



UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**PRODUCCIÓN DEL INHIBIDOR ENDÓGENO RECOMBINANTE DE
LA CISTEÍN PEPTIDASA DE *Trypanosoma evansi*.**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela, por el bachiller Eliezer A. Cruz C. como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología

Tutora: Dra. Yenis Pérez Rojas.

**CARACAS, VENEZUELA
Mayo - 2019**

**DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL
DE GRADO DEL Br. ELIEZER AUGUSTO CRUZ COLINA**

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado del Br. Eliezer Augusto Cruz Colina, C.I: 20.754.326, titulado **"PRODUCCIÓN DEL INHIBIDOR ENDÓGENO RECOMBINANTE DE LA CISTEÍN PEPTIDASA DE *Trypanosoma evansi*"**, para optar al título de Licenciado en Biología, considerando que el trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en la ciudad de Caracas, a los veintitrés días del mes de mayo del año dos mil diecinueve, dejando constar que el profesor Alexander Laurentin actuó como Asesor Académico y como Coordinador del jurado examinador.



Prof.^a Victoria Navas
Jurado



Prof. José Bubis
Jurado



Prof. Alexander Laurentin
Asesor académico
Coordinador



Prof. Yenis Gladinex Pérez
Tutora

RESUMEN

La surra, o tripanosomosis equina, es una enfermedad causada por *Trypanosoma evansi* de suma importancia veterinaria en Venezuela. La búsqueda de nuevos blancos moleculares para el desarrollo de quimioterapias es prioritario. Las cisteín peptidasas y sus respectivos inhibidores, o ICP, con tamaños moleculares característicos entre los 12 y 15 kDa, han demostrado ser un blanco molecular prometedor. Se ha demostrado en *Trypanosoma cruzi*, que los ICP cumplen un rol importante en el desarrollo del parásito en el hospedador al regular la actividad de las cisteín peptidasas. Por la alta homología en las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas que hay entre los ICP de *T. evansi* y *T. cruzi*, se cree que el ICP de *T. evansi* puede cumplir el mismo rol. Utilizando el sistema heterólogo de *Escherichia coli*, se logró clonar y expresar una proteína con un tamaño próximo a los 45 kDa. Esta proteína fue reconocida a través de Western blots con anticuerpos anti-ICP contra *T. cruzi*, indicando que posee epítopes característicos de un ICP del género *Trypanosoma*. Ensayos de inhibición por zimogramas, de la proteína recombinante contra las cisteín peptidasas de *T. evansi*, revelaron que la primera posee actividad inhibitoria sobre las cisteín peptidasas de 33 y 35 kDa de *T. evansi*, desde concentraciones de 55 nM hasta los 5 μ M. No se observó inhibición aparente sobre la principal cisteín peptidasa de *T. evansi*, evansaína, de un tamaño de 28 kDa. Por lo tanto, se cree que la proteína recombinante oligomerizó durante su expresión, formando agregados solubles denominado cuerpos de inclusión, debido a un desbalance de las proteínas chaperonas de *E. coli* durante la inducción por IPTG.

Palabras claves: Surra, clonación, proteína heteróloga, oligomerización, inhibición.

ÍNDICE GENERAL

I.	RESUMEN.....	ii
II.	ÍNDICE DE CONTENIDO	iii
III.	ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
IV.	ÍNDICE DE TABLAS	viii

ÍNDICE DE CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN	1
1.	<i>Trypanosoma evansi</i> : Relación filogenética y distribución geográfica	2
2.	<i>Trypanosoma evansi</i> y su morfología	4
3.	<i>Trypanosoma evansi</i> y su transmisión.....	5
4.	<i>Trypanosoma evansi</i> : Signos Clínicos	6
5.	Peptidasas en parásitos	8
5.1.	Clasificación de las peptidasas.....	9
5.2.	Cisteín peptidasa en parásitos.....	14
6.	Inhibidores de peptidasa	19
6.1.	La súperfamilia de las cistatinas: Inhibidores de cisteín peptidasa	20
6.2.	La chagasina: El inhibidor endógeno de cisteín peptidasa de <i>T. cruzi</i>	22
II.	ANTECEDENTES	28
III.	OBJETIVOS	31
1.	Objetivo general	31
2.	Objetivos específicos	31
IV.	METODOLOGÍA	32
1.	Purificación de <i>Trypanosoma evansi</i>	32
2.	Extracción de ADN de alto peso molecular de <i>Trypanosoma evansi</i>	33
3.	Evaluación del ADN de alto peso molecular extraído.....	34
4.	Estandarización de la técnica de PCR para la amplificación del gen que codifica para el ICPte.	34

5. Ligación del producto de PCR en el vector de clonación-expresión pET101/D-TOPO® y transformación de células <i>E. coli</i> TOP10.....	37
6. Selección de clones positivos mediante PCR anidada.....	39
6.1. <i>Colony PCR</i> con cebadores universales T7	40
6.2. PCR anidada con cebadores internos específicos IEFTopo e ICPE1.1.....	42
7. Extracción de ADN plasmídico de células <i>E. coli</i> TOP10 transformadas.....	42
8. Ensayo de restricción.....	44
9. Transformación de células <i>E. coli</i> BL21 y expresión a mini escala mediante inducción con IPTG.....	45
10. Análisis de muestras a través de electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)	46
11. Análisis de muestras a través Western blot	47
12. Expresión a mayor escala y purificación de la proteína recombinante por columna de afinidad Níquel-agarosa.....	49
13. Purificación de las cisteín peptidasas de <i>T. evansi</i> por columna de afinidad Bacitracina-Sepharosa	50
14. Análisis de las fracciones por Zimografía.....	51
15. Ensayo de inhibición de las cisteín peptidasas de <i>T. evansi</i> por la proteína recombinante...	53
16. Análisis bioinformático	53
V. RESULTADOS	55
1. Purificación de <i>Trypanosoma evansi</i> aislado TeAp-ElFrío01	55
2. Aislamiento de ADN genómico de alto peso molecular de <i>Trypanosoma evansi</i>	55
3. Estandarización de la técnica de PCR para la amplificación del gen que codifica para el ICP de <i>Trypanosoma evansi</i>	56
4. Clonación del producto de PCR en el vector de clonación-expresión pET101/D-TOPO®	58
5. Selección de clones positivos mediante PCR anidada	59
6. Extracción del ADN plasmídico de células <i>E. coli</i> TOP10 recombinantes	61
7. Ensayo de restricción.....	63
8. Transformación de células <i>E. coli</i> BL21 y expresión a mini escala mediante inducción con IPTG.....	65
9. Análisis de muestras a través Western blot	67
10. Expresión a mayor escala y purificación de la proteína recombinante por columna de afinidad Níquel-agarosa.....	70
11. Purificación de las cisteín peptidasa de <i>T. evansi</i> por Bacitracina-Sepharosa y análisis por Zimografía.....	73

12. Ensayo de inhibición de las cisteín peptidasa de <i>T. evansi</i> por la proteína recombinante purificada	75
13. Análisis bioinformáticos	76
13.1. Alineamiento de la secuencia nucleotídica que codifica par el ICP de <i>T. evansi</i>	76
13.2. Predicción de la estructura terciaria del ICP de <i>T. evansi</i>	77
13.3. Predicción de la estructura terciaria del ICP recombinante de <i>T. evansi</i>	79
13.4. Predicción de epítopes lineales de la secuencia aminoacídica de la proteína ICP de <i>T. evansi</i>	81
VI. DISCUSIÓN.....	83
VII. CONCLUSIONES	103
VIII. RECOMENDACIONES.....	104
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	105

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol de evolución hipotético del subgénero Trypanozoon	3
Figura 2. Distribución geográfica de <i>Trypanosoma evansi</i> en el mundo.....	4
Figura 3. Ilustración de las características principales de un <i>Trypanosoma</i>	5
Figura 4. Mecanismo de hidrólisis de los sustratos por la cisteín peptidasa.....	11
Figura 5. Esquema de la clasificación MEROPS para las cisteín peptidasas de parásitos.....	14
Figura 6. Representación esquemática de los sitios de unión al sustrato de las peptidasas tipo papaína a lo largo de la hendidura del sitio activo.....	18
Figura 7. Estructura de la chagasina y comparación con otros inhibidores similares	24
Figura 8. Comparación de la chagasina con la proteína CD8 α	25
Figura 9. Unión claves en la interacción de la chagasina con peptidasa diana	27
Figura 10. Secuencia del gen que codifica para el ICPte tomado de TritypDB Sequence ID: STIB805_Chr08.....	35
Figura 11. Mapa físico del vector pET 101 señalando la posición donde se insertó el producto	39
Figura 12. Mapa físico del vector pET 101/D/ <i>lacZ</i> señalando la posición donde se insertó el gen <i>lacZ</i>	39
Figura 13. Esquema general del proceso de la técnica PCR anidada.....	40
Figura 14. Ensayo de restricción <i>in silico</i> para la secuencia del gen que codifica para el ICPte tomado de TritypDB Sequence ID: STIB805_Chr08 con el programa online NEBcutter V2.0	44
Figura 15. Análisis del ADN de alto peso molecular extraído a partir de <i>Trypanosoma evansi</i> , aislado TeAp-ElFrío01 a través de electroforesis en gel de agarosa al 0,8% m/v	56
Figura 16. Análisis de la estandarización de la PCR con los cebadores IEFTopo e ICP1.1. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% m/v	57
Figura 17. Análisis de los productos de PCR con los cebadores IEFTopo e ICP1.1 hibridados a una temperatura de 56,5°C	58
Figura 18. Análisis de las colonias <i>E. coli</i> TOP10 recombinantes a través de <i>Colony</i> PCR con cebadores universales T7	60
Figura 19. Análisis de las colonias <i>E. coli</i> TOP10 recombinantes a través de PCR anidada con cebadores específicos IEFTopo e ICPE1.1.....	61
Figura 20. Análisis de la integridad de los ADN plasmídico extraídos de células <i>E. coli</i> TOP10 recombinantes mediante lisis alcalina. Electroforesis	62
Figura 21. Análisis de restricción del ADN plasmídico tratado con la enzima SmaI	65
Figura 22. Análisis de la cinética de expresión de la proteína recombinante en la fracción soluble del lisado celular.....	66
Figura 23. Análisis de la cinética de expresión de la proteína recombinante en la fracción insoluble del lisado celular.....	67

Figura 24. Análisis de la cinética de expresión de la proteína recombinante en fracción soluble. Western Blot con anticuerpo monoclonal de ratón anti-polihistidina	68
Figura 25. Análisis de la cinética de expresión de la proteína recombinante en fracción soluble. Western Blot con anticuerpo policlonal mono-específico de conejo anti-ICP de <i>T. vivax</i>	70
Figura 26. Análisis del perfil de elución de la proteína recombinante purificada por columna de afinidad His-Link. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%.....	71
Figura 27. Análisis de las eluciones de purificación de la proteína recombinante. Western Blot con anticuerpo monoclonal de ratón anti-polihistidina.....	72
Figura 28. Análisis de las eluciones de purificación de la proteína recombinante. Western Blot con anticuerpo policlonal mono-específico de conejo anti-ICP de <i>T. vivax</i>	73
Figura 29. Imagen en negativo. Análisis del perfil de elución y actividad proteolítica de las cisteín peptidasas de <i>T. evansi</i> purificadas por columna de afinidad Bacitracina-Sepharosa 74	
Figura 30. Imagen en negativo. Análisis del ensayo de inhibición de las cisteín peptidasas de <i>T. evansi</i> con la proteína recombinante (PR) a diferentes concentraciones	76
Figura 31. Alineamiento de la secuencia nucleotídica del gen que codifica para el ICP de <i>T. evansi</i> cepa STIB805 (TritypDB Sequence ID: STIB805_Chr08) con la secuencia del ICP reportado para <i>T. brucei</i> (GenBank ID: N° AJ548878.1) según programa BioEdit.....	77
Figura 32. Modelo de la estructura secundaria y terciaria del ICpte mediante el uso del programa Phyre2	79
Figura 33. Modelo de la estructura terciaria del ICpte recombinante mediante el uso del programa Phyre2	81
Figura 34. Predicción de oligómeros del ICpte recombinante mediante el uso del programa GalaxyWeb.....	102

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Inhibidores de cisteín peptidasa	20
Tabla 2. Genotipo de bacterias	32
Tabla 3. Vectores de clonación	32
Tabla 4. Condiciones de la mezcla de reacción para PCR a utilizar para amplificar el gen que codifica para el ICpte	36
Tabla 5. Condiciones del programa “ICpte gradiente” en el termociclador	36
Tabla 6. Condiciones de temperatura por columna en el bloque del termociclador establecido por el programa “ICpte gradiente”	37
Tabla 7. Condiciones de la mezcla de reacción para la <i>Colony</i> PCR	42
Tabla 8. Condiciones del programa “T7” en el termociclador Bioer XP cycler	42
Tabla 9. Preparación de geles para zimogramas al 12% de acrilamida	52
Tabla 10. Colonias <i>E. coli</i> TOP10 recombinantes obtenidas con el plásmido pET101+ICpte y pET 101/D/ <i>lacZ</i> en placas LB-ampicilina (100 µg/mL)	59
Tabla 11. Concentración y pureza asociada del ADN plasmídico extraído de las colonias <i>E. coli</i> TOP10 recombinantes analizadas	63
Tabla 12. Análisis de predicción de epítopes lineales con el programa ABCpred	82

I. INTRODUCCIÓN

Trypanosoma evansi es un parásito protozoario hemoflagelado perteneciente a la familia Trypanosomatidae, subgénero Trypanozoon, rama Salivarian ya que los parásitos se desarrollan en la parte anterior del tracto digestivo del insecto (Adl y col., 2012). Ha tomado importancia en el ámbito de la salud dado que es altamente patogénico para las familias Camelidae y Equidae, siendo el agente etiológico de la “Surra”, enfermedad que afecta principalmente a los camellos en África, búfalos en Asia y caballos en América (Desquesnes, 2004).

Actualmente, las investigaciones científicas se han inclinado en el reconocimiento e identificación de moléculas específicas en los parásitos que desempeñan roles importantes en los procesos del organismos y que puedan ser nuevos blancos potenciales para mejorar las áreas de diagnóstico y quimioterapia (Holzmuller y col., 2008). Unas de estas moléculas son las peptidasas. Juegan un papel importante en el ciclo de vida y patogénesis del parásito, lo que abrió la posibilidad del diseño de nuevos métodos quimioterapéuticos basado en inhibidores específicos de estas peptidasas (McKerrow, 2018), ya que se observó que la inhibición de las cisteín peptidasas lleva a una rápida muerte de los parásitos (Holzmuller y col., 2008). Por ello, se ha propuesto realizar un estudio sobre el inhibidor endógeno de cisteín peptidasa de *Trypanosoma evansi*, cepa TeAp-ElFrío01, con miras de facilitar el estudio para alcanzar terapias alternativas que puedan controlar la enfermedad que ocasionan.

1. *Trypanosoma evansi*: Relación filogenética y distribución geográfica.

T. evansi fue el primer tripanosoma patógeno de mamíferos en ser descrito en el mundo por Griffith Evans en 1880. En muchos casos los hospedadores son asintomáticos, lo cual impide un mayor control sobre la propagación de la enfermedad. Algunos ejemplos de la gran variedad de hospedadores que posee *T. evansi* son camellos, cerdos, ovejas, cabras, gatos, perros, búfalos de agua y venados (Desquesnes y col., 2013a). En Venezuela, se encuentran principalmente en los caballos, vacas y roedores. El capibara es considerado particularmente un reservorio natural ya que se ha reportado que hasta el 70% de los animales estudiados presentaban anticuerpos contra *T. evansi* (Desquesnes y col., 2013a; Ramírez-Iglesias y col., 2016).

Como consenso general se dice que *T. evansi* derivó de un *Trypanosoma brucei* mutante que perdió totalmente sus maxicírculos dentro del kinetoplasto (Jensen y col., 2008; Lai y col., 2008), por lo tanto, otros autores indican que se debería clasificar como una subespecie de *T. brucei* (Borst, 1987; Lai y col., 2008; Carnes y col., 2015). También se ha postulado que a partir de *T. brucei* surgió un mutante que presentó pérdida parcial de sus minicírculos y que se denominó *Trypanosoma equiperdum*. Luego, surgió *T. evansi* a partir de la pérdida total de los maxicírculos de *T. equiperdum* (Borst, 1987; Brun y col., 1998; Desquesnes y col., 2013a). La polémica continua, pero dejando a *T. brucei*, *T. equiperdum* y *T. evansi* como especies diferentes dentro del género *Trypanosoma* para facilitar los estudios. A continuación, en la figura 1, se presenta un árbol de evolución hipotético del subgénero Trypanozoon.

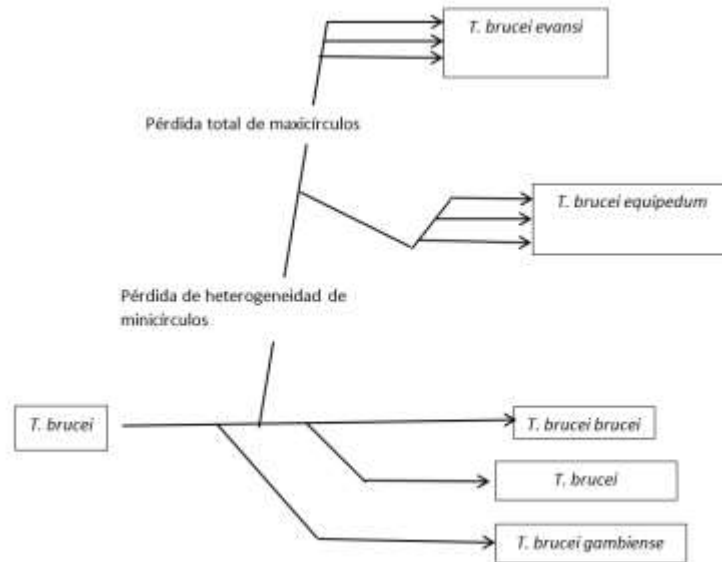


Figura 1. Árbol de evolución hipotético del subgénero Trypanozoon. Tomado y modificado de Desquesnes y col. (2013).

Según Jensen y col. (2008), lo más probable es que *T. brucei* tuvo una mutación en uno de sus maxicirulos impidiéndole desarrollarse dentro de la mosca tsetse. Retenido en la parte anterior del tracto digestivo de la mosca tsetse, la mosca pica otro animal y el mutante se propaga por el torrente sanguíneo del hospedador. Luego, este mutante se transmitió vía otros insectos chupadores de sangre, saliendo de la zona de la mosca tsetse y propagándose por el mundo a través de múltiples hospedadores, donde continuó la pérdida de sus minicirulos y la eliminación completa de los maxicirulos hasta llegar a *T. evansi*.

Gracias a la gran variedad de hospedadores y a la capacidad de transmitirse por vías mecánicas que permite a *T. evansi* ser esparcido por diferentes áreas sin las restricciones asociadas a un vector biológico, sean la causa más probable de su gran distribución geográfica (Desquesnes, 2004; Desquesnes y col., 2013a) (Figura 2).



Figura 2. Distribución geográfica de *Trypanosoma evansi* en el mundo. Tomado de Desquesnes y col. (2013).

2. *Trypanosoma evansi* y su morfología.

T. evansi no posee diferentes estadios morfológicos, solo está presente en un estado tripomastigote en la sangre de los hospedadores. Según Desquesnes (2004), la morfología de *T. evansi* es similar a la de *T. brucei* en su forma tripomastigote dentro del torrente sanguíneo del hospedador. Posee una longitud de $24 \pm 4 \mu\text{m}$ (min $15 \mu\text{m}$, max $33 \mu\text{m}$). Su polimorfismo es muy limitado y la mayoría de los autores lo describen como un parásito monomórfico de forma esbelta. Hoare (1972) observó algunos tripanosomas con formas rechonchas (stumpy) o delgadas (slender), pero concluyó que el polimorfismo en *T. evansi* es una característica inconsistente que aparece esporádicamente. Posee un flagelo libre de 3 a $5 \mu\text{m}$ (no existente en las formas rechonchas) y, una membrana ondulante bien desarrollada que crea “bolsillos de luz” al ser observados en muestras frescas bajo una fase de contraste por el microscopio. Cuando el kinetoplasto está presente, es pequeño ($0.6 \mu\text{m}$) y posicionado en la parte posterior cercana a la base del flagelo. El núcleo se encuentra en el medio del organismo con forma ovalada bien definida. El cuerpo del parásito está cubierto por una envoltura gruesa y resistente conocida como periplasto, que preserva la forma del parásito. El periplasto consiste de tres capas y en su exterior posee glicoproteínas variables de superficie (VSG) que contribuyen a evadir la respuesta

inmune del hospedador (Hoare, 1972). A continuación, en la figura 3, se muestra un esquema de un *Trypanosoma* característico.

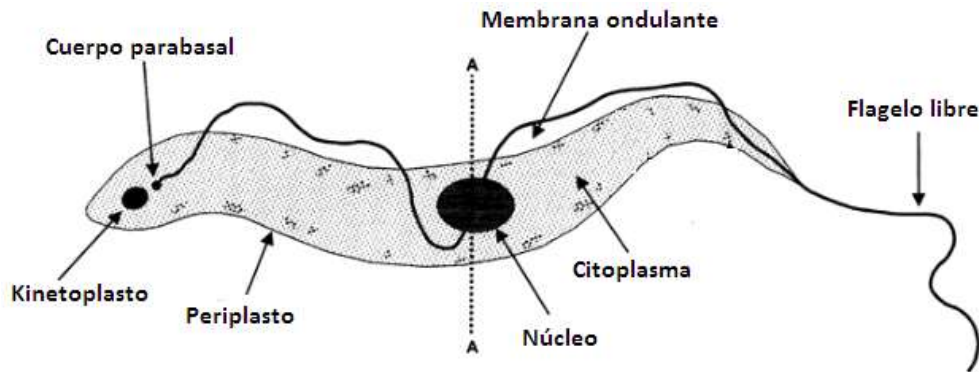


Figura 3. Ilustración de las características principales de un *Trypanosoma*. Tomado y modificado de <http://www.fao.org/docrep/006/x0413e/X0413E02.htm> [Consulta: 18 de noviembre de 2017].

3. *Trypanosoma evansi* y su transmisión.

Cuando el hospedador es infectado con el parásito, los tripomastigotes llegan al torrente sanguíneo en donde comienzan a reproducirse por fisión binaria. De esta manera logran un crecimiento logarítmico que alcanza altas parasitemias en un tiempo variable dependiente del inoculo inicial (Horchner y col., 1983). Según Rottcher y col. (1987), existe una estrecha relación entre parásitos de forma esbelta como *T. evansi* e insectos con probóscide debido a la trasmisión mecánica. Cuando los insectos del genero *Tabanus* y *Stomoxys* (principales vectores asociados) inician su ingesta de sangre en un animal infectado, el animal se puede mover como mecanismo de defensa por la picadura y una porción de la sangre infectada con el parásito queda en la probóscide del insecto (alrededor de 1-12 nL en *Tabanus*, 0.03 nL en *Stomoxys*). El insecto volará a causa del movimiento y se posará en otro animal para continuar su alimentación, propagando el

parásito (Uilenberg, 1998; Desquesnes, 2004; Desquesnes y col., 2013b). Se ha comprobado matemáticamente que la eficacia de la transmisión mecánica es proporcional a la parasitemia. Si esta es mayor a 10^6 tripanosomas/mL, la transmisión mecánica se vuelve significativa (Desquesnes y col., 2008). En camellos y caballos, las parasitemias pueden ser mayores a 10^8 *T. evansi*/mL (Desquesnes y col., 2013b) y en roedores, como el capibara, entre 10^6 - 10^9 *T. evansi* /mL (Herrera y col., 2011).

El vampiro de Latino América, *Desmodus rotundus*, es considerado tanto un reservorio como un vector natural de *T. evansi* (Desquesnes, 2004; Desquesnes y col., 2013a), el cual se infecta por vía oro-digestiva (el parásito entra por la membrana oral y/o gástrica) y, actúa como un verdadero reservorio de parásitos al mantenerlos dentro de la colonia de vampiros en la ausencia de sus principales hospedadores. La transmisión por contaminación oro-digestivo ocurre cuando las mucosas orales son dañadas. Esto sucede cuando perros y felinos infectados pelean o comen carne de cerdos, zorros y capibaras infectados con el parásito (Herrera y col., 2011). También se observó la transmisión placentaria en bovinos a través de abortos donde se confirmó por diagnóstico molecular (PCR), clínico y bioquímico que el feto estaba infectado (Desquesnes y col., 2013b).

4. *Trypanosoma evansi*: Signos Clínicos.

Se pueden distinguir tres etapas en la evolución de la enfermedad. La primera consiste en una etapa de incubación que puede durar de 4 a 9 días, en la cual el parásito invade el torrente sanguíneo produciendo una parasitemias alta y fiebre. La segunda etapa consiste en una crisis crónica seguida de un declive de la parasitemia, donde los tripanosomas son

casi imperceptibles en la sangre. En la fase terminal, la parasitemia aumenta hasta llegar a un estado crónico que resulta fatal en 2-3 meses (Hoare, 1972). Estos picos sucesivos de alta y baja parasitemia son debidos a la repuesta evasiva del parasito a la respuesta inmune del hospedador, mediante la modificación de las glicoproteínas variantes de superficie (VSG) que se encuentran en el periplasto (Donelson y Turner, 1985).

Las tripanosomosis son enfermedades que causan fiebre acompañados de anemia, lagrimación, hipertrofia de los nódulos linfáticos, edemas, pérdida de apetito y peso, desordenes digestivos y/o nerviosos. Aparte de los signos en los genitales que son específicos para *T. equiperdum*, no hay síntomas específicos para las demás tripanosomosis, ya que la intensidad y naturaleza de los síntomas varían acorde a la especie y cepa del parasito, así como de la especie, raza y condición nutricional e inmune del hospedador (Desquesnes, 2004). En Latinoamérica, los caballos son los animales de granja más susceptibles a *T. evansi* seguido del búfalo. En caballos, los síntomas que se presentan son fiebre con estados transitorios de hipertermia, anemia, oftalmia con lagrimación y conjuntivitis, agrandamiento de nódulos linfáticos, pérdida de peso, edemas en la región intermandibular, extremidades y abdomen. Pueden ocurrir síntomas nerviosos, como meningoencefalitis, agresividad y ataques de epilepsias, cuando los parásitos pasan al sistema nervioso central (Desquesnes y col., 2013b). Para búfalos y ganado vacuno, la enfermedad es altamente patogénica y tiene un tiempo de gestación de 7 semanas, donde se ven los mismos síntomas descritos para caballos incluyendo miocarditis, hidropericardio, neumonía, congestión hepática y del bazo, así como agrandamientos de estos últimos (Desquesnes, 2004). En las vacas lecheras se ha

reportado decrecimiento en la producción de leche, abortos y casos de enfermedades nerviosas como ataques epiléptico y meningoencefalitis (Desquesnes y col., 2013a). Por lo tanto, *T. evansi* es de suma importancia veterinaria ya que causa graves pérdidas económicas y de ganado en todo el mundo.

5. Peptidasas en parásitos.

Las peptidasas son un amplio grupo de enzimas que catalizan el rompimiento de enlaces peptídicos y están involucradas en numerosos procesos intra y extracelulares, por lo que no es sorprendente encontrarlas en una gran variedad de seres vivos (Sajid y McKerrow, 2002; McKerrow, 2018). Para combatir las enfermedades causadas por parásitos, han surgido las peptidasas como un blanco potencial para el diseño de agentes basados en inhibidores y sustratos específicos de la enzima. Todo esto se debe a las importantes funciones biológicas que cumplen estas enzimas, entre las que se destacan (Mckerrow y col., 1993; McKerrow, 2018):

- Invasión del hospedador facilitada por la degradación catalítica de tejidos conectivos.
- Utilización de proteínas específicas del hospedador presentes en el medio donde reside el parásito para su metabolismo.
- Evasión o modulación inmune, por degradación o activación de moléculas inmunológicas del hospedador.
- Interferencia con el proceso de coagulación de la sangre del hospedador en los cuales numerosas reacciones son catalizadas por peptidasas.
- Remodelación del parásito durante la transición de un estado morfológico a otro.

- Degradación de proteínas del citoesqueleto del hospedador durante la invasión o ruptura de las células.

Debido a su papel degradativo en la célula, las peptidasas están rigurosamente controladas mediante diversos mecanismos, tales como: la síntesis de precursores inactivos o zimógenos, presencia de inhibidores endógenos (cistatinas en mamíferos) y a través de restringir la enzima a compartimientos subcelulares específicos, como los lisosomas (Twining, 1994).

5.1. Clasificación de las peptidasas.

Existen varios criterios de clasificación de las peptidasas, entre los más comunes se pueden mencionar la reacción catalizada, la naturaleza química del sitio catalítico y las relaciones filogenéticas (Sajid y McKerrow, 2002; McKerrow y col., 2008).

- En base a la reacción catalizada, las peptidasas comprenden dos grupos. Las que actúan sobre enlaces internos de la cadena polipeptídica, conocidas como endopeptidasas y las que actúan a partir de los extremos amino o carboxilo, conocidas como exopeptidasas (Sajid y McKerrow, 2002).

- En base a la naturaleza química del sitio catalítico, las peptidasas han sido divididas de acuerdo al mecanismo catalítico utilizado en el proceso de hidrólisis. Actualmente se dividen en las siguientes clases: Aspartil (A), Cisteín (C), Glutamil (G), Metalo (M), Asparaginil (N), Mixtas (P), Serín (S), Treonín (T), Desconocidas (U) (Rawlings y Barret, 1993; McKerrow y col., 2008). El mecanismo de la serín y cisteín peptidasa es muy similar, diferenciándose en que las primeras tienen como nucleófilo el ion hidroxilo de un residuo de serina y las segundas tienen como nucleófilo el ion sulfhidrilo de un residuo de

cisteína. En el caso particular de las cisteín peptidasa, esta requiere un residuo de cisteína en el sitio activo para la hidrolisis. Gracias a los estudios sobre la papaína, la primer cisteín peptidasa purificada y caracterizada de *Carica papaya*, se dilucidó el mecanismo de acción. En la papaína, el grupo tiol de la Cys-25 actúa como un nucleófilo al ser desprotonado debido a la cercana proximidad con una histidina (His-159) del sitio activo que actúa como base para la ionización del grupo tiol. El grupo sulfhidrilo (-SH) del residuo de cisteína y el grupo imidazol de la histidina forman una diada tiolato-imidazolio, la cual está estabilizada por una asparagina (Asn-175) que mantiene la His-159 en la posición adecuada en los diferentes pasos de la reacción. La Cys-25, His-159 y Asn-175 forman la denominada tríada catalítica del sitio activo. Una glutamina (Gln-19) altamente conservada de la cadena lateral forma un oxianión con la diada tiolato-imidazolio, esencial para formar un centro electrofílico que estabiliza el intermediario tetraédrico que se forma durante la hidrolisis del carbono carbonílico del enlace peptídico del sustrato (Sajid y McKerrow, 2002). El intermediario tetraédrico es transformado en un tioéster con la liberación de la sección C-terminal del sustrato por un proceso conocido como acilación. Luego, el tioéster es hidrolizado por una molécula de agua formando un segundo intermediario tetraédrico, el cual va a desacilación resultando en la enzima regenerada y en la sección N-terminal del sustrato liberado (Figura 4) (Vather, 2010).

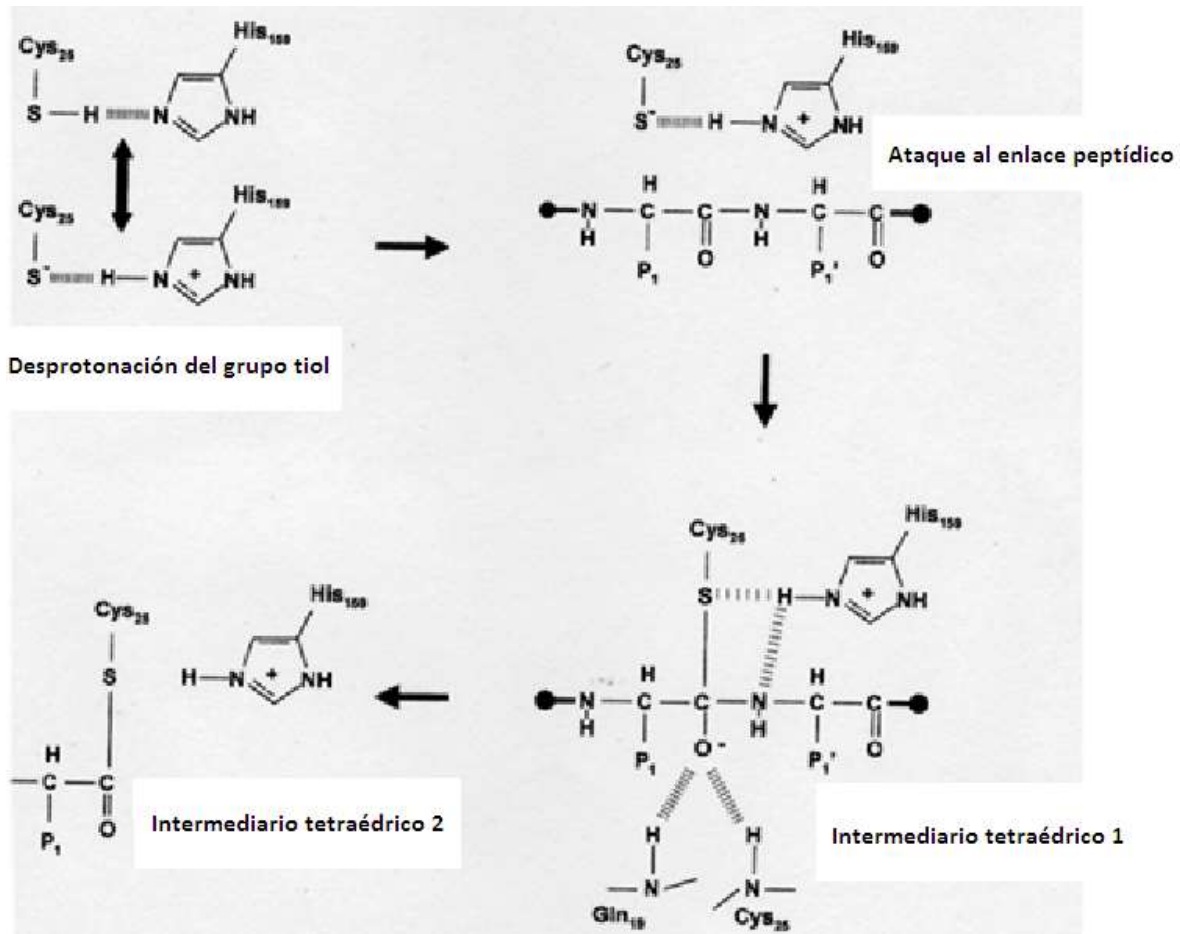


Figura 4. Mecanismo de hidrólisis de los sustratos por la cisteína peptidasa. Tomado y modificado de Vather (2010).

- El tercer criterio de clasificación se basa en la comparación de las secuencias aminoacídicas de las peptidasas, conociendo así sus relaciones estructurales y evolutiva. Esto se debió al incremento en el número de peptidasas caracterizadas y diferencias presentadas entre las mismas. Este nuevo sistema fue publicado en Internet en 1996 y es conocido como la base de datos MEROPS (URL: <http://www.merops.co.uk>). Los inhibidores de las peptidasas también se incluyen en esta base de datos. La clasificación de MEROPS se encuentra basada en varios niveles. Algunos están descritos a continuación (Rawlings y col., 2014):

a) Clan: Un clan contiene todas las peptidasa actuales que han surgido de un solo origen evolutivo ya que, la similitud de las estructuras tridimensional soporta la evidencia de que muchas familias comparten ancestros comunes con otros. El clan esta armado alrededor de una peptidasa con una estructura muy bien caracterizada. Representan una o más familias que han mostrado evidencia de su relación evolutiva por la similitud de su estructura terciaria, por el orden de los residuos en el sitio catalítico o secuencias motivo en común alrededor de los residuos catalíticos. Una familia es incluida en un clan si un miembro de una familia puede ser relacionado al tipo ejemplo de ese clan. Cada clan está identificado por dos letras. La primera letra representa el tipo catalítico de la familia incluida en el clan, mientras que la segunda letra corresponde a una numeración alfabética (A-Z) para cada clan de peptidasas

b) Familia: Una familia es un grupo de enzimas proteolíticas homologas. La homología es mostrada como la similitud en la secuencia aminoacídica con respecto al miembro fundador o a una proteína que ha sido demostrado previamente homologa al miembro fundador y, por lo tanto, miembro de esta familia. Cada familia es identificada por una letra que representa el mecanismo catalítico utilizado en el proceso de hidrólisis (Aspartil (A), Cisteín (C), Glutamil (G), Metalo (M), Asparaginil (N), Mixtas (P), Serín (S), Treonín (T), Desconocidas (U)) y se utiliza un número arbitrario único para cada familia. Algunas familias están divididas en subfamilias debido a la evidencia de divergencias muy antiguas dentro de la familia.

Las cisteín peptidasas de parásitos están divididas en dos clanes, CD y CA. En el clan CD (familia C13; tipo leguminosa) las aspariginil endopeptidasas hidrolizan exclusivamente

péptidos y proteínas en el lado carboxilo de un residuo de asparagina. Son denominadas tipo leguminosa debido a que la primera de este tipo que fue identificada y caracterizada proviene de una planta leguminosa, *Canavalia ensiformis*. Los parásitos *S. mansoni* y *F. hepatica* contienen este tipo de peptidasa. Estas peptidasas contienen una cisteína en el sitio activo (Cys-197; numeración de la asparaginil endopeptidasa de *S. mansoni*). Estas peptidasas en su forma inactiva poseen en el sitio activo un residuo de asparagina en lugar de la cisteína (Asn-197 en lugar de Cys-197). En 1879, la primer cisteín peptidasa fue purificada y caracterizada de *Carica papaya*, la fruta de la papaya, por lo que fue nombrada papaína. Fue la primera estructura de una cisteín peptidasa en ser resuelta y desde su descubrimiento, numerosas peptidasas que tienen secuencias en común con ella han sido llamadas “tipo papaína”. Las tipo papaína o peptidasas del clan CA, están divididas en subfamilias. Importantes peptidasas de parásitos están localizadas en la familia C1 (familia papaína) y familia C2 (familia calpaína) (Figura 5). Por convención, las peptidasas son asignadas a familias y clanes dependiendo de un número de características que incluyen similitud en la secuencia, especificidad bioquímica a pequeños sustratos peptídicos. La robusta clasificación recae en homología de secuencias de la triada catalítica (Sajid y McKerrow, 2002).

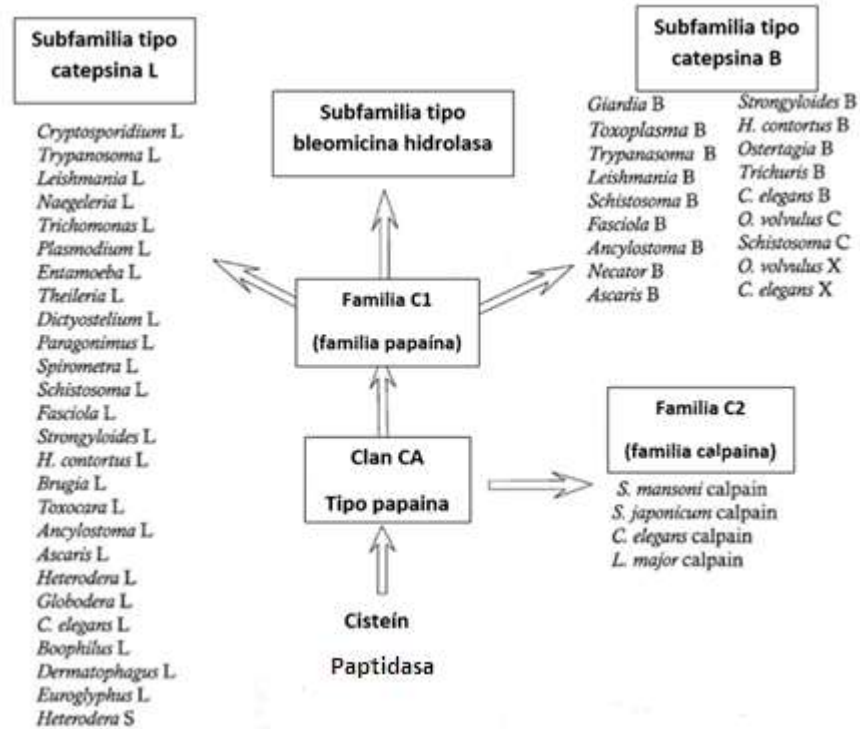


Figura 5. Esquema de la clasificación MEROPS para las cisteín peptidasas de parásitos. Tomado y modificado de Sajid y McKerrow (2002).

5.2. Cisteín peptidasas en parásitos.

En los últimos años se despertó un gran interés en el estudio de las cisteín peptidasas debido a que la mayoría de las enzimas proteolíticas identificadas y caracterizadas, en una gran variedad de parásitos, pertenecen a esta clase (North y col., 1990).

Existen dos grandes subfamilias de cisteín peptidasas: a) Las catepsinas, que son enzimas lisosomales presentes en innumerables tejidos y, b) Las calpaínas, que pertenecen a un grupo especial de peptidasas que requieren calcio para su actividad. Las calpaínas son enzimas lisosomales que también se encuentran muy frecuentemente en el espacio extracelular (North, 1992). Están relacionadas con la regulación de ciertos eventos intracelulares, como por ejemplo, mantener la estabilidad del citoesqueleto mediante la

degradación de proteínas asociadas a los microtúbulos. Las catepsinas por su parte, se dividen en catepsinas L, H, S y B. Están involucradas en eventos relacionados con la degradación de proteínas para suministrar a la célula una fuente de nitrógeno para el metabolismo celular (catepsinas L, H y S), mientras que las catepsinas B utilizan como sustrato la hemoglobina (Twining, 1994). La mayoría de las enzimas identificadas y caracterizadas hasta la fecha en protozoarios, pertenecen a cisteín peptidasas que son homologas a las catepsinas L y B de mamíferos (North, 1992).

De todas las cisteín peptidasas de parásitos, la cruzipáina, proveniente de *Trypanosoma cruzi*, ha sido la mejor caracterizada. Presenta un peso molecular de 60 kDa y se ubica en los lisosomas. Posee una actividad proteolítica con pH óptimo alrededor de 4 y una especificidad de sustrato similar a la catepsina L (North y col., 1990; Machuca, 2002). Se ha determinado que al igual que las catepsinas, se encuentra glicosilada, conteniendo cerca del 10% de carbohidratos ricos en manosa (Cazullo y Franke de Cazzulo, 1990). Se conoce que esta peptidasa posee una larga extensión en su extremo C-terminal, cuya función no está del todo clarificada. Sin embargo, se ha especulado que tiene alguna relación con la autoproteólisis de la enzima como un posible mecanismo de autorregulación de la actividad peptidasa. También se cree que juega un rol en la alteración de la respuesta inmune del hospedador dado que esta región es extremadamente inmunogénico. Formas recombinante de la cisteín peptidasa de *T. cruzi* y *T. brucei* que no tenían la extensión C-terminal eran activas, confirmando que no es vital para la actividad enzimática (Vather, 2010). La cruzipáina está localizada en epimastigote (forma del parásito en el insecto-vector) dentro del sistema endosomal/lisosomal

cumpliendo la función de degradación de los nutrientes endocitados. En amastigote (forma del parásito dentro de la célula del hospedador) está presente en la superficie celular, mientras que en los tripomastigotes se encuentra en el bolsillo flagelar (Monteiro y col., 2001). Debido a semejanzas estructurales en cuanto al sitio catalítico, se ha estudiado con más interés la evansina, las cisteín peptidasas de *T. evansi*.

En general, todas las cisteín peptidasas de protozoarios comparten la misma estructura primaria respecto a la papaína, en la que las regiones de mayor homología corresponden a los alrededores de dos aminoácidos claves del sitio catalítico: Cys-25 y Asn-175 en la papaína. Las cisteín peptidasas tipo catepsina L de *Trypanosoma congolense*, *T. brucei* y *T. cruzi* son sintetizados en forma de un precursor inactivo o zimógeno. Cada enzima tiene una pre-región, pro-región, extensión C-terminal y un dominio catalítico (North, 1992). La pre-región es usualmente hidrofóbica y actúa como péptido de señalización. La pro-región contribuye a varias funciones. Asiste al plegamiento de la enzima ya que esta región actúa como una chaperona intramolecular. También regula la actividad peptidasa ya que actúa como inhibidor endógeno e incluso actúa como una señal que permite a la peptidasa viajar a su localización intracelular (Sajid y McKerrow, 2002). A la extensión C-terminal no se le conoce una función específica, pero no está presente en su homólogo en mamíferos. El dominio catalítico en la papaína presenta seis residuos de cisteína fuertemente conservados, que conforman los tres puentes de disulfuros en la papaína y un corazón hidrofóbico esencial para los aminoácidos del sitio catalítico, formado por la triada Cys-25, His-159 y Asn-175 (North y col., 1990; North, 1992) (Figura 6). El corazón hidrofóbico contiene sitios de interacción con el sustrato, los cuales marcan la pauta de la

especificidad de esta cisteín peptidasa, debido a que posee una geometría específica que permite al sustrato encajar en la hendidura del sitio activo. La geometría específica del sitio activo posee la siguiente nomenclatura: Desde el sitio activo al extremo N-terminal, los sitios de unión son enumerados S1, S2, Sn. Desde el sitio activo al extremo C-terminal, los sitios de unión se enumeran S1', S2', Sn'. El sitio escindible es la unión peptídica hidrolizable por la enzima que se encuentra en el sustrato. Las correspondientes posiciones del sustrato están enumeradas P1, P2, Pn del extremo N-terminal al sitio escindible y P1', P2', Pn' del extremo C-terminal al sitio escindible (Figura 6) (Sajid y McKerrow, 2002; Vather, 2010). Por lo tanto, cada sitio Pn del sustrato interactúa con un subsitio Sn en la enzima. La estructura tridimensional de la catepsina B y L de mamíferos reveló los aminoácidos que contribuyen a la especificidad del sustrato a través del subsitio S2 de la enzima. Se utilizó pequeños péptidos fluorogénicos que varían en el aminoácido del sitio P2. Los péptidos utilizados fueron Z-Phe-Arg-AMC y Z-Arg-Arg-AMC, donde la Z es un grupo bloqueante N-terminal y AMC es un grupo que posterior a la hidrólisis emite fluorescencia. La catepsina B de mamíferos puede hidrolizar ambos sustratos, mientras que la catepsina L solo hidroliza el sustrato Z-Phe-Arg-AMC. Las peptidasas de parásitos no siempre mantienen este orden. La catepsina L de *T. cruzi*, conocida como cruzipaína, puede degradar al sustrato Z-Arg-Arg-AMC correspondiente a una catepsina B. La peptidasa de *L. major*, aunque es de tipo catepsina B por secuencia y estructura, esta peptidasa no puede hidrolizar el sustrato clásico de las catepsinas B (Sajid y McKerrow, 2002). La principal cisteín peptidasa de *T. brucei*, conocida como brucipaína, posee un peso molecular de 28 kDa. Su actividad proteolítica aumenta en presencia de agentes

reductores y tiene un amplio intervalo de pH óptimo (4-9) y, una especificidad de sustrato similar a la catepsina L. Se sabe que es lisosomal, sugiriendo una función catabólica análoga a las catepsinas de mamíferos (McKerrow y col., 1993). La cisteín peptidasa de *T. evansi*, evansaína, posee un peso molecular de 28 kDa y muestra una actividad preferencial por los péptidos Z-Phe-Arg-AMC a pH ácido (como la catepsina L) y, por los péptidos Z-Phe-Arg-AMC y Z-Arg-Arg-AMC a pH neutro (tipo catepsina B) (Bremo, 1997).

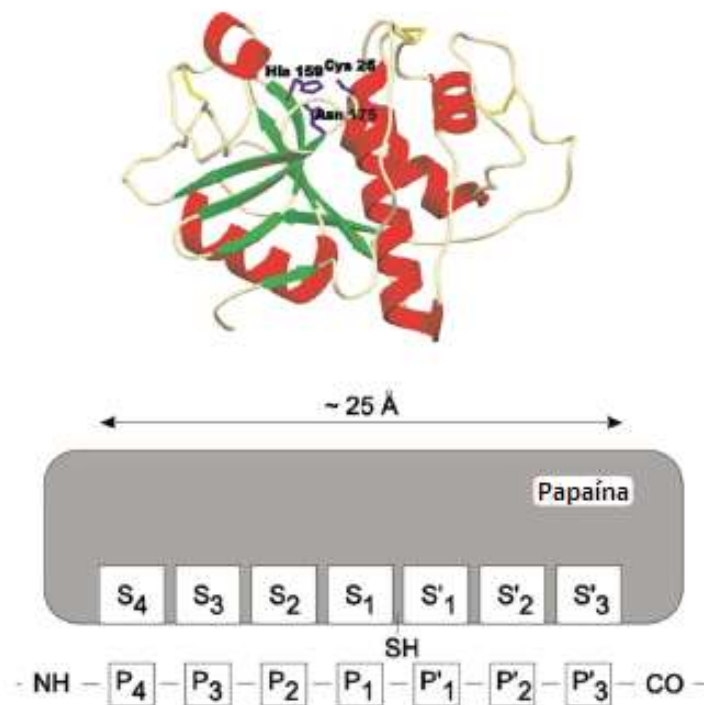


Figura 6. Representación esquemática de los sitios de unión al sustrato de las peptidasas tipo papaína a lo largo de la hendidura del sitio activo. Tomado y modificado de Reyes (2014).

Debido a las similitudes de las enzimas presentes en protozoarios con las de organismos superiores, se han adaptado las técnicas utilizadas inicialmente para el estudio de las enzimas de mamíferos. Sin embargo, muchas de las enzimas de parásitos presentan una mayor actividad después de ser separadas por SDS-PAGE bajo condiciones parcialmente

desnaturalizantes. Esto ha permitido el amplio uso de técnicas electroforéticas como base para la detección y caracterización parcial de estas enzimas, Así, los geles de poliacrilamida copolimerizados con algún sustrato como gelatina, fibrinógeno o albumina de suero bovina, han sido de gran utilidad para la identificación y caracterización primaria de peptidasas presentes en homogenatos de parásitos, pues permite conocer de una manera sencilla el peso molecular aproximado y características enzimáticas tales como pH óptimo y susceptibilidad a inhibidores (Vandooren y col., 2013).

6. Inhibidores de peptidasa.

Los inhibidores de peptidasa son herramientas importantes de la naturaleza para la regulación de la actividad proteolítica de sus peptidasa blanco (Barret, 1987). Actualmente se conocen numerosos inhibidores naturales y sintéticos. Los inhibidores naturales tienen funciones importantes en la regulación postraducciona de la actividad proteolítica, mientras que los inhibidores sintéticos son ampliamente usados como herramientas de clasificación de las peptidasas según la naturaleza química de su sitio activo (McKerrow y col., 1993). En la tabla 1 se muestra algunos de los inhibidores de cisteín peptidasas (ICP) más comúnmente usados (North y col., 1992).

Tabla 1. Inhibidores de cisteín peptidasa. Tomado y modificado de North y col. (1992).

Nombre	Concentración** (μ M)	Reversible	Mecanismo y especificidad
Iodoacetato (IAA)	10-100	No	Alquila grupos $-SH$ de cisteína localizados en sitios activos. No específico para peptidasas.
Leupeptina	10-100	Si	Se enlaza al sitio activo. También inhibe serín y treonin peptidasas.
E-64	1-10	No	Epóxido peptídico que alquila el sitio activo de cisteín peptidasa. Altamente específico.
Cistatinas	0.1-1	Si	Superfamilia de proteínas inhibitorias. Se enlaza firmemente alrededor del sitio activo. Altamente específico.
Peptidildiazometanos	1-10	No	Alquila grupos $-SH$ de cisteína localizados en el sitio activo. Generalmente específico para cisteín peptidasa.
Peptidilfluorometanos	1-10	No	Alquila grupos $-SH$ de cisteína localizados en el sitio activo. Muchos son inhibidores de serín peptidasa. Algunos específicos a cisteín peptidasas.

**Intervalo de concentración recomendado para la inhibición de enzimas en lisados de parásitos.

6.1. La superfamilia de las cistatinas: Inhibidores de cisteín peptidasa.

Desde hace mucho tiempo se ha pensado que el control de las cisteín peptidasa estaba mediado principalmente por inactivación vía pH. Sin embargo, se ha evidenciado que la actividad de estas peptidasas está regulado por proteínas endógenas inhibitoras llamadas cistatinas (Turke y Bode, 1991). Estos inhibidores podrían proteger la célula de la inapropiada proteólisis endógena o externa y/o involucrada en el mecanismo control

responsable para el rompimiento de proteínas intra y extracelular. Las cistatinas son inhibidores estrictos y reversibles de las cisteín peptidasa tipo papaína. Ellos forman una superfamilia de proteínas homologas subdivididas en tres familias: Las estefinas, las cistatinas y los kininógenos (Barret, 1987; Turke y Bode, 1991).

- La familia de las estefinas: Está representada por moléculas de 100 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 11 kDa, que se encuentra en tejidos y fluidos extracelulares (Twining, 1994). Su estructura carece de puentes de disulfuros y enlaces carbohidratos (Barret, 1987). En general comparten una secuencia homologa con las otras dos familias de la cistatina alrededor del sitio activo y por ser los miembros más sencillo se piensa que representa al arquetipo de la superfamilia (Barret, 1987; Turke y Bode, 1991). Las estefinas son potentes inhibidores de cisteín peptidasa y son estables a pH neutro y alcalino, así como también al calor (Twining, 1994).

- La familia de las cistatinas: Comprende moléculas de 115 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 13 kDa, siendo la principal característica la presencia de dos puentes de disulfuros en el extremo C-terminal. Son inhibidores competitivos y reversibles capaces de formar complejos estables. La inhibición es producida por un efecto estérico que no involucra los residuos del centro activo y a diferencia de los inhibidores sintéticos, como el IAA, no se enlaza covalentemente al sitio activo (Barret, 1987; Twining, 1994).

- La familia de los kininógenos: Comprende los miembros más grandes de la superfamilia. Existen tres tipos de kininógenos, designados como el de alto peso molecular (H-kininógeno) con una masa molecular aproximada de 120 kDa, el de bajo peso

molecular (L- kininógeno) con una masa molecular aproximada de 68 kDa y el T-kininógeno, conseguido en ratas nada más. La actividad inhibitoria de los kininógenos reside en una estructura que consiste en tres bloques repetidos similares al dominio de las cistatina (Turke y Bode, 1991).

6.2. La chagasina: El inhibidor endógeno de cisteín peptidasa de *T. cruzi*.

Uno de los inhibidores mejor caracterizados de las cisteín peptidasa tipo papaína de parásitos es la chagasina, una proteína de 12 kDa de *T. cruzi*. Es un inhibidor endógeno termo-estable reversible y específico de la cruzipaína, que es parte de la superfamilia de las cistatinas (Monteiro y col., 2001). Estudios realizados por Santos y col. (2004) sobre la ultraestructura, mostraron que la chagasina y la cruzipaína se localizan en el complejo de Golgi y reservosomas (organelos tipo lisosomas), donde la chagasina libre fue encontrado en pequeñas vesículas intracelulares. Utilizando epimastigotes de *T. cruzi* transfectados con el gen de la chagasina, los investigadores demostraron una reducción en la diferenciación de los parásitos que sobreexpresaron la chagasina. Haciendo una comparación con los parásitos tipo salvaje, se indicó que tanto la chagasina como la cruzipaína son importantes en el proceso de metaciclologénesis del parásito. También se encontró que en los tripomastigote in vitro que sobreexpresan la chagasina son menos virulentos que su contraparte salvaje. En los tripomastigote salvajes, la relación molar entra la cruzipaína y la chagasina es de 50:1. También se observó, en una cepa poco virulenta, una relación de 5:1 de peptidasa:inhibidor, indicando que la chagasina regula la actividad de la cisteín peptidasa y con ello modula la función proteolítica que es esencial para la diferenciación parasitaria e invasión de las células mamíferas.

Wang y col. (2007) confirmaron que la chagasina es un inhibidor endógeno de la peptidasa de este parásito, así como también de peptidasas homólogas tipo catepsina L. También observaron que es un inhibidor más potente que la cistatina contra 5 peptidasas tipo catepsina L y B. Ellos realizaron la cristalización y analizaron la estructura del complejo chagasina con la falcipaina 2 (FP2), una cisteína peptidasa tipo catepsina L de *Plasmodium falciparum*. La chagasina adopta una estructura con láminas beta que generan una forma de "sándwich" tipo inmunoglobulina (Ig) (Figura 7, A) (da Silva y col., 2007; Wan y col., 2007). Los dominios de la mayoría de las estructuras tipo Ig β -sándwich se describen como región-constante y región-variable. Las regiones hipervariables que conectan las láminas β son las regiones que determinan complementariedad (CDRs) que contribuyen a la versatilidad de plegamientos tipo Ig de numerosas interacciones proteína-proteína (García y col., 1998). En la chagasina, el equivalente a las CDRs son los lazos de unión BC, DE y FG (Figura 7, A y B). Estos lazos corresponden con tres motivos altamente conservados que se ven en la familia de inhibidores I42 (Rigden y col., 2002; da Silva y col., 2007), lo que indica que los mecanismos de inhibición descritos para la chagasina pueden ser aplicados para el resto de la familia de inhibidores (Smith y col., 2006).

chagasina y el lazo CDRs de CD8 α al complejo mayor de histocompatibilidad, muestra que cuatro de los siete aminoácidos conservados juegan roles similares en la interacción proteína-proteína, por lo tanto, el lazo BC es responsable parcial de la actividad del inhibidor contra su peptidasa (Salmon y col., 2006; da Silva y col., 2007). Alineamiento de secuencias sugiere que otros inhibidores tipo chagasina también adoptan un plegamiento similar tipo Ig. Esto se confirmó con la resolución de la estructura del ICP de *L. mexicana* (Smith y col., 2006).

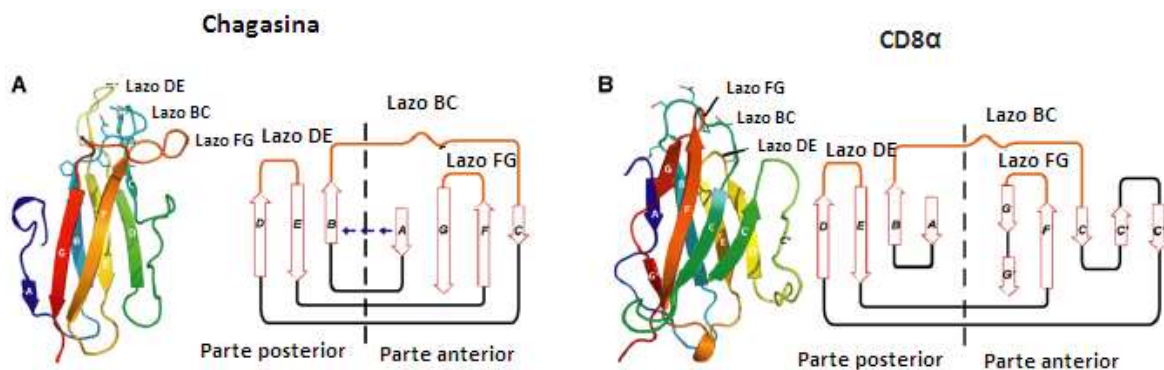


Figura 8. Comparación de la chagasina con la proteína CD8 α . (A) y (B) Esquema del arreglo topológico de la chagasina y CD8 α , respectivamente. Ambas moléculas están orientadas para mostrar sus lazos conservados. Tomado y modificado de Wang y col. (2007).

Los análisis de rayos X mostraron que la interacción de la chagasina con la peptidasa diana viene dada por los tres lazos de unión (BC, DE, y FG) en una interacción tipo cuña importante para la unión y completa inhibición de la peptidasa (Figura 9, A), donde el lazo BC interactúa directamente con la triada catalítica de la peptidasa diana (Figura 9, B), obstruyendo la unión del sustrato por interferencia estérica al ser la hendidura del sitio activo ocupada en su totalidad por el inhibidor (Salmon y col., 2006; da Silva y col., 2007; Wang y col., 2007). Esta unión es reminiscente a la de la cistatina. La chagasina también

inhibe a la papaína (Redzynia y col., 2009) a través de este efectivo modo de inhibición tripartita, así como a las demás cisteín peptidasa tipo papaína como la cruzipaína, FP2, FP3 y las catepsinas B, H, K y L de humano, lo que indica que podría existir un ancestro común (Wang y col., 2007). Los estudios de cinética de inhibición para la chagasina han demostrado que la constante de disociación en equilibrio del complejo chagasina-cruzipaína (K_i) está en el rango de picomolar a nanomolar. Específicamente, el K_i para la FP2 es de 1,7 nM (Wang y col., 2007; Redzynia y col., 2009), mientras que el K_i para la cruzipaína, papaína y catepsina L están en el orden de picomolar con valores de 15, 28 y 37 pM, respectivamente (Monteiro y col., 2001; Wang y col., 2007; Redzynia y col., 2009). Esto demuestra la alta especificidad del inhibidor y la alta sensibilidad de la peptidasa diana al primero. De forma paralela, se ha demostrado que en comparación, la chagasina es un inhibidor más potente (un K_i menor) respecto a la cistatina, debido a que el K_i de este último para las peptidasas diana está en el rango nanomolar, con un K_i para la catepsina L de 11,5 nM (Redzynia y col., 2009).

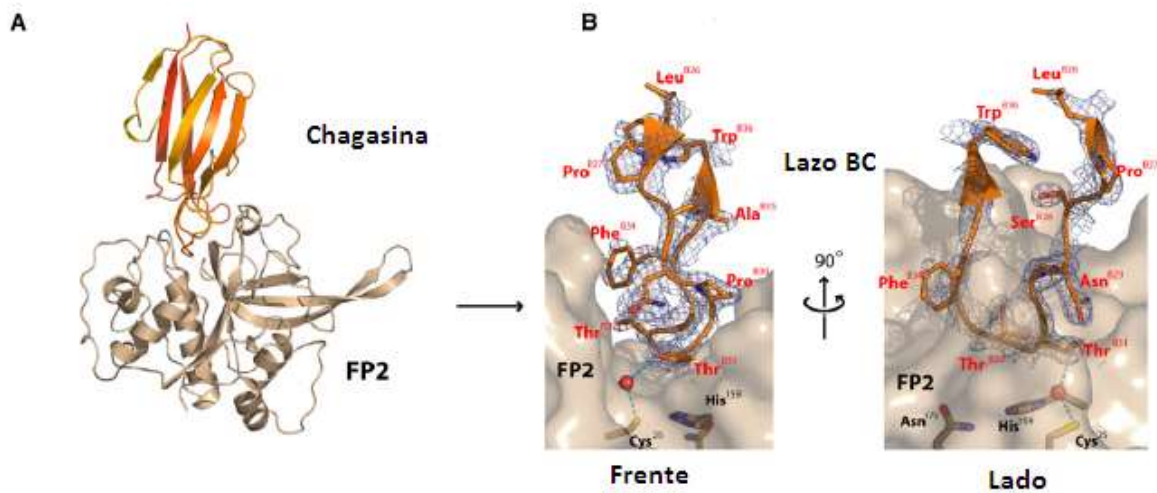


Figura 9. Unión claves en la interacción de la chagasina con peptidasa diana. (A) Estructura del complejo formado por la chagasina y falcipaina 2 (FP2). (B) Interacción del lazo BC con la triada catalítica de la peptidasa diana. Tomado y modificado de Wang y col. (2007).

Estos lazos con sus respectivos motivos, al ser tan importantes en la chagasina para su actividad inhibitoria, así como para el ICP de *T. vivax* (Reyes, 2014) y el ICP de *L. major* y *T. brucei* (Figura 9, B), son nombrados como L2, L4 y L6 en el resto de la literatura, para su mejor referencia (Salmon y col., 2006; da Silva y col., 2007; Wang y col., 2007; Redzynia y col., 2009; Costa y Lima, 2016). Esta nomenclatura será adoptada también en este trabajo. El lazo L2 contiene el motivo NPTTG. El lazo L4 contiene una región conservada comprendida por dos residuos hidrofóbicos seguidos por la secuencia GXGG. El lazo L6 contiene el motivo RPW/F.

II. ANTECEDENTES

La principal cisteín peptidasa de *T. evansi*, denominada evansaína, es una enzima extraída a partir de homogenato de parásitos purificados. Esta peptidasa posee una masa molecular de 28 kDa, en su forma madura (Pérez, 2008). Se evidenció la presencia del inhibidor endógeno de la evansaína, de manera similar al descrito por Monteiro y col. (2001) para la chagasina. El inhibidor de la evansaína, con una masa molecular de aproximadamente 14 kDa y termoestable, presenta una alta afinidad por su enzima diana (Pérez, 2008).

Los procesos de purificación de la proteína a través de una cromatografía de afinidad, utilizando como sustrato la papaína, no fueron exitosos debido a la aparición de contaminantes de mayor peso molecular en las fracciones extraídas de la columna. Se evaluó, por ensayos de zimografía, el efecto del inhibidor parcialmente purificado por cromatografía de afinidad sobre la evansaína nativa purificada. La evansaína nativa purificada fue incubada a 37°C por 30 minutos en presencia del inhibidor parcialmente purificado. Para la evansaína sola se observó una banda transparente, que corresponde a la degradación del sustrato (gelatina) por la actividad proteolítica de la peptidasa, con un peso molecular aparente de 28 kDa, correspondiente a lo reportado previamente por Turcios (1996), Bremo (1997), Fernández (1999) y Machuca (2002). Para la evansaína preincubada con el inhibidor parcialmente purificado, se observó una banda alrededor de los 28 kDa, correspondiente al ensayo control con la evansaína sola y, dos bandas adicionales de mayor tamaño al de la evansaína, con pesos moleculares aparentes de 33 y 35 kDa donde hubo degradación de la gelatina. Estas proteínas podrían ser precursores de

la enzima madura purificada, ya que esta es sintetizada como un zimógeno. La presencia de precursores en la muestra tratada, sugiere que este inhibidor endógeno podría cumplir un papel regulador de la actividad autocatalítica del zimógeno de la evansina en su activación (Pérez, 2008), como lo es la chagasina para la cruzipaina de *T. cruzi* (Monteiro y col., 2001).

Al existir problemas para la purificación del inhibidor por cromatografía de afinidad, se concluyó que este proceso no generó los resultados deseados, por lo que se propuso clonar y expresar este polipéptido en su forma recombinante con la finalidad de obtener la proteína sin necesidad de utilizar infecciones experimentales. Para ello se realizó la amplificación del gen que codifica para el inhibidor de cisteín peptidasa de *Trypanosoma evansi* (ICPte) con los cebadores F1 y R1 a través de una PCR, que dio como resultado un fragmento de 340 pb. Este fragmento fue secuenciado y alineado con otras secuencias ICP conocidas (ICP de *T. brucei*, *T. cruzi*, *L. major*, *L. mexicana* y *E. histolytica*), donde se observó una identidad del 100% con el ICP de *T. brucei* y fragmentos altamente conservados con respecto a las demás secuencias ICP analizadas. Estos fragmentos conservados corresponden en la secuencia aminoacídica a los motivos de los lazos L2, L4 y L6, lazos altamente importante para la interacción inhibidor-enzima diana. El alineamiento múltiple también arrojó como resultado la necesidad de reamplificar el fragmento ICPte con un nuevo par de cebadores y clonarlo en un vector adecuado. Esto a fin de obtener los primeros 40 nucleótidos del extremo 5' y eliminar los últimos 20 nucleótidos del extremo 3' para coincidir completamente con el marco abierto de lectura del gen ICP de *T. brucei*. Reyes (2014) logro realizar la clonación, expresión y purificación del inhibidor de

cisteín peptidasa de *Trypanosoma vivax* (ICPtv), aislado LIEM-176, utilizando células *E. coli* TOP10 para la clonación del gen y, células *E. coli* BL21 para la expresión de dicha proteína recombinante. Sanderson y col. (2003) clonaron y expresaron los ICP de *Leishmania mexicana*, *Leishmania major* y *Pseudomonas aeruginosa*, con inducción de la expresión de estos ICP recombinantes con IPTG a 37°C por un tiempo de 4 horas. La producción y cristalización de la chagasina realizada por da Silva y col. (2007) incluyó un precultivo de *E. coli* a 37 °C e inducción de la proteína recombinante en 1 litro de medio de cultivo LB-kanamicina con IPTG a 16°C durante toda la noche. Monteiro y col. (2001), Salmon y col. (2006), Dos Reis y col. (2008) y Redzynia y col. (2009) lograron clonar la chagasina, con actividad inhibitoria contra la peptidasa diana, en células *E. coli* BL21 con diferentes tipos de vectores. Por consiguiente, la utilización de un sistema heterólogo, como el de *E. coli*, para la producción de un ICP funcional es totalmente valido.

III. OBJETIVOS

1. Objetivo general.

Clonar y expresar el gen que codifica para el inhibidor de cisteín peptidasa (ICP) de *Trypanosoma evansi*.

2. Objetivos específicos.

2.1. Obtención de ADN genómico a partir de parásitos *Trypanosoma evansi*, aislado TeAp-ElFrío01, purificados.

2.2. Clonación del producto amplificado del gen que codifica para el inhibidor de cisteín peptidasa de *Trypanosoma evansi* en el vector de clonación-expresión pET101/D-TOPO® en células *E. coli* TOP10.

2.3. Expresión y purificación por cromatografía de afinidad de la proteína recombinante en células *E. coli* BL21.

IV. METODOLOGÍA

Las cepas bacterianas y los vectores de clonación utilizados están descritos, a continuación, en las tablas 2 y 3, respectivamente.

Tabla 2. Genotipo de bacterias.

Designación	Genotipo	Referencia
<i>E. coli</i> TOP10.	F- <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Phi80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ <i>recA1</i> <i>araD139</i> $\Delta(ara-leu)7697$ <i>galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21 STAR™ (DE3)	F- <i>ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm rne131</i> (DE3)	Invitrogen

Tabla 3. Vectores de clonación.

Designación	Descripción	Tamaño	Referencia
pET101/D-TOPO®	Vector utilizado en la clonación y expresión del producto de PCR.	5753 bp	Invitrogen
pET101/D/lacZ	Vector que contiene el gen <i>lacZ</i> y resistencia a ampicilina. Utilizado como control positivo de transformación.	8825 bp	Invitrogen

1. Purificación de *Trypanosoma evansi*.

El criopreservado del aislado TeAp-ElFrío01, de *T. evansi*, fue obtenido inicialmente de un capibara (chigüire) infectado de manera natural en la Hacienda El Frío, Estado Apure (Perrone y col., 2009). Este fue propagado en el bioterio de la Universidad Simón Bolívar mediante inoculación intraperitoneal a ratas albinas Sprague-Dawley. Se extrajo la sangre mediante punción cardíaca y los tripanosomas fueron purificados a través de una cromatografía de intercambio iónico DEAE-celulosa (Sigma) según el método descrito a continuación. Todos los pasos fueron realizados a 4°C. Se centrifugó la sangre extraída de las ratas a 3.000g por 15 minutos y el plasma obtenido de esta forma se descartó. La capa de células que sedimenta por encima de los eritrocitos, la cual está constituida por tripanosomas y leucocitos, se recolecta y diluyó en buffer fosfato salino glucosado (PBSG:

60 mM $\text{Na}_2\text{PO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 8; 150 mM NaCl; glucosa al 1% m/v para mantener vivos los parásitos). Esta suspensión celular se centrifugó tres veces más bajo las condiciones descritas anteriormente. Se colocó la suspensión sobre la superficie de la columna de DEAE-celulosa, con precaución de no producir turbulencias, usando una pipeta Pasteur. Se dejó penetrar dicha suspensión completamente en la resina, añadiendo pequeños volúmenes de PBSG sin dejar secar la columna (Lanham y Godfrey, 1970). Los tripanosomas eluidos se centrifugaron a 3.000g por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en PBSG. El número de tripanosomas fue determinado por hemocitometría en cámara de Neubauer.

2. Extracción de ADN de alto peso molecular de *Trypanosoma evansi*.

El ADN de alto peso molecular fue extraído siguiendo el protocolo modificado descrito por Bowen y col., (2003). Se agregó 500 μL de buffer de lisis celular (Tris-HCl 10mM pH 8, sacarosa 11% m/v, MgCl_2 5mM, Tritón X-100 al 1% v/v) y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó a 2000g por 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Al sedimento formado se le agregó 300 μL de buffer de lisis nuclear (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 10 mM, citrato de sodio 10 mM, SDS al 1% m/v), 500 μL de cloroformo (frío) y 100 μL de NaCl 5,3 M. La mezcla se agitó por inversión hasta que se formó una emulsión que fue centrifugada a 2000g por 5 minutos a temperatura ambiente para separar la fase acuosa de la orgánica. Se tomó la fase acuosa superior y se mezcló con 600 μL de etanol absoluto. Se centrifugó a 2000 g por 10 min y el precipitado (ADN) se resuspendió en 30 μL de buffer TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM).

3. Evaluación del ADN de alto peso molecular extraído.

Se verificó la integridad del ADN doble cadena a través de una corrida electroforética en gel de agarosa al 0.8% m/v y revelado bajo incubación con bromuro de etidio, a una concentración final de 0,5 µg/mL, por un período de 30 minutos. Fue visualizado bajo luz UV mediante Digidoc (Fotodyne). Las muestras positivas para presencia de ADN doble cadena se les realizó una evaluación cuantitativa al medir absorbancia a 260 nm con un lector de placa de ELISA, donde la cantidad de ADN fue determinada usando la relación $1 \text{ DO}_{260} = 50 \text{ ng de ADN doble cadena}/\mu\text{L}$. La pureza fue determinada a través de la relación de la densidad óptica a 260 nm entre la densidad óptica a 280 nm ($\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$). Si esta relación está entre 1,8-2 se considera que la muestra tiene una mezcla de 60% de proteínas, y 40% de ADN (Glasel, 1995), por lo tanto, se considera que la muestra es de ADN de alta calidad (Healey y col., 2004). Por encima de 2 se considera que la muestra está contaminada con ARN o exceso de etanol.

4. Estandarización de la técnica de PCR para la amplificación del gen que codifica para el ICPte.

La secuencia nucleotídica de 366 pb con la que se trabajó se obtuvo de un trabajo previo de Pérez (2008). Posteriormente, a través de un análisis de alineamiento de estas secuencias se diseñaron los cebadores IEFTopo e ICP1.1 utilizando el programa Oligo Explorer V1.1.2 con base en la secuencia de *T. evansi* cepa STIB805 (TritypDB Sequence ID: STIB805_Chr08. Posición de nucleótidos: 1833667 a 1834032), que permitió la amplificación de una secuencia de 360 pb del gen que codifica para el ICPte y su posterior clonación bajo el protocolo del manual "Champion™ pET Directional TOPO® Expression

Kits Invitrogen” para el vector de clonación-expresión pET101/D-TOPO®. El diseño de los cebadores contempla las siguientes características: 1) La adición de la secuencia CACC en el cebador sentido IEFTopo que permitió garantizar la direccionalidad durante la ligación del inserto con el vector. 2) El cebador sentido IEFTopo incluye el codón de iniciación de traducción. 3) El cebador antisentido ICPE1.1 no incluye el codón de terminación de traducción para incluir la etiqueta polihistidina que se encuentra aguas abajo en el vector pET101/D-TOPO®. El codón de terminación utilizado es el que provee el vector de clonación-expresión aguas abajo de la etiqueta polihistidina.

A continuación, en la figura 10, se muestra la secuencia nucleotídica correspondiente al gen del ICP para *Trypanosoma evansi* y los cebadores diseñados a partir del primero.

Cebadores ICP Trypanosoma evansi

IEFTopo: 5'-CACC**ATGTCCCACAACCTAT**-3' (cebador sentido)

ICPE1.1 Reverse: 3'-GGTGGCCTCGACGTGAAT-5' (cebador antisentido)
CCACCGGAGCTGCACTTA

>TevSTIB805.8.6740 ICP *Trypanosoma evansi* strain STIB 805. Fragmento de 360 pb

ATGTCCCACAACCTATTTACTGAGGAAGACAACAACAAGACCATCCGTATGGTCATTGGTGAAACCTTCACG
ATTGAACTTAAGAGCAACCCAACCACCGGCTACACGTGGCTTCGTTTCAGGTCTCGCCGGTACCGAACTCAGC
GATTGCACCTTCGCCATCCAAAGCAAATTTAACAACCGTGCGCCTCATGATAACCACAAGAATCACAGACGC
CTATTGGTTGGTGGCGGTGGCACGATGGTACTCGAAGTGAAAGCCCTTAAACCCGGGAAGCACACGCTTTC
ACTCGCTTACGGACGCCCATGGGTTGGATTCAATGCCGACGCCAAACGTTACAAC**ATTACGTCGAGGCCA**
CCGCATAA

Figura 10. Secuencia del gen que codifica para el ICPte tomado de TritypDB Sequence ID: STIB805_Chr08. En verde y amarillo se resaltan las secuencias de los cebadores sentido IEFTopo y antisentido ICPE1.1 dentro del gen, respectivamente.

La amplificación del fragmento de 360 pb se realizó siguiendo las condiciones de mezcla de reacción y condiciones de programa descritas en las tablas 4 y 5, respectivamente, con

una ADN polimerasa de alta fidelidad (Platinum® *Taq* DNA Polimerasa, Invitrogen), que presenta una menor tasa de error en la amplificación. La temperatura de hibridación predicha para los cebadores en su diseño fue de 57°C, pero esta fue estandarizada a partir de un gradiente de temperatura de 52-60°C.

Tabla 4. Condiciones de la mezcla de reacción para PCR a utilizar para amplificar el gen que codifica para el ICPTe.

Componente	Ci	Cf	Vi 1X (Vf = 12,5 µL)
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	0,75 µL
10X PCR Buffer (no MgCl ₂)	10X	1X	2,5 µL
Mezcla de dNTP's	40 mM	0,8 mM	0,25 µL
IEFTopo	100 µM	10 µM	1 µL
ICPE1.1 Reverse	100 µM	10 µM	1 µL
ADN molde	172,3 ng/µL	50 ng/µL	2 µL
Platinum® <i>Taq</i> DNA Polimerasa	5U/µL	0,05U/µL	0,125 µL
Agua Destilada	-	-	4,875 µL

Tabla 5. Condiciones del programa "ICPTe gradiente" en el termociclador.

Etapa		Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	Desnaturalización inicial	94	1
2	Desnaturalización	94	1
3	Hibridación en gradiente	52-60	1
4	Extensión	72	1
5	Repetir etapa 2-4, 30 veces más (30 ciclos)		
6	Extensión final	72	10
	Extensión final	30	5
7	Finalización	4	---

El gradiente de temperatura establecido para la hibridación en el programa "ICPTe gradiente" estuvo determinado de la siguiente manera en las columnas del bloque del termociclador Bioer XP cycler (Tabla 6).

Tabla 6. Condiciones de temperatura por columna en el bloque del termociclador establecido por el programa "ICPte gradiente".

Columna	Temperatura (°C)	Columna	Temperatura (°C)	Columna	Temperatura (°C)
1	52	5	54,8	9	58,5
2	52,5	6	55,8	10	59,3
3	53	7	56,5	11	59,9
4	53,7	8	57,5	12	60

Las temperaturas evaluadas fueron 52°C; 54,8°C; 56,5°C; 58,5°C y 60°C. La evaluación de la presencia del producto de PCR se realizó bajo la metodología del apartado 3, utilizando un gel de agarosa al 1,5 % m/v. Las reacciones positivas fueron recolectadas en una sola alícuota para los siguientes experimentos. La cuantificación se realizó bajo la metodología del apartado 3.

5. Ligación del producto de PCR en el vector de clonación-expresión pET101/D-TOPO® y transformación de células *E. coli* TOP10.

La ligación del producto de PCR se realizó siguiendo las indicaciones del manual *Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits* y, se utilizó el vector de clonación-expresión pET101/D-TOPO® cuyo mapa físico se presenta en la figura 11. Este vector está diseñado para facilitar la clonación de productos de PCR con extremos como para su expresión regulada en *E. coli*. Las características del vector pET101 son las siguientes:

- Etiqueta peptídica (epítipo V5 y cola de polihistidina) en el extremo C-terminal para detección y purificación de la proteína recombinante.
- Gen de resistencia a la ampicilina como marcador de selección de las transformantes.

- Promotor T7/*lac* para una alta expresión, inducible por IPTG, del gen de interés en *E. coli* (Studier y Moffat, 1986; Studier y col., 1990).
- Gen *lacI* que codifica el represor lac para reducir la transcripción basal del promotor T7/*lac* en el vector y del promotor *lacUV5* en las células *E. coli*.
- Origen de replicación pBR322 para la replicación y mantenimiento del plásmido en el hospedador *E.coli*.

La reacción de ligación se preparó con 4 μL del producto amplificado y 1 μL del vector de clonación-expresión para una relación 2:1 en μg de ADN, con 1 μL de solución salina. Se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y se guardó a -20°C durante toda la noche. Transcurrido ese tiempo se tomó 5 μL de la reacción de ligación y se agregó a un vial con células *E. coli* TOP10 químicamente competentes con CaCl_2 100 mM bajo el protocolo descrito por Maniatis y col. (1989). Se mezcló suavemente y se colocó en hielo por 30 minutos. Luego, la mezcla se le dio un choque de calor a 42°C sin agitación por 30 segundos para culminar la transformación bacteriana por choque térmico. Se añadieron al vial 250 μL de medio SOC y se incubó horizontalmente por 1 hora a 37°C con agitación a 200 rpm. Concluida la transformación se sembró 100-200 μL de las células transformadas a placas con medio LB agar-ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) preincubadas a 37°C por 1 hora. Se realizó un control positivo de la transformación con el vector pET101/D//*lacZ* (Figura 12).

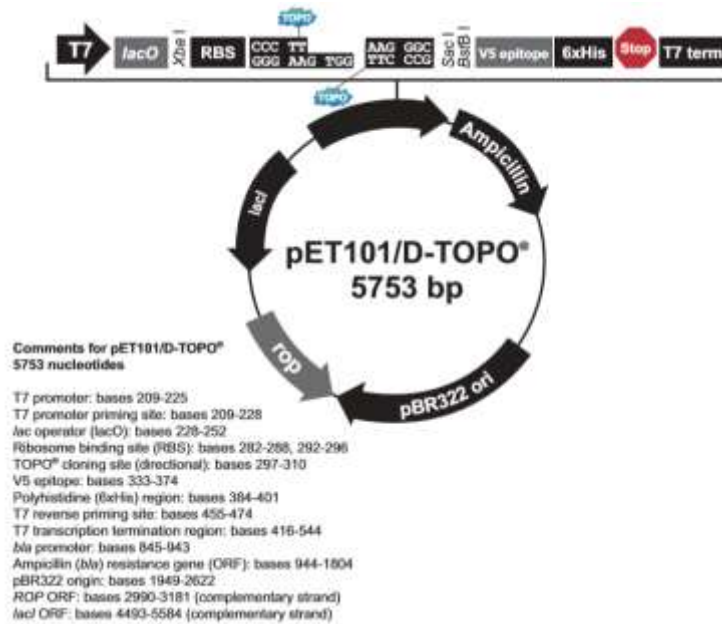


Figura 11. Mapa físico del vector pET 101 señalando la posición donde se insertó el producto de PCR. Tomado del Manual Champion™ pET Directional TOPO Expression Kits, Invitrogen.

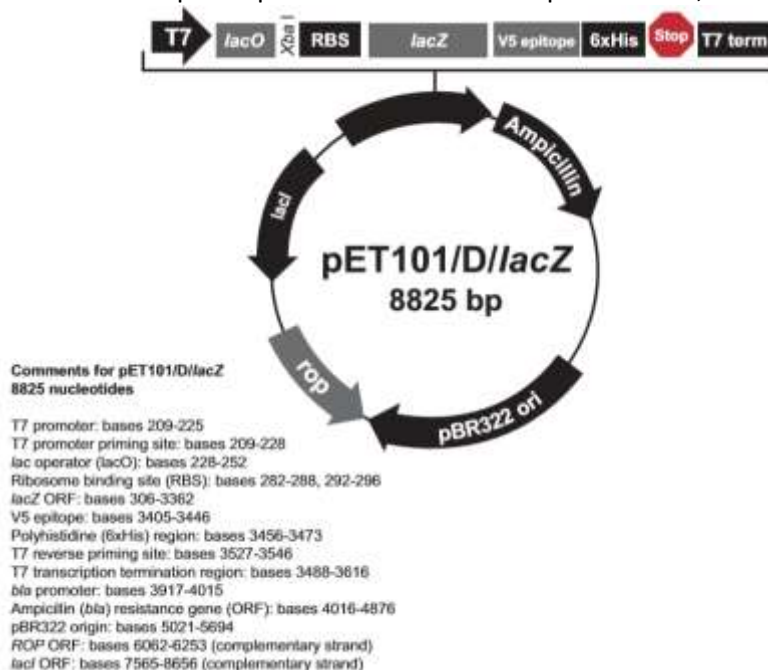


Figura 12. Mapa físico del vector pET 101/D/lacZ señalando la posición donde se insertó el gen *lacZ*. Tomado del Manual Champion™ pET Directional TOPO Expression Kits, Invitrogen.

6. Selección de clones positivos mediante PCR anidada.

La PCR anidada o Nested PCR, es una variante de la PCR convencional que comprende dos rondas de amplificación con distintos pares de cebadores en cada una. Esta técnica se

utiliza cuando la muestra tiene muy pocas copias de la molécula diana con el fin de incrementar la sensibilidad y la especificidad de la detección (Linszen y col., 2000). Primero se realiza una reacción con los cebadores externos para amplificar una región de ADN más extensa que contiene el segmento diana. Después, este producto de amplificación se utiliza como molde de una segunda PCR con los cebadores internos para amplificar la región específica (Figura 13) (Linszen y col., 2000; Sonneveld y col., 2003).



Figura 13. Esquema general del proceso de la técnica PCR anidada. Tomado y modificado de <https://analyticalbiotech.wordpress.com/pcr-anidada/> [Consulta: 17 de marzo de 2019].

Para lograr esto, se explica a continuación los pasos realizados.

6.1. Colony PCR con cebadores universales T7.

Primero, se realizó una Colony PCR que permite detectar de manera rápida el plásmido recombinante directamente de las colonias *E. coli* transformadas. Las células transformadas fueron seleccionadas por su resistencia a la ampicilina conferido por el plásmido como marcador de selección. De las colonias que crecieron en LB agar-ampicilina (100 µg/mL) se tomó muestra con la punta de una micropipeta. La muestra se resuspendió en agua estéril (100 µL) y con aplicación de ciclos de congelamiento-descongelamiento se creó el lisado

celular. Los lisados fueron centrifugados por 10 segundos a 9.200g a temperatura ambiente y se tomó 15 μ L del sobrenadante que se utilizó como ADN molde para la reacción de la *Colony* PCR. La punta de micropipeta, aun con muestra de la colonia, se colocó en un vial con 250 μ L de medio SOC y se incubó toda la noche a 37°C con agitación. Para amplificar la región de ADN más extensa que contiene el fragmento completo del ICPte, la reacción de PCR se realizó con los cebadores universales T7 que flanquea dicho fragmento, cuyas secuencias son:

T7F: 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'

T7R: 5' TAGTTATTGCTCAGCGGTGG 3'

Esto es posible debido a que el vector pET101/D-TOPO® tiene incluido el promotor del bacteriófago T7. La ARN polimerasa T7 reconoce específicamente este promotor en el vector y se une para comenzar la transcripción cuando se induce el proceso de expresión vía IPTG (Studier y Moffat, 1986; Studier y col., 1990). Los productos de la *Colony* PCR predicho a través del programa BioEdit son los siguientes: Para la secuencia del ICPte insertada correctamente en el vector, es de 625 pb. Para el vector sin el inserto es de 265 pb. Este ensayo se realizó con dos controles positivos. Un control positivo con el vector pET101/D/*lacZ* cuyo producto de amplificación predicho es de 3337 pb y, el otro control positivo fue el gen que codifica para ICP de *T. vivax* ligado al vector pET100 obtenido del trabajo de Reyes (2014), cuyo producto de amplificación es de 673 pb. Las condiciones de la mezcla de reacción y de programa utilizadas son las descritas a continuación en la tabla 7 y tabla 8, respectivamente. Para la *Colony* PCR se utilizó la enzima polimerasa GoTaq (GoTaq® DNA polymerase, Promega).

Tabla 7. Condiciones de la mezcla de reacción para la *Colony* PCR.

Componentes	(Vf = 25 μ L)
GoTaq® Green MasterMix (2X)	12,5 μ L
T7F	1 μ L
T7R	1 μ L
Lisado celular (ADNp)	10,5 μ L

Tabla 8. Condiciones del programa "T7" en el termociclador Bioer XP cycler.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1 Desnaturalización inicial	94	10
2 Desnaturalización	94	1
3 Hibridación	58	1
4 Extensión	72	1
5 Repetir etapa 2-4, 25 veces más (25 ciclos)		
6 Extensión final	72	10
7 Finalización	4	---

6.2. PCR anidada con cebadores internos específicos IEFTopo e ICPE1.1.

Luego, se utilizó el producto de PCR amplificado con cebadores universales T7 como ADN molde para la segunda amplificación con los cebadores internos específicos IEFTopo e ICPE1.1. Esto para asegurar la presencia de la secuencia nucleotídica que codifica para el ICPte dentro del fragmento de ADN más extenso. La segunda PCR se realizó bajo las condiciones que fueron estandarizadas previamente en el apartado 4 de la metodología.

7. Extracción de ADN plasmídico de células *E. coli* TOP10 transformadas.

Con base en la selección por Colony PCR y PCR anidada de las colonias recombinantes, se tomó los cultivos realizados en el apartado 6.1 para inocular 5 mL de medio LB-ampicilina (100 μ g/mL) en tubos cónicos para centrifuga Falcon™ de 15 mL, para seleccionar las células con resistencia a la ampicilina. Se dejó crecer durante toda la noche a 37°C con agitación. Con base en el protocolo propuesto por Birnboim y Doly (1979) para la extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina y, en las modificaciones de Ish-Horowicz y

Burke (1981) para la extracción de ADN plasmídico “miniprep”, se tomó 1,5 mL de los cultivos saturados (a una D.O.₆₀₀ aproximada de 1 a 1,5) y se centrifugaron a 16.000g por 1 minuto a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se agregó 100 µL de solución 1 (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 50 mM Glucosa) para resuspender el sedimento hasta que se obtuvo una mezcla homogénea. Se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y se agregó 200 µL de solución 2 (0,2 N NaOH, 10% m/v SDS) mezclando por inversión varias veces y se incubó por 5 minutos en hielo. Se agregó 150 µL de solución 3 (Acetato de potasio 5 M pH 4,8) incubándose en hielo por 3 minutos. Luego, se centrifugó la mezcla a 16000g por 7 minutos y se agregó un volumen equivalente de fenol-cloroformo. Se mezcló por inversión y se centrifugó a 16000g por 2 minutos para luego transferir el sobrenadante a viales nuevos de 1,5 mL. Se añadió 2 volúmenes de etanol absoluto con respecto al sobrenadante recolectado y se mezcló por inversión varias veces para dejarse a 4°C toda la noche. Luego, se centrifugó a 16000g por 10 minutos y se descartó el sobrenadante invirtiendo el vial para secar el precipitado de ADN plasmídico por 1-2 horas. Se añadió 200 µL de etanol al 70% v/v frío y se centrifugó a 16000 g por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado para luego ser resuspendido en 50 µL de buffer TE estéril (Tris HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM). Las muestras fueron incubadas con 1µL de ARNasa (20 µg/mL) a 37°C por 2 horas. Con base a lo descrito en el apartado 3, se confirmó la integridad del ADN plasmídico doble cadena a través de una electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % m/v, así como la cuantificación y pureza del material extraído.

8. Ensayo de restricción.

Para confirmar de manera complementaria que la secuencia que codifica para ICpte está dentro del vector pET101/D-TOPO[®], se realizó un ensayo de restricción. Primero se realizó un ensayo de restricción *in silico* con el programa online NEBcutter V2.0 (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) donde se buscó enzimas cortaran una sola vez a la secuencia que codifica para ICpte. De esto se obtuvo que las enzimas Aval, HaeIII y SmaI, disponibles en el laboratorio, cumplieran con el requisito (Figura 14). Luego, se verificó en la página https://tools.thermofisher.com/content/sfs/vectors/pet101dtopo_rest.pdf cuál de estas enzima no corta al vector pET101/D-TOPO[®] con el fin de linealizar el plásmido solo, y solo si, el plásmido tiene la secuencia que codifica para ICpte dentro. La enzima de restricción SmaI (proveniente del organismo *Serratia marcescens*) cumplía los requisitos.

IEFTopo: 5'-CACCA**ATGTC**CCACAACCTAT-3' (cebador sentido)

ICPE1.1 Reverse: 3'-GGTGGCCTCGACGTGAAT-5' (cebador antisentido)

CCACCGGAGCTGCACTTA

ATGTCCCACAACCTATTTACTGAGGAAGACAACAACAAGACCATCCGTATGGTCATTGGTGAAACCTTCAGG
ATTGAACTTAAGAGCAACCCAACACCGGCTACACGTGGCTTCGTTTCAGGTCTCGCCGGTACCGAACTCAGC
GATTGCACCTTCGCCATCCAAAGCAAATTTAACAACCGTGCGCCTCATGATAACCACAAGAATCACAGACGC
CTATTGGTTGGTGCGGGTGGCACGATGGTACTCGAAGTGAAAGCCCTTAAAC**CCCGG**GAAGCACACGCTTTC
ACTCGCTTACGGACGCCCATGGGTTGATTCAATGCCGACGCCAAACGTTACAAC**ATTCACGTCGAGGCCA**
CC

Enzimas de restricción de un corte:

AvaI	C [↓] YCGR _A G	268/272
HaeIII	GG [↓] CC	355
SmaI	CCC [↓] GGG	270

Figura 14. Ensayo de restricción *in silico* para la secuencia del gen que codifica para el ICpte tomado de TritypDB Sequence ID: STIB805_Chr08 con el programa online NEBcutter V2.0. En verde y amarillo se resaltan las secuencias de los cebadores sentido IEFTopo y antisentido ICPE1.1

dentro del gen, respectivamente. En color fucsia y gris se resaltan las secuencias dianas de las enzimas de restricción Aval y SmaI y, HaeIII dentro del gen, respectivamente.

El ensayo de restricción se realizó en un volumen final de 20 μL de la siguiente manera: 15 μL de agua destilada, 2 μL de buffer Tango 10X (330 mM Tris-acetato pH 7.9, 100 mM Acetato de magnesio, 660 mM Acetato de potasio), 1 μL de ADN plasmídico (0,5-1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 1 μL de BSA (2 mg/mL) y 1 μL de SmaI (10 U/ μL). Se mezcló gentilmente y se incubó por 2 horas y media a 30°C. Para detener la reacción se incubó a 60°C por 20 minutos. El ensayo fue observado a través de una electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % m/v.

9. Transformación de células *E. coli* BL21 y expresión a mini escala mediante inducción con IPTG.

Con base en lo descrito en el apartado 7, se realizó la transformación de las células *E. coli* BL21 con los plásmidos positivo por ensayo de restricción. Las células fueron transformadas por choque térmico con 50 ng de ADN plasmídico contenidos en un volumen de 5 μL (10 ng/ μL). Al vial se le añadió 250 μL de medio SOC y se incubó por 1 hora a 37°C, con agitación a 200 r.p.m. Transcurrido este tiempo, todo el contenido de la transformación se utilizó para inocular 10 mL de medio LB-ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en tubos cónicos para centrífuga Falcon™ de 50 mL y se incubó durante toda la noche a 37°C, con agitación. Luego, se realizó la expresión piloto a mini escala de las células *E. coli* BL21 transformadas con la finalidad de saber si la proteína recombinante se expresó. Para ello se siguió el siguiente protocolo: A partir de 500 μL de los cultivos del apartado 10, se inoculó 20 mL de LB-ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se dejó crecer hasta obtener una D.O.₆₀₀ entre 0,5-0,8. Se dividió el cultivo en 2 partes iguales: A una parte se le realizó la inducción

con IPTG (isopropil- β D-1-tiogalactopiranosido) a una concentración final de 1 mM y la otra parte se utilizó como control negativo de la inducción al no agregarle el IPTG. A cada hora se tomaron alícuotas de 1,5 mL de los dos cultivos partiendo del tiempo cero hasta la hora 5 de inducción. Se centrifugó cada alícuota a 16.200g por 20 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se guardaron todos los sedimentos a -20°C hasta su análisis.

10. Análisis de muestras a través de electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE).

Se resuspendió los sedimentos correspondientes a las muestras del apartado 9 con 500 μ L de buffer de lisis (50 mM K_2HPO_4 pH 7,8; 400 mM NaCl; 100 mM KCl; 10% v/v glicerol; 0,5% v/v Tritón X-100; Imidazol 10 mM). Luego, se realizó 3 ciclos de congelamiento-descongelamiento y ciclos de 10 segundos de golpes a máxima potencia/30 segundos de enfriamiento con el sonicador para lisar completamente las células. Se centrifugaron las muestras a 16.200g por 40 minutos a 4°C para separar las proteínas insolubles, en el sedimento, de las proteínas solubles en el sobrenadante. Con base en el protocolo descrito por Laemmli (1970), las muestras fueron analizadas a través de electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones disociantes y reductoras en presencia de SDS y β -mercaptoetanol. Los sobrenadantes fueron transferidos a tubos de centrifuga nuevos y se mezcló con buffer muestra SDS-PAGE 4X (Tris- HCl 125 mM, pH 6,8; glicerol (20% v/v); β -mercaptoetanol (3.92% v/v); azul de bromofenol 3mM y SDS 138 mM) para una concentración final de 1X. Para las fracciones insolubles se les agregó 500 μ L de buffer muestra SDS-PAGE 1X. Todas las muestras se hirvieron por 5 minutos. Las muestras fueron analizadas en geles de poliacrilamida 12% m/v (12% m/v de poliacrilamida en 1,5 M Tris-

HCl pH 8,8; 0,4% m/v SDS; 0,1% m/v persulfato de amonio y 0,1% v/v TEMED). La electroforesis fue corrida a 90 voltios para el gel de apilamiento (4% m/v de poliacrilamida en 1 M de Tris-HCl pH 6,8; 0,1% m/v SDS, 0,1% m/v de persulfato de amonio y 0,1% v/v de TEMED) y, como máximo 120 voltios para el gel de resolución. Una vez finalizada la corrida, los geles fueron teñidos con solución azul Coomassie (azul Coomassie R-250 al 0,3% m/v en isopropanol: ácido acético: agua destilada en proporción 25: 10: 65) toda la noche con agitación. Los geles fueron decolorados en la misma solución sin el colorante. Se predice una proteína con un masa molecular relativa de 16,8 kDa.

11. Análisis de muestras a través Western blot.

A los geles de poliacrilamida del apartado 10 se les realizó una electrotransferencia semiseca a una membrana de nitrocelulosa con buffer de transferencia Schaefer-Nielsen (Tris base 48 mM pH 9,2; Glicina 39 mM; SDS 0,037% m/v; Metanol 20% v/v) en una cámara modelo Trans-Blot® SD (BioRad) a 400 mA por 1 hora y 10 minutos. Esto con el fin de realizar la inmunodetección del ICPte recombinante con un anticuerpo monoclonal anti-polihistidina (Amersham Bioscience). Para confirmar una transferencia exitosa se tiñó la membrana con el colorante reversible rojo Ponceau (0,2% m/v rojo Ponceau; 3% v/v ácido tricloroacético; 3% v/v ácido sulfosalicílico) por 5 minutos en agitación. Luego, el colorante fue eliminado por varios lavados con solución de lavado (20 mM $\text{Na}_2\text{PO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7,5; Tween 20 al 0,05 % v/v; 150 mM NaCl) en agitación. La membrana fue bloqueada durante 1 hora a temperatura ambiente en solución de bloqueo (leche descremada al 5% m/v en solución de lavado) con agitación. Se removió la solución de bloqueo con 3 lavados de 5 minutos c/u en agitación, con solución de lavado. Luego, la

membrana se incubó con el anticuerpo específico monoclonal de ratón anti-polihistidina (Amersham Bioscience), con título de 1/2000 en 10 mL de solución de lavado. A continuación, se lavó la membrana con solución de lavado 3 veces por 5 minutos c/u en agitación y, se incubó por 1 hora con el anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch), con título de 1/1000 en 10 mL de solución de lavado. Se lavó la membrana con solución de lavado 3 veces por 5 minutos c/u en agitación y la detección fue realizada con 6 mg de diaminobenzidina y 10 μ L de H₂O₂ al 30% v/v contenido en 10 mL de buffer Tris-HCl 50mM pH 7,2. Se dejó incubar hasta la aparición de bandas nítidas de color marrón y se detuvo la reacción con solución de lavado.

Del trabajo de Reyes (2014) se obtuvo sueros hiperinmunes con anticuerpos policlonales mono-específicos de conejo contra el ICP de *T. vivax* a partir del ICPTv recombinante purificado. También se observó una reactividad cruzada con infecciones experimentales de equino con *Trypanosoma evansi* debido a la alta homología que existe en sus secuencia aminoacídicas, por lo tanto, se utilizó el suero como anticuerpo primario policlonal mono-específico de conejo anti-ICP de *T. vivax*, para la detección de la proteína recombinante ICPTe. El protocolo utilizado es el mismo descrito anteriormente, donde el anticuerpo anti-ICP de *T. vivax* se preparó con un título de 1/700 en 10 mL de solución de lavado. El anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch) se preparó con un título de 1/1000 en 10 mL de solución de lavado.

12. Expresión a mayor escala y purificación de la proteína recombinante por columna de afinidad Níquel-agarosa.

El cultivo a mayor escala de las células *E. coli* BL21 transformadas fue realizado en 1 L de medio LB-ampicilina (100 µg/mL) con la finalidad de garantizar una mayor cantidad de la proteína de interés. Una vez el cultivo alcanzo una D. O.₆₀₀ de 0,9, se realizó la inducción con IPTG como se indicó en el apartado 9, con el tiempo de inducción que fue estandarizado en el apartado 10. Las células fueron recolectadas centrifugando a 3.200g por 10 minutos a 4°C. Con base en lo descrito en el apartado 9 se separó la fracción soluble de la insoluble centrifugando esta vez a 39.000g por 45 minutos a 4°C. Se procedió a la purificación de la proteína recombinante siguiendo el protocolo modificado del manual de purificación “Ni-NTA Purification System” (novex®) descrito a continuación.

A partir de 3 mL de resina de purificación HisLink™ (Promega), se equilibró con 20 mL de solución de enlazamiento (Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 500 mM, Imidazol 5mM) por “Batch”. El pH de la fracción soluble fue ajustado con la solución de enlazamiento hasta alcanzar pH 8. La resina y el sobrenadante fueron trasvasados a un tubo cónico para centrífuga Falcon™ de 50 mL para unir el material de partida a la resina durante toda la noche en agitación rotatoria a 4°C. Luego, el material no enlazado a la resina fue recolectado mediante centrifugación a 1000g por 30 segundos a 4°C y se empacó nuevamente la resina en un vial para centrifuga Falcon™ de 5 mL. Se realizaron 4 lavados por batch a la resina con 2 mL de solución de lavado (Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 500 mM, Imidazol 20 mM) cada uno, almacenando una alícuota de 500 µL de la misma. Finalmente, se eluyó por batch el material enlazado a la columna con 1 mL solución de elución (Tris-

HCl 20 mM pH 8, NaCl 500 mM, Imidazol 500 mM) a 1000g por 30 segundos, recolectando 6 fracciones de 1 mL. Todas las fracciones fueron analizadas a través de geles SDS-PAGE con acrilamida al 12% m/v y Western Blot con anticuerpos anti-polihistidina y anti-ICP de *T. vivax*. Las alícuotas de las eluciones fueron pasadas por un concentrador Amicon Millipore con límite inferior de poro de 5 kDa y, se cuantificó la cantidad de proteína, obtenida a través de la purificación, con un mini ensayo de Bradford. La curva de calibración se realizó a partir de un estándar de BSA (10 mg/mL) que fue diluido para medir las siguiente concentraciones y dibujar la regresión lineal: 0 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL y 200 µg/mL en un volumen final de 100 µL. Todas las muestras fueron hechas por duplicado. Luego, se añadió 1 mL del reactivo de Bradford y se esperó 30 minutos para luego leer a 595 nm en un espectrofotómetro. Las muestras fueron almacenadas a – 40°C.

13. Purificación de las cisteín peptidasas de *T. evansi* por columna de afinidad

Bacitracina-Sepharosa.

Las cisteín peptidasas de *T. evansi* se purificaron mediante cromatografía de afinidad, utilizando una columna de Bacitracina-Sepharosa, previamente acoplada de acuerdo al procedimiento descrito por van Noort y col. (1991), donde en un solo paso cromatográfico las peptidasas se separan de otras biomoléculas por unión selectiva a la bacitracina, la cual es un antibiótico peptídico que actúa como inhibidor de las peptidasas. Todos los pasos cromatográficos se realizaron a 4°C, debido a la susceptibilidad de las peptidasas a sufrir degradación.

Se equilibró 5 mL de resina con 20 mL de buffer acetato (Acetato de sodio/ácido acético 25 mM pH 4). Una vez equilibrada la resina se procedió a obtener el homogenato crudo de parásitos. A partir de una alícuota de $6,4 \times 10^9$ parásitos totales purificados por DEAE-celulosa como material de partida, se resuspendió con 500 μ L de buffer de lisis RIPA (Tris-HCl 20 mM pH 7,4; NP-40 al 1% v/v; Tritón X-100 al 0,1% v/v). Se agito por vortex y se realizó 3 ciclos de congelamiento-descongelamiento y ciclos de 10 segundos de golpes a máxima potencia/30 segundos de enfriamiento con el sonicador para lisar completamente las células. El homogenato fue centrifugado a 25.000g por 30 minutos y se tomó el sobrenadante. El sobrenadante se incubo por 2 horas con los 5 mL de resina equilibrada en agitación rotatoria para enlazar el material de partida con la resina. Se empacó la columna y el material no enlazado fue removido por gravedad con buffer acetato hasta que la absorbancia de la muestra, medido a 280 nm, alcanzo nivel basal. A continuación, las peptidasas fueron eluidas con buffer elución (Tris-HCl 200 mM pH 7,8; NaCl 1 M e isopropanol al 25% v/v) hasta que la absorbancia medida a 280 nm alcanzo nivel basal. Cada alícuota fue de 1,5 mL por tubo y de cada muestra se tomó 75 μ L con 25 μ L de buffer muestra SDS-PAGE 4X para posteriores estudios. Todas las muestras fueron guardadas a -40°C.

14. Análisis de las fracciones por Zimografía.

La actividad proteolítica de las muestras del apartado 13 fue analizada a través de zimogramas con acrilamida al 12% m/v copolimerizado con gelatina al 1% m/v siguiendo el protocolo propuesto por Lantz y Ciborowski (1994), con las siguientes modificaciones. Se prepararon los geles de poliacrilamida al 12% m/v, con un espesor de 0,75 mm,

siguiendo las especificaciones de la tabla 9. El gel de apilamiento se realizó con las especificaciones descritas en el apartado 10. Las muestras en buffer muestra no fueron hervidas para evitar la desnaturalización de las peptidasas. La corrida electroforética se realizó a 4°C con 70 voltios para el gel de apilamiento y un máximo de 90 voltios en el gel de resolución. Terminada la corrida, los geles fueron lavados tres veces con agua destilada por 5 minutos c/u y luego con buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8,8 conteniendo Tritón X-100 al 1% v/v durante 30 minutos a temperatura ambiente, para remover el SDS. Posteriormente, los geles fueron lavados 3 veces con agua destilada por 5 minutos c/u y nuevamente con buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8,8 por 30 minutos para eliminar el detergente restante. Terminado el periodo de lavado, los geles se incubaron con buffer citrato 0,1 M pH 4,5 conteniendo 25 mM de L-cisteína y 2,5 mM de CaCl₂ a 37°C durante 1 hora. El buffer de incubación fue removido con tres lavados con agua destilada y se tiñeron/destiñeron los zimogramas de la manera descrita en el apartado 10 hasta que se observaron bandas transparentes sobre un fondo azul (Turcios, 1996; Fernández, 1999; Machuca, 2002; Pérez, 2008).

Tabla 9. Preparación de geles para zimogramas al 12% m/v de acrilamida.

Gel de resolución	
Solución	Cantidad por minigel
Solución acrilamida/bisacrilamida al 30% m/v (29,2:0,8)	2 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	1,3 mL
SDS (10% m/v)	50 µL
Persulfato de amonio (10% m/v)	50 µL
TEMED	2 µL
Glicerina	0,2 mL
Gelatina (1% m/v)	0,5 mL
Agua destilada	1 mL

15. Ensayo de inhibición de las cisteín peptidasas de *T. evansi* por la proteína recombinante.

Santos y col. (2004) realizaron ensayos de invasión de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* a células de músculo liso de mamíferos mediado por la cisteín peptidasa. En estos ensayos los autores observaron que la incubación de 5,5 nM de chagasina, el inhibidor endógeno de cisteín peptidasa de *T. cruzi*, condujo a la inhibición de la actividad de la cisteín peptidasa en hasta un 55%. Con 55 nM de chagasina se inhibió aproximadamente un 62% la actividad peptidasa. Con base a estos datos se realizó un ensayo de inhibición de la proteína recombinante con las cisteín peptidasa de *T. evansi* purificadas del apartado 13. La inhibición se realizó con diferentes concentraciones de la proteína recombinante, las cuales fueron: 55 nM, 100 nM, 500 nM, 1000 nM y 5000 nM. El protocolo del ensayo de inhibición fue el siguiente: Las diluciones de la proteína recombinante se realizaron en buffer citrato 0,1 M pH 4,5 conteniendo 25 mM de L-cisteína y 2,5 mM de CaCl₂ al doble de la concentración indicadas previamente (110 nM, 200 nM, 1000 nM, 2000 nM y 10000 nM). Luego, en un volumen final de 100 µL se colocó 50 µL de la fracción de elución de las cisteín peptidasa a utilizar y 50 µL de la dilución de la proteína recombinante. Esta última dilución ½ llevó a la proteína recombinante a la concentración deseada. Luego, los viales fueron incubados por 1 hora a 37 °C y el ensayo se visualizó a través de un zimograma siguiendo las instrucciones del apartado 14 (Pérez, 2008).

16. Análisis bioinformáticos.

Con base en la secuencia nucleotídica que codifica para el ICP de *T. evansi*, cepa STIB805 (TritypDB Sequence ID: STIB805_Ch08), se realizó un análisis utilizando recurso

bioinformáticos tales como el paquete bioinformático BioEdit, versión 7.2.5 (Hall, 1999), para el análisis de secuencias múltiple, el paquete de programas de Expasy, disponibles en línea, para la predicción de las secuencias aminoacídicas y masa molecular. Como información complementaria se determinó la estructura secundaria y se modeló la estructura tridimensional tanto de la proteína ICPte, como de la proteína recombinante, basados en las secuencias aminoacídicas mediante la herramienta informática Phyre2 V 2.0 (Kelley y col., 2015), disponible en línea. Utilizando el programa ABCpred V 1.0 (Saha y Raghava, 2006), se obtuvo la predicción de epítopes lineales a partir de las secuencias aminoacídicas de las proteínas ICP de *T. vivax* cepa Y486 y *T. evansi* cepa STIB805.

V. RESULTADOS

1. Purificación de *Trypanosoma evansi* aislado TeAp-ElFrío01.

Utilizando el método descrito por Lanham y Godfrey (1970) se obtuvo dos alícuotas de parásitos *T. evansi*, aislado TeAp-ElFrío01. A través de hemocitometría en cámara de Neubauer se contabilizó $9,76 \times 10^8$ parásitos en total en la alícuota 1. Para la alícuota 2 se contabilizó $1,8 \times 10^9$ parásitos en total.

2. Aislamiento de ADN genómico de alto peso molecular de *Trypanosoma evansi*.

Se obtuvo ADN de alto peso molecular de *T. evansi*, aislado TeAp-ElFrío01, a partir de las alícuotas del apartado 1. Mediante corrida electroforética en gel de agarosa al 0,8% m/v se analizó la integridad del material extraído observándose ADN de alto peso molecular, sin degradación del ácido nucleico para ambas alícuotas pero con ARN como contaminante que se observa como una banda difusa por debajo de la escalera de peso molecular (Figura 15, carril 1). La alícuota 1 presentó una concentración final de 121,3 ng/ μ L y una pureza asociada de 3,758. La alícuota 2 presentó una concentración final de 172,3 ng/ μ L y una pureza asociada de 2,5. Para los siguientes experimentos se utilizó la alícuota 2.

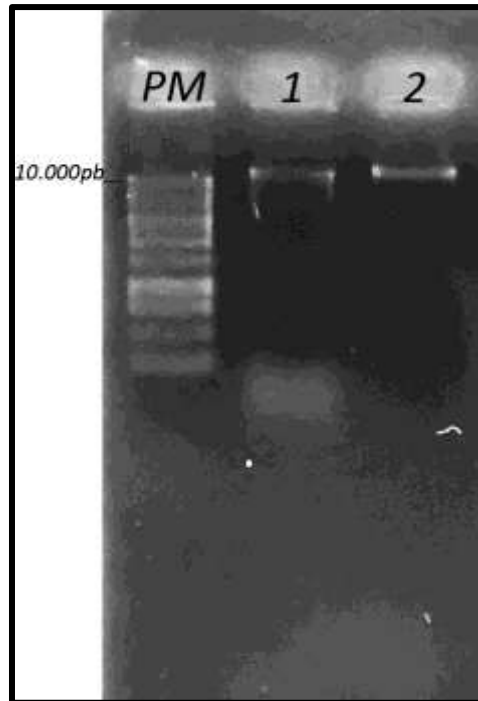


Figura 15. Análisis del ADN de alto peso molecular extraído a partir de *Trypanosoma evansi*, aislado TeAp-ElFrío01 a través de electroforesis en gel de agarosa al 0,8% m/v. Carril PM: Marcador de peso molecular 1Kb (Promega); Carril 1: Alícuota 1; Carril 2: Alícuota 2.

3. Estandarización de la técnica de PCR para la amplificación del gen que codifica para el ICP de *Trypanosoma evansi*.

Luego de la obtención del ADN del alto peso molecular, se procedió a la estandarización de la PCR con los cebadores IEFTopo e ICP1.1. Tal como se observa en la figura 16, se obtuvo una banda única de aproximadamente 360 pares de bases (pb) en todas las temperaturas de hibridación ensayadas, correspondiente al tamaño predicho para la secuencia putativa del gen que codifica para el Inhibidor de cisteín peptidasa de *T. evansi* para los cebadores utilizado. En el carril 3 se obtuvo una banda con mayor intensidad comparada con las demás, la cual corresponde a la temperatura de hibridación de 56,5°C. Por lo tanto, se seleccionó 56,5 °C como la temperatura de hibridación óptima para la reacción de ligación. Esto se correlaciona con la temperatura de hibridación de 57°C

predicha en el diseño de los cebadores. En el carril 6 del control de negativo de la reacción no se obtuvo ninguna banda, indicando que los reactivos utilizados no presentaban contaminación con ADN foráneo debido a que el ADN molde se reemplazó con agua destilada.

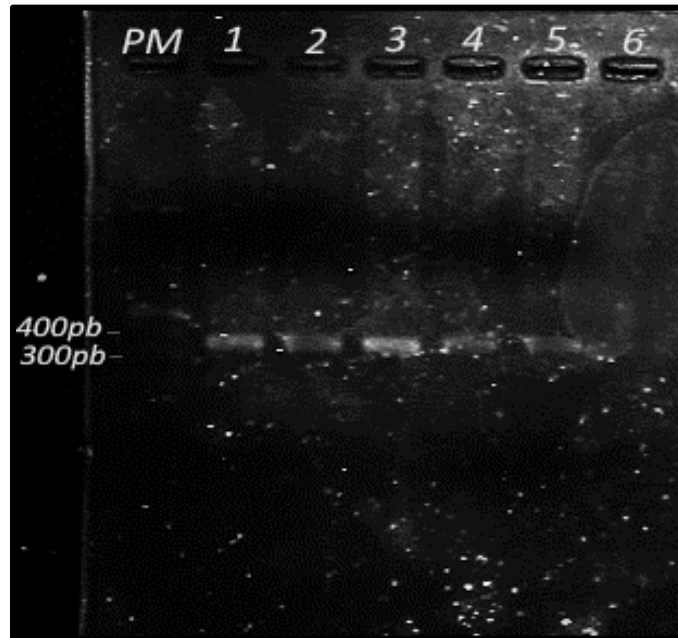


Figura 16. Análisis de la estandarización de la PCR con los cebadores IEFTopo e ICP1.1. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% m/v. Carril PM: Marcador de peso molecular de 100 pb (Promega). Carril 1-5: Producto amplificados en gradiente de temperatura entre 52 y 60 °C con el ADN de alto peso molecular de *Trypanosoma evansi*, aislado TeAp-ElFrio01; Carril 6: Control negativo de la reacción.

Para obtener suficiente producto de PCR para la reacción de ligación, primero se realizó 6 sendas reacciones de PCR con la temperatura de hibridación óptima de 56,5 °C (Figura 17). Luego, estas 6 reacciones positivas fueron colocadas en una sola alícuota de la cual se obtuvo una concentración de 42,3 ng/ μ L con una pureza asociada de 2,2.

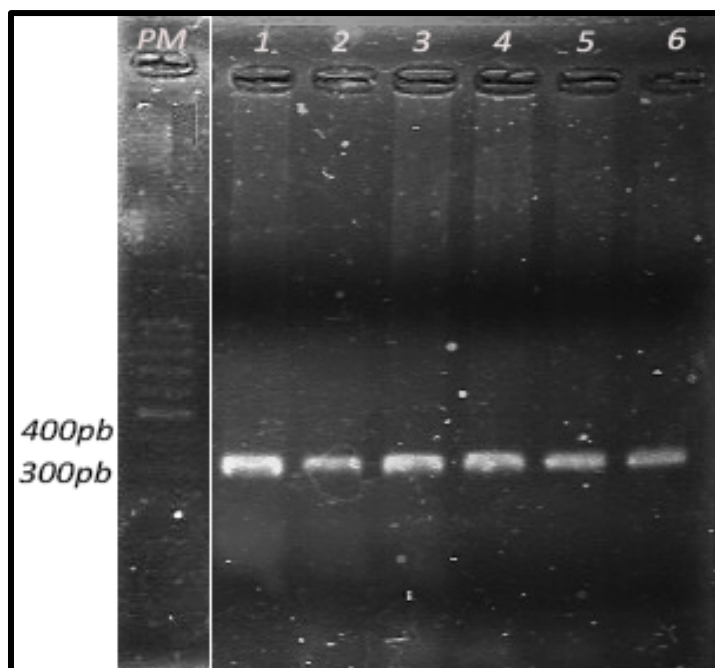


Figura 17. Análisis de los productos de PCR con los cebadores IEFTopo e ICP1.1 hibridados a una temperatura de 56,5°C. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% m/v. Carril PM: Marcador de peso molecular de 100 pb (Promega). Carril 1-6: Producto amplificados a temperatura constante de 56,5 °C con el ADN de alto peso molecular de *Trypanosoma evansi*, aislado TeAp-ElFrío01.

4. Clonación del producto de PCR en el vector de clonación-expresión pET101/D-TOPO®.

La ligación del producto de PCR se realizó siguiendo las indicaciones del manual *Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits* y la transformación fue realizada en células *E. coli* TOP10 químicamente competentes, como se describió en el apartado 5 de la metodología, obteniéndose los siguiente resultados. A partir de cinco placas LB-ampicilina (100 µg/mL), se sembró a las dos primeras placas un volumen de 200 µL de la mezcla de reacción y a las siguientes dos placas con un volumen de 150 µL. El control positivo con el vector pET101/D//lacZ se realizó con 200 µL sembrados en la quinta placa de LB-ampicilina (100 µg/mL). De estas se obtuvo un total de 16 colonias recombinantes para el plásmido

pET101+ICPte y 3 colonias recombinantes para el plásmido control pET 101/D//lacZ (tabla 10).

Tabla 10. Colonias *E. coli* TOP10 recombinantes obtenidas con el plásmido pET101+ICPte y pET 101/D//lacZ en placas LB-ampicilina (100 µg/mL).

Placa	Colonias a analizar	Nomenclatura
1 ICPte (200 µL)	3	1.1; 1.2; 1.3
2 ICPte (200 µL)	4	2.1; 2.2; 2.3; 2.4
3 ICPte (150 µL)	4	3.1; 3.2; 3.3; 3.4
4 ICPte (150 µL)	5	4.1; 4.2; 4.3; 4.4; 4.5
5 lacZ (200 µL)	3	5.1; 5.2; 5.3

5. Selección de clones positivos mediante PCR anidada.

Para evaluar la presencia del plásmido pET101+ICPte en las colonias *E. coli* TOP10 recombinantes, estas fueron sometidas a una PCR anidada. Primero, se realizó una *Colony* PCR con cebadores universales T7 para amplificar la región de ADN más extensa que contiene la secuencia de interés. En la figura 18 se observan las 16 colonias recombinantes que fueron analizadas (carriles 1-16), donde la colonia 4.5 (carril 16 dentro de recuadro blanco) fue la única en amplificar la banda correspondiente al peso molecular predicho de 625 pb, similar a el producto amplificado obtenido a partir del pET100+ICPtv (carril 22 dentro de recuadro blanco) de 673 pb. Para las colonias 2.4 (carril 7) y 4.3 (carril 14), se obtuvieron banda de un tamaño mucho mayor al esperado. En el resto de las colonias no se observó producto de amplificación. Para las colonias 5.1, 5.2 y 5.3 (carriles 18-20) con el vector pET101/D//lacZ, se observó bandas de aproximadamente 3000 pb, correspondiente al producto de amplificación predicho para el plásmido con cebadores universales T7 de 3337 pb. En el carril 21 se observó que el control negativo de la reacción no amplificó. Las muestras fueron sembradas siguiendo el orden que se estableció en la tabla 10.

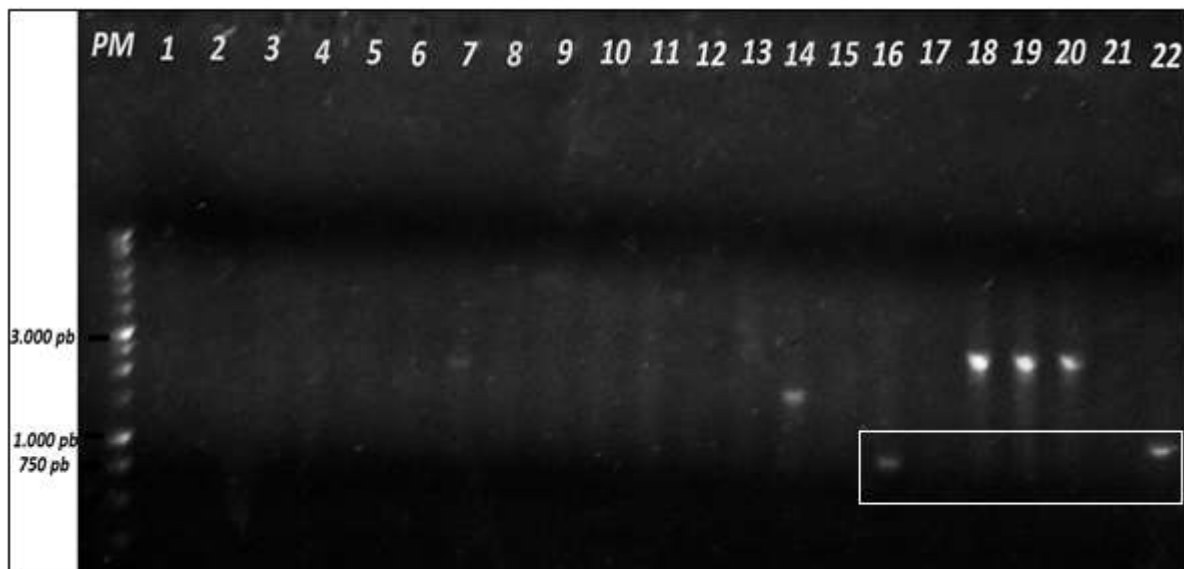


Figura 18. Análisis de las colonias *E. coli* TOP10 recombinantes a través de *Colony* PCR con cebadores universales T7. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% m/v. Carril PM: Marcador de peso molecular de 1 Kb (Promega). Carril 1-16: Colonias recombinantes analizadas desde la 1.1 hasta la 4.5. Carril 17: Vacío. Carril 18-20: Colonias recombinantes con plásmido pET101/D//lacZ. Carril 21: Control negativo de la reacción. Carril 22: Control positivo pET100+ICPtv.

Luego, para evaluar la presencia del inserto en el vector pET101, se realizó una PCR anidada con cebadores específicos IEFTopo e ICPE1.1, utilizando el producto de amplificación obtenido en la *Colony* PCR como ADN molde. En la figura 19 se observan las 16 colonias recombinantes positivas que fueron analizadas (carriles 1-16). Todas las colonias dieron positivo para un producto de PCR de aproximadamente 360 pb correspondiente a la secuencia que codifica para el ICpte. En el carril 17 el control negativo de la reacción no amplificó. En el carril 18 se observó que el control positivo amplificó con la banda esperada de 360 pb. Las colonias positivas fueron posteriormente propagadas en medio LB-ampicilina (100 µg/mL) y se procedió a la extracción del ADN plasmídico.

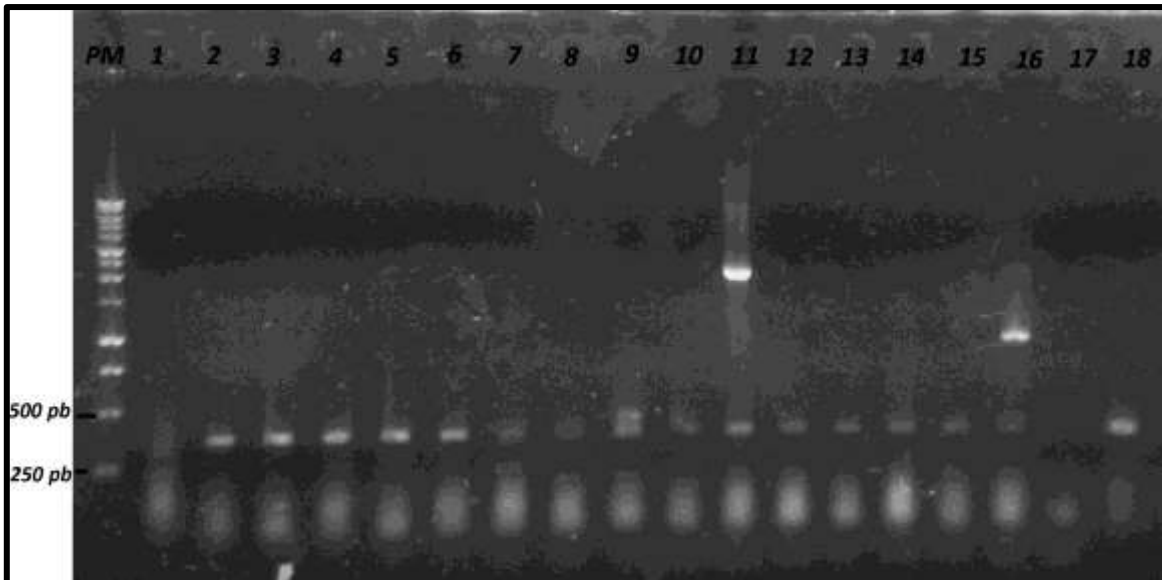


Figura 19. Análisis de las colonias *E. coli* TOP10 recombinantes a través de PCR anidada con cebadores específicos IEFTopo e ICPE1.1. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% m/v. Carril PM: Marcador de peso molecular de 1 Kb (Promega). Carril 1-16: Colonias recombinantes analizadas desde la 1.1 hasta la 4.5. Carril 17: Control negativo de la reacción. Carril 18: Control positivo de la reacción.

6. Extracción del ADN plasmídico de células *E. coli* TOP10 recombinantes.

Se realizó la extracción de ADN plasmídico de las colonias positivas por PCR anidada, según el protocolo descrito en el apartado 7 de la metodología. En la figura 20 se observó que en todas las colonias analizadas se obtuvo la presencia de dos bandas, donde la de abajo corresponden a la forma superenrollada característico de este tipo de ADN, mientras que la de arriba corresponde al ADN plasmídico circular abierto (Schmidt y col., 1999). En todos los carriles, muy por debajo del marcador de peso molecular, se observó unas bandas difusas que corresponde al ARN contaminante.

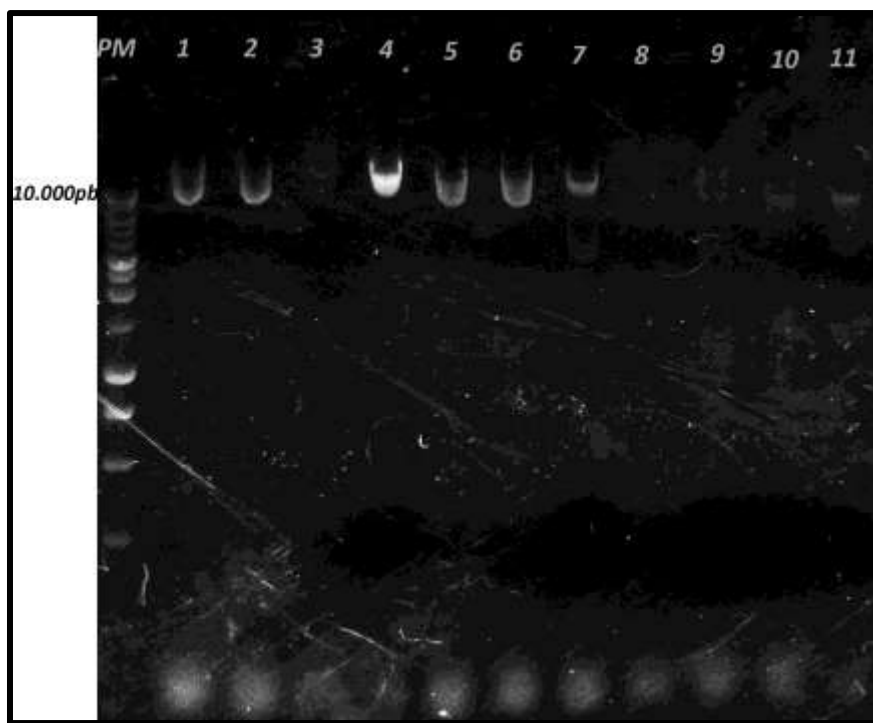


Figura 20. Análisis de la integridad de los ADN plasmídico extraídos de células *E. coli* TOP10 recombinantes mediante lisis alcalina. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% m/v. Carril PM: Marcador de peso molecular de 1 Kb (Promega). Carril 1-11: ADN plasmídico extraído de las colonias recombinantes analizadas.

Para la cuantificación y valor de pureza se utilizó el protocolo descrito en el apartado 3 de la metodología, donde se obtuvo más de 500 ng/ μ L para todas las extracciones realizadas (Tabla 11). Las purezas asociadas en todos los casos igualan o superan el valor de 2,7 debido a la contaminación por ARN, aun siendo estas tratadas con 0,02 μ g de ARNasa, o al etanol utilizado para la precipitación de los ácidos nucleicos.

Tabla 11. Concentración y pureza asociada del ADN plasmídico extraído de las colonias *E. coli* TOP10 recombinantes analizadas.

Carril	Colonia	ADN [ng/ μ L]	Pureza
1	1.1	545,95	2,9
2	1.2	563,05	2,8
3	1.3	521,5	2,8
4	2.1	518	2,8
5	2.2	544,95	2,9
6	2.3	550,65	2,8
7	4.5	543	2,9
8	3.4	525,8	2,7
9	4.1	524,75	2,8
10	4.2	526,15	2,7
11	4.3	504,8	2,9

7. Ensayo de restricción.

Se realizó a los plásmidos extraídos un ensayo de restricción con la enzima SmaI, con el propósito de tener una prueba confirmatoria adicional de la inserción de la secuencia que codifica para el ICPte dentro del vector pET101. Los plásmidos tratados con la enzima SmaI fueron aquellos extraídos de las colonias 1.1, 1.2, 2.1, 2.2 y 2.3. En la figura 21 se observó que los plásmidos control, es decir, sin tratamiento con la enzima de restricción (carriles 2, 4, 6 y 8) presentan tres conformaciones: La conformación superior corresponde al plásmido circular abierto, donde una de las dos hebras está cortada. La conformación del medio corresponde al plásmido superenrollado y, la conformación inferior corresponde a una sola hebra del plásmido enrollado, ya que debido a las condiciones alcalinas utilizada en la extracción del ADN plasmídico, algunos plásmidos son desnaturalizados completamente produciendo hebras circulares de ADN (Schmidt y col., 1999; Ishido y col., 2010; Roy y col., 2018). Los plásmidos tratados con la enzima de restricción SmaI (carriles 1, 3, 7 y 9) se observó que la banda correspondiente al plásmido superenrollado no está.

En cambio, se observó una nueva banda que se sitúa ligeramente más arriba respecto a la del control y, que corresponde al plásmido linealizado (bandas dentro del recuadro blanco). Las demás bandas se observaron a la misma altura respecto al control. Para el carril 5, correspondiente a la colonia 2.1, no se observó ningún patrón de bandas visible. Estos resultados indican que las colonias 1.1, 1.2, 2.2 y 2.3 tienen una sola secuencia del gen que codifica para el ICpte insertado dentro del vector pET101. Con base a que la secuencia diana de la enzima de restricción SmaI solo se encuentra dentro del gen que codifica para el ICpte y no en el vector pET101 y, la inserción de múltiples productos de PCR dentro del vector pET101 se vería en el ensayo de restricción como un patrón múltiple de bandas, se confirma, a falta de una secuenciación del plásmido, la correcta inserción y exitosa clonación del gen que codifica para el ICpte dentro del vector pET101. Para los siguientes ensayos se utilizó el plásmido obtenido de la colonia 1.2.

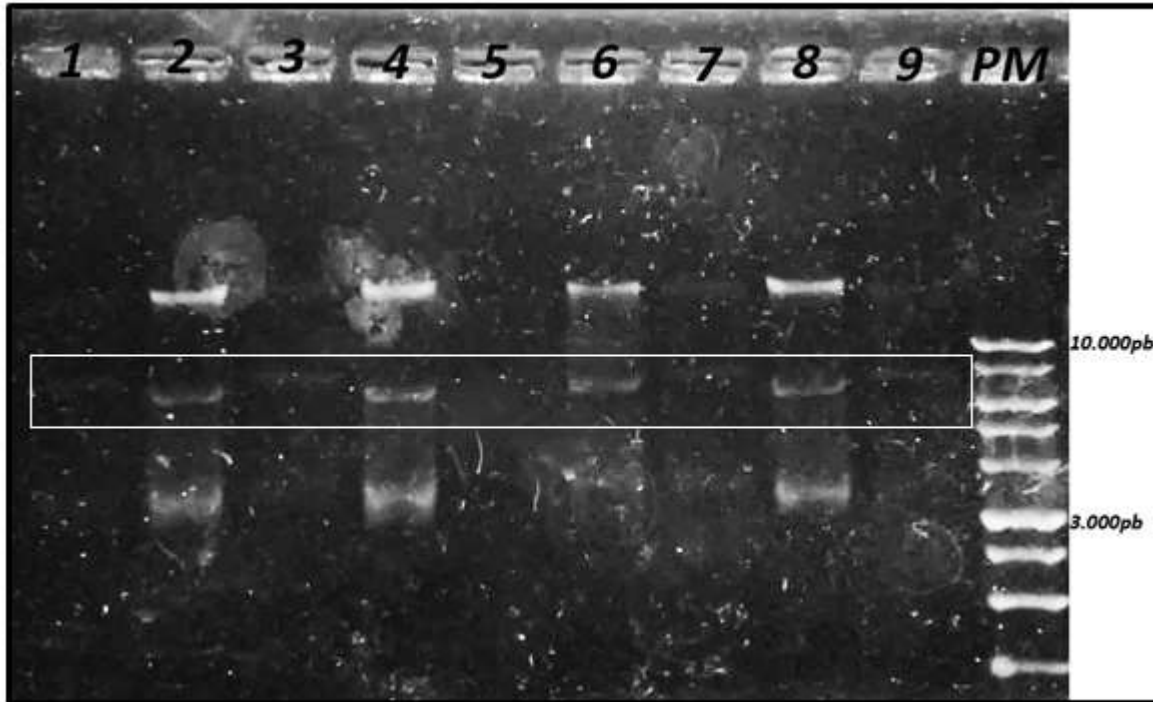


Figura 21. Análisis de restricción del ADN plasmídico tratado con la enzima SmaI. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8. Carril PM: Marcador de peso molecular de 1 Kb (Promega). Carril 2, 4, 6 y 8: ADN plasmídico control. Carril 1, 3, 5, 7 y 9: ADN plasmídico de las colonias 1.1, 1.2, 2.1, 2.2 y 2.3 tratado con la enzima de restricción SmaI.

8. Transformación de células *E. coli* BL21 y expresión a mini escala mediante inducción con IPTG.

Las células *E. coli* BL21 fueron transformadas por choque térmico con el plásmido de la colonia 1.2, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 9 de la metodología. Los resultados del ensayo piloto de expresión a mini escala de la colonia 1.2 permitieron la identificación de la proteína recombinante en la fracción soluble del lisado celular (Figura 22, carriles 1-6 identificado con una flecha), donde se observó una banda de peso molecular alrededor de los 45 kDa, muy por encima de los 16,8 kDa predichos para el inhibidor de cisteín peptidasa sumado al peso molecular de las etiquetas en el extremo C-terminal (≈ 3 kDa; cola de polihistidina y epítipo V5). También se observó un nivel máximo de expresión a partir de las 3 horas de inducción (carril 4), por lo cual este tiempo se tomó

como el tiempo óptimo de inducción, con el propósito de obtener una mayor cantidad de proteína en los ensayos de inducción a mayor escala. Mientras, en la fracción insoluble no fue posible la identificación de la proteína recombinante, tanto en la muestra inducida con IPTG como la no inducida (Figura 23). Esta tendencia se repitió para las muestras de las colonias 2.2 y 2.3.

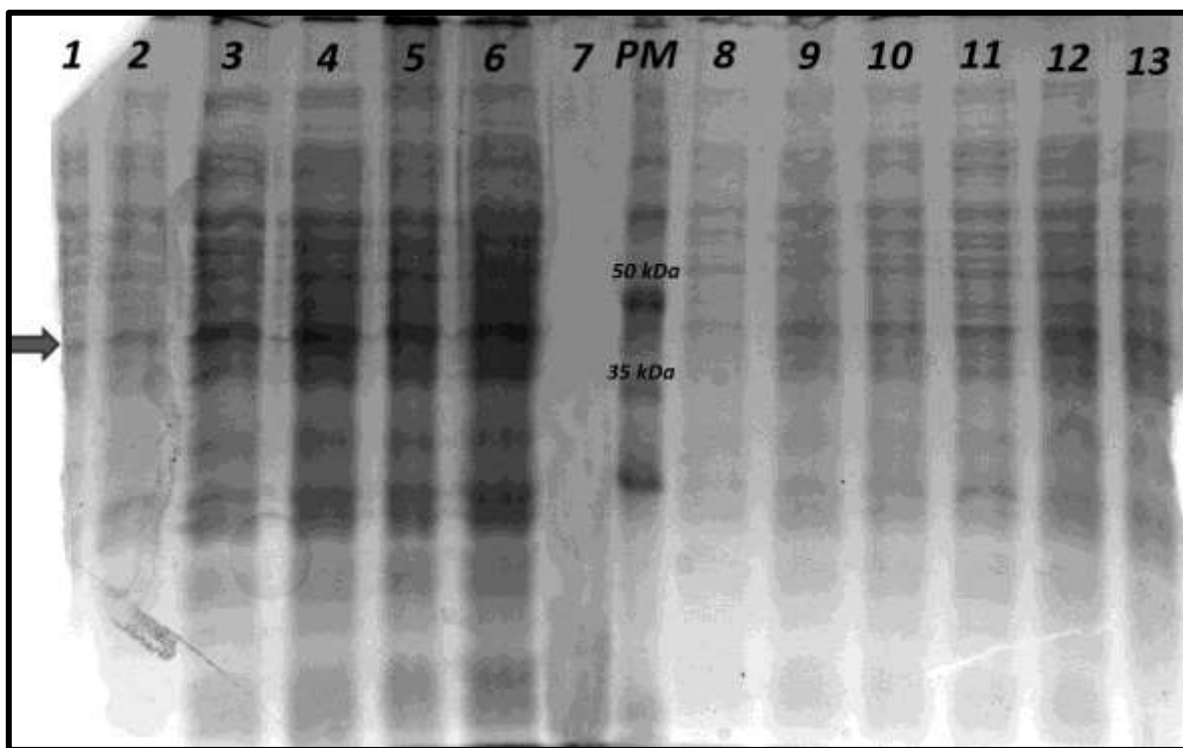


Figura 22. Análisis de la cinética de expresión de la proteína recombinante en la fracción soluble del lisado celular. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% m/v, teñido con azul de Coomassie. Carril PM: Marcador de peso molecular de proteínas Broad Range Protein Molecular Weight Markers (Promega). Carriles 1-6: Muestras inducida con IPTG desde el tiempo 0 a 5 horas. Carril 7: vacío. Carriles 8-13: Muestras no inducida desde el tiempo 0 a 5 horas.

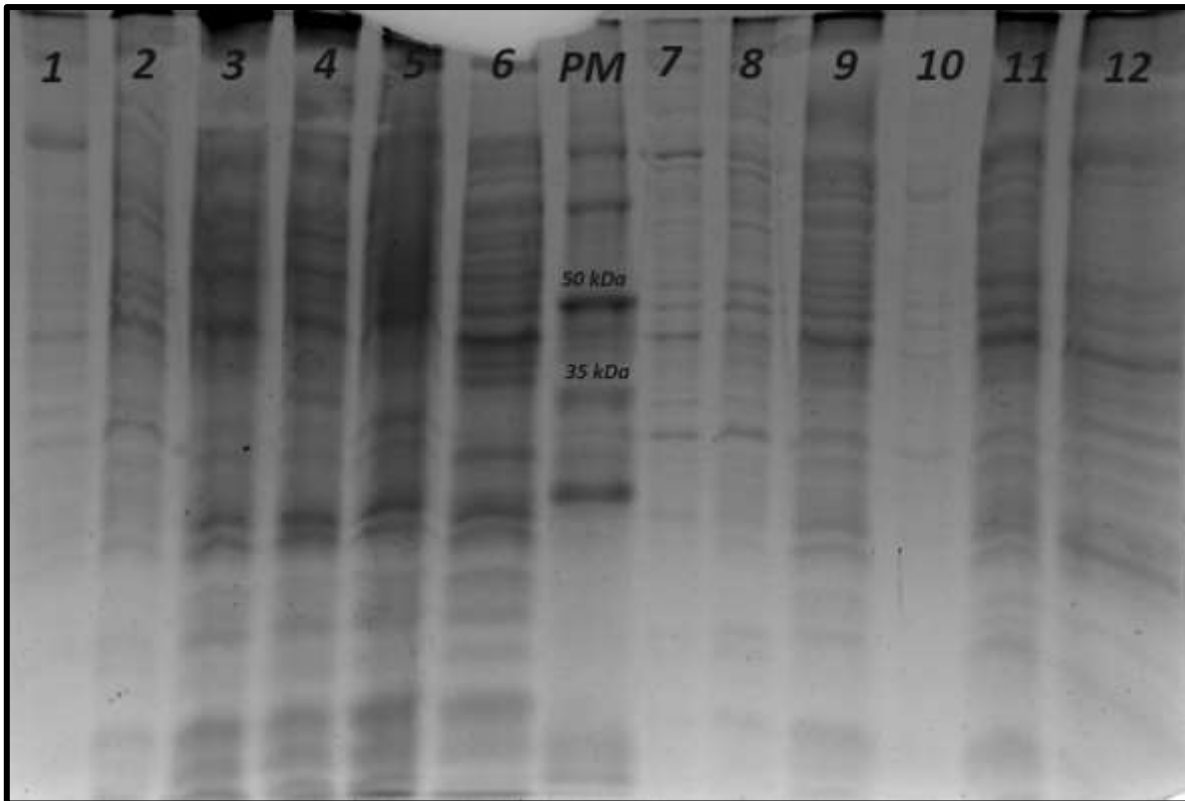


Figura 23. Análisis de la cinética de expresión de la proteína recombinante en la fracción insoluble del lisado celular. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% m/v, teñido con azul de Coomassie. Carril PM: Marcador de peso molecular de proteínas Broad Range Protein Molecular Weight Markers (Promega). Carriles 1-6: Muestras inducida con IPTG desde el tiempo 0 a 5 horas. Carriles 7-12: Muestras no inducida desde el tiempo 0 a 5 horas.

9. Análisis de muestras a través Western blot.

Las fracciones solubles correspondientes al ensayo piloto de expresión fueron analizadas mediante Western Blot, utilizando el anticuerpo monoclonal de ratón anti-poli-histidina (Figura 24). En los tiempos de inducción de 0 a 4 horas (carril 1-5) se observó el reconocimiento del epítipo correspondiente a la extensión de histidina en el extremo C-terminal de la proteína recombinante. La detección en el tiempo cero de inducción se debió a la expresión basal del sistema de *E. coli* BL21. La proteína recombinante reconocida se observó de nuevo con un tamaño aparente alrededor a los 45 kDa, lo cual vuelve a no concordar con estudios anteriores para un inhibidor de cisteín peptidasa del

genero *Trypanosoma*. También se observó un nivel máximo de expresión a las 3 horas de inducción (carril 4), similar al descrito en el apartado previo, reafirmando este tiempo como el tiempo óptimo de inducción.

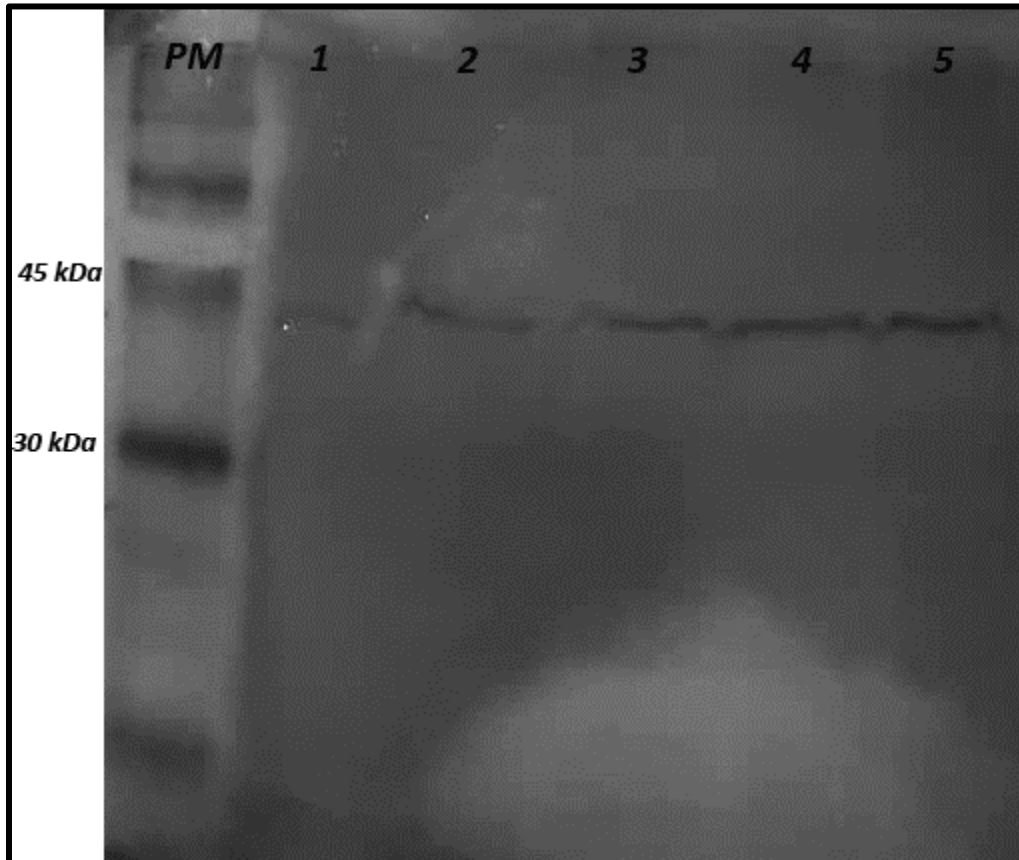


Figura 24. Análisis de la cinética de expresión de la proteína recombinante en fracción soluble. Western Blot con anticuerpo monoclonal de ratón anti-polihistidina (Amersham Bioscience) 1/2000 en complejo con el anticuerpo anti-ratón conjugado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch) 1/1000 revelado con diaminobenzidina. Carril PM: Marcador de peso molecular preteñido de proteínas Pierce® Blue Prestained Molecular Weight Marker Mix (Thermo Scientific). Carriles 1-5: Muestras inducida con IPTG desde el tiempo 0 a 4 horas.

Debido a las incongruencias respecto al tamaño obtenido de la proteína recombinante y el esperado, se realizó un Western Blot con un anticuerpo policlonal de conejo anti-ICP de *T. vivax* como prueba confirmatoria adicional (Figura 25). En los tiempos de inducción de 0 a 5 horas (carril 1-6) se observó el reconocimiento de lo que se sospecha es la proteína recombinante a partir de la primera hora de inducción (Figura 25, indicado con recuadro

negro). También se reconoció proteínas del hospedador *E. coli* BL21, como proteínas y polisacáridos de membrana, como los antígenos K (Orskov y col., 1977), debido a que el suero también contiene anticuerpos para epítopes diferentes al del ICP de *T. vivax*. La proteína recombinante se observó nuevamente con un tamaño alrededor de los 45 kDa. El reconocimiento de la proteína recombinante por parte del anticuerpo monoclonal de ratón anti-poli-histidina confirmó que es una proteína recombinante producida a través de la ligación con el pET101, quien es el que confiere la etiqueta de poli-histidina. Además, el reconocimiento de esta proteína recombinante por parte del anticuerpo policlonal de conejo anti-ICP de *T. vivax* indica que es una proteína con epítopes característico de una proteína ICP del género *Trypanosoma*. Esta tendencia se repitió en las muestras de las colonias 2.2 y 2.3. Se prosiguió a la purificación de esta proteína recombinante para estudios adicionales.

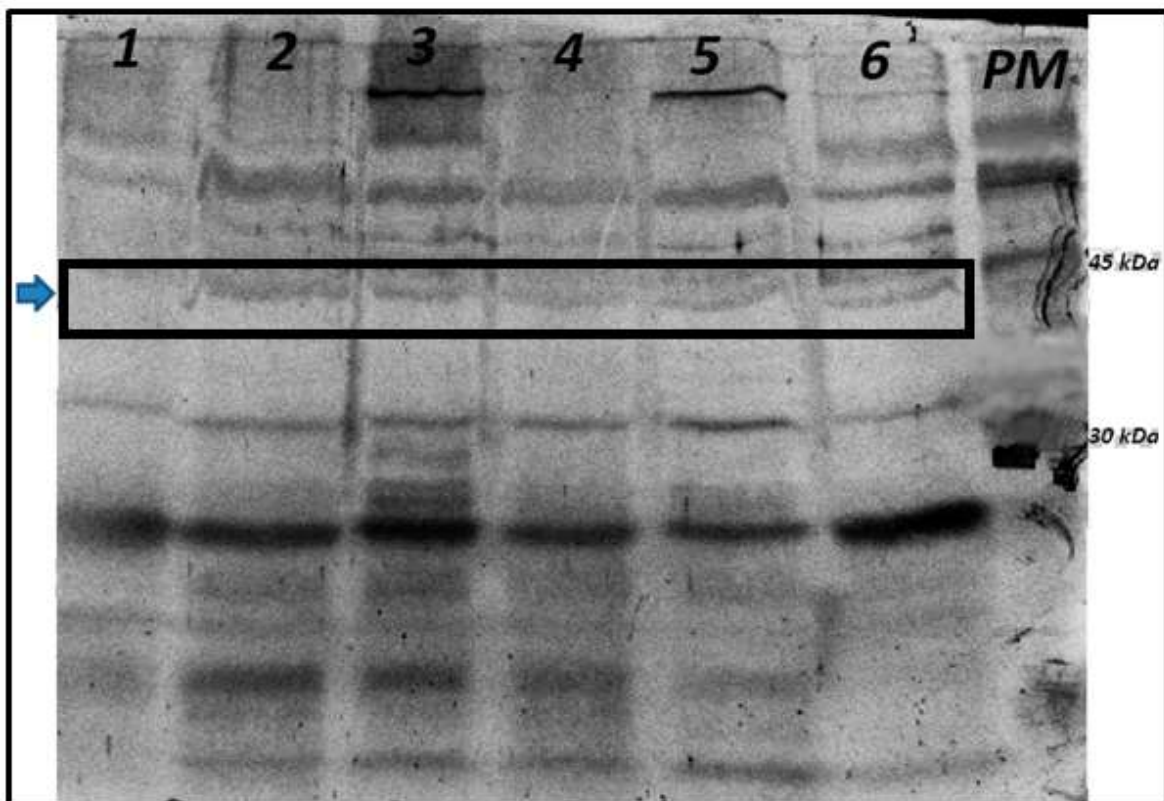


Figura 25. Análisis de la cinética de expresión de la proteína recombinante en fracción soluble. Western Blot con anticuerpo policlonal mono específico de conejo anti-ICP de *T. vivax* 1/700 en complejo con anticuerpo anti-conejo conjugado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch) 1/1000. Carril PM: Marcador de peso molecular preteñido de proteínas Pierce® Blue Prestained Molecular Weight Marker Mix (Thermo Scientific). Carriles 1-6: Muestras inducida con IPTG desde el tiempo 0 a 5 horas.

10. Expresión a mayor escala y purificación de la proteína recombinante por columna de afinidad Níquel-agarosa.

Con el propósito de obtener suficiente cantidad de proteína para estudios adicionales, se realizó el cultivo e indujo, durante 3 horas, la expresión de la proteína recombinante a mayor escala. Esta fue purificada mediante columna de afinidad His-Link™ (Promega). En la figura 26 se observó que en las fracciones de elución (carriles 9-12), la obtención de la proteína recombinante como una banda bien definida con una masa molecular alrededor de los 45 kDa (indicado con una flecha).

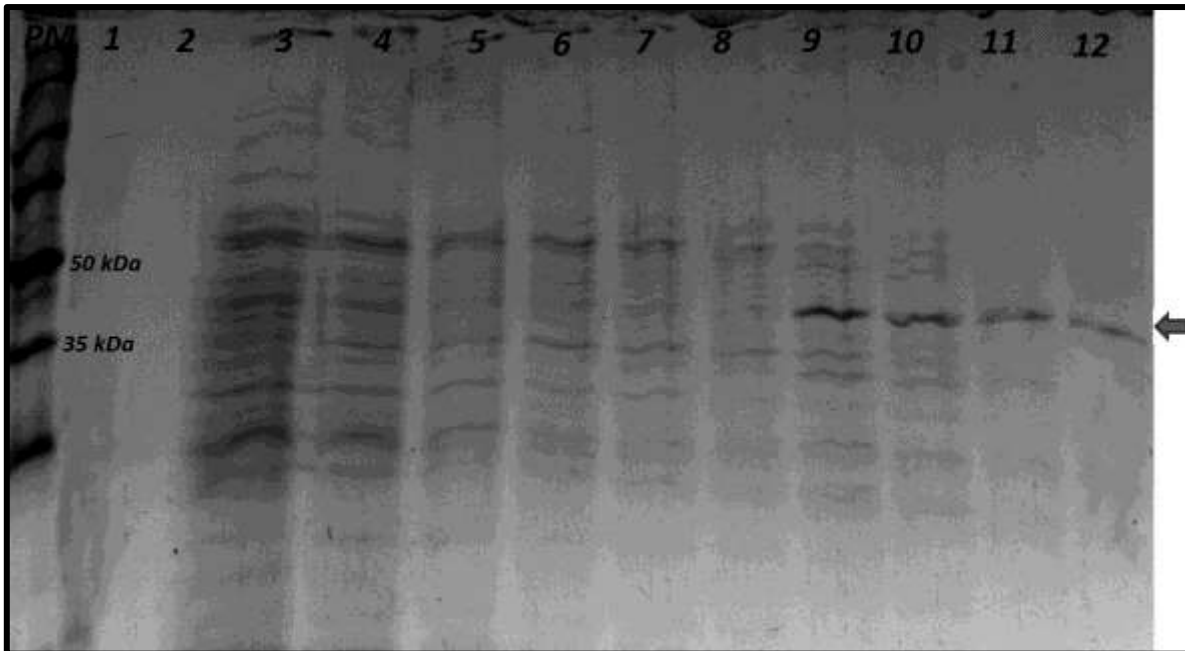


Figura 26. Análisis del perfil de elución de la proteína recombinante purificada por columna de afinidad His-Link (Promega). Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% m/v, teñido con azul de Coomassie. Carril PM: Marcador de peso molecular de proteínas Broad Range Protein Molecular Weight Markers (Promega). Carril 1-2: Vacío. Carril 3: Material de partida. Carril 4: Material no enlazado. Carriles 5-8: Lavados 1-4. Carriles 9-12: Eluciones 1-4.

Para asegurar que la proteína purificada es de hecho la proteína recombinante observada previamente, se realizó un ensayo Western blot con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-poli-histidina y anticuerpo policlonal e conejo anti-ICP de *T. vivax* (Figura 27 y 28, respectivamente). En la figura 27 se observó que las fracciones de elución (carriles 1, 3, 5 y 7, indicado con una flecha) fueron reconocidas por el anticuerpo monoclonal de ratón anti-poli-histidina como una banda definida alrededor de los 45 kDa respecto al marcador de peso molecular. En el carril 8 se observó que el control positivo fue reconocido por el anticuerpo anti-poli-histidina, indicando que efectivamente el anticuerpo reconoce a esta etiqueta. El control positivo es la subunidad reguladora tipo II (RII α) de la proteína quinasa A (PKA) de mamífero, clonada en *E. coli* BL21 con una cola de poli-histidina añadida para estos efectos, cuyo peso molecular es de 55 kDa, la cual fue obtenida como donación de

un laboratorio del mismo recinto donde se realizó este trabajo, para la realización de este ensayo. En la figura 29 se observó que las fracciones de elución (carriles 1, 3, 5 y 7, indicado con una flecha) también fueron reconocidas por el anticuerpo policlonal mono-específico de conejo anti-ICP de *T. vivax* como una banda definida alrededor de los 45 kDa, respecto al marcador de peso molecular. Es de destacar que la señal observada con el anticuerpo policlonal de conejo anti-ICP de *T. vivax* fue más intensa que el obtenido con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-poli-histidina. Como se estableció en los resultados del apartado 9, el reconocimiento de la proteína recombinante purificada por parte del anticuerpo monoclonal de ratón anti-poli-histidina y por parte del anticuerpo policlonal de conejo anti-ICP de *T. vivax*, confirman que es una proteína recombinante producida a través de la ligación con el vector pET101 e, indican que es una proteína con epítopes característico de una proteína ICP del género *Trypanosoma*.

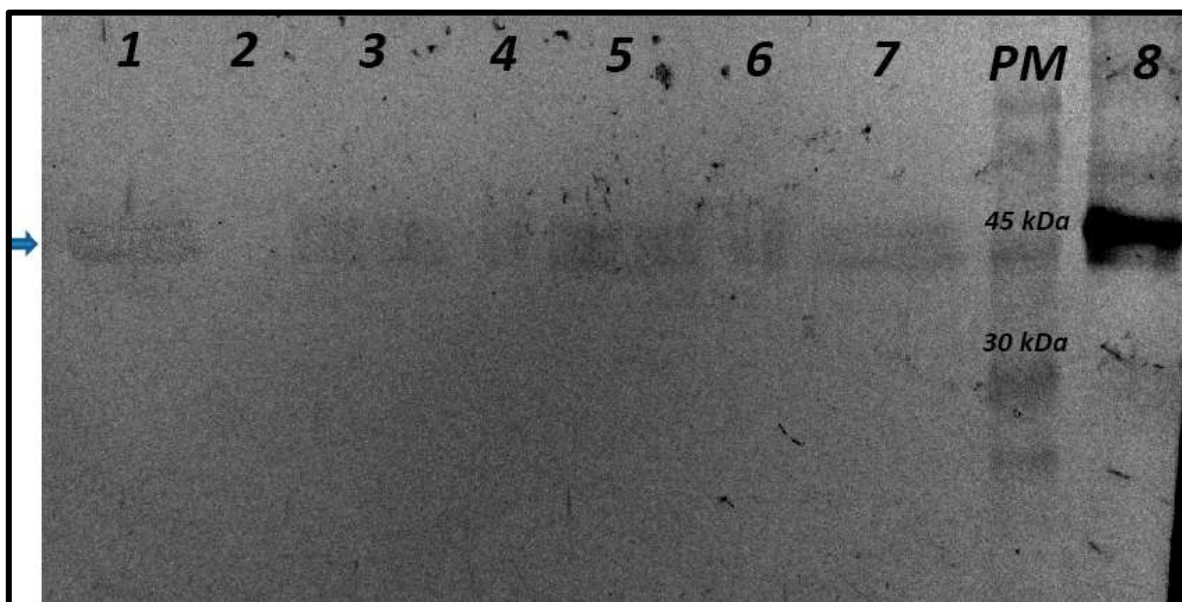


Figura 27. Análisis de las eluciones de purificación de la proteína recombinante. Western Blot con anticuerpo monoclonal de ratón anti-poli-histidina (Amersham Bioscience) 1/2000 en complejo con el anticuerpo anti-ratón conjugado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch) 1/1000 revelado con diaminobenzidina. Carril PM: Marcador de peso molecular preteñido de proteínas Pierce®

Blue Prestained Molecular Weight Marker Mix (Thermo Scientific). Carril 1: Elución 1. Carril 3: Elución 2. Carril 5: Elución 3. Carril 7: Elución 4. Carril 8: Proteína control positivo.

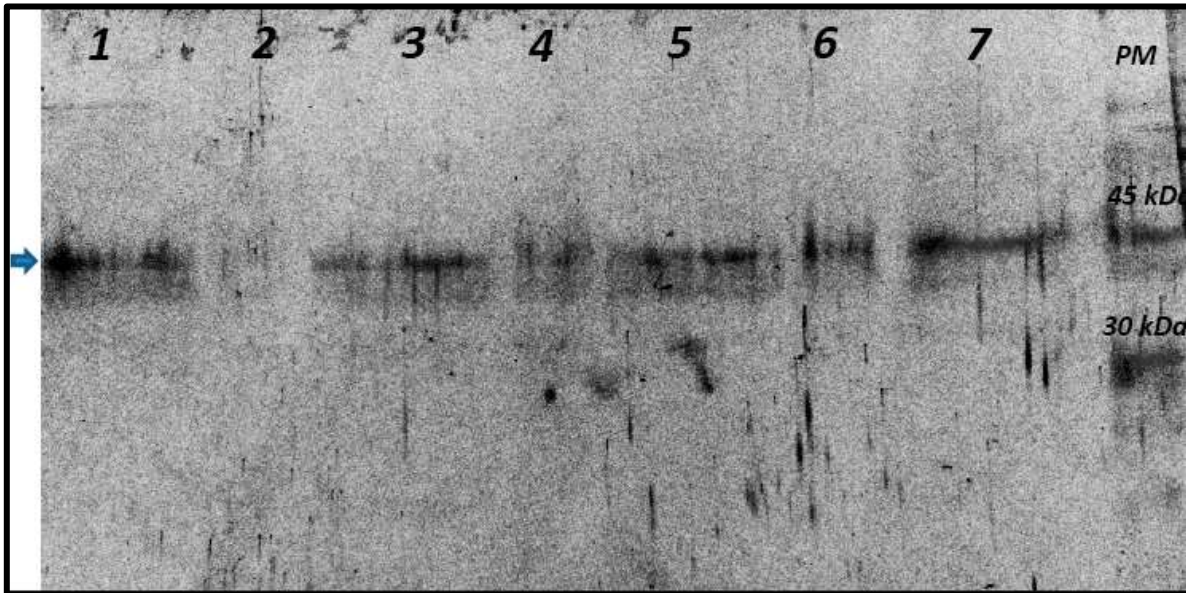


Figura 28. Análisis de las eluciones de purificación de la proteína recombinante. Western Blot con anticuerpo policlonal mono específico de conejo anti-ICP de *T. vivax* 1/700 en complejo con anticuerpo anti-conejo conjugado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch) 1/1000 revelado con diaminobenzidina. Carril PM: Marcador de peso molecular preteñido de proteínas Pierce® Blue Prestained Molecular Weight Marker Mix (Thermo Scientific). Carril 1: Elución 1. Carril 3: Elución 2. Carril 5: Elución 3. Carril 7: Elución 4.

La fracción de elución 4 (carril 12) fue concentrado mediante Amicon (Millipore; tamaño de poro para proteínas de 5 kDa o menores) a 12.000g a 4°C por 10 minutos. Luego, se determinó que la concentración final proteica fue de 292 µg/mL. Con esta fracción concentrada y purificada, se procedió a verificar si la proteína recombinante posee actividad inhibitoria contra las cisteín peptidasas de *Trypanosoma evansi*.

11. Purificación de las cisteín peptidasa de *T. evansi* por Bacitracina-Sepharosa y análisis por Zimografía.

Para determinar si la proteína recombinante posee actividad inhibitoria, primero se purificó su proteína diana, las cisteín peptidasas de *T. evansi*. Las fracciones fueron analizadas por Zimografía (Figura 29) tal como fue descrito en el apartado 14 de la

metodología. En el zimograma se observó que, tanto en el material de partida (carril 1) como en las eluciones 4-7 (carriles 6-9), la presencia de 4 proteínas con actividad proteolítica y con tamaños aparentes próximos a 28, 33, 35 y 40 kDa (Figura 29, indicado con flechas), como ha sido descrito previamente por Brems (1997), Fernández (1999), Turcios (1999) y Machuca (2002), donde la proteína de 28 kDa, que corresponde a la evansaína, posee la mayor actividad proteolítica. Por lo tanto, se purificó las cisteín peptidasas de *T. evansi*, donde se observó la evansaína como la proteína de mayor proporción y enzimáticamente activa. Se utilizó la elución 5 (carril 7) para el estudio de inhibición con la proteína recombinante purificada, al ser esta la que presentó la mayor actividad proteolítica comparada con las demás eluciones.

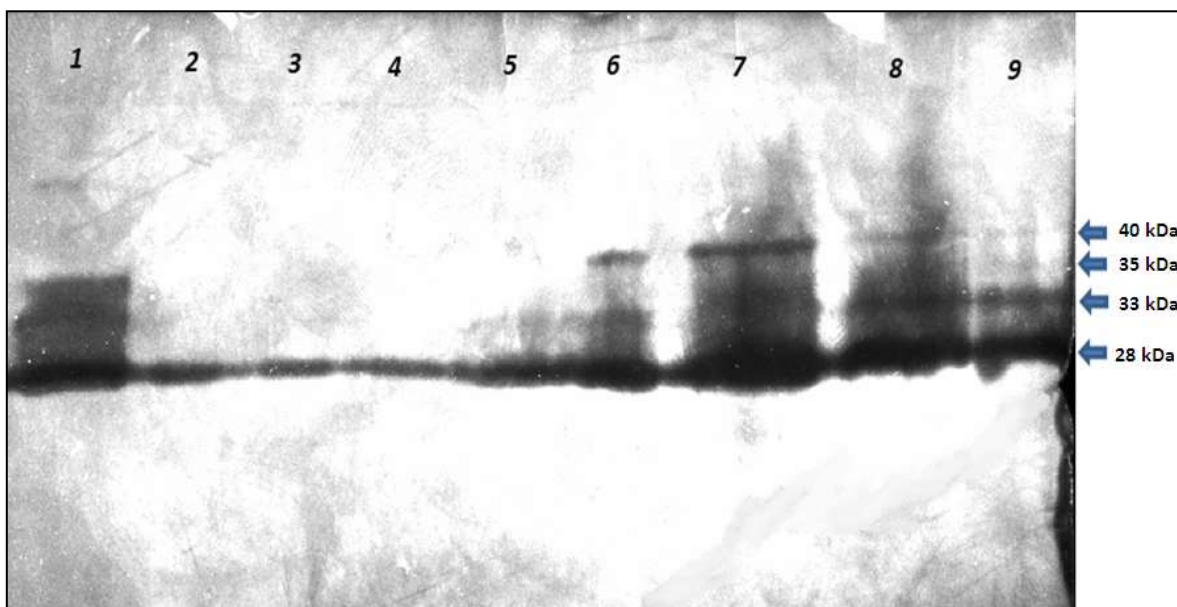


Figura 29. Imagen en negativo. Análisis del perfil de elución y actividad proteolítica de las cisteín peptidasas de *T. evansi* purificadas por columna de afinidad Bacitracina-Sepharosa. Zimografía al 12% m/v copolimerizado con gelatina al 1% m/v, teñido con azul de Coomassie. Carril 1: Material de partida. Carril 2: Lavado. Carriles 3-9: Eluciones 1-7.

12. Ensayo de inhibición de las cisteín peptidasa de *T. evansi* por la proteína recombinante purificada.

Para dilucidar si la proteína recombinante purificada posee actividad inhibitoria sobre las cisteín peptidasa de *T. evansi*, se realizó un ensayo de interacción entre las peptidasas y la proteína recombinante. El ensayo se visualizó a través de un zimograma al 12 % m/v (Figura 30). En el carril 7 (elución 5), utilizado como control de la actividad peptidasa, se observó la presencia de 4 proteínas con tamaños aparentes próximos a 28, 33, 35 y 40 kDa con actividad proteolítica, similar al descrito en el apartado previo. La evansaína, con un tamaño aparente de 28 kDa, se observó como la proteína en mayor proporción y por ende, la proteína con mayor actividad proteolítica. En los carriles 1-5, donde se ensayó la proteína recombinantes a concentraciones de 55 nM, 100 nM, 500 nM, 1000 nM y 5000 nM, se observó la disminución del grosor de las bandas correspondiente a las cisteín peptidasas de 33 y 35 kDa (Figura 30; señalado con flechas huecas), para todas las concentraciones de la proteína recombinante ensayada, haciéndose más notorio este efecto en la concentración de 5000 nM, o 5 μ M. Por lo tanto, hubo una disminución en la actividad proteolítica de estas enzimas causada por la presencia de la proteína recombinante. Para el caso de la evansaína, como de la peptidasa de 40 kDa, no se observó una disminución aparente del grosor de la banda en el zimograma (Figura 30; señalado con flechas solidas), indicando que no hubo una inhibición de la actividad proteolítica de estas enzimas. Esto confirma que la proteína recombinante obtenida es una proteína que posee actividad inhibitoria parcial sobre las cisteín peptidasas de *Trypanosoma evansi*.

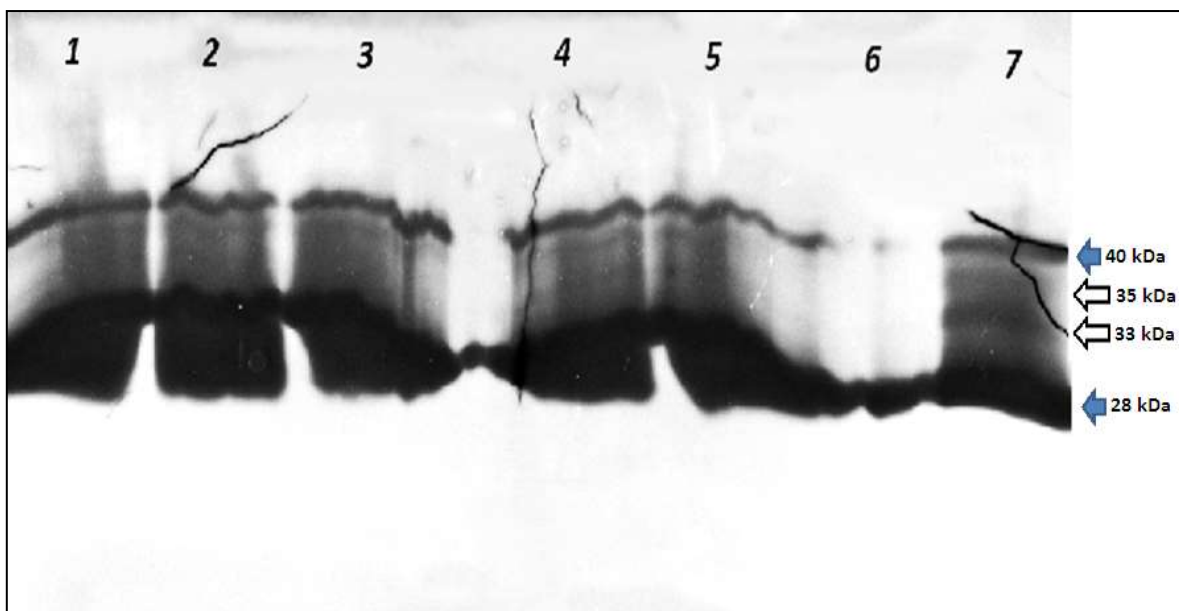


Figura 30. Imagen en negativo. Análisis del ensayo de inhibición de las cisteín peptidasas de *T. evansi* con la proteína recombinante (PR) a diferentes concentraciones. Zimografía al 12% m/v copolimerizado con gelatina al 1% m/v, teñido con azul de Coomassie. Carril PM: Marcador de peso molecular de proteínas Broad Range Protein Molecular Weight Markers (Promega). Carril 1: PR a 55 nM. Carril 2: PR a 100 nM. Carril 3: PR a 500 nM. Carril 4: PR a 1000 nM. Carril 5: PR a 5000 nM. Carril 6: Vacío. Carril 7: Control de la elución 5.

13. Análisis bioinformáticos.

Con base en la secuencia nucleotídica del gen que codifica para el ICP de *T. evansi*, cepa STIB805 (TritypDB Sequence ID: STIB805_Ch08), se realizó los siguientes análisis *in silico*.

13.1. Alineamiento de la secuencia nucleotídica que codifica par el ICP de *T. evansi*.

El diseño de los cebadores IEFTopo e ICP1.1 para la clonación de la secuencia nucleotídica del gen que codifica para el ICPte logro obtener la correcta cantidad de nucleótidos de 360 pb. Esta secuencia se corresponde con el marco abierto de lectura para el gen que codifica para el ICP de *T. brucei*, con una identidad del 98% y cobertura del 100% (Figura 31), a excepción de los últimos 6 nucleótidos, donde se encuentra el codón de terminación de

traducción del gen que codifica para el ICPte, el cual no fue incluido para poder añadir la etiqueta polihistidina que se encuentra aguas abajo en el vector pET101.

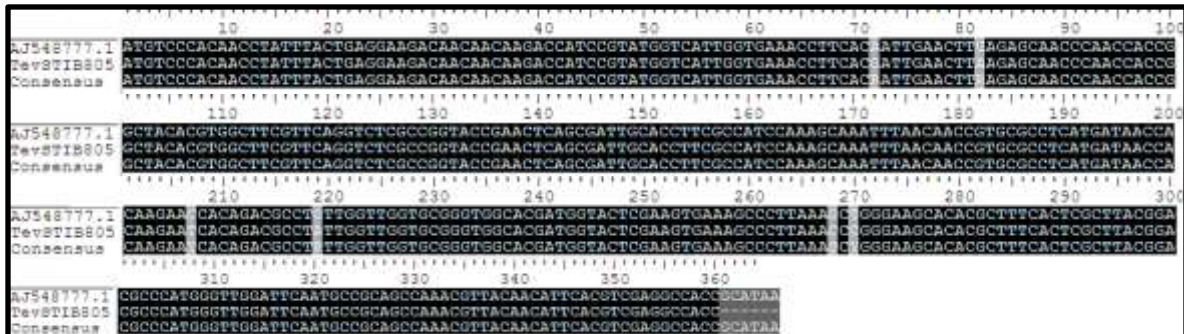


Figura 31. Alineamiento de la secuencia nucleotídica del gen que codifica para el ICP de *T. evansi* cepa STIB805 (TritypDB Sequence ID: STIB805_Ch08) con la secuencia del gen que codifica para el ICP reportado para *T. brucei* (GenBank ID: N° AJ548777.1) según programa BioEdit. Los nucleótidos idénticos están sombreados de negro, mientras que los nucleótidos diferentes están sombreados de gris.

13.2. Predicción de la estructura terciaria del ICP de *T. evansi*.

La traducción de la secuencia nucleotídica del gen que codifica para el ICPte dio como resultado una secuencia aminoacídica de 120 residuos con una masa molecular relativa de 13,38 kDa (<https://web.expasy.org/translate/>).

La estructura terciaria de la proteína ICPte predicha mediante el uso del programa Phyre2, disponible en <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index> (Figura 32, A) corresponde con lo reportado previamente para la chagasina (Figura 32, B) con un 99% de los residuos modelados con más de 90% de confianza. El modelo ICPte describe un plegamiento tipo sandwich inmunoglobulina gracias a 9 láminas β en comparación con las 8 láminas β de la chagasina. El modelo tridimensional presenta los lazos L2, L4 y L6 importantes para la interacción del inhibidor con la peptidasa diana (Salmon y col., 2006; da Silva y col., 2007; Wang y col., 2007). Casados-Vázquez y col. (2011) indicó que los lazos L4 y L6 son flexibles, mientras que el lazo L2 es fijo. La flexibilidad de los lazos L4 y L6

podría ser útil para la unión de estos inhibidores a la gran variedad de peptidasas que han sido reportadas. El programa también predijo dos pequeñas hélices 3_{10} que concuerdan con las descritas para la chagasina. Principalmente, predijo la hélice 3_{10} en el lazo L2 (Figura 32, A), la cual se inserta en el centro catalítico de la peptidasa diana y que contiene el motivo NPTTG que se sabe que es el responsable parcial de la actividad inhibitoria del ICP contra su peptidasa diana (Salmon y col., 2006; da Silva y col., 2007). Esta hélice 3_{10} se cree que estabiliza las estructuras de los residuos aminoacídicos cuando interactúan con la peptidasa diana (Wang y col., 2007).

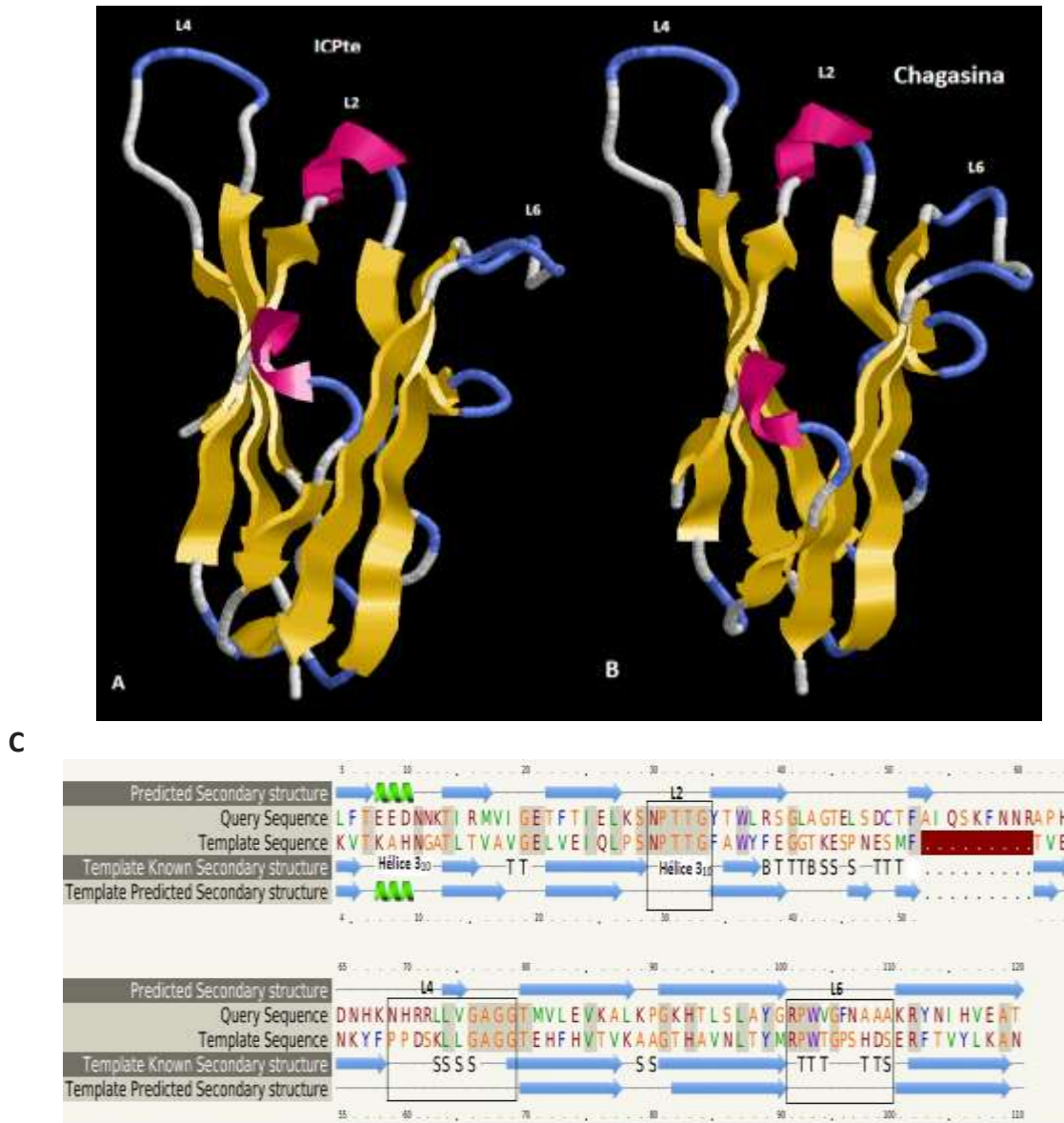


Figura 32. Modelo de la estructura secundaria y terciaria del ICPte mediante el uso del programa Phyre2. (A) Estructura tridimensional del ICPte con base en los dominios compartido de la secuencia de la chagasina. (B) Estructura cristalina de la chagasina (Código SCOP: d2nqda1). Se representan las láminas β con cintas flechadas color amarillo y las hélices 3_{10} con cintas color rosado. (C) Estructura secundaria del ICPte en comparación con la estructura secundaria conocida y predicha de la chagasina. Se representa las láminas β como flechas color celeste y las hélices como espirales color verde. Los dobleces o giro indicado por las letras B, T y S.

13.3. Predicción de la estructura terciaria del ICP recombinante de *T. evansi*.

La traducción de la secuencia nucleotídica del gen que codifica para el ICPte recombinante, gracias a la expresión del plásmido pET101+ICPte, dio como resultado una

secuencia aminoacídica de 152 residuos con una masa molecular relativa de 16,8 kDa (<https://web.expasy.org/translate/>). Con base en la secuencia aminoacídica de la proteína ICpte recombinante, se realizó la predicción de la estructura terciaria del ICpte predicha mediante el uso del programa Phyre2 (Figura 33) con un 95% de los residuos modelados con más de 90% de confianza. El modelo de la proteína ICpte recombinante también describe un plegamiento tipo sándwich inmunoglobulina gracias a 14 láminas β , 6 más que su contraparte natural (Figura 34). El modelo tridimensional también presenta los lazos L2, L4 y L6 importantes para la interacción del inhibidor con la peptidasa diana. La diferencia más radical del modelo se aprecia en el extremo C-terminal, donde se encuentra la etiqueta de polihistidina y epítipo V5. En el modelo de la proteína ICpte recombinante, la zona nueva del extremo C-terminal correspondiente a las etiquetas conferidas por el vector pET101, producen un giro que causa que la secuencia aminoacídica atraviese la totalidad de la proteína y, del otro lado de esta, se extienda más allá de la estructura principal. Allí se forma una horquilla reminiscente a un gancho (Figura 33, indicado con una flecha).

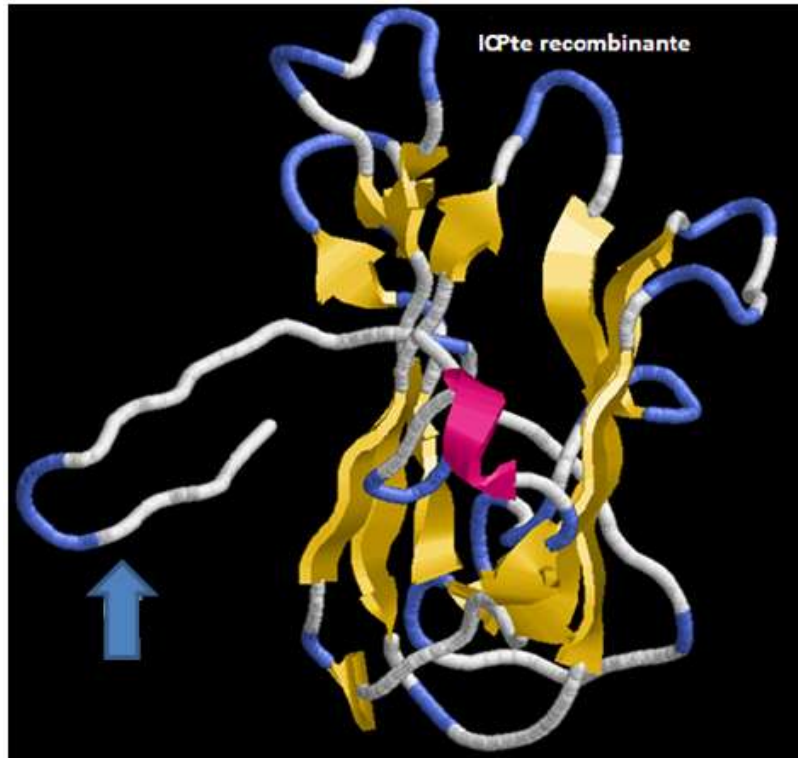


Figura 33. Modelo de la estructura terciaria del ICPte recombinante mediante el uso del programa Phyre2.

13.4. Predicción de epítopes lineales de la secuencia aminoacídica de la proteína ICP de *T. evansi*.

Utilizando el programa ABCpred, se obtuvo la predicción de epítopes lineales (http://crdd.osdd.net/raghava/abcpred/ABC_submission.html), a partir de las secuencias aminoacídicas del ICP de *T. vivax*, cepa Y486, e ICP de *T. evansi*, cepa STIB805. Los epítopes más probables a ser reconocidos por los anticuerpos están involucrados con los lazos L2, L4 y L6 de la secuencia del inhibidor de *T. vivax* (Tabla 12, A). Estos mismos epítopes fueron predichos por el programa para el ICPte con una certeza de más del 80% (Tabla 12, B).

Tabla 12. Análisis de predicción de epítopes lineales con el programa ABCpred. (A) Predicción de epítopes para la secuencia aminoacídica del ICP de *T. vivax* cepa Y486 (GenBank ID: CCC49998.1). (B) Predicción de epítopes para la secuencia aminoacídica del ICP *T. evansi* cepa STIB805 (TritrypDB Sequence ID: STIB805_Ch08). Los motivos conseguidos en los lazos L2, L4 y L6 están marcados en negrita.

**(A) *Trypanosoma vivax* ICP cepa Y486
(GenBank ID: CCC49998.1)**

Rank	Secuencia	% Predicción
1	GFTWIREGVKGSELS	87
2	SVAVGEAFHIDLQSNP	85
3	HNEPQKLTESDNAKTI	83
4	NRPWLAPSSAVKRYAI	82
5	AFHIDLQSN PTTG FTW	77

**(B) *Trypanosoma evansi* ICP cepa STIB 805
(TritrypDB Sequence ID: STIB805_Ch08)**

Rank	Secuencia	% Predicción
1	RMVIGETFTIELESNP	88
2	PTTGYTWLRSLAGTE	84
3	RLLV GAGG TMVLEKKA	82
4	HTLSLAY GRP WVGFNA	81
5	TFTIELES NP TTGYTW	80

VI. DISCUSIÓN

Preparaciones enriquecidas con una proteína específica son rara vez fáciles de obtener de la célula hospedadora natural. Por lo tanto, la producción de proteínas recombinantes es frecuentemente el único procedimiento aplicable (Sørensen y Mortensen, 2005). El uso de proteínas recombinantes ha sido ampliamente utilizado en el estudio de parásitos protozoarios debido a su utilidad y aplicabilidad en estudios de estructura y función, así como también en el desarrollo de diagnósticos (Reyes, 2014). *E. coli* facilita la expresión proteica gracias a su bien conocida genética. Su maquinaria ribosomal es un excepcional biosintetizador de proteínas recombinantes. Su simplicidad, cultivos rápidos de alta densidad y de poco costo y, una gran variedad de herramientas disponibles para la biotecnología como la variedad de plásmidos, etiquetas recombinantes y cepas mutantes, han mejorado las posibilidades con *E. coli* (Sørensen y Mortensen, 2005).

La publicación y acceso público del genoma de la cepa STIB805, de *T. evansi*, permitió el diseño de los cebadores IEFTopo e ICP1.1 para la clonación de la secuencia nucleotídica que codifica para el inhibidor de la cisteína peptidasa de *T. evansi* (ICPte), aislado TeAp-ElFrío01, en el vector de clonación-expresión pET101, partiendo de la secuencia putativa presente en el cromosoma 8 (TritypDB Sequence ID: STIB805_Chr08. Posición de nucleótidos: 1833667 a 1834032). La clonación de la secuencia nucleotídica de 360 pb del gen que codifica para el ICPte (figuras 16 y 19) es similar a los descritos por Monteiro y col., (2001) para la chagasia, donde lograron obtener una secuencia de 373 pb para el inhibidor de la cisteína peptidasa de *T. cruzi*. Reyes (2014) obtuvo un producto de amplificación de un tamaño de 363 pb correspondiente al gen que codifica para el ICP de

T. vivax, aislado LIEM-176. Este resultado se obtuvo a partir del diseño de cebadores respecto a la secuencia putativa en el cromosoma 8 del aislado africano de *T. vivax* Y486. Los resultados aquí presentados también confirmaron los obtenidos en un inicio por Pérez (2008) para la amplificación de la secuencia nucleotídica que codifica para el ICPte. El producto de PCR era de unos 340 pb, debido a que faltaban los primeros 40 nucleótidos del extremo 5' y se excedía por 20 nucleótidos en el extremo 3' del gen para coincidir completamente con el marco abierto de lectura del gen que codifica para el ICP de *T. brucei*, cepa TREU927 y cepa RPCI93. Con los cebadores IEFTopo e ICP1.1 se logró obtener la correcta cantidad de nucleótidos de 360 pb, para corresponder completamente con el marco abierto de lectura del gen que codifica para el ICP de *T. brucei*, con una identidad del 98% y una cobertura del 100% (Figura 31). Esto indica que, tanto el diseño de los cebadores, como la clonación por PCR del gen que codifica para el inhibidor de la cisteín peptidasa de *T. evansi*, aislado TeAp-ElFrío01, fueron exitosos.

La traducción de la secuencia nucleotídica que codifica para el ICPte evidenció una secuencia aminoacídica de 120 residuos con una masa molecular relativa de 13,38 kDa (<https://web.expasy.org/translate/>), similar a las reportadas para los ICP de *T. brucei*, *L. mexicanus*, *T. cruzi* y *T. vivax*, de 13,5; 13; 12 y 13,2 kDa, respectivamente (Monteiro y col., 2001; Pérez, 2008; Reyes, 2014), los cuales corresponden para un inhibidor de la familia de la cistatina, poseedores de un peso molecular aproximado de 13 kDa (Barret, 1987; Twining, 1994). La estructura de la proteína ICPte predicha mediante el uso del programa Phyre2 (Figura 32, A) corresponde con lo reportado previamente para la chagasina (Salmon y col., 2006; da Silva y col., 2007; Wang y col., 2007; Redzynia y col., 2009 y Costa

y Lima, 2016) y para el ICP de *T. vivax* (Reyes, 2014). Tanto en la alineación de la secuencia aminoacídica del ICPte con el de la chagasina, como la predicción de la estructura terciaria (Figura 32), se destaca en el ICPte la presencia de los tres motivos característicos de los inhibidores endógenos de cisteín peptidasas: los motivos NPTTG, GAGG y RPW. Estas secuencias han sido identificadas y reportadas para la estructura de la chagasina, dilucidada por Resonancia Magnética Nuclear (RMN), en la cual se describe los lazos L2 (NPTTG, L4 (GXGG) y L6 (RPW/F), correspondiente a los residuos 27-33, 59-69 y 91-100, respectivamente, de la chagasina (Salmon y col., 2006; da Silva y col., 2007; Wang y col., 2007; Redzynia y col., 2009 y Costa y Lima, 2016). Estos mismo motivos aminoacídicos fueron reportados para *L. major*, *L. mexicana* (Smith y col., 2006), *E. histolitica* (Casados-Vázquez y col., 2011), parásitos del genero *Plasmodium* (Lehmann y col., 2014) y por Reyes (2014) para el ICP de *T. vivax*, con la diferencia del motivo del lazo L4, en el cual el aminoácido alanina (A) es sustituido por un residuo de glutamina (Q). Esto indica la conservación a nivel funcional y estructural de estos inhibidores y la forma de interactuar con su peptidasa diana.

La selección de los clones positivo a través de la *Colony* PCR (Figura 18) no fue del todo exitosa debido a la inconsistencia de los resultados. Específicamente, de 16 colonias recombinantes solo 1 amplificó con el producto de PCR esperado y en otras dos colonias dieron productos con mayor tamaño del esperado. En contraste, en la PCR anidada (Figura 19) todas las colonias recombinantes analizadas dieron resultados positivos para el producto de PCR esperado. Con base en el hecho de que la PCR anidada si amplificara con las muestras utilizada en la *Colony* PCR, indica que la inconsistencia de la *Colony* PCR no es

debido a una falta de ADN molde en la mezcla de reacción. También influyó el uso de una enzima polimerasa GoTaq, para la *Colony* PCR, que presenta mayor tasa de error que la enzima polimerasa Platinum *Taq*, utilizado para la segunda ronda de PCR.

La causa más común de una PCR inespecífica se debe a una pobre estandarización del ensayo (Maniatis y col., 1989). Esto puede deberse a las siguientes razones: Condiciones subóptimas de la temperatura de hibridación y extensión, concentración errónea de los reactivos, contaminantes como proteínas y lípidos que en exceso inhiben la reacción, la adición de demasiado lisado celular que altera el balance iónico de la reacción y el tipo de polimerasa utilizada. Reyes (2014) aplicó el mismo programa de PCR descrito en este trabajo, obteniendo resultados favorables y consistentes. La única diferencia con respecto a este trabajo fue el origen del ADN molde empleado. En este trabajo el ADN molde se obtuvo de un lisado bacteriano total, mientras que Reyes (2014) lo obtuvo a partir de una extracción de plásmidos por lisis alcalina. Tanto Maniatis y col. (1989) como el manual “Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits Invitrogen” recomiendan un protocolo de lisado donde la colonia a analizar se deposite directamente en la mezcla de reacción de la PCR, que aún no contiene la *taq* polimerasa. Esta mezcla se hervirá por 10 minutos y una vez se estabilice a temperatura ambiente, agregar la *taq* polimerasa y realizar la PCR. De este modo, se debe considerar el método de obtención del ADN molde como una variable a tomar en cuenta. No se debe descartar los contaminantes como proteínas, lípidos de la membrana celular u otros residuos de las colonias lisadas ya que, aunque el lisado fue centrifugado, muchos de estos contaminantes son solubles y pudieron quedar cantidades en exceso en el sobrenadante donde se tomó la muestra.

La formación de productos quiméricos y heteroduplex surgen como consecuencia de la inespecificidad de la PCR (Sharifian, 2010). Estos productos son casi imposibles de evitar en las PCR (Qiu y col., 2010). Los heteroduplex se forman en los últimos ciclos de la reacción cuando la mayoría de los cebadores han sido utilizados y el producto amplificado está en mayor concentración. En estas condiciones, se forma la hibridación cruzada de secuencias heterólogas. Los productos quiméricos ocurren al inicio del ciclo de la PCR cuando el cebador está en mayor proporción respecto a la hebra molde. Cuando el cebador está unido a su hebra molde y la extensión comienza, una hebra complementaria se rehibrida con la hebra molde y desplaza el cebador extendido de forma incompleta. El cebador incompleto puede unirse a otra hebra molde o hebra extendida de forma incompleta y formar una molécula quimérica. Sharifian (2010) también indica que con el uso de cebadores universales que se unen a regiones altamente conservadas dentro del gen, como los cebadores T7 utilizados en este trabajo, podría generar problemas de hibridación entre los cebadores y las hebras moldes. Esto a su vez podría aumentar la probabilidad de formación de productos quimeras o heteroduplex.

Pérez (2008) también realizó una *Colony* PCR bajo las mismas condiciones que en este trabajo. Sin embargo, el programa de PCR presentó la particularidad de utilizar diferentes condiciones de temperatura, tiempos de hibridación y extensión. La hibridación fue a 50°C por 5 segundos y la extensión a 60°C por 4 minutos, mientras en este trabajo se empleó 58°C por 1 minutos para la hibridación y 72°C por 1 minutos para la extensión. Por consiguiente, también se debe estandarizar las condiciones de la PCR con base a la DNA polimerasa a utilizar. Qiu y col. (2010), a partir de 162 muestras, indicó que tiempos de

extensión a partir de 2 minutos hasta 4 disminuyeron la formación de estos artefactos de un 16,1 a 3,2%. Reporto una correlación positiva entre la formación de los artefactos y el número de ciclos de PCR. La cantidad de artefactos no varió mientras los ciclos de PCR eran menores a 20, mientras que estos aumentaron dramáticamente cuando los ciclos pasaron a ser más de 20. Los artefactos aumentaron de 13 a 20,8% cuando los ciclos aumentaron de 22 a 28, mientras que en este trabajo se realizó la PCR con 30 ciclos. También indicó que la frecuencia de quimeras es más alta que la formación de heteroduplex. En conclusión, para que esta técnica pueda generar resultados consistentes se debe estandarizar múltiples condiciones que están establecidas actualmente en este trabajo.

Otros de los aspectos considerados en este trabajo y el cual tienen una gran importancia, es el proceso de purificación de la proteína recombinante una vez que se ha realizado la inducción de su expresión. Hengen (1995) encontró proteínas de *E. coli* ricas en histidina que interfieren con el método de purificación al co-purificarse o competir con la proteína recombinante marcada con polihistidina. Una de estas proteínas es una con un dominio homólogo a la proteína de unión de humanos FK506 (codificada por los genes FKBP). Posee un alto número de histidinas (20 de los 196 aminoácidos) y se une fuertemente al níquel. Reyes (2014) realizó diferentes protocolos utilizando diferentes resinas (cobalto en vez de níquel), pero aun así se presentaba trazas de otras proteínas contaminantes que se observaron al eluir la proteína de interés. Resultados similares se observaron en la purificación que se realizó en este trabajo (Figura 26). Por lo tanto, una estandarización adecuada del procedimiento para cada proteína recombinante es necesaria, ya que en

este trabajo se evidenció que no siempre las condiciones estándar utilizadas en proteínas recombinantes funcionan a cabalidad, lo cual repercute en el rendimiento de la purificación, perdiendo muestras de la proteína recombinante de interés por contaminación con proteínas del hospedador.

En este trabajo, se utilizó un sistema de expresión bacteriano que permitió la identificación de una proteína recombinante en la fracción soluble (Figura 22), una vez que se indujo su expresión con IPTG. Lo particular fue que se obtuvo una banda alrededor de los 45 kDa, en comparación a los 16,8 kDa correspondientes a la predicción de la proteína recombinante con sus respectivas etiquetas recombinantes (Figura 33). Estos resultados discrepan con los obtenidos por Sanderson y col. (2003), que clonaron y expresaron los ICP de *Leishmania mexicana* y *Leishmania major*, utilizando también una extensión de polihistidina en el extremo N-terminal de la proteína recombinante clonada y expresada, posteriormente, por inducción con IPTG a 37°C por un tiempo de 4 horas. Las fracciones fueron eluidas de la columna Níquel-agarosa con altas concentraciones de Imidazol, bajo condiciones similares a las empleadas en nuestro estudio. Obtuvieron las proteínas recombinantes con las masas moleculares predichas de 13,5 y 13 kDa. Monteiro y col. (2001), Salmon y col. (2006), Dos Reis y col. (2008) y Redzynia y col. (2009) también lograron clonar la chagasina, con un tamaño reportado de 12 kDa y actividad inhibitoria contra la peptidasa diana, en células *E. coli* BL21 con diferentes tipos de vectores. La producción y cristalización de la chagasina realizada por da Silva y col. (2007) se realizó en *E. coli* a 37 °C e inducción de la proteína recombinante en 1 litro de medio de cultivo LB-kanamicina con IPTG a 16 °C durante toda la noche. Casados-Vázquez y col. (2011)

lograron clonar el ICP2 de *E. histolytica* con un tamaño de 13 kDa. En todos los casos descritos previamente, el ICP en cuestión fue expresado sin ningún inconveniente reportado y con los pesos moleculares predichos. El único caso con un inconveniente reportado durante la clonación de un ICP del género *Trypanosoma*, es el de Reyes (2014), en el cual durante el proceso de purificación de la proteína recombinante ICP de *T. vivax*, se obtuvo dos bandas predominantes. Una de 16 kDa, correspondiente al ICP en cuestión y, una banda de 48kDa, muy similar a la vista en este trabajo. Se indicó en primera instancia que la banda de 48 kDa podría corresponder a agregados (trímeros) de la banda de 16 kDa. Solo la banda de 16 kDa fue reconocida por el anticuerpo anti-polihistidina en el ensayo western blot. Esto difiere a lo reportado en este trabajo donde la banda, correspondiente a la proteína recombinante próxima a los 45 kDa, si fue reconocida por este anticuerpo. Además, los anticuerpos policlonales de conejo anti-ICP de *T. vivax*, obtenidos a partir de la hiperinmunización de conejos contra el ICPTv de Reyes (2014), también reconocieron a la proteína recombinante purificada, obtenida en este trabajo, sin la interferencia de otras proteínas de *E. coli* que puedan ser reconocidas por otros anticuerpo existente en el suero (Figura 28) y, con una señal más fuerte que la obtenida en los western blot con anticuerpo monoclonal de ratón anti-polihistidina. La predicción de epítopes realizada a las proteínas ICPTe e ICPTv (Tabla 12), muestran que los epítopes más probables a ser reconocidos por el sistema inmune del conejo son los que están dentro de los lazos L2, L4 y L6, secuencias aminoacídicas altamente conservadas en múltiples organismos parasíticos (Salmon y col., 2006; da Silva y col., 2007; Wang y col., 2007; Pérez, 2008; Redzynia y col., 2009; Costa y Lima, 2016). Por lo tanto, si este

anticuerpo reconoció a la proteína recombinante purificada, es debido a que presenta epítopes característicos de un ICP del género *Trypanosoma*, en específico, epítopes dentro de los lazos de unión del inhibidor con su peptidasa diana.

Con base a esta información se realizó los ensayos de inhibición para saber si efectivamente esta proteína recombinante posee actividad inhibitoria sobre las cisteín peptidasas de *T. evansi*, y por lo tanto, es el inhibidor de cisteín peptidasa de *T. evansi*. En primer lugar se purificó las cisteín peptidasas, empleando una resina de Bacitracina-Sepharosa, la cual ha sido ampliamente utilizada con cisteín y serín peptidasas (Van Noort y col., 1991). La purificación de las cisteín peptidasas de *T. evansi* constituyó el primer paso para su análisis con la proteína recombinante, a través de un método sencillo que aporta buenos resultados. El material purificado se analizó por zimografía, donde se apreció 4 bandas con masas moleculares próximas a los 28, 33, 35 y 40 kDa, la primera siendo la evansaína (Figura 29). Turcios (1996), Brems (1997), Fernández (1999), Machuca (2002) y Pérez (2008) han indicado este mismo patrón de bandas en la purificación de las cisteín peptidasas de *T. evansi* a través de la purificación por Bacitracina-Sepharosa, e indican que posiblemente las proteínas de mayor masa molecular que la evansaína representan pasos intermedios en el proceso de maduración de esta.

En el ensayo de inhibición de las cisteín peptidasas de *T. evansi* con la proteína recombinante (Figura 30), se observó la disminución del grosor de las bandas correspondiente a las cisteín peptidasas de 33 y 35 kDa (Figura 30; señalado con flechas huecas), para todas las concentraciones de la proteína recombinante ensayada, haciéndose más notorio este efecto en la concentración de 5000 nM, o 5 μ M, de la

proteína recombinante. Por lo tanto, esta disminución del grosor de las bandas implica una disminución en la actividad proteolítica de estas enzimas causada por la presencia de la proteína recombinante. Para el caso de la evansaína, como de la peptidasa de 40 kDa, no se observó una disminución aparente del grosor de la banda en el zimograma (Figura 30; señalado con flechas solidas), indicando que no hubo una disminución de la actividad proteolítica de estas enzimas por inhibición. Esto confirma que la proteína recombinante obtenida en este estudio, es una proteína que posee actividad inhibