



RESUMEN TRABAJO DE GRADO

AUTOR(ES): NOMBRES Y APELLIDOS COMPLETOS

NOMBRE(S): DANIEL EDUARDO APELLIDOS: MOROS DUARTE

NOMBRE(S): _____ APELLIDOS: _____

NOMBRE(S): _____ APELLIDOS: _____

FACULTAD: CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

DIRECTOR:

NOMBRE(S): VERONICA APELLIDOS: COCERES

NOMBRE(S): NATALIA APELLIDOS: DE MIGUEL

TÍTULO DEL TRABAJO (TESIS): ANÁLISIS DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR Y EL POSIBLE ROL DE LA PROTEÍNA SNF7 DEL COMPLEJO ESCRT-III EN *Tritrichomonas foetus*

RESUMEN

T. foetus es un protozoario flagelado extracelular que coloniza el tracto genital bovino causando la enfermedad venérea trichomonosis, de impacto negativo en el sector productivo ganadero. La proteína SNF7 en otros organismos forma parte del complejo proteico endosomal ESCRT III (*Complejo endosomal requerido para el transporte*) involucrado en la formación de cuerpos multivesiculares, el transporte vesicular endo/exocítico, y en la división celular formando el andamiaje para la separación final de las células hijas durante la fase de citocinesis. Procesos vitales para cualquier tipo celular y relevantes como blanco de estudio de la patogénesis de parásitos y sobre todo los de tipo extracelular.

El objetivo de esta investigación es analizar a nivel celular el posible rol de la proteína SNF7 en *T. foetus*; específicamente en el proceso de escisión de las membranas. En este contexto en el presente trabajo se generaron parásitos mutantes sobreexpresando diferentes fragmentos de la proteína TFSNF7 que pudieran estar afectando la estabilidad del complejo ESCRT-III y por ende alterar los mecanismos de escisión de las membranas en nuestro parásito de interés

PALABRAS CLAVE: Endosoma, Cuerpos multivesiculares (CMV), Vesículas intraluminales (ILV), Exosoma, *Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP)-Tag

CARACTERÍSTICAS:

PÁGINAS: 90

PLANOS:

ILUSTRACIONES: 5

CD ROOM: 1

ANÁLISIS DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR Y EL POSIBLE ROL DE LA
PROTEÍNA SNF7 DEL COMPLEJO ESCRT-III EN *Tritrichomonas foetus*

DANIEL EDUARDO MOROS DUARTE

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA
SAN JOSÉ DE CÚCUTA

2015

ANÁLISIS DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR Y EL POSIBLE ROL DE LA
PROTEÍNA SNF7 DEL COMPLEJO ESCRT-III EN *Tritrichomonas foetus*

DANIEL EDUARDO MOROS DUARTE

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de
Ingeniero Biotecnológico

Directora

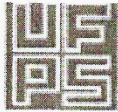
VERONICA COCERES Ph. D

Co-Directora

NATALIA DE MIGUEL Ph. D

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA
SAN JOSÉ DE CÚCUTA

2015



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE UN TRABAJO DE GRADO

FECHA: 27 OCTUBRE 2015

HORA: 11:00 A.M.

LUGAR: CREAD SALA 3

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

TÍTULO: ANÁLISIS DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR Y EL POSIBLE ROL DE LA PROTEÍNA SNF7 DEL COMPLEJO ESCRT-III EN *Tritrichomonas foetus*.

MODALIDAD: INVESTIGACIÓN

JURADOS: LILIANA YANETH SUÁREZ CONTRERAS
YANETH AMPARO MUÑOZ PEÑALOZA
JUAN CARLOS RAMÍREZ BERMÚDEZ

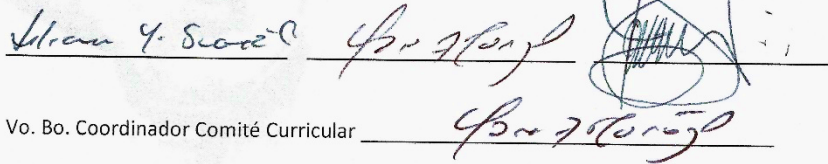
DIRECTOR: VERÓNICA COCERES

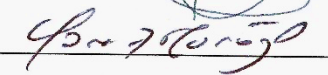
CO-DIRECTOR: NATALIA DE MIGUEL

NOMBRE DEL ESTUDIANTE	CÓDIGO	CALIFICACIÓN
DANIEL EDUARDO MOROS DUARTE	1610530	4.8

OBSERVACIONES: MERITORIA

FIRMA DE LOS JURADOS:



Vo. Bo. Coordinador Comité Curricular 

Resumen

T. foetus es un protozooario flagelado extracelular que coloniza el tracto genital bovino causando la enfermedad venérea trichomonosis, de impacto negativo en el sector productivo ganadero.

La proteína SNF7 en otros organismos forma parte del complejo proteico endosomal ESCRT III (*Complejo endosomal requerido para el transporte*) involucrado en la formación de cuerpos multivesiculares, el transporte vesicular endo/exocítico, y en la división celular formando el andamiaje para la separación final de las células hijas durante la fase de citocinesis. Procesos vitales para cualquier tipo celular y relevantes como blanco de estudio de la patogénesis de parásitos y sobre todo los de tipo extracelular.

El objetivo de esta investigación es analizar a nivel celular el posible rol de la proteína SNF7 en *T.foetus*; específicamente en el proceso de escisión de las membranas. En este contexto en el presente trabajo se generaron parásitos mutantes sobreexpresando diferentes fragmentos de la proteína TFSNF7 que pudieran estar afectando la estabilidad del complejo ESCRT-III y por ende alterar los mecanismos de escisión de las membranas en nuestro parásito de interés.

Agradecimientos

A las Doctoras Veronica Coceres y Natalia de Miguel por la dirección, seguimiento y enseñanza durante este proyecto.

A todos los miembros de LPA por apoyarme en mi proceso de aprendizaje en el laboratorio, Romy, Fernando, Aye, Tomas, Freddy.

A mis amigos y compañeros quienes fueron parte de mi estadía en Argentina, me brindaron su apoyo y mates.

A mi familia por siempre estar en todos los momentos.

Y a todos los locos que conocí de regreso a casa, quienes atraviesan fronteras, van más allá de las creencias y del statu quo, para romper los límites de la normalidad, abrir la percepción y soñar lo desconocido.

Finalmente a la Ingeniera Yaneth Muñoz y a los Ingenieros Alexis Medina y Josman Velasco, por el apoyo hacia el semillero de investigación SINBI, siendo la base de mi aprendizaje inicial.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	14
1. El Problema	15
1.1 Título	15
1.2 Planteamiento del Problema	15
1.3 Formulación del Problema	16
1.4 Justificación	17
1.5 Objetivos	18
1.5.1. Objetivo General	18
1.5.2. Objetivos Específicos	18
1.6 Alcances y Limitaciones	18
1.6.1 Alcances	18
1.6.2 Limitaciones	19
1.7 Delimitaciones	19
1.7.1 Espacial	19
1.7.2 Temporal	19
1.7.3 Conceptual	20
2. Marco Referencial	21
2.1 Antecedentes	21
2.2 Marco Teórico	24
2.2.1 Aspectos generales de <i>Tritrichomonas foetus</i>	24
2.2.2 Trichomonosis bovina	26

2.2.3 Mecanismos de acción patógena	27
2.2.4 Complejo de Agrupación Endosomal Requerido para el Transporte (ESCRT)	28
2.2.5 ESCRT-III	30
2.2.6 Roles de la maquinaria ESCRT-III	31
2.2.7 Proteína SNF7 del complejo ESCRT-III	31
2.2.8 Patogenicidad y tráfico vesicular	33
2.3 Marco Conceptual	34
2.4 Marco Contextual	36
2.5 Marco Legal	36
3. Diseño Metodológico	37
3.1 Tipo de Investigación	37
3.2 Población y Muestra	37
3.2.1. Población	37
3.2.2. Muestra	37
3.3 Hipótesis	37
3.4 Variables	38
3.5 Fases de la investigación	38
3.5.1 Análisis de parásitos SNF7-MasterNeo-HA previamente transfectados en el laboratorio	38
3.5.1.1 Análisis de localización subcelular por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)	38
3.5.1.2 Transfección de <i>T.foetus</i> con la proteína TSP1	40

3.5.1.3 Ensayo de <i>Western Blot</i> .	40
3.5.2. Análisis de parásitos SNF7 MasterNeo EGFP	41
3.5.2.1 Cultivo de <i>Tritrichomonas foetus</i>	42
3.5.2.2 Extracción de ADN genómico de <i>Tritrichomonas foetus</i>	43
3.5.2.3 Análisis de pureza y cuantificación de la muestra de ADN	43
3.5.2.4 Cebadores	43
3.5.2.5 Amplificación de ADN por PCR	44
3.5.2.6 Verificación del producto de amplificación	46
3.5.2.7 Clonado de SNF7 FL y SNF7 $\Delta\alpha 5$ en el vector de expresión MasterNeo-EGFP	46
3.5.2.8 Digestión y desfosforilación del vector de expresión MasterNeo-EGFP	47
3.5.2.9 Ligación de SNF7 FL y SNF7 $\Delta\alpha 5$ al vector de expresión	48
3.5.2.10 Trasformación de bacterias competentes	48
3.5.2.11 <i>Screening</i> de colonias recombinantes	49
3.5.2.12 Midiprep del clon recombinante	49
3.5.2.13 Transfección de parásitos	50
3.5.2.14 Ensayo de <i>Western Blot</i>	50
3.5.2.15 Tratamiento de los <i>slides</i> para ensayo de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)	51
3.5.2.16 Análisis de localización subcelular por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)	51
3.5.2.17 Estudio de la cinética de crecimiento	51
3.5.2.18 Ensayo de viabilidad	52

3.5.2.19 Ensayo preliminar del ciclo celular	52
4. Resultados y Análisis	54
4.1 Patrón de expresión	54
4.1.1 Localización subcelular de SNF7	54
4.2 Clonado de TfSNF7 y TfSNF7 Δ Ct α 5 utilizando un tag-EGFP	59
4.3 El truncamiento de la hélice α 5 en la proteína SNF7 causa importantes alteraciones en <i>T.foetus</i> .	65
5. Conclusiones	72
6. Recomendaciones	74
Referencias bibliográficas	75
Anexos	84