



Estancia en Medellín, Colombia Febrero-Marzo 2016

Transferencia de Conocimientos PVCT15-53

**Programa de Vinculación de
Científicos y Tecnólogos**

Convocatoria 2015



CONSEJO NACIONAL
**DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA**



GOBIERNO NACIONAL
Construyendo el Futuro hoy



Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales



Ensayos Biológicos e Inmunología

Objetivo General

- Manejar nuevas técnicas fluorescentes para la evaluación *In Vivo* de compuestos con actividad tripanocida y leishmanicida utilizando cepas transfectadas de *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania* spp.

Objetivos Específicos

1. Conocer la producción, manejo, mantenimiento y preparación de parásitos tripanosomátidos transfectados para los ensayos *In Vivo* de compuestos tripanocidas y leishmanicidas.
2. Realizar ensayos fluorimétricos *In Vivo* utilizando parásitos transfectados por medio de un sistema de análisis de imágenes *In Vivo* y en tiempo real.
3. Manejar software para análisis e interpretación de resultados obtenidos.

Gen Reportero

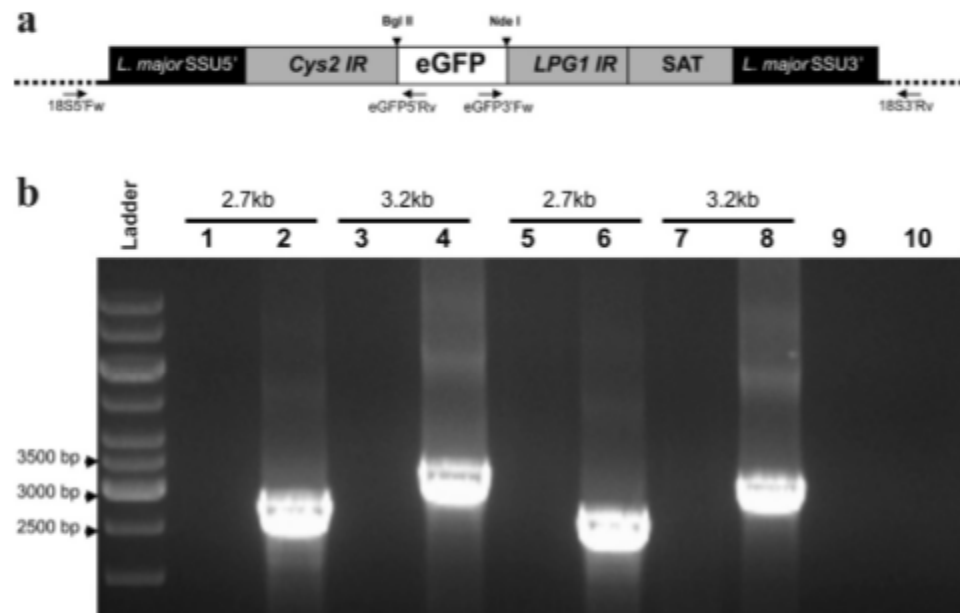


Fig. 1. Cassette for integration of the GFP ORF into the 18S rRNA locus. (a) Schematic drawing of the integration cassette of the pIR3(-)-eGFP; dotted lines represents chromosome portions of the 18S rRNA locus of *Leishmania* sp. *L. major* SSU5': *Leishmania major* small subunit rRNA coding sequence 5' end arm; Cys2-IR: intergenic region of *Leishmania mexicana* cysteine protease 2 gene; eGFP: coding gene of the green fluorescent protein; LPG1 IR: intergenic region of *L. major* LPG1 gene; SAT: nourseothricin resistance gene; *L. major* SSU3': *Leishmania major* small subunit rRNA coding sequence 3' end arm. Annealing sites of the primers for verification of the cassette integration into the 18S rRNA locus by PCR are represented by arrows as described above in material and methods, 18S5'Fw and eGFP5'Rv primers flank a 2.7 kb region and 18S3'Rv flank a 3.2 kb region. (b) Results of the PCR for verification of the integration of the cassette into the 18S rRNA locus in New World strains: lane 1, *L. panamensis* wt; lane 2, *L. panamensis* pIR3(-)-eGFP; lane 3, *L. panamensis* wt; lane 4, *L. panamensis* pIR3(-)-eGFP; lane 5, *L. braziliensis* wt; lane 6, *L. braziliensis* pIR3(-)-eGFP; lane 7, *L. braziliensis* wt; lane 8, *L. braziliensis* pIR3(-)-eGFP; lanes 9 and 10, negative controls of the 2.7 kb and 3.2 kb PCR reactions respectively.

