

Transformación genética de *Aspergillus foetidus* ATCC 10061 con secuencias tipo quimera anticuerpo-antígeno de *Trypanosoma cruzi*

Diego Asención Alcantar,¹ Dr. Denis I. Magaña Ortiz¹ y Dra. Blanca E. Millan Chiu²

1. Instituto Tecnológico de Mérida, 2. Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, UNAM Campus Juriquilla

Resumen



La enfermedad de Chagas causada por el protozoario *Trypanosoma cruzi* se ha convertido en una seria amenaza a la salud humana. El propósito de este trabajo es modificar genéticamente el hongo *Aspergillus foetidus* ATCC 10061 para promover la producción extracelular de la proteína Tc52 (adyuvante) y una proteína antigénica TSSA de *T. cruzi* fusionada a una fracción scFv (quimera) dirigida al receptor DEC205 en células dendríticas. De tal forma que las proteínas recombinantes puedan ser empleadas como una opción para la elaboración de una vacuna preventiva contra *T. cruzi*.

Introducción

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis es causada por el protozoario *Trypanosoma cruzi*, un organismo flagelado que es transmitido principalmente a humanos a través de las heces de insectos triatomíneos de la familia *Reduviidae* (vectores de transmisión en áreas endémicas). Debido a la tendencia de migración rural a urbana durante los pasados 50 años; millones de personas infectadas han mudado a las ciudades en busca de mejores condiciones de vida, pero han permitido que la enfermedad se propague cada vez más.

México es un país endémico de la enfermedad de Chagas, donde dos terceras partes del territorio pueden ser consideradas en riesgo de transmisión vectorial, es decir 1,100,000 individuos podrían estar infectados y 29,500,000 en riesgo (Salazar et al., 2016).

El desarrollo de una vacuna efectiva y segura que induzca una respuesta protectora de tipo Th1 y que genere células T antígeno específicas de memoria contra el patógeno intracelular *T. cruzi* se ha convertido en una necesidad urgente.

Objetivos

General

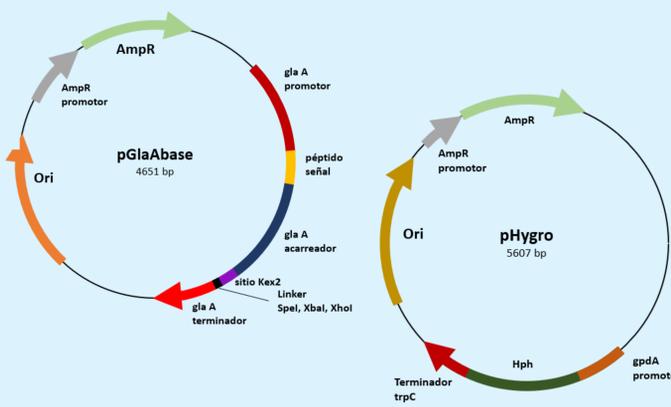
- Modificar genéticamente *Aspergillus foetidus* ATCC 10061 utilizando el método de ondas de choque para obtener cepas transformantes que contengan los genes de la proteína Tc52 (adyuvante) y de la proteína antigénica TSSA de *T. cruzi* fusionada a una fracción scFv (quimera) dirigida al receptor DEC205 en células dendríticas.

Específicos

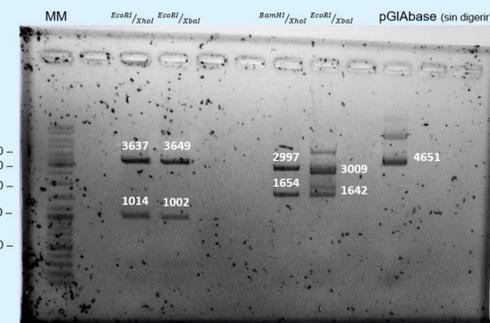
- Diseñar un vector base funcional para expresión extracelular que pueda ser utilizado en plataformas basadas en *A. foetidus*.
- Diseñar, construir y producir el vector genético que incluya las secuencias TSSA y Tc52 de *T. cruzi*.
- Clonar y amplificar el vector en *E. coli*.
- Transformar conidios de *A. foetidus* ATCC 10061 utilizando ondas de choque.
- Obtener las colonias de transformantes, utilizando higromicina.
- Analizar genéticamente las colonias transformadas.

Resultados

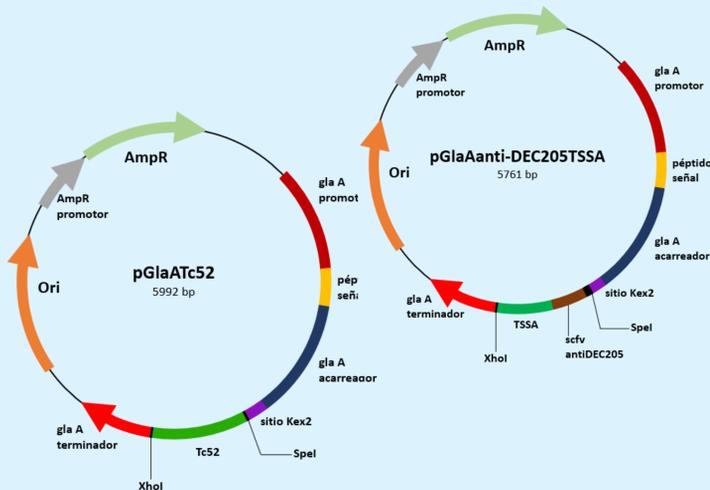
Diseño y síntesis del vector base y del vector de selección.



