

## Secuenciación del gen de la Sialidasa de *Trypanosoma rangeli* en aislados con y sin actividad enzimática, de la provincia de Panamá Oeste, República de Panamá

### Sequencing of *Trypanosoma rangeli* Sialidase gene in isolates with and without enzymatic activity, of the Province of Panama Western, Republic of Panama

Tania Gómez<sup>1</sup>, Gloria González<sup>2</sup>, Franklin Samudio<sup>3</sup>, Carmen Corina de Juncá<sup>4</sup>, Azael Saldaña<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Licenciatura en Biología con especialización en Zoología; Profesora Asistente, Universidad de Panamá, Facultad de Medicina, Departamento de Microbiología Humana, Centro de Investigación y Diagnóstico de Enfermedades Parasitarias (CIDEP), Panamá; [taniagomez201@gmail.com](mailto:taniagomez201@gmail.com); <https://orcid.org/0000-0002-9960-057X>

<sup>2</sup>Maestría en Biotecnología; Investigadora, Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, Departamento de Proteómica y Genómica, Panamá; [glormgonzal@gmail.com](mailto:glormgonzal@gmail.com); <https://orcid.org/0000-0002-7843-7486>

<sup>3</sup>Doctorado en Ciencias; Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, Sección de Parasitología, Panamá; [Fsamudio@gorgas.gob.pa](mailto:Fsamudio@gorgas.gob.pa); <https://orcid.org/0000-0002-1780-3729>

<sup>4</sup>Licenciatura en Biología y Química; Profesor Asistente, Universidad de Panamá, Facultad de Medicina, Departamento de Microbiología Humana, Centro de Investigación y Diagnóstico de Enfermedades Parasitarias (CIDEP), Panamá; [juncacorina@yahoo.com](mailto:juncacorina@yahoo.com); <https://orcid.org/0000-0001-7053-2385>

<sup>5</sup>Doctorado en Microbiología Médica-Inmunología-Parasitología, Profesor Titular, Universidad de Panamá, Facultad de Medicina, Departamento de Microbiología Humana, director del Centro de Investigación y Diagnóstico de Enfermedades Parasitarias (CIDEP), Panamá; [azasal@hotmail.com](mailto:azasal@hotmail.com); <https://orcid.org/0000-0002-5653-1332>

**Resumen:** *Trypanosoma rangeli* es un hemoparásito no patógeno, frecuente en humanos y otros mamíferos. La forma epimastigota de *T. rangeli* expresan una enzima con actividad de sialidasa (SA), la cual es diferente a la trans-sialidasa encontrada en *T. cruzi*. Se han descrito dos subpoblaciones de *T. rangeli*, una con actividad de sialidasa (SA+) y otra sin actividad (SA-). El objetivo de este estudio fue analizar y comparar la secuencia del gen de la SA de *T. rangeli* en aislados SA+ y SA-. Para este fin, se analizaron 2 aislados, uno SA+ de *T. rangeli*, y otro SA-. La actividad de la Sialidasa fue medida utilizando la técnica MU-NANA. El RNA total y mRNA de cada aislado fueron extraídos, posteriormente los genes SA fueron clonados con pGEM-T Easy y secuenciados con 3130 Genetic Analyzer Sanger. La secuencia SA de los aislados analizados poseen 99% de identidad con un gen precursor de sialidasa anteriormente reportado, pero a la vez presentó diferencias en 4 posiciones de los aminoácidos.

**Palabras clave:** *Trypanosoma rangeli*; Sialidasa; Panamá, secuenciación

**Abstract:** *Trypanosoma rangeli* is a non-pathogenic hemoparasite, common in humans and other mammals. The epimastigotic forms of *T. rangeli* express an enzyme with sialidase (SA) activity, which is different from the trans-sialidase found in *T. cruzi*. Two subpopulations of *T. rangeli* have been described, one with sialidase activity (SA+) and the other without activity (SA-). The objective of this study was to analyze and compare the sequence of the *T. rangeli* SA gene in SA+ and SA- isolates. For this purpose, 2 isolates were analyzed, one SA+ from *T. rangeli*, and one SA-. Sialidase activity was measured using the MU-NANA technique. The total RNA

and mRNA of each isolate was extracted, later the SA gene were cloned with pGEM-T Easy and sequenced with 3130 Genetic Analyzer Sanger. It was found that the isolates analyzed have 99% identity with a previously reported sialidase precursor gene, but at the same time it presented differences in 4 amino acid positions.

**Key words:** *Trypanosoma rangeli*; Sialidase; Panamá; sequencing

## 1. Introducción

*Trypanosoma rangeli* es un parásito común de mamíferos encontrados en diferentes áreas geográficas de América Central y América del Sur (D'Alessandro, A. 1976). La infección humana con *T. rangeli* se conoce en Panamá desde 1957, cerca de veintiséis años después de haberse reportado el primer caso de enfermedad de Chagas en el istmo (Sousa, 1972). Este tripanosoma no es patógeno para el hospedero vertebrado, incluyendo al ser humano, pero sí para sus vectores (chinchas triatomínicos del género *Rhodnius*). *T. rangeli* y *Trypanosoma cruzi*, el agente causal de la enfermedad de Chagas, guardan profundas relaciones biológicas, bioquímicas e inmunológicas. Ambos son encontrados infectando a humanos y a otros mamíferos en áreas endémicas. Debido a que comparten una gran cantidad de componentes antigénicos (Cuba, 1998), los estudios sobre el *T. rangeli* se han encaminado, tanto al desarrollo de herramientas diagnósticas específicas, como al análisis de genes o antígenos que sean relevantes dentro del contexto de su relación con *T. cruzi* (Guhl, F et al. 2002; Guhl & Vallejo, 2003). Existe información limitada sobre la inmunidad innata en triatomínicos contra *T. rangeli*, un parásito humano, infeccioso y no patogénico, y *T. cruzi*, el agente causal de la enfermedad de Chagas. (Suárez-Quevedo, Y., et al. 2020)

