

### 38 Aislamiento de genes diferencialmente expresados en amastigotes de *Leishmania (Viannia) panamensis*

Juan Alzate<sup>1</sup>, Antonio Jiménez<sup>2</sup>, Víctor González<sup>2</sup>, Edwin Patiño<sup>3</sup> y Róbinson Ramírez<sup>3</sup>

#### PALABRAS CLAVE

EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES  
LEISHMANIA  
RDA  
SSH

#### INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

En Colombia cada año se diagnostican 6.500 casos nuevos de leishmaniasis cutánea y *Leishmania (Viannia) panamensis* es la responsable del 95% de los casos. Durante su ciclo de vida, el parásito reside en el insecto vector como promastigote y se diferencia a amastigote después de ser inoculado en el hospedero mamífero. La transformación de promastigote a amastigote implica cambios morfológicos y bioquímicos que tienen lugar en el fagolisosoma del macrófago, y se caracterizan, entre otros, por la expresión de enzimas con actividad óptima a pH ácido además del cambio de los glicoconjugados de membrana. La supervivencia del parásito está asociada con su capacidad para inhibir funciones efectoras en el macrófago infectado permitiéndole al amastigote su replicación; sin embargo, poco se conoce acerca de los productos génicos expresados diferencialmente en este estadio por lo que nos propusimos con este trabajo aislar genes diferencialmente expresados en amastigotes de *Leishmania (Viannia) panamensis*.

#### METODOLOGÍA

Aplicamos las metodologías de hibridación subtractiva con selección por PCR: RDA (*Representation of differential analysis*) (1) y SSH (*Suppressive subtractive hybridization*) (2) para aislar mRNA regulados positivamente en amastigotes; posteriormente se clonaron y secuenciaron y se determinó su patrón de expresión.

#### RESULTADOS

Con ambos métodos se aislaron 20 clones cuyas secuencias mostraron identidad entre el 70% y el 80% con EST (*expressed sequence tag*) y secuencias del proyecto genoma de *L. major*. Sólo uno de los clones presentó identidad con un gen ya reportado, el SW3 descrito en *L. major*, que se expresa mayoritariamente en el estadio de amastigote (3). Otros dos clones muestran regulación positiva en amastigotes; no obstante, se desconoce la proteína que codifican y su función.

#### BIBLIOGRAFÍA

- HUBANK M, SCHATZ DG. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 5.640-5.648.
- DIATCHENKO L, LAU YF, CAMPBELL AP, CHENCHIK A, MOQADAM F, HUANG B, et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 6.025-6.030.
- NOLL TM, DESPONDS C, BELLI SI, GLASER TA, FASEL NJ. Histone H1 expression varies during the *Leishmania major* life cycle. *Mol Biochem Parasitol* 1997; 84: 215-227.

<sup>1</sup> Estudiante de Maestría, CCB, Universidad de Antioquia  
<sup>2</sup> Profesor, Universidad de Alcalá de Henares, Madrid, España  
<sup>3</sup> Profesor, Universidad de Antioquia  
juanfar4@yahoo.com

### 39 Procesamiento y unión de la toxina Cry11Bb del *Bacillus thuringiensis* subsp. *Medellin* al intestino de larvas de mosquitos

Sergio Orduz<sup>1</sup>, César Segura<sup>2</sup>, Lina Ruiz<sup>3</sup>, Michael Adang<sup>4</sup>, Fanny Guzmán<sup>5</sup>, Manuel Patarroyo<sup>6</sup>

#### PALABRAS CLAVE

B. THURINGIENSIS  
TOXINA CRY11BB  
MOSQUITO  
PROCESAMIENTO  
UNIÓN

#### INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La proteína Cry11Bb (94 kDa) es producida por *B. thuringiensis* subsp. *Medellin*. El modo de acción de las toxinas Cry incluye el procesamiento proteolítico y la unión de la toxina a receptores específicos sobre la superficie del intestino de las larvas de los insectos susceptibles. Después de unida, la toxina forma poros de baja selectividad sobre la superficie de la membrana apical de las células intestinales, produciendo un desequilibrio osmótico que lleva a la destrucción celular y consecuente muerte de la larva (1). Los objetivos de esta investigación fueron: caracterizar el procesamiento de la proteína Cry11Bb (94kDa) y analizar la unión de ésta proteína a los intestinos de las larvas de los mosquitos susceptibles *C. quinquefasciatus*, *A. aegypti* y *A. albimanus*.

#### METODOLOGÍA

El procesamiento proteolítico de la protoxina Cry11Bb se caracterizó mediante electroforesis y secuencia del extremo amino de los fragmentos generados. La capacidad de unión de la proteína se analizó mediante ensayos de unión con la toxina radiomarcada y vesículas preparadas a partir de larvas completas de los mosquitos, por *ligand blot* e inmunohistoquímica usando secciones de tejido larval.

#### RESULTADOS

El procesamiento proteolítico de la protoxina Cry11Bb de 94 kDa indica la formación de fragmentos de 30 y 35 kDa que forman el complejo 30/35 kDa, a través de un fragmento de 68 kDa (2). Tanto 30/35 kDa como 68 kDa fueron prepurificados y aislados. Los resultados de los ensayos de unión sugieren que sólo la forma de 68 kDa podría interactuar específicamente con las vesículas. La toxina se localizó en la membrana apical del intestino medio de las larvas. Varias proteínas de las vesículas reconocieron el fragmento de 68 kDa.

#### CONCLUSIONES

La toxina Cry11Bb (94 kDa) se procesa en fragmentos de 30 y 35 kDa a través de un fragmento de 68 kDa (2). El fragmento de 68 kDa interactúa específicamente con las vesículas de las larvas de los mosquitos. El sitio primario de acción de la toxina Cry11Bb es la membrana apical del intestino medio. Se sugiere la presencia de receptores para la toxina Cry11Bb en el intestino de los mosquitos.

#### BIBLIOGRAFÍA

- SCHNEPF E, CRICKMORE N, VAN RIE J, LERECLUS D, BAUM J, FEITELSON J, et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62: 775-797.
- SEGURA C, GUZMÁN F, PATARROYO ME, ORDUZ S. Activation pattern and toxicity of the Cry11Bb1 toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Medellin*. *J Invertbr Pathol* 2000; 76: 56-62.

<sup>1</sup> Jefe, Unidad de Biotecnología y Control Biológico, Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB)  
<sup>2</sup> Estudiante de doctorado, Postgrado en Ciencias Básicas Biomédicas, Universidad de Antioquia (UdeA) y CIB  
<sup>3</sup> Estudiante de Maestría, Facultad de Biología, UdeA y CIB  
<sup>4</sup> Profesor de Entomología, Departamento Biología, Universidad de Georgia  
<sup>5</sup> Jefe, Sección de Química, Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC)  
<sup>6</sup> Director, FIDIC  
sorduz@epm.net.co