóloga en *T. rangeli*.
- La proteína nitrorreductasa tipo I recombinante de *T. cruzi* tiene un peso molecular de 35,48 kDa mientras que su homóloga en *T. rangeli* tiene un peso molecular de 34,77 kDa.
- Se expresó la proteína recombinante nitrorreductasa tipo I de *T. cruzi* y *T. rangeli*.

## **9. Recomendaciones**

1. Continuar los ensayos de purificación de las proteínas recombinantes de *T. cruzi* y de *T. rangeli*.

## 10. Referencias bibliográficas

- Ajioka J, Swindle J. (1996). The *calmodulin-ubiquitin (CUB)* genes of *Trypanosoma cruzi* are essential for parasite viability. *Mol Bioc Para.* 78: 1-11.
- Baker N, Alford S, David H. (2011). Genome-wide RNAi screens in African trypanosomes identify the nifurtimox activator NTR and the eflornithine transporter AAT6. *Mol Biochem Parasitol.* 176: 1-7
- Bellini M, Souza R, Garcia M, Oliviera M, Silva A. (2011). Biologic and Genetics Aspects of Chagas Disease at Endemic Areas. *J Trop Medi.* 1-11.
- Brack C. (1968). Electron microscopic studies on the life cycle of *Trypanosoma cruzi* with special reference to developmental forms in the vector *rhodnius prolixus*. *Medline.* 25: 1-6.
- Cuervo C, Mayorga D, Pavia P, Lopez M, Puerta C. (2004). Caracterización parcial de los genes codificantes para la proteína de choque térmico HSP70 de *Trypanosoma rangeli*. 1-11.
- Flechas I, Cuellar A, Cucunubá Z, Rosas F, Velasco V, Steindel M, Thomas M, López M, González J, Puerta C. (2009). Characterising the KMP-11 and HSP-70 recombinant antigens'humoral immune responseprofile in chagasic patients. *BMC Infectious Diseases.* 186: 1-11.

- Grisard E, Stoco P, Wagner G, Sincero T, Rotava G, Rodrigues J, Snoeijs C, Koerich L, Sperandio M, Santos E, Fragoso S, Goldenberg S, Triana O, Vallejo G, Tyler K, Dávila A, Steindel M. (2010). Transcriptomic analyses of the avirulent protozoan parasite *Trypanosoma rangeli*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 174: 1-8.
- Hall B, Wu X, Hu L, Wilkinson S. (2010). Exploiting the Drug-activating Properties of a Novel Trypanosomal Nitroreductase. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*. 54: 1-7.
- Hall B, Bot C, Wilkinson S. (2011). Nifurtimox Activation by Trypanosomal Type I Nitroreductases Generates Cytotoxic Nitrile Metabolites. *J Biol Chem*. 286: 1-8.
- Hall B, Meredith E, Wilkinson S. (2012). Targeting the substrate preference of a type I nitroreductase to develop anti-trypanosomal quinone-based prodrugs. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*. 54: 1-35.
- Hu L, Wu X, Han J, Chen L, Vass S, Browne P, Hall B, Bot C, Gobalakrishnapillai V, Searle P, Knox R, Wilkinson S. (2011). Synthesis and structure–activity relationships of nitrobenzylphosphoramidate mustards as nitroreductase-activated prodrugs. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 3986:1-6.
- Puerta C. & Uruña C. P. (2005). *Prácticas de Biología Molecular*. Primera edición, Editorial Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Tanowitz H.B., Kirchhoff L.V., Simon D., Morris S.A., Weiss L.M., Wittner M. (1992). Chagas disease. *Clin Microbiol Rev*. 5: 400-419.

- Vallejo G, Marinkelle C, Guhl F, De Sanchez N. (1988). Behavior of the infection and morphologic differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the intestine of the vector *Rhodnius prolixus*. *Bras Biol.* 48: 1-6.
- Vallejo G, Guhl F, Carranza J, Moreno J, Triana O, Grisard E. (2003). Parity between kinetoplast DNA and mini-exon gene sequences supports either clonal evolution or speciation in *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius colombiensis*, *R. pallescens* and *R. prolixus* in Colombia. *Infection, Genetics and Evolution.* 3: 1-7.
- Vallejo G.A, Guhl F, Carranza J.C, Lozano L.E, Sanchez J.L, Jaramillo J.C, Gualtero D, Castañeda N, Silva J.C, Steindel M. (2002). kDNA markers define two major *Trypanosoma rangeli* lineages in Latin-America. *Acta Trop.* 81: 77-82.
- Wilkinson S, Taylor M, Horn D, Kelly J, Cheeseman L. (2008). A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105: 1-6.
- Yoshida N. (2006). Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Biomedical and Medical Sciences.* 78:1-25.