*Trypanosoma rangeli* expresa una enzima con actividad de sialidasa/neuraminidasa (SA), la misma es producida, abundantemente, por el estadio epimastigote (Buschiazzo, et al. 1993). Esta enzima difiere de las trans-sialidasas encontradas en *T. cruzi* (Buschiazzo et. al.1997). Pereira y Moss (1985) informaron que la actividad de SA estaba presente en aislados de *T. rangeli* provenientes de El Salvador, Costa Rica y Panamá, llegando a la conclusión de que la liberación de esta enzima era, probablemente, un proceso de secreción. Además, mutaciones puntuales inducidas a través de experimentos mutagénicos (Buschiazzo, et al. 2000) han demostrado que los cambios de un solo aminoácido en la

disposición estructural de la SA de *T. rangeli*, puede inducir fuertes cambios en la actividad catalítica de esta proteína.

Sin embargo, se ha demostrado, que las poblaciones de *T. rangeli*, pueden ser divididas en dos subgrupos fenotípicos, uno con una alta actividad de sialidasa, y el otro sin actividad detectable (Sousa, et al. 2005), prevaleciendo los aislados con actividad de SA positiva. Aunque el significado de dicha variación no está claro, parece que la actividad de SA no es, metabólicamente, esencial en algunas poblaciones de *T. rangeli*. En este sentido, es importante que durante la identificación y caracterización de nuevos aislados de *T. rangeli* se debe tener cuidado de no excluir a las poblaciones de *T. rangeli* SA negativos cuando todos los demás caracteres, morfológicos, biológicos, bioquímicos, genéticos y epidemiológicos, son consistentes con las características de las especies de *T. rangeli*. (Sousa A., et al. 2005).

Investigaciones dirigidas con este fin pueden proveer información sobre la función de esta enzima durante el ciclo celular de *T. rangeli*, así como su relación inmunobioquímica con la sialidasa/trans-sialidasa de *T. cruzi*. (Grisard et al., 2010). El objetivo principal de este estudio fue analizar la secuencia del gen de la SA de *T. rangeli* en aislados que presentan o no actividad de sialidasa.

## **2. Materiales y métodos**

### **Procedencia de las muestras**

Se utilizaron dos aislados de *T. rangeli*, suministrados por el Centro de Investigaciones y Diagnóstico de Enfermedades Parasitarias (CIDEP), Universidad de Panamá, Facultad de Medicina: 1-Aislado JB aislado (humano), provincia de Panamá, distrito de Chorrera, Altos del Jobo, con actividad de sialidasa (TrSA+). 2-Aislado 028 (humano), provincia de Panamá Oeste, distrito de Capira, Cacao, sin actividad de sialidasa (TrSA-) (Sousa et al., 2005).

### **Condiciones de cultivo**

La actividad sialidasa de los aislados utilizados, uno con TrSASi (028) y el otro TrSASa (JB), fue medida con la técnica M.U.N.A.N.A. (Sousa, et al. 2005), expandidos en medio bifásico (Seneckje/salina al 8.5% con estreptomycin-penicilina) (Cazzulo et al.,1985).

Utilizamos la cosecha de epimastigotes en su fase de crecimiento exponencial, el día 12, lo que nos permitió generar suficiente pellet de cada muestra para realizarle todas las técnicas moleculares requeridas.

### **Medición de la actividad enzimática de SA en los aislados de *T. rangeli***

La actividad de sialidasa fue medida en el sobrenadante de los cultivos en la fase exponencial de crecimiento, para esto utilizamos el sustrato ácido 2(4-metilumbeliferil) - $\alpha$ -D-N-acetilneuramínico.

(MU-NANA. Sigma St Louis MO) según fue descrito, previamente, (Shottelius, 1987). El cual se utilizó, 40  $\mu$ l de cada muestra, con 10  $\mu$ l de sustrato (0.025mM de MU-NANA en un buffer a pH 5.5 de acetato de sodio a 100mM).

### **Extracción y procesamiento de RNA**

Para la extracción de RNA a partir de los epimastigotes de *T. rangeli* se siguió el protocolo para cultivo celular por centrifugación descrito por el fabricante del Kit RNeasy Mini Cat 74106 de Qiagen. Cada cepa fue procesada por separado, los botones de parásitos contenían  $3 \times 10^8$  parásitos /ml células. La cuantificación del RNA se llevó a cabo midiendo la absorbancia a 260 nm ( $A_{260}$ ) en el equipo NanoDrop 2000c de ThermoScientific. La pureza del RNA fue estimada determinando el ratio de la absorbancia 260nm y 280nm ( $A_{260}/A_{280}$ ). Para la purificación de mRNA se empleó el protocolo del kit mRNA Isolation Kit (Roche cat. 11741985001) con 200 $\mu$ l de RNA total de los aislados a estudiar, de JB y 028. Las muestras de mRNA fueron tratadas con DNase-1 grado amplificación, (Cat: 18068-015, Invitrogen™), para eliminar DNA genómico (Grisard et al., 2010).

Nos aseguramos que los mRNA, extraídos de nuestras muestras, estuvieran libre de DNA genómico, con el uso, de DNase I (18068-015). A la vez empleamos para el RT PCR, una enzima muy eficiente, la SuperScript® III Reverse Transcriptase la Platinum High Taq Polymerase, con un juego de primers, Random primers (RP) (Invitrogen™), oligo dT primers de Live Technologies y primers específicos de Alejandro Buschiazzi (AB). Además, se probaron todos los primers, para tratar de tener, una buena cantidad de cDNA. La transcripción reversa genera una copia de la hebra de RNA, pero esta copia es DNA

complementario (cDNA), el cual se estable al calor y puede resistir la metodología PCR. (Martínez. 2004).

### **Síntesis de cDNA a partir del mRNA**

Se utilizaron Random primers (RP) (RT-PCR con SuperScript® III Reverse Transcriptase Invitrogen™), oligo dT primers de Live Technologies siguiendo las siguientes instrucciones del fabricante. RTr-AB GCC ATC CGT GCC AAT CAT GTC; Reversa complementaria: GAC ATG ATT GGC ACG GAT GGC; FTr-AB 5' CAC CAT GTC CTG GCT AGC GGT TTT C3'; RTr AB-1/2 5' GTC AAA GAT GCG CTG ATT GTC 3' y FTr AB-1/2 5' CAC CAT GCT CTT CAC CCA CCC GCT G3'

Los mRNA fue, nuevamente, tratados con DNase I, para excluir la contaminación con DNA genómico. Para cada aislado se utilizaron cinco (5) tubos. Con todos los primeros arriba indicado, con una reacción final de 20 µl, en todas las Rx.

### **PCR con ssDNA**

Para la re-amplificación se utilizaron las muestras de la síntesis de cDNA, enzima Platinum Taq DNA polimerasa High Fidelity, cat: 11304011 y primers específicos para la sialidasa de *T. rangeli* descritos por Alejandro Buschiazzi (AB).

### **Purificación de las secuencias amplificadas**

Una vez amplificadas las secuencias (Gen completo, primera mitad y segunda mitad del gen de Sialidasa) y verificadas por la presencia de bandas con sus tamaños correspondientes (primera mitad + segunda mitad =1056 + 996 =2052). Se purificó cada producto mediante un gel de agarosa 1% de bajo punto de fusión en tampón TAE 1X, seguido del kit Wizard SV Gel and PCR clean-up system cat A9282 Promega, siguiendo el protocolo de purificación de productos de PCR por centrifugación (Cuervo y col. 2004). La cuantificación del DNA purificado se realizó por medida de la absorbancia a 260 nm (NanoDrop).

### **Clonación y ligación**

Para el proceso de clonación se utilizó el vector de propagación, pGEM-T Easy (Promega) (Sanbrook, et al. 2006). Ya clonadas, se realizó, la relación para la ligación con el vector de 3:1., para con cada uno de los tres productos, transformando las células

competentes JM109(cat. L2001 Promega™). Las mezclas de ligación fueron añadidas a 200 µL de células competentes para transformarlas mediante choque térmico (30 min 4 °C, 90 seg 42 °C, 2 min 4 °C). Para la purificación del plásmido, se utilizó el kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega™) (Sanbrook et al., 2006).

### **Transformación**

Se utilizaron las células JM 109 (cat. L2001 Promega™). Una vez realizada la transformación, se platearon 200 µl x c/d tubo falcón, de cada muestra, en los platos de LB, para luego incubar a 37°C, hasta el día siguiente. Para cada procedimiento de ligación, se procedía a diluir los productos 1/10, para realizar el PCR (con las mismas condiciones, anteriormente, descritas), para comprobar que sí se llevó a cabo la ligación.

### **Secuenciación**

Los productos de las PCR purificados de los parásitos con actividad de sialidasa y sin actividad, fueron secuenciados por el método de Dideoxi Nucleótidos marcados en el secuenciador automático 3130 genetic Analyzer, método de Sanger (Applied Biosystem), empleando los iniciadores universales M13F y M13R, según la reacción descrita por Sanger, (1977) (Marañón, et al.2000 y Sanbrook, et al. 2001), igualmente, los cebadores diseñados para la amplificación del gen de la sialidasa (Buschiazzo et al., 1997).

Procedimos a realizar la secuenciación de cada uno de los 15 clones seleccionados (ver tabla 1). Los productos así amplificados fueron clonados en el plásmido pGEM®-T Easy. Para realizar los análisis bioinformáticos, se procedió a revisar y editar las secuencias obtenidas, mediante un análisis BLAST-N y ubicación de los iniciadores ([www.ch.embnet.org](http://www.ch.embnet.org)) (Stephen et al., 1997). Posteriormente, se realizó un alineamiento y ensamblado, entre las secuencias obtenidas con ambos iniciadores. Usando los programas ALIGN (Pearson & Lipman, 1988).

**Tabla 1. Clones seleccionados para hacer las secuencias requeridas**

CLON	AISLADO	FRAGMENTO
1	028	I MITAD
2	028	I MITAD
3	028	II MITAD
4	028	II MITAD
7	028	GEN COMPLETO
33	028	GEN COMPLETO
34	028	GEN COMPLETO
66	JB	I MITAD
70	JB	I MITAD
72	JB	I MITAD
6	JB	II MITAD
35	JB	II MITAD
36	JB	II MITAD
38	JB	II MITAD
41	JB	GEN COMPLETO
98	JB	GEN COMPLETO
104	JB	GEN COMPLETO

Fuente: Los autores.

En esta tabla 1, se muestran los clones, que se utilizaron para realizar las secuencias de cada aislado.

### **Análisis de resultados**

Para los análisis de la homología de nucleótidos y de aminoácidos se utilizaron las herramientas bioinformáticas tales de Blast en NCBI y EBI. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Tools/index.html>, <http://www.ebi.ac.uk>).

Se seleccionaron las secuencias de los clones que se lograron alinear. Gen Precursor que utilizamos para comparar nuestras secuencias. **GI 2894809** *T. rangeli* sialidase precursor ene, complete CDs 2,620bp genomic DNA. Clone: TrSA4. Accession: U83180.1GI: 289.

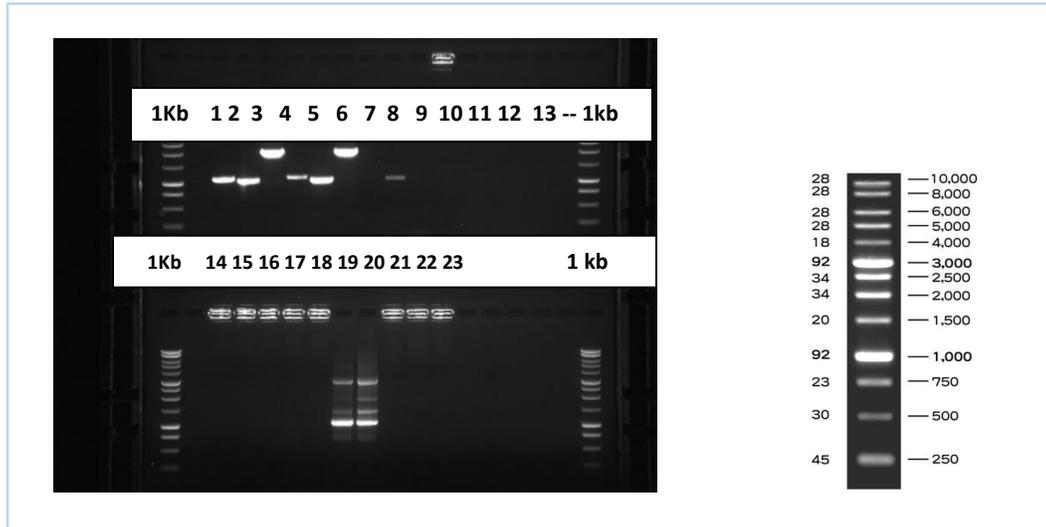
### **3. Resultados**

La pureza de las muestras de RNA de los epimastigotes analizados fueron estimadas en JB (TrSAS+) = 994.6 ng/ul; y 028 (TrSAS-) = 412.2 ng/ul.

### Síntesis de cDNA a partir del mRNA. RT-PCR

Los resultados del RT-PCR con SuperScript® III Reverse Transcriptase fueron, nuevamente, tratados con DNase I, para detectar si aún, se observa contaminación con DNA genómico. Como se muestra en la figura 1.

**Figura 1. Muestras de cDNA de 028 y JB.**



Fuente: Los autores.

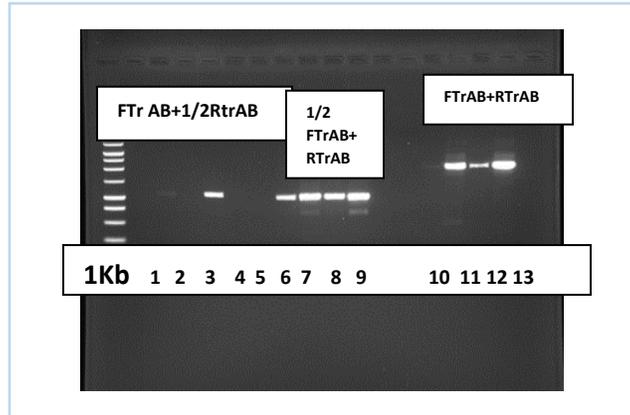
En esta figura 1, se visualizan los productos de la del RT-PCR, con sus bandas, bien definidas, de cada muestra de cDNA, de 028 y JB, cada una con Random primers (RP) (2,8,9,11,12 y 13); con Oligo dT (14-21) y con primers específicos AB (1,3,4,5,6 y 10), donde se corrobora, que no tenían contaminación con DNA genómico.

La transcripción reversa genera una copia de la hebra de RNA, pero esta copia es DNA complementario (cDNA). Esta reacción es la utilizada, en todos los PCR que se usa la enzima Platinum High Taq Polymerase.

#### Condiciones de la PCR

- 1- 94°C  $\longrightarrow$  2min
  - 2- 94°C  $\longrightarrow$  15 seg
  - 3- 57°C  $\longrightarrow$  30 seg
  - 4- 72°C  $\longrightarrow$  5min
  - 6- T = 72°C  $\longrightarrow$  7 min
  - 7- HOLD 4°C
- } 40 ciclos
- } 40 ciclos

**Figura 2. ss DNA de *T. rangeli* con los productos obtenidos de la síntesis de cDNA de los tres fragmentos.**



Fuente: Los autores.

En la figura 2 se visualizan las bandas con los cDNA, de las cuales fueron escogidas las más separadas, re-amplificados con Platinum Taq DNA polimerasa y libres de DNA genómico. Se ven, claramente, las bandas obtenidas, de cada fragmento.

Primera mitad	FTr-AB + RTr AB-1/2 $\rightleftharpoons$	Producto de 1056 pb
Segunda mitad	FTr AB-1/2 + RTr AB $\rightleftharpoons$	Producto de 996 pb
Gen completo	FTr-AB + RTr AB $\rightleftharpoons$	Producto de 1962 pb

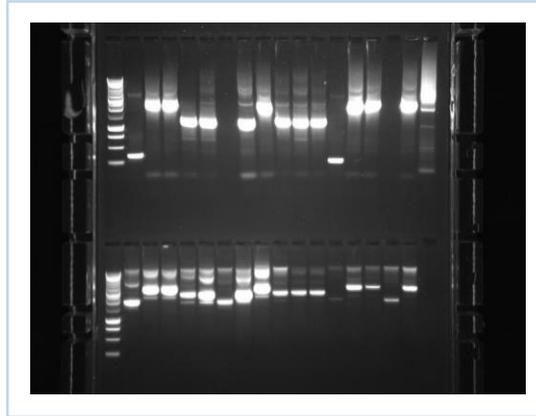
**Figura 3. Productos del PCR, analizados en gel de agarosa, demostrando la presencia del inserto en cada producto de Ligación.**



Fuente: Los autores.

Como vemos, en esta figura 3, se puede visualizar los productos de ligación, que se demuestra que el inserto, está en c/d producto. 1. 028 I mitad; 2. JB I mitad; 3. 028 II mitad; 4. JB II mitad; 5.028 Gen completo; 6. JB Gen completo; 7. Control de Ligación

**Figura 4. Gel de Minipreps de PCR con primers M13 de los clones de JB y 028.**



Fuente: Los autores.

En esta figura 4, se puede visualizar, la confirmación, de que c/u, de los 30 clones de nuestras células competentes transformadas (JM109), de ambos aislados (JB y 028), si tenían el plásmido, para este proceso de clonación se utilizó el vector de propagación, pGEM-T Easy (Promega). Para luego verificarlos, con una PCR, tratados con la Platinum Taq Polymerase.

**Figura 5. PCR de células transformadas, tratadas con primers M13 a clones de 028.**



Fuente: Los autores.

En esta figura 5, se puede comprobar, con las bandas obtenidas, que el plásmido, estaba en nuestros clones, de las células transformadas, de los tres fragmentos del aislado 028. Los cuales se verificaron *con* una PCR con la Platinum Taq Polymerase.

### Secuenciación

Encontramos, una identidad del 99%, con el gen precursor de la Sialidasa reportada por Buschiazzo, (1997). Pero no así a nivel de a.a, ya que, se observó, una diferencia de cuatro aminoácidos (a.a), en posiciones diferentes con respecto al gen precursor U83180.1GI.

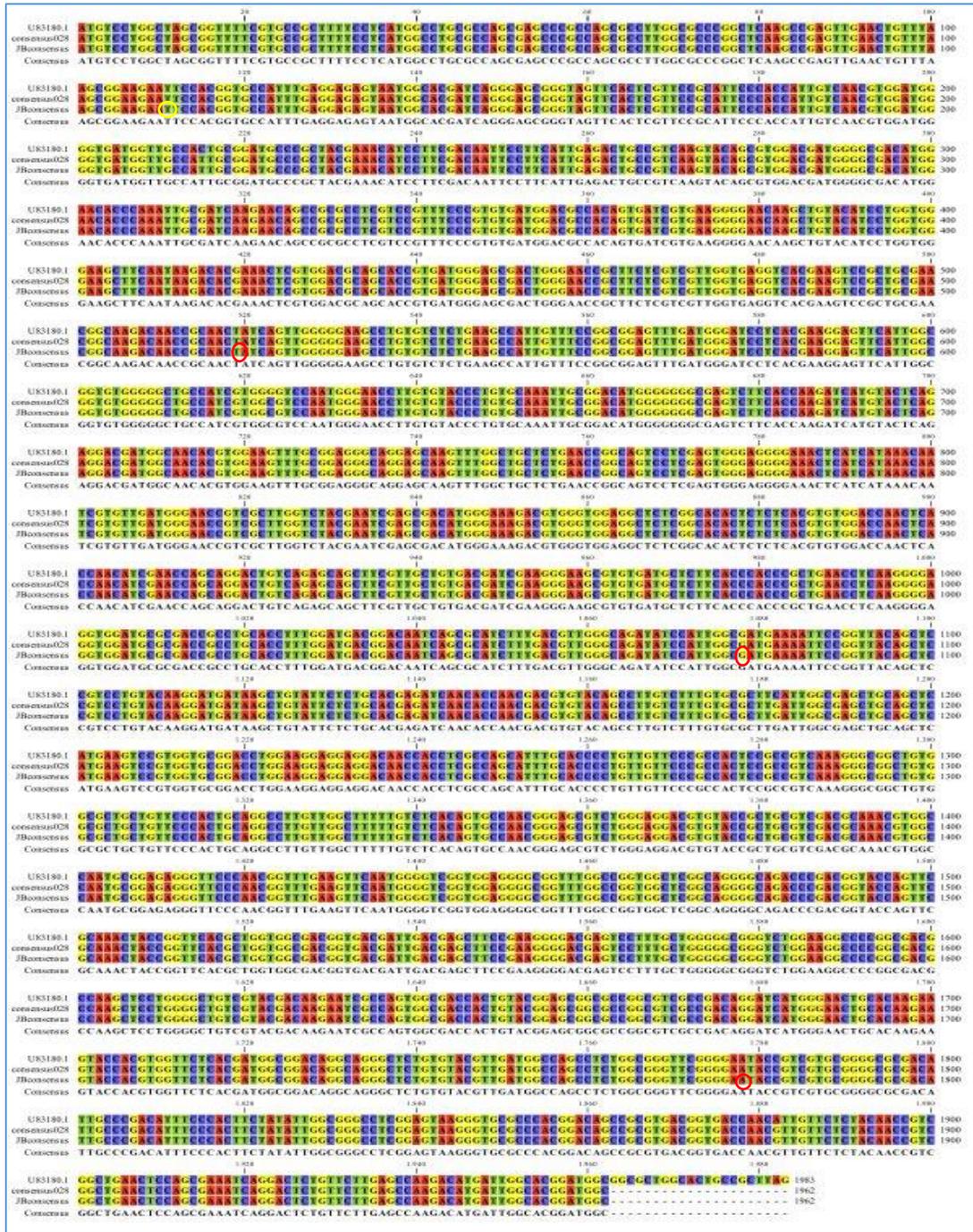
Al secuenciar cada uno de los clones, mostrados en la tabla 1, observamos cambios en los ORFs, con respecto al gen precursor U83180.1GI. Sin embargo, se demostró que no existen diferencias entre las dos secuencias consensus estudiadas desde 332pb hasta 1983pb; aunque estas son idénticas entre ellas a nivel de ORFs; pero no así, a nivel de aminoácidos con respecto al gen precursor U83180.1GI; como se puede observar, en la tabla 2.

**Tabla 2. Cambios en los ORFs entre las dos secuencias consensus de JB Y 028.**

CEPA	SITIOS ORFs	SITIOS ORFs	SITIOS ORFs	SITIOS ORFs
028 CONSENSOS	215pb C → T	623pb G → C	1182 C → G	1882 A → G
JB CONSENSOS	C → T	G → C	C → G	A → G
	NO SINONIMA TRANSICIÓN	NO SINONIMA TRANSVERSIÓN	NO SINONIMA TRANSICIÓN	NO SINONIMA TRANSICIÓN

Fuente: Los autores.

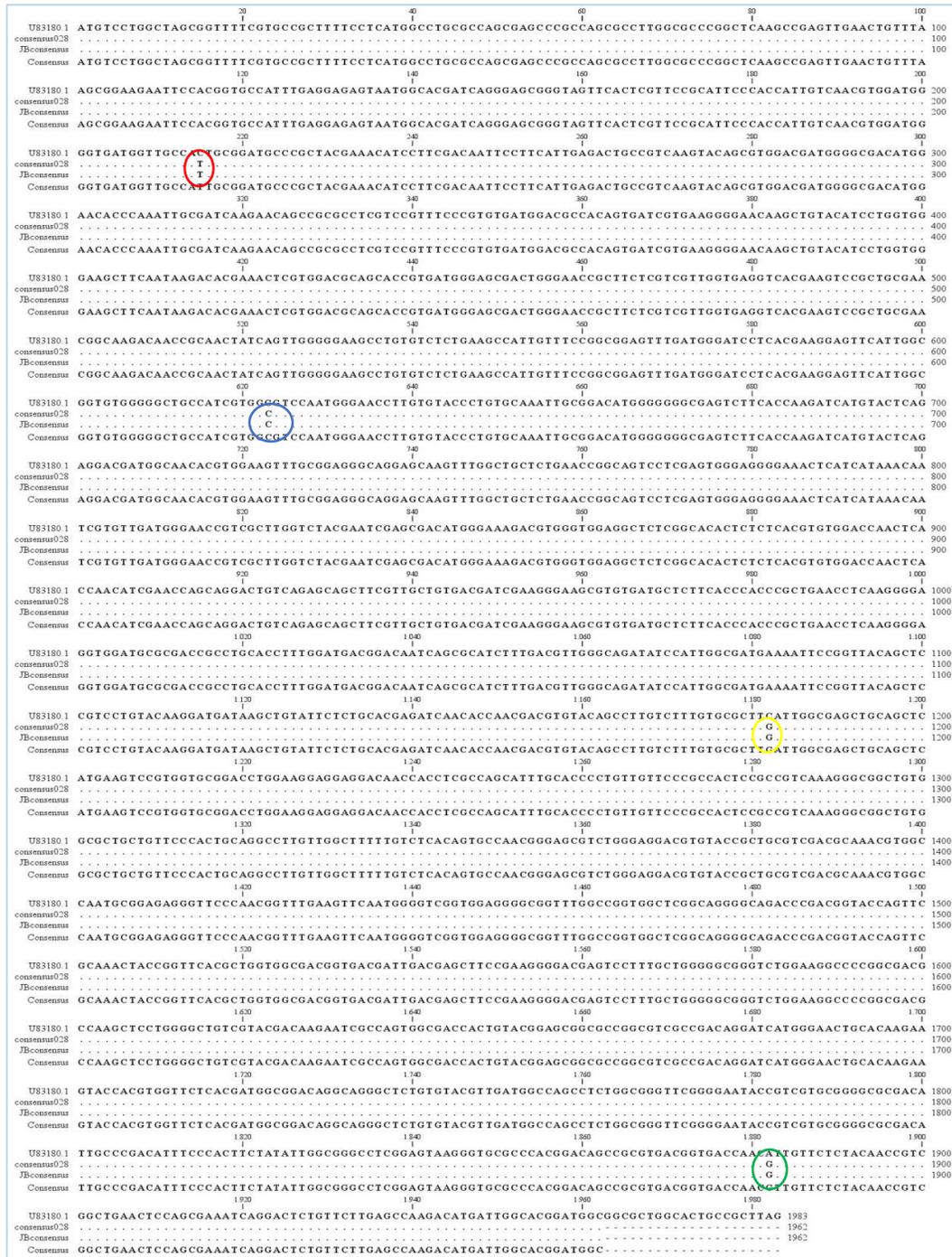
Figura 6. Secuencias nucleotídicas de los consensos de 028 y JB, comparándola con el gen precursor de sialidasa. U83180.1GI.



Fuente: Los autores

En esta figura 6, se logra elucidar la identidad de 99%, con respecto al gen precursor de la sialidasa reportado y los cambios en las posiciones de los nucleótidos resaltados con círculos de colores diferentes.

**Figura 7. Secuencias de nucleótidos en las cuatro (4) posiciones diferentes de las secuencias consensos y el gen precursor**



Fuente: Los autores.

En la figura 7, se logra visualizar los cambios en las cuatro (4) posiciones diferentes de las secuencias consensos y el gen precursor. Entre ellas dos no hay diferencias a nivel de las

ORFs. En las respectivas, posiciones a nivel de los sitios ORFs, en rojo la posición 215pb; en color azul, la posición 623pb; en color amarillo la posición 1182pb y, por último, en la posición 1882.

#### 4. Discusión

Los avances recientes en los estudios de transcripción genómica de *T. rangeli*, y su comparación con *T. cruzi* constituyen el punto de partida para entender, cabalmente, la transmisión vectorial selectiva de *T. rangeli* y *T. cruzi*, así como de la patogenia de *T. rangeli* para el vector y la incapacidad de este y la capacidad de *T. cruzi* para invadir células del mamífero (Vallejo et al., 2015).

Medina-Acosta et al. (1994) en la evaluación de la expresión de las actividades de la TSA y SA en el orden Kinetoplastida, euglenozoos, reconocen cuatro tipos de expresiones: Tipo I, con niveles comparables de TSA y SA (*Endotrypanum* y *T. lewisi*); Tipo II, que expresa la actividad, predominantemente, TSA (*T. cruzi* y *T. conorhini*); Tipo III, parásitos que expresan la actividad, exclusivamente, SA (*T. rangeli* y *T. leeuwenhoekii*); y Tipo IV, parásitos no expresan bien la actividad (*Leishmania* y *Trypanoplasma borreli*).