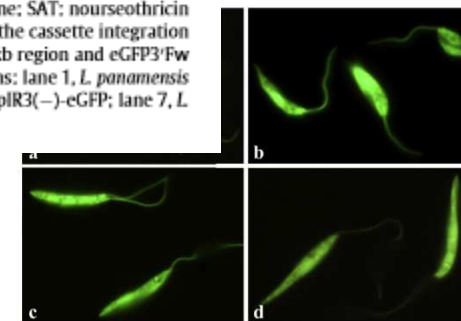
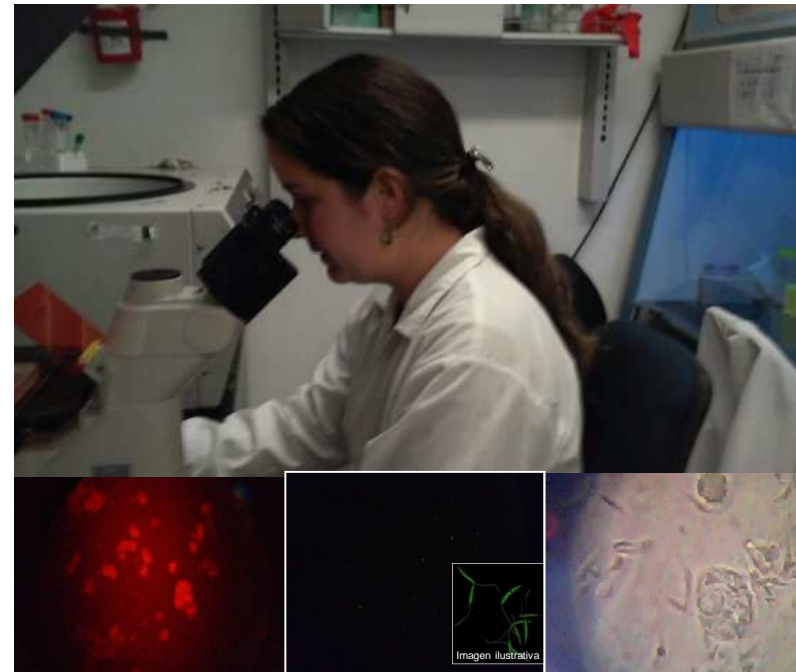
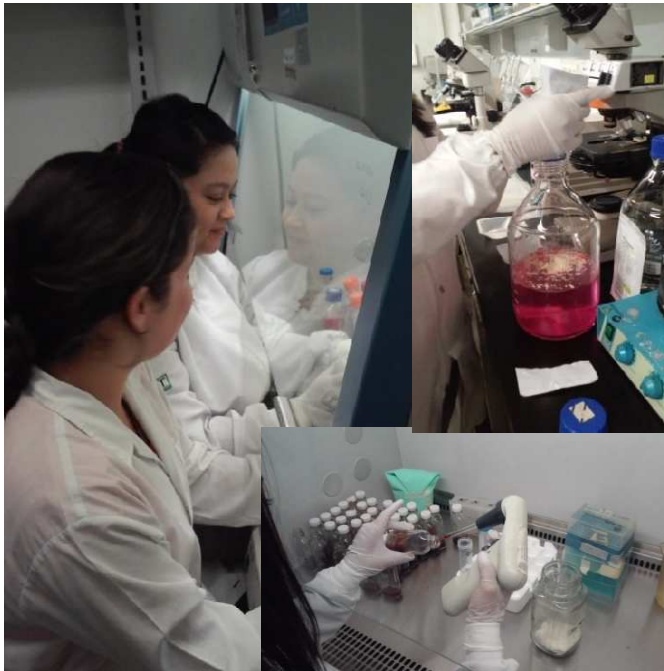


Fig. 2. Detection of the GFP expression in the transduced promastigotes by epifluorescence microscopy. (a) *L. panamensis*; (b) *L. braziliensis*; (c) *L. amazonensis*; (d) *L. infantum*.

Actividades y Resultados

- Manejo y mantenimiento de cultivos de parásitos tripanosomátidos transfectados *In Vitro*.



Varela, R. 2009.; Insuasty, B. 2015

- Manejo y mantenimiento de parásitos tripanosomátidos transfectados en modelo *In Vivo*.



Imagen ilustrativa



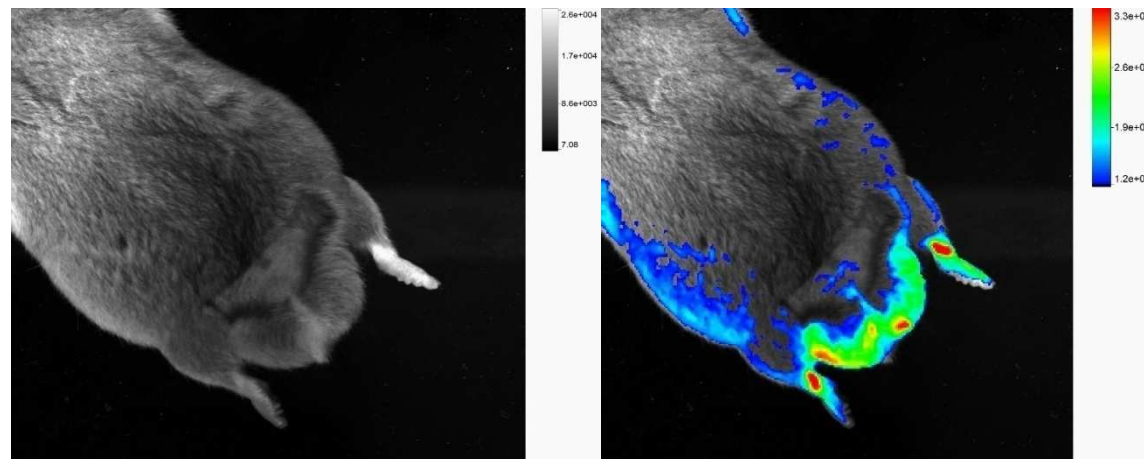
Imagen ilustrativa

Pulido, S. 2012.

- Manejo de animales infectados con cepas transfectadas de *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania* spp.



- Capacitación en el manejo, interpretación de resultados y análisis utilizando el sistema de análisis de imágenes en tiempo real para detección de fluorescencia en modelo *In Vivo*.



Conclusiones

- El manejo y mantenimiento de los cultivos de parásitos transfectados con genes fluorescentes precisa de procedimientos aplicables en las instalaciones de la institución de origen y son una alternativa eficaz a la utilización de ensayos colorimétricos *In Vitro*.
- Con sistemas de análisis de imágenes en tiempo real puede realizarse un monitoreo constante y no invasivo de los animales de experimentación, así como aminorar la cantidad de individuos utilizados en cada grupo experimental.

Agradecimientos



Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales