Pasantía en el grupo de investigación Biología y Control de Enfermedades Infecciosas (BCEI)

Estudiante

Dahiana Mera Estrada

Director(es)

Geysson Javier Fernandez[1]

Ana María Mejía Jaramillo[1]

[1]Grupo Biología y Control de Enfermedades Infecciosas, Universidad de Antioquia UdeA, Medellín, Colombia.

Codirector(es)

Juliana Martinez Garro[2]

[2]Universidad CES, Medellín, Colombia.

Trabajo de Grado

En la modalidad de *Pasantía*

Programa de Biología

Universidad CES

Medellín

Septiembre 2024

Pasantía en el grupo de investigación Biología y Control de Enfermedades Infecciosas (BCEI)

Dahiana Mera Estrada

Resumen

Se realizó una pasantía durante 4 meses en el grupo de investigación Biología y Control de Enfermedades Infecciosas (BCEI) de la Universidad de Antioquia, el cual brinda una oportunidad para el desarrollo de un perfil profesional enfocado en la investigación, permitiendo aplicar, fortalecer y aprender conocimientos teóricos y habilidades prácticas de un estudiante de pregrado en Biología. Durante la pasantía se adquirieron habilidades prácticas en el campo de la bioinformática; se llevó a cabo un análisis de regulación postranscripcional de microARN en cardiomiocitos humanos chagásicos, logrando identificar 11 microARN diferencialmente expresos que posiblemente tengan un efecto en la regulación de algunos genes. También se desarrollaron habilidades en técnicas moleculares para el proceso de clonación de un plásmido para la sobreexpresión de un gen en *Trypanosoma cruzi*, implementando técnicas como PCR, electroforesis, ligación, transfección, entre otros. Finalmente, se lograron cumplir los objetivos planteados, enriqueciendo el perfil profesional y así tener bases y conceptos para la investigación en el área de la bioinformática

Palabras clave: miARN, Chagas, Transcriptoma

TABLA DE CONTENIDO

1. Contenido

2. PRESENTACIÓN **5**

3. RESEÑA DE LA INSTITUCIÓN **7**

4. OBJETIVOS **8**

4.1 OBJETIVO GENERAL 8
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 8

5. LOGROS ALCANZADOS **9**

6. DIFICULTADES **9**

7. RESULTADOS **10**

7.1 ANÁLISIS DE CALIDAD Y MAPEO DE RNASEQ 10
7.2 OBTENCIÓN DE MIARNS DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS 12
7.3 OBTENCIÓN DE POSIBLES GENES DIANA 14
7.4 CONTRUCCIÓN DE RED DE GENES DIANA COMPARTIDOS ENTRE LOS MIARNS 16
7.5 REPARACIÓN PARA EL KO DE GENES EN *T. CRUZI* A TRAVÉS DE CRISPR-CAS9 18
7.6 CLONACIÓN DE GENES PARA SOBREEXPRESIÓN EN VECTOR PTEX 20

8. CONCLUSIONES **23**

9. RECOMENDACIONES **24**

10. BIBLIOGRAFÍA **24**

2. Presentación

La enfermedad de Chagas, o tripanosomiasís americana, es una infección causada por el protozoario *Trypanosoma cruzi*, que afecta principalmente a personas en áreas rurales de México, América Central y América del Sur. Se estima que entre 6 y 7 millones de personas están infectadas en todo el mundo. La transmisión ocurre principalmente a través de las heces de los insectos triatominos, pero también puede propagarse por transfusiones de sangre, trasplantes de órganos, transmisión congénita y consumo de alimentos contaminados (Moretti *et al*., 2019).

El Grupo de Biología y Control de Enfermedades Infecciosas (BCEI), ubicado en la Sede de Investigación Universitaria (SIU) y adscrito al Instituto de Biología de la Universidad de Antioquia, investiga varios aspectos de enfermedades infecciosas, incluida la enfermedad de Chagas. El enfoque del laboratorio abarca tanto aproximaciones bioinformáticas para el análisis de datos ómicos del parásito *T. cruzi* como aproximaciones moleculares en el campo de la genómica funcional, utilizando herramientas como CRISPR-Cas9 y estrategias de sobreexpresión génica para estudiar genes poco caracterizados en este modelo (Yagoubat *et al*., 2020).

Una de las manifestaciones más graves de la enfermedad de Chagas es la miocardiopatía chagásica, que afecta aproximadamente al 30% de las personas con Chagas crónico y se caracteriza por insuficiencia cardíaca, arritmias y un mayor riesgo de muerte súbita. Esta afección es una de las principales causas de insuficiencia cardíaca en América Latina (Hernández-Leiva, 2011). Su patogenia incluye la persistencia del parásito en el tejido cardíaco, lo que causa daño directo, una respuesta inmunomediada que produce fibrosis y disfunción microvascular que agrava las complicaciones cardíacas (Saraiva *et al*., 2021). Sin embargo, aún existen grandes vacíos en el entendimiento de los mecanismos de infección de los cardiomiocitos y los cambios moleculares que llevan a la miocardiopatía.

Los microARN (miARN) son pequeñas moléculas de ARN no codificante, de 19 a 24 nucleótidos, que regulan la expresión génica a nivel postranscripcional. Se estima que controlan alrededor del 30% de los genes codificantes de proteínas en humanos. Su biogénesis implica una serie de

procesos que culminan en su unión al ARNm diana a través del complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), donde pueden degradar el ARNm o reprimir su traducción, según el grado de complementariedad (Lam *et al*., 2015). Los micro ARN (miARN) son cruciales en la diferenciación celular, proliferación, apoptosis y desarrollo embrionario. Además, la alteración en su expresión está vinculada a diversas enfermedades, como cáncer y diabetes, lo que ha convertido a los miARN en un objetivo terapéutico y biomarcador prometedor en la investigación biomédica (Agrawal *et al*., 2003; MacFarlane & Murphy, 2010).

En el contexto de la miocardiopatía chagásica, los miARN juegan un papel crucial en la regulación de la expresión génica durante la fase crónica de la enfermedad, influyendo en la remodelación cardíaca, la hipertrofia y la fibrosis. La infección por *T. cruzi* está asociada con la regulación negativa de ciertos miARN, lo que contribuye a los cambios patológicos en el tejido cardíaco (Tefe-Silva *et al*., 2023). Estos miARN también representan dianas terapéuticas potenciales, abriendo la puerta a tratamientos dirigidos a restaurar la expresión génica normal o mitigar el daño cardíaco. No obstante, se requieren más estudios, especialmente en humanos, para validar estos biomarcadores y explorar su potencial en la terapéutica de la miocardiopatía chagásica (Laugier *et al*., 2020).

Durante la pasantía en el laboratorio de Biología y Control de Enfermedades Infecciosas (BCEI), el trabajo se centró en la investigación bioinformática del papel de los microARN (miARN) en la regulación génica durante la infección temprana por *T. cruzi* en cardiomiocitos humanos. Para ello, se utilizaron datos derivados de secuenciación de ARN (RNAseq) de cardiomiocitos humanos infectados con *T. cruzi*. El análisis de estos datos permitió identificar miARN diferencialmente expresados y predecir sus posibles dianas, con el objetivo de hipotetizar factores clave implicados en los procesos de remodelación cardíaca, hipertrofia y fibrosis, característicos de la miocardiopatía chagásica. Este enfoque contribuye a la integración del conocimiento biológico sobre esta enfermedad, y abre nuevas perspectivas para validar las hipótesis planteadas en futuros estudios.

Adicionalmente, se brindó apoyo en técnicas de biología molecular, específicamente en la síntesis de casetes de reparación o ADN donadores para emplear la tecnología CRISPR-Cas9 en *T. cruzi*, con el objetivo de generar mutantes mediante la deleción de genes de interés. También se trabajó en la clonación de estos genes en plásmidos para su sobreexpresión, lo cual es fundamental para estudios de genómica funcional enfocados en investigar la resistencia a drogas y otros aspectos críticos de la biología de este patógeno. Esta experiencia proporcionó un valioso entrenamiento en técnicas avanzadas de edición genética y análisis molecular.

3. Reseña de la institución

La Universidad de Antioquia (UdeA), fundada en 1803, es la institución de educación superior más antigua de Colombia y la más importante del departamento de Antioquia. Surgida del Real Colegio de Franciscanos, ha evolucionado hasta consolidarse como un referente académico a nivel nacional. Su campus principal, conocido como Ciudad Universitaria y ubicado en Medellín, es reconocido por sus modernas instalaciones y amplios espacios verdes, los cuales fomentan un ambiente de aprendizaje e investigación. Además, la UdeA cuenta con varias sedes regionales y se organiza en 26 unidades académicas, incluyendo 14 facultades, cuatro escuelas y diversos institutos, lo que la convierte en un centro de excelencia en áreas como ciencias de la salud, biología, ingeniería y humanidades.

La Sede de Investigación Universitaria (SIU), inaugurada en 2004, es un pilar fundamental para la investigación interdisciplinaria en Colombia. Con especialidades en biotecnología, química, genética, medio ambiente e inmunología, y equipada con laboratorios de alta tecnología, la SIU ofrece servicios tanto a la comunidad universitaria como a entidades externas. Alberga más de 160 grupos de investigación reconocidos por Colciencias y genera anualmente más de 153 publicaciones en revistas científicas de alto impacto. Su compromiso con la ética y la

responsabilidad social se refleja en todos sus proyectos, posicionándola como un motor de innovación científica en el país.

Uno de los grupos destacados de la SIU es el BCEI, donde se realizan investigaciones de vanguardia en salud pública y enfermedades tropicales. Durante mi pasantía en el BCEI, ubicada en la SIU, viví una experiencia académica y personal profundamente enriquecedora. A pesar de enfrentar grandes desafíos al inicio debido a mis limitadas bases conceptuales, el apoyo de mis tutores y compañeros me permitió adquirir conocimientos avanzados en herramientas bioinformáticas en el estudio del papel de los microARN en la infección por *Trypanosoma cruzi*. Mi trabajo se centró en el análisis de datos de secuenciación de ARN en cardiomiocitos humanos infectados, abriendo nuevas perspectivas sobre la miocardiopatía chagásica. El ambiente del laboratorio y del campus no solo fue ideal para el desarrollo académico, sino que también me brindó la oportunidad de crecer profesionalmente y enfrentar nuevos desafíos con confianza y respaldo.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Adquirir competencias y habilidades para desempeño profesional en investigación avanzada en el grupo BCEI

4.2 Objetivos específicos

- Apoyar proyectos de investigación del grupo BCEI
- Adquirir habilidades en bioinformática asociadas a transcriptómica y genómica
- Fortalecer competencias en comunicación científica

5. Logros alcanzados

- Apropiación de habilidades prácticas y conceptuales de herramientas bioinformáticas como Linux, RStudio, Cytoscape, Enrichr y bases de datos como GEO NCBI, TargetscanHuman, MiRTarBase, entre otros.
- Integración de conocimiento sobre técnicas CRISPR, sus diferentes enfoques en la edición génica, y análisis bioinformático, enfocado en datos transcriptómicos, específicamente miARN.
- Capacitación y manejo de cultivos de *T. cruzi*, técnicas moleculares como PCR, electroforesis, clonación, transfección, entre otros.
- Adquisición de experiencia laboral en el campo de la investigación molecular y bioinformática, capacidades de comunicación científica y pensamiento crítico.

6. Dificultades

Durante el período de pasantía se presentaron inconvenientes relacionados con la disponibilidad de datos de secuenciación, la calidad de las secuencias obtenidas y la complejidad de los análisis bioinformáticos requeridos para interpretar los resultados. Debido a estos desafíos fue necesario realizar ajustes en el enfoque metodológico, tales como la implementación de técnicas de preprocesamiento de datos más rigurosas, la optimización de los algoritmos de análisis y la exploración de nuevas herramientas de bioinformática para abordar adecuadamente la variabilidad y la complejidad de los datos.

7. Resultados

7.1 Análisis de Calidad y mapeo de RNAseq

Se tomaron datos crudos de un estudio previo (Rayford *et al*., 2020) de la base de datos GEO NCBI, estos datos corresponden a RNAseq de cardiomiocitos humanos infectados con *T. cruzi*, tomados en diferentes tiempos (0h, 1h, 2h, 3h y 6h) post infección. Se realizaron varios procedimientos clave en el software Linux para la obtención de las secuencias finales correspondientes a miARN:

- Trimado: Este procedimiento es necesario para eliminar secuencias no deseadas de las lecturas de RNA-seq, como los adaptadores (secuencias agregadas durante el proceso de secuenciación que deben eliminarse antes del análisis) y las bases de baja calidad (nucleótidos en los extremos de las lecturas con baja calidad de secuenciación). Además, se realizó el corte de las lecturas a la longitud correspondiente a una secuencia de miARN (19-23 nt).
- Indexado: Se usó un archivo de referencia que contiene secuencias de miARN maduros para el proceso de alineamiento. Se utilizó el comando bowtie-build, creando un índice a partir de este archivo. Este índice sirve para que Bowtie, un alineador eficiente, pueda comparar rápidamente las lecturas de RNA-seq con las secuencias de miARN maduras, facilitando el mapeo en los pasos posteriores.
- Mapeo: (o alineamiento) es el proceso de tomar las lecturas de RNA-seq y alinearlas contra una secuencia de referencia (genoma o transcriptoma). El objetivo es determinar de dónde proviene cada lectura y qué genes o regiones están representadas en los datos.
- Clasificación, indexación y filtrado: Estos son pasos posteriores en el procesamiento de los datos de RNA-seq, que permiten organizar y optimizar los archivos de alineamiento para el análisis diferencial y la interpretación.

- Conteo: se usó la herramienta samtools, es un paso en el análisis de RNA-seq que se utiliza para contar cuántas lecturas se alinean a diferentes genes o regiones del genoma. Este proceso ayuda a medir la expresión de genes o, en el caso de miARN, cuántas lecturas se alinean a cada secuencia de miARN maduro.

Tabla 1

Resumen de lecturas iniciales, alineadas y no alineadas por muestra

Muestras	# sec iniciales	# lecturas alineadas	#lecturas no alineados
SRR11852196	26592670	19729358	14133640
SRR11852197	25604998	24793304	12821600
SRR11852198	27470154	22812562	14235521
SRR11852199	25858082	23285895	11688950
SRR11852200	26367642	29615643	12543970
SRR11852201	26109076	28460367	11289337
SRR11852202	25658643	31632891	11006355
SRR11852203	25484395	34443026	8759769
SRR11852204	25501291	46062600	18636583
SRR11852205	27578007	23772749	12457596
SRR11852206	27386316	26357795	11616862
SRR11852207	27190829	22597190	14419119
SRR11852208	27164919	25773086	13476967
SRR11852209	27147670	31317103	11005140
SRR11852210	26674500	34865006	10270746

Nota. La tabla muestra las lecturas finales obtenidas (# lecturas alineadas) luego de los procesos anteriormente mencionados.

7.2 Obtención de miARNs diferencialmente expresados

Se analizaron las lecturas ya purificadas para buscar miARNs diferencialmente expresados (DEGs). Esto se refiere a aquellos miARNs cuya cantidad o nivel de expresión varía significativamente entre dos o más condiciones biológicas o experimentales. Para este análisis, se utilizó un script en el software RStudio, donde primero se realizó un filtro para eliminar los miARNs con una expresión muy baja (<32 lecturas). Posteriormente, se utilizó el paquete DESeq2 con filtros de padj < 0.01 y Log2FC > |1| (log2 fold change es una medida utilizada en análisis de expresión génica para cuantificar el cambio en la expresión de un gen entre dos condiciones. Se calcula tomando el logaritmo en base 2 del cociente de las medias de expresión del gen en dos condiciones diferentes, como un tratamiento y un control, (OLVTools, 2024), obteniendo 256 DEGs. Finalmente, se filtraron estos DEGs con la base de datos mirGeneDB (miARNs ya anotados), obteniéndo 11 DEGs con los cuales se llevó a cabo el análisis (Tabla 2).

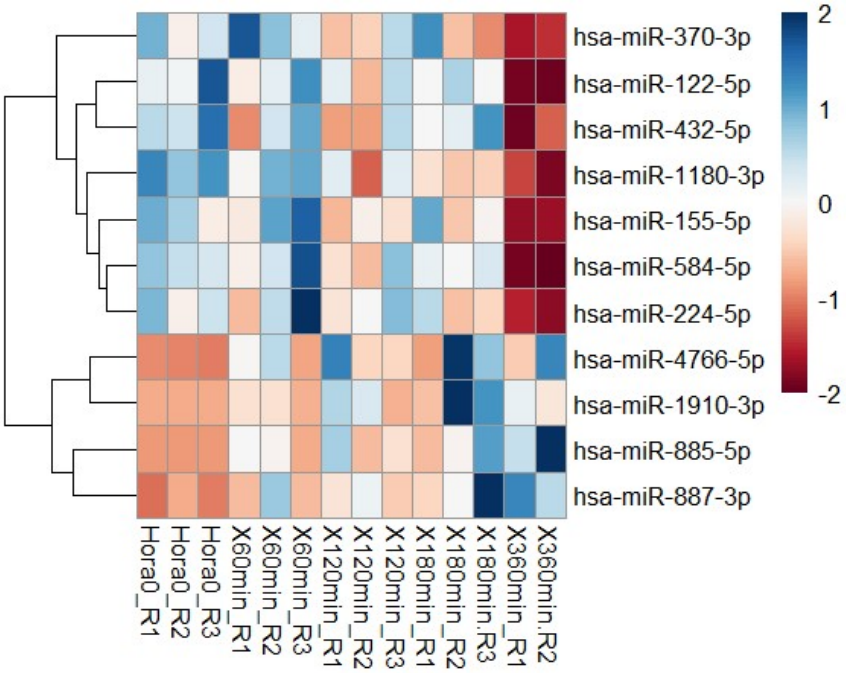
Se realizó un mapa de calor con un código en RStudio para visualizar los patrones de expresión de los miARNs, mostrando las diferencias y similitudes entre las muestras. El objetivo es resaltar qué miARNs están regulados al alza o a la baja y mostrar de manera visual qué genes varían más entre las muestras (Figura 1).

Tabla 2 *Valores de Log2 Fold Change (FC) de miARNs diferencialmente expresados*

miARN	Log2 FC
miR-885-5p	6.3
miR-1910-3p	6.2
miR-4766-5p	3.6
miR-887-3p	3.3
miR-432-5p	-1.1
miR-1180-3p	-1.2
miR-155-5p	-1.9
miR-224-5p	-1.9
miR-584-5p	-2
miR-370-3p	-2.2
miR-122-5p	-4

Nota. Esta tabla muestra los valores de Log2 Fold Change (FC) de los miARNs que presentan una regulación diferencial significativa en el experimento. Los valores positivos indican una regulación al alza, mientras que los valores negativos corresponden a una regulación a la baja.

Figura 1*Mapa de calor de la expresión de miARNs en diferentes puntos temporales (muestras)*



Nota. El mapa de calor muestra los patrones de expression de los miARNs en las distintas muestras. Los colores representan los niveles de expression diferencial, donde el azul indica regulación al alza y el rojo regulación a la baja, según la escala de color a la derecha de la figura. La agrupación jerárquica a la izquierda sugiere similitudes en los patrones de expresión entre los miARNs.

7.3 Obtención de posibles genes diana

Continuando en el análisis del papel de estos miARNs, se buscó en la base de datos TargetscanHuman los genes diana predichos para cada uno de ellos, luego se realizaron varios filtros para obtener máximo 30 genes por miARN, estos son los filtros:

- Se filtraron estos genes diana predichos utilizando el artículo de Venturini *et al*. (2023) para validar genes que estuvieran diferencialmente expresados en cardiomiocitos humanos infectados con *T. cruzi*
- Buscando una relación de expresión opuesta, para los miARN expresados al alza se seleccionaron los genes expresados a la baja y viceversa
- Por último, para aquellos miARN que contaban con más de 30 genes diana se filtraron teniendo en cuenta un Cumulative weighted context++ score < -0.1 (El Cumulative weighted context++ score es una métrica utilizada en la predicción de interacciones entre miRNAs y sus genes diana en la base de datos TargetScan. Evalúa la eficacia con la que un miRNA puede unirse a una región 3' UTR (untranslated region) de un gen y, por lo tanto, regular su expresión) (TargetScan, 2024)

Tabla 3 *Número de genes diana de miARNs diferencialmente expresados*

miARN	# Genes diana
miR-885-5p	18
miR-1910-3p	31
miR-4766-5p	23
miR-887-3p	12
miR-432-5p	29
miR-1180-3p	13
miR-155-5p	9

miR-224-5p	8
miR-584-5p	21
miR-370-3p	30
miR-122-5p	5

7.4 Contrucción de red de genes diana compartidos entre los miARNs

Una vez definidos los genes diana para cada uno de los miARNs, se realizó el análisis de los genes compartidos. Para ello, se utilizó un script de RStudio que analiza cada miARN en comparación con los otros 10, con el fin de determinar la cantidad de genes compartidos y luego calcular el índice de Jaccard, una estadística utilizada para medir la similitud y diversidad entre conjuntos de muestras. Este índice se define formalmente como la relación entre el tamaño de la intersección y el tamaño de la unión de dos conjuntos (Graph Everywhere, 2024).

Se modelaron estos resultados construyendo la red representativa con el software Cytoscape, como se muestra en la figura 2. Cada nodo representa un miARN específico, identificado por su nombre. El tamaño de cada nodo está relacionado con la cantidad de genes diana predichos para ese miARN; los nodos más grandes indican que el miARN tiene más genes diana asociados. El color de los nodos indica el log2 fold change (Log2 FC) de la expresión de cada miARN, con un rango de colores que va desde azul (regulación a la baja) hasta rojo (regulación al alza), mientras que los colores intermedios reflejan grados intermedios de cambio en la expresión.

Los enlaces (líneas entre los nodos) representan el porcentaje de superposición entre los genes diana de los miARNs conectados (índice de Jaccard). Las líneas más gruesas indican una mayor superposición de genes diana entre dos miRNAs, mientras que las líneas más delgadas indican

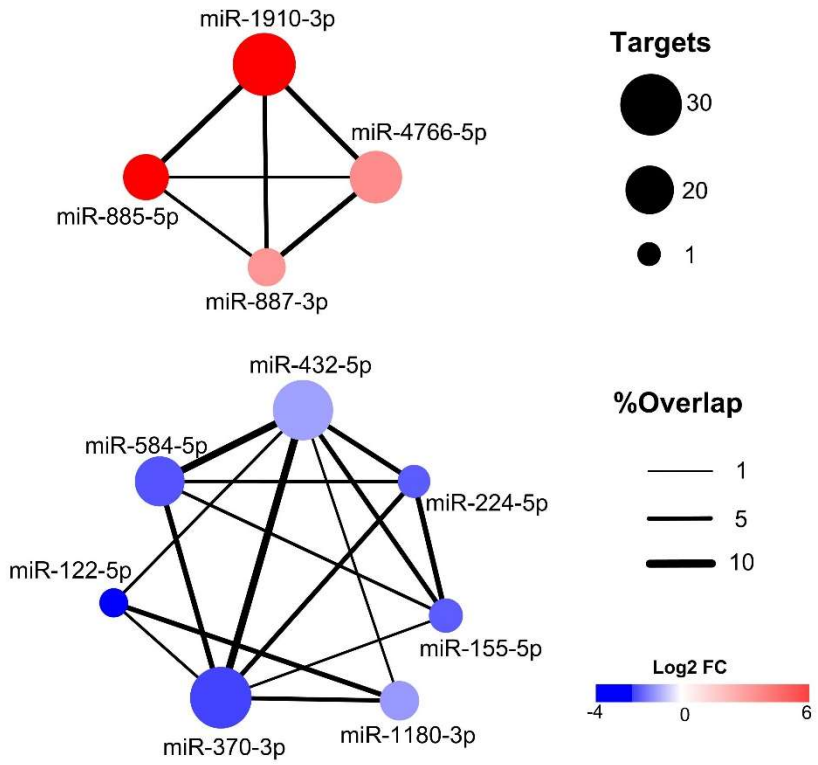
una menor superposición. La leyenda especifica que el grosor de las líneas varía entre un 1% y un 10% de superposición. Se evidencian dos grupos de miARNs:

- **Cluster superior (rojo):** Este conjunto de miARNs está regulado al alza (rojo), con variaciones en la magnitud de la sobreexpresión, según el gradiente de color. Tienen una interconexión densa, lo que sugiere que comparten varios genes diana.
- **Cluster inferior (azul):** Este conjunto de miARNs está regulado a la baja (azul) y también muestra una fuerte interconexión.

Las leyendas indican lo siguiente:

- **Targets (círculos negros de diferentes tamaños):** Representan la cantidad de genes diana que tiene cada miARN. Los nodos más grandes corresponden a miARNs con más genes diana.
- **%Overlap (grosor de líneas):** Indica el porcentaje de superposición de genes diana entre los miRNAs conectados. Las líneas más gruesas denotan mayor superposición.

Figura 2. *Red de interacciones entre miARNs basada en la similitud de sus genes diana*



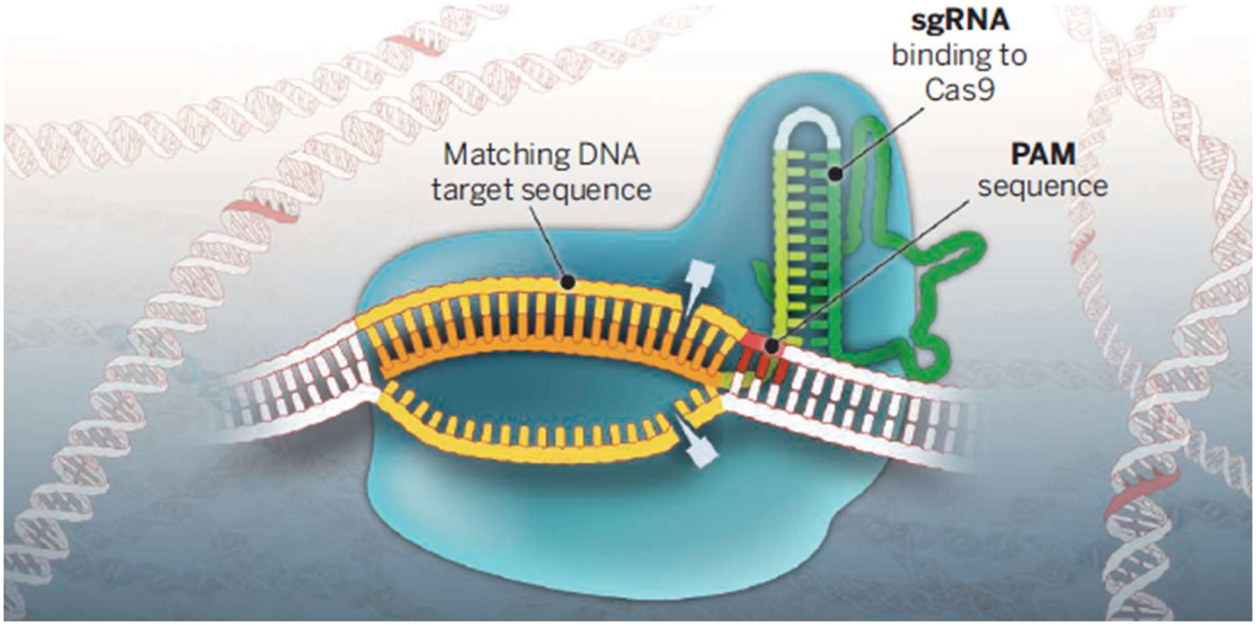
7.5 Reparación para el knock-out de genes en *T. cruzi* a través de CRISPR-Cas9

Una porción del tiempo de trabajo en el laboratorio se distribuyó para diferentes actividades de apoyo, donde se recibió entrenamiento en diferentes técnicas de biología molecular. Una de estas fue la PCR, con el objetivo de sintetizar fragmentos de ADN conocidos como ADN donadores o Casetes de reparación, cuya función es permitir la deleción de genes de interés en *T. cruzi* empleando CRISPR-Cas9. El sistema CRISPR-Cas9 utiliza la proteína Cas9, dirigida a una región genómica objetivo por ARN guías específicamente diseñados. Cas9 a través de su actividad nucleasa, produce una ruptura de doble hebra en el ADN, que luego la célula repara por un mecanismo de homología utilizando un ADN donador, compuesto por un gen apropiado

para la selección y flanqueado por secuencias de homología con el sitio genómico de estudio, (Doudna & Charpentier, 2014), (figura 3).

Figura 3.

Funcionamiento del sistema CRISPR-Cas9

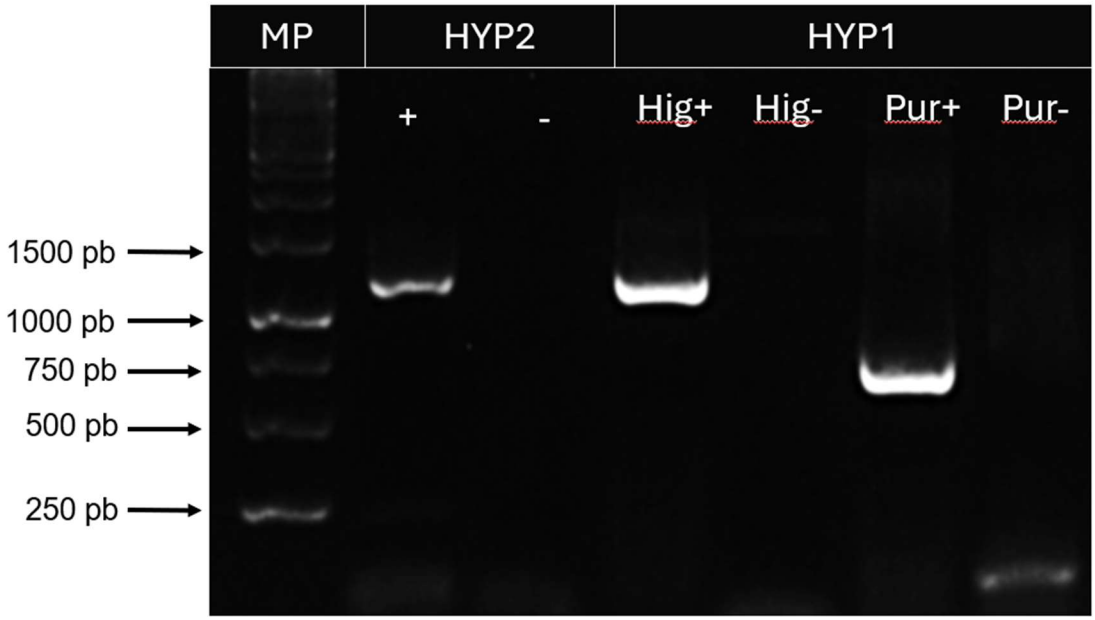


Nota: La enzima Cas9 (azul) genera cortes en el ADN de doble cadena al usar sus dos centros catalíticos para cortar cada hebra en un sitio de ADN objetivo (dorado) junto a una secuencia PAM (rojo) y coincidiendo con una secuencia de 20 nucleótidos del ARN guía (sgRNA) (naranja). Imagen tomada de Doudna & Charpentier, 2014

La intención era eliminar el gen C4B63_30g140, una proteína hipotética conservada, que en adelante se denominará HYP1. Este gen es ortólogo de un gen identificado como 'proteína con dominio helicasa DEAD/DEAH box', un dominio asociado a la unión a ARN. La literatura sugiere que genes con estos dominios están implicados en la 'proteostasís mitocondrial' (Padmanabhan *et al*., 2016). Para su deleción, se sintetizaron dos casetes de reparación por PCR, uno que confiere resistencia a la higromicina y otro a la puromicina, con el objetivo de realizar una doble

selección. Se espera que cada uno reemplace uno de los alelos de este gen. En la figura 4 se muestra la electroforesis de los productos de PCR.

Figura 4. *Gel de agarosa mostrando productos de PCR para la amplificación de HYP2 y casetes de reparación de HYP1*



Nota. Imagen de un gel de agarosa que muestra los productos de PCR utilizados para amplificar HYP2 con un tamaño de 1143 pb, y los casetes para la deleción de HYP1. El casete de higromicina (Hig) tiene un tamaño de 1150 pb, mientras que el de puromicina (Pur) es de 700 pb. MP es el marcador de peso molecular de 1kb, los signos (+) y (-) corresponden a los controles positive y negative respectivamente.

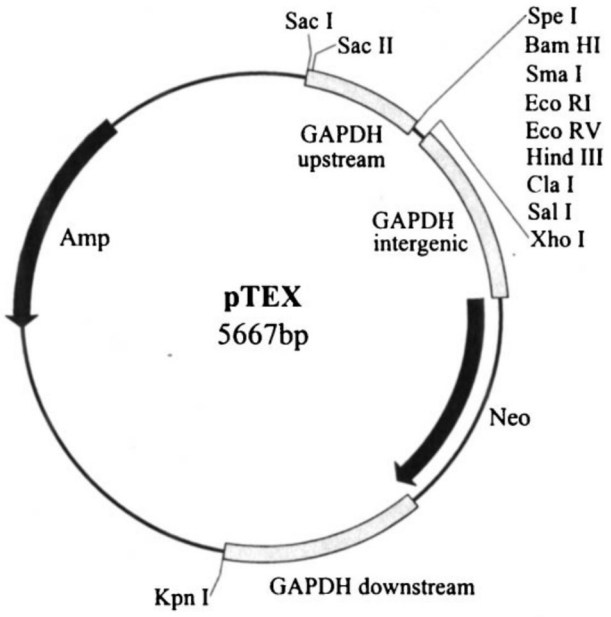
7.6 Clonación de genes para sobreexpresión en vector pTEX

Adicionalmente se buscó sobreexpresar el gen C4B63_234g4, denominado HYP2, que codifica una proteína hipotética conservada cuyo gen es de 1095 pares de bases. Este gen mostró

sobreexpresión en parásitos resistentes al benznidazol, por lo que se propuso su sobreexpresión en parásitos silvestres. HYP2 fue identificado como parte de la familia de mucolipinas, canales monoaniónicos no selectivos, asociados a funciones como la fusión endosoma-lisosoma, autofagia y regulación del pH vacuolar (Mistry *et al*., 2020). Dado que ortólogos de mucolipinas están implicados en la homeostasis de hierro en *T. brucei*, se sugiere que HYP2 podría influir en el equilibrio redox y en la resistencia a fármacos, incluyendo la extrusión de estos en un ambiente intracelular (Stijlemans *et al*., 2015).

Para realizar la sobreexpresión de este gen, primero era indispensable su amplificación a partir de ADN genómico con primers que contenían extremos que codifican para sitios de restricción reconocibles por las enzimas *XhoI* y *HindIII* (Figura 3). Seguidamente para su clonación en el plásmido pTEX (figura 5) específico para expresión en *T. cruzi*, se realizó una digestión de ADN en una mezcla de 20 µL que contenía 2 µL de Buffer R, 0.5 µL de las enzimas *HindIII* y *XhoI*, el ADN a digerir y completado con agua libre de nucleasas. La reacción se incubó a 37°C durante 1-2 horas y luego se corrió la digestión mediante electroforesis en gel de agarosa para los fragmentos con el kit Invisorb® Fragment CleanUp. Posteriormente, el fragmento digerido y el vector digeridoo con las mismas (pSpy o pTEX) se ligaron utilizando ligasa T4, incubando la reacción a 4°C durante la noche.

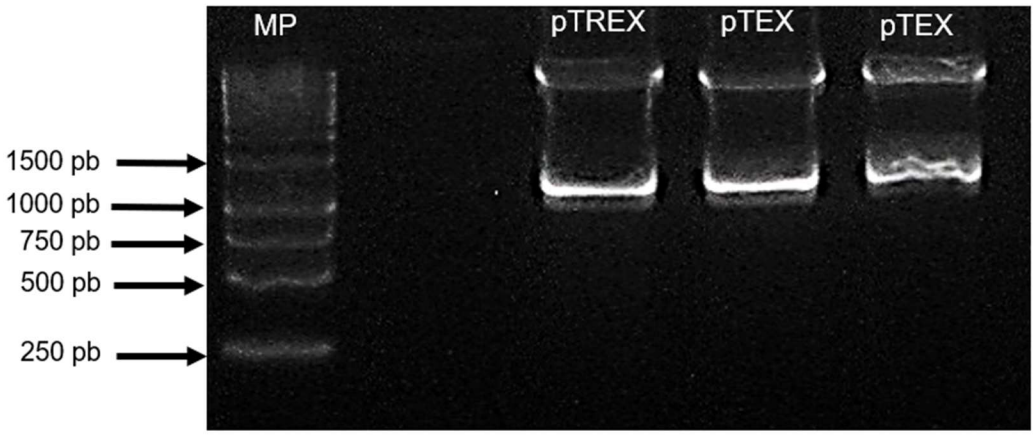
Figura 5. *Mapa del plásmido pTEX utilizado para la clonación del gen HYP2 con el fin de su sobreexpresión en T. cruzi*



Para la transformación bacteriana, 100 µL de E. coli DH5α competentes fueron transformadas con los productos de ligación. Se mantuvieron en hielo por 1 hora, seguidos de un choque térmico de 1 minuto a 42°C y luego 10 minutos en hielo. Las bacterias se recuperaron durante 1 hora en medio LB sin antibióticos a 37°C en agitación, tras lo cual se sembraron en placas de agar LB con 100 µg/mL de ampicilina, incubándose toda la noche a 37°C. Colonias independientes fueron seleccionadas, cultivadas en 5 mL de medio LB con ampicilina durante 16 horas, y el plásmido se aisló usando el kit ZymoPURE Plasmid Miniprep Kit específico para miniprep.

Después de la purificación del plásmido pTEX y para confirmar la clonación, el producto de la miniprep se sometió a digestión enzimática bajo las condiciones descritas. Si la clonación fue exitosa, tras el tratamiento con las mismas enzimas de restricción, se espera que se libere un fragmento de aproximadamente 1150 pares de bases, tal como se muestra en la figura 6.

Figura 6. *Gel de agarosa mostrando la liberación de un fragmento de 1150 pb del gen HYP2 clonado en el plásmido pTEX*



Nota. Imagen de un gel de agarosa que muestra la liberación de un fragmento de aproximadamente 1150 pares de bases del gen HYP2 clonado en el plásmido pTEX. MP es el marcador molecular de 1 kb. Una clonación previa en el plásmido pTREX, semejante a pTEX, se empleó como control positivo.

8. Conclusiones

Esta pasantía brindó una gran oportunidad para el desarrollo personal y profesional. Es un espacio que permite el acercamiento a las responsabilidades en un entorno laboral, comprendiendo los deberes y las actividades no solo del trabajo personal, sino también del trabajo en equipo y la red de apoyo.

Se desarrollaron habilidades en bioinformática, abriendo así la oportunidad para continuar en este campo, ya que se aprendió sobre diferentes técnicas de análisis computacional para datos genómicos. Se logró interpretar los resultados y desarrollar hipótesis a través de ellos.

Esta experiencia permitió entender el tiempo requerido y la importancia de los procesos de laboratorio, los contratiempos y la resolución de dificultades, comprendiendo de esta manera el valor de cada proceso realizado.

9. Recomendaciones

En caso de que otros estudiantes estén interesados en realizar esta pasantía, se recomienda familiarizarse previamente con los fundamentos de la bioinformática y las herramientas de analisis de datos genómicos, ya que esto facilitará la comprensión y ejecución de las tareas asignadas durante la pasantía, así mismo mantenerse actualizado sobre los avances y nuevas técnica en el campo de la bioinformática y la genómica, participando en seminarios, conferencias y actividades académicas relacionadas.

10. Bibliografía

Agrawal, N., Dasaradhi, P. V. N., Mohmmed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R. K., &

Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science, 346(6213). https://doi.org/10.1126/science.1258096

Graph Everywhere. (2024). Algoritmo de similaridad de Jaccard. https://www.grapheverywhere.com/algoritmo-de-similaridad-de-jaccard/

Hernández-Leiva, E. (2011). Epidemiología del síndrome coronario agudo y la insuficiencia cardiaca en Latinoamérica. Revista Española de Cardiología, 64, 34-43. https://doi.org/10.1016/j.recesp.2011.01.022

Historia. (s. f.). www.udea.edu.co. Recuperado 10 de septiembre de 2024, de https://www.udea.edu.co/wps/portal/udea/web/inicio/udea-regiones/acerca-udea-regiones/historia

Lam, J. K. W., Chow, M. y. T., Zhang, Y., & Leung, S. W. S. (2015). siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. Molecular Therapy — Nucleic Acids, 4, e252. https://doi.org/10.1038/mtna.2015.23

Laugier, L., Ferreira, L. R. P., Ferreira, F. M., Cabantous, S., Frade, A. F., Nunes, J. P., Ribeiro, R. A., Brochet, P., Teixeira, P. C., Santos, R. H. B., Bocchi, E. A., Bacal, F., Da Silva Cândido, D., Maso, V. E., Nakaya, H. I., Kalil, J., Cunha-Neto, E., & Chevillard, C. (2020). miRNAs may play a major role in the control of gene expression in key pathobiological processes in Chagas disease cardiomyopathy. PLoS Neglected Tropical Diseases, 14(12), e0008889. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008889

MacFarlane, L., & Murphy, P. R. (2010). MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. Current Genomics, 11(7), 537-561. https://doi.org/10.2174/138920210793175895

Mistry, J., Chuguransky, S., Williams, L., Qureshi, M., Salazar, G. A., Sonnhammer, E. L. L., Tosatto, S. C. E., Paladin, L., Raj, S., Richardson, L. J., Finn, R. D., & Bateman, A. (2020). Pfam: The protein families database in 2021. Nucleic Acids Research, 49(D1), D412-D419. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa913

Moretti, N. S., Mortara, R. A., & Schenkman, S. (2019). Trypanosoma cruzi. Trends In Parasítology, 36(4), 404-405. https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.10.002

OLVTools. (2024). Fold change. OLVTools. https://olvtools.com/en/rnaseq/help/fold-change

Padmanabhan, P. K., Zghidi-Abouzid, O., Samant, M., Dumas, C., Aguiar, B. G., Estaquier, J., & Papadopoulou, B. (2016). DDX3 DEAD-box RNA helicase plays a central role in mitochondrial protein quality control in Leishmania. Cell Death And Disease, 7(10), e2406. https://doi.org/10.1038/cddis.2016.315

Rayford, K. J., Cooley, A., Arun, A., Rachakonda, G., Kleschenko, Y., Villalta, F., Pratap, S., Lima, M. F., & Nde, P. N. (2020). Trypanosoma cruzi Modulates PIWI-Interacting RNA Expression in Primary Human Cardiac Myocytes during the Early Phase of Infection. International journal of molecular sciences, 21(24), 9439. https://doi.org/10.3390/ijms21249439

Saraiva, R. M., Mediano, M. F. F., Mendes, F. S., Da Silva, G. M. S., Veloso, H. H., Sangenis, L. H. C., Da Silva, P. S., Mazzoli-Rocha, F., Sousa, A. S., Holanda, M. T., & Hasslocher-Moreno, A. M. (2021). Chagas heart disease: An overview of diagnosis, manifestations, treatment, and care. World Journal Of Cardiology, 13(12), 654-675. https://doi.org/10.4330/wjc.v13.i12.654

Sede de Investigación Universitaria. (s. f.). www.udea.edu.co. Recuperado 10 de septiembre de 2024, de https://www.udea.edu.co/wps/portal/udea/web/inicio/investigacion/sede-investigacion-universitaria

Stijlemans, B., Beschin, A., Magez, S., Van Ginderachter, J. A., & De Baetselier, P. (2015). Iron Homeostasís andTrypanosoma bruceiAssociated Immunopathogenicity Development: A Battle/Quest for Iron. BioMed Research International, 2015, 1-15. https://doi.org/10.1155/2015/819389

TargetScan. (2024). The context+ scores and context++ scores. TargetScanMouse. https://www.targetscan.org/mmu_80/docs/context_score.html

Tefe-Silva, C., De Oliveira Teixeira, L., Durigan, L. R., Cardoso, M. C. S., De Castro Davi, M. L., Pin, P. A., Milanez, S., Lourenço, V. C., De Sousa Beine, T. C., & Clemente, E. y. A. (2023). The Role of MicroRNAs in the Pathogenesis of Chagas Disease. International Journal Of Cardiovascular Sciences, 36. https://doi.org/10.36660/ijcs.20220210

Venturini, G., Alvim, J. M., Padilha, K., Toepfer, C. N., Gorham, J. M., Wasson, L. K., Biagi, D., Schenkman, S., Carvalho, V. M., Salgueiro, J. S., Cardozo, K. H. M., Krieger, J. E., Pereira, A. C., Seidman, J. G., & Seidman, C. E. (2023). Cardiomyocyte infection by Trypanosoma cruzi promotes innate immune response and glycolysis activation. Frontiers in cellular and infection microbiology, 13, 1098457. https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1098457

Yagoubat, A., Corrales, R. M., Bastien, P., Lévêque, M. F., & Sterkers, Y. (2020). Gene Editing in Trypanosomatids: Tips and Tricks in the CRISPR-Cas9 Era. Trends in Parasítology, 36(9), 745–760. https://doi.org/10.1016/J.PT.2020.06.005