#### Clonación, ligación y transformación

En estos procesos, siempre comprobamos que teníamos el producto de cada aislado y que estuviera nuestro inserto en las células utilizadas, como se observan, tanto en las figuras 3 y 4, respectivamente.

Nuestro gen completo mostró un tamaño: 1962 bp sin las dianas de las enzimas y A taling; la primera mitad: 1056; segunda mitad:996, fragmento que se superpone: 90bp; Suma primera mitad + segunda mitad) menos fragmento superpuesto (1056 + 996) - 90 = 1962.

#### Preparación de Minipreps

Antes de hacer el Minipreps, verificamos con un PCR con los primers M13, si en realidad nuestras células están transformadas. En las figuras 4 y 5, se puede demostrar, que nuestros plásmidos estaban presentes, ya que, se verificaron con una PCR con la Platinum Taq Polymerase, se verificaron con una PCR con la Platinum Taq Polymerase, solo 15 clones, fueron seleccionados para secuenciar.

## Secuenciación

Vale la pena resaltar, que los datos obtenidos, en nuestro trabajo de investigación, son confiables, libres de ADN genómico y representan una secuencia consenso de cada una de los aislados, utilizados en este trabajo.

En cuanto a los resultados de secuenciación de las dos cepas de *T. rangeli* 028 TrSASi y JB TrSASa y la consignada en la base de datos del GenBank **GI 2894809** *Trypanosoma rangeli* sialidase precursor gene, complete cds2,620bp genomic DNA. Clone: TrSA4. Accession: **U83180.1**GI: 2894809); no mostraron entre ellas, ninguna diferencia. A la vez revelaron una identidad del 99%, con el gen precursor de la sialidasa reportada por Buschiazzo (1997). Sin embargo, a nivel de los aminoácidos (a.a) observamos una diferencia de cuatro de ellos, en posiciones diferentes con respecto al gen precursor U83180.1GI. Como mostramos abajo.

- 1- En posición 215pb, C-----T = Una transición no sinónima: Treonina por Leucina
- 2- En posición 623pb G-----C = Una transversión no sinónima: Glicina por Alanina
- 3- En posición 1182pb C-----G = Una transición no sinónima: Fenilalanina por Leucina
- 4 -En posición 1882b A-----G = Una transición no sinónima: Isoleucina por Valina

Todo esto parece indicar que se está transcribiendo mRNA que codifica para sialidasa en los dos aislados, con el mismo mensaje, aunque nuestras dos secuencias consenso, muestran diferencias, con la que ha reportado como activa Buschiazzo (1997). La diferencia encontrada de 4 aa (figuras 6 y 7), nos resalta la posición donde ocurre el cambio. Las regiones intergénicas de tripanosomátidos constituyen, por lo tanto, un blanco importante de estudio a pesar de no tener función codificante para productos proteicos. Es así, como por ejemplo Brandao & Fernández (2006), demuestran cómo la región 3' no traducida (la cual hace parte de la región intergénicas o espaciadora) de los genes codificantes para la calmodulina, acumula mutaciones entre los diferentes linajes de *T. cruzi*, que hacen posible su distinción utilizando métodos filogenéticos.

En muchos estudios, de los proyectos del genoma humano y de otros organismos se ha puesto de manifiesto que los marcos abiertos de lectura (ORFs) codificantes para productos proteicos constituyen el 1,5% del genoma, los cuales además no exhiben

diferencias significativas con especies similares. Por lo tanto, el 98,5% restante del genoma se compone de regiones intergénicas, secuencias reguladoras, secuencias repetitivas y ARN. En tripanosomatidos la mayoría de los genes codificantes para proteínas se organizan en tándem y se transcriben de forma policistrónicas (Thomas et al., 1993) no codificantes para proteínas, cobra importancia en este sentido (Zemann et al., 2006).

Además, mutaciones puntuales inducidas a través de experimentos mutagénicos (Buschiazzo et al., 2000) han demostrado que los cambios de un solo aminoácido en la disposición estructural de la SA de *T. rangeli*, puede inducir fuertes cambios en la actividad catalítica de esta proteína. Estos resultados sugieren el origen genético de la diferencia en actividad de sialidasa presentada por aislados de *T. rangeli*. Los mismos contribuyen también con el entendimiento de la función biológica de esta enzima.

## 5. Conclusiones

- Las secuencias del gen SA de los aislados analizados poseen 99% de identidad con el gen precursor de la Sialidasa reportada por Buschiazzo, (1997).
- Las secuencias de 028 y JB del cDNA son idénticas. No existen diferencias entre las dos secuencias consensus estudiadas desde 332 pb hasta 1983 pb.
- Hay 4 sustituciones no sinónimas que llevan a cambios de 4 posiciones (215 pb;623 pb;1182 pb y 1882 pb), cuando la comparamos con la secuencia SA previamente reportada como activa.

## Referencias bibliográficas

- Brandao, A., Fernandes, O. (2006). *Trypanosoma cruzi*: Mutations in the 3' untranslated region of calmodulin gene is specific for lineages *T. cruzi* I, *T. cruzi* II, and the Zymodeme III isolates. *Elsevier Experimental Parasitology*, (112), 247 – 252. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2005.11.011>
- Buschiazzo A., Cremona ML., Campetella O., Frasch AC., & Sánchez, DO. (1993). Sequence of a *Trypanosoma rangeli* gene closely related to *Trypanosoma cruzi* transsialidase. *Mol Biochem Parasitol* 62 (1), 115-6.

[https://doi.org/10.1016/0166-6851\(93\)90183-x](https://doi.org/10.1016/0166-6851(93)90183-x)

Buschiazzo A., Campetella O., & Frasch A. (1997). *Trypanosoma rangeli* sialidase: cloning, expression and similarity to *T. cruzi* trans-sialidase. *Glycobiology*, 7(8), 1167-1173.

<https://doi.org/10.1093/glycob/7.8.1167>

Buschiazzo A., Tavares GA., Campetella O., Spinelli S., Cremona ML., Paris G., Amaya MF., Frasch AC., & Alzari PM. (2000). Structural basis of sialyltransferase activity in trypanosomal sialidases. *EMBO Journal*, 19, 16-24.

<https://doi.org/10.1093/emboj/19.1.16>

Cazzulo, J., Cazzulo B., Engels, J., & Cannata, J. (1985). End products and enzymes level of aerobic glucose fermentation in trypanosomatids. *Molecular Biochemical Parasitology*, 16, (3), 329-43. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(85\)90074](https://doi.org/10.1016/0166-6851(85)90074)

Cuba, Cuba, C. (1998). Review of the biologic and diagnostic aspects of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. *Elsevier Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 31, (2), 207-220. <https://doi.org/10.1590/S0037-86821998000200007>

D'Alessandro, A. (1976). Biology of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920. In WHR Lumsden & DA Evans (Eds.), *Biology of Kinetoplastida*, 1, 327-493.

Grisard E., Stoco, P., Wagner, G., Sincero, T., Rotava, R., Rodrigues, J., Snoeijs, C., Koerich, L., Sperandio, M., Bayer-Santos, E., Frago, S., Goldenberg, S., Triana, O., Vallejo, G., Tyler, K., Dávila, A., & Steind, M. (2010). Transcriptomic analyses of the avirulent protozoan parasite *Trypanosoma rangeli*. PubMed Central. Sponsor (Eds.) document from *Molecular and Biochemical Parasitology* 174 (1), 1825

<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.06.008>

Guhl, F., Jaramillo, C., Carranza JC., & Vallejo G. (2002). Molecular characterization and diagnosis of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli*. *Elsevier, Archives of Medical Research* 33 (4), 362-370. [https://doi.org/10.1016/S0188-4409\(02\)00380-6](https://doi.org/10.1016/S0188-4409(02)00380-6)

Marañón, C., Thomas, M., Puerta, C., Alonso, C., & López, M. (2000). The stability and maturation of the H2A histone mRNAs from *Trypanosoma cruzi* are implicated in their post-transcriptional regulation. *Biochemical Biophysical Acta*. 1490, 1-10.

[https://doi.org/10.1016/s0167-4781\(99\)00228-6](https://doi.org/10.1016/s0167-4781(99)00228-6)

- Medina-Acosta E., Franco, A., Jansen, A., Sampol, M., Neves, N., Pontes-de-Carvalho, L., Grimaldi, J., & Nussenzweig, V. (1994). Trans-sialidase and sialidase activities discriminate between morphologically indistinguishable trypanosomatids, *Eur. J. Biochem*, 1, 225, 333-339 <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.00333x>
- Pereira, ME., Moss, D. (1985). Neuraminidase activity in *Trypanosoma rangeli*, *Molecular Biochemical Parasitology*, 15 (1), 95-103. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(85\)90031-3](https://doi.org/10.1016/0166-6851(85)90031-3)
- Sambrook, J., Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd (Eds.)* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor, 2001-2100. <https://www.sigmaaldrich.com/PA/es/product/sigma/m8265>
- Sanger, F., Nicklen, A., & Coulson, R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc.Nati.Acad.Sci.USA*, 74, (12), 5463-5467. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/271968/>
- Shottelius J. (1987). Neuraminidase fluorescence test for the differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *Tropical Medicine Parasitology* 38, 323-327. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3327143/>
- Sousa, Octavio. (1972). Anotaciones sobre la enfermedad de Chagas en Panamá. Frecuencia y distribución de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli*. *Rev.Biol. Trop*, 20 (2), 167-179. <http://www.gorgas.gob.pa/BiblioGorgas/pdf/>
- Sousa, O., Lombardo, M., & Saldaña, A. (2005). *Trypanosoma rangeli* sialidase: lack of activity in stocks from Panama and other regions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100, (3), 241-243. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000300004>
- Stephen A., Madden, T., Schäffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. (1997). BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs Stephen F. Altschul. *Nucleic Acids Research*, 25, (17), 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Suárez, Y., Barbosa, H., Gutiérrez, S., Olaya, J., Zabala, D., Carranza, J., Guhl, F., Cantillo, O., & Vallejo, G. (2020). Factores tripanolíticos innatos contra *Trypanosoma rangeli* y *T. cruzi* en la hemolinfa de triatomíneos: un estudio comparativo en ocho especies de

vectores de la enfermedad de Chagas. *RACCEFYN*, 44(170), 88–104.  
<https://doi.org/10.18257/raccefyn.1097>

Thomas, C., Fernández, A., Moro, A., García, J., & González, A. (1993). *Biología molecular de tripanosomatidos*. En: Rivas, L.I. y López, M.C. (Eds.). *Nuevas tendencias de parasitología molecular*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid, España. 135-143.

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. *Elsevier, Journal Infection Genetics and Evolution* 3 (1), 39-45. [https://doi.org/10.1016/s1567-1348\(02\)00150-8](https://doi.org/10.1016/s1567-1348(02)00150-8)

Vallejo, G., Suárez, J., Olaya, J., Gutiérrez, S., & Carranza, J. (2015). *Trypanosoma rangeli*: un protozoo infectivo y no patógeno para el humano que contribuye al entendimiento de la transmisión vectorial y la infección por *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas. *RACCEFYN*, 39 (150), 111–122.  
<https://doi.org/10.18257/raccefyn.143>

Zemann, A., de Bekke, A., Kiefmann., Brosius, J., & Schmitz, J. (2006). Evolution of small nucleolar RNAs in nematodes. *Nucleic Acids Research*, 34, (9), 2676-2685.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkl359>