Ensayos de digestión para comprobar la identidad del plásmido base



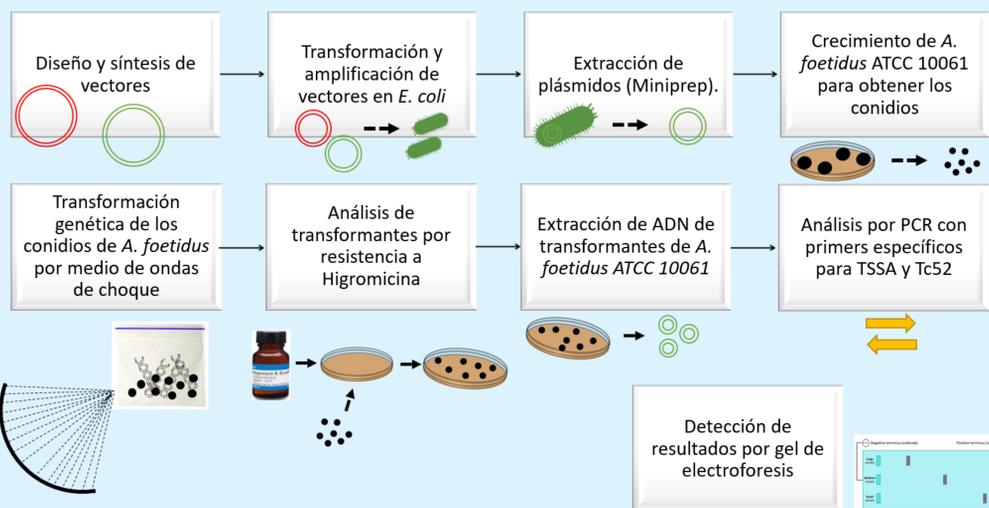
Diseño y obtención del vector base con las secuencias de



Ensayos de digestión para comprobar la ligación del plásmido base con las secuencias de interés



Metodología



Conclusiones

- Se han obtenido las secuencias de las proteínas TSSA y Tc52 de *T. cruzi*
- Se ha logrado el diseño y síntesis del vector base para expresión extracelular en *A. foetidus*
- Se realizó el diseño del vector base con las secuencias recombinantes
- Se llevaron a cabo digestiones y PCR para comprobar la identidad del vector base
- Se han llevado digestiones para obtener los genes de interés
- Se ha logrado clonar el vector base con los genes de interés para su inserción en *A. foetidus*
- Se ha activado la cepa de *A. foetidus* para su posterior transformación

Los resultados hasta el momento son satisfactorios y pese a los contratiempos encontrados debido a la situación sanitaria actual, se estima que la transformación genética se lleve a cabo como se tiene planificado.

Referencias

- Stuart, K., Brun, R., Croft, S., Farilamb, A., Gürtler, R., McKerrow, J., Reed, S. y Tarleton, R. (2008). Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(4): 1301-1310. doi: 10.1172/JCI33945
- Magaña-Ortiz, D., Coconi-Linares, N., Ortiz-Vázquez, E., Fernández, F., Loske, A. y Gómez-Lim, M. (2013). A novel and highly efficient method for genetic transformation of fungi employing shock waves. *Fungal Genetics and Biology* 56 (2013) 9-16. doi: 10.1016/j.fgb.2013.03.008
- Carabarin-Lima, A., González-Vázquez, M., Rodríguez-Morales, O., Baylón-Pacheco, L., Rosales-Encina, J., Reyes-López, P. y Arce-Fonseca, M. (2013). Chagas disease (American Trypanosomiasis) in Mexico: an update. *Acta Tropica*. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.actatropica.2013.04.007>
- Lubertozzi, D. y Keasling, J. (2009). Developing *Aspergillus* as a host for heterologous expression. *Biotechnology Advances*, 27: 53-75. doi:10.1016/j.biotechadv.2008.09.001
- Su, X., Schmitz, G., Zhang, M., Mackie, R. y Cann, I. (2012). Heterologous Gene Expression in Filamentous Fungi. *Advance in Applied Microbiology*, Vol. 81. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-394382-8.00001-0>
- Salazar-Schettino, P., Bucio-Torres, M., Cabrera-Bravo, M., de Alba-Alvarado, M., Castillo-Saldaña, D., Zenteno-Galindo, E., Rojo-Medina, J., Fernández-Santos, N. y Perera-Salazar, M. (2016). Enfermedad de Chagas en México. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 59(3): 6-16
- De Souza, W., Carvalho, T. y Barrias, E. (2017). Ultrastructure of *Trypanosoma cruzi* and its interaction with host cells. *American Trypanosomiasis Chagas Disease. Segunda edición*, 401-427. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801029-7.00018-6>
- Bartholomeu, D., Teixeira, S. y El-Sayed, N. (2017). Genetics of *Trypanosoma cruzi*. *American Trypanosomiasis Chagas Disease. Segunda edición*, 429-454. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801029-7.00019-8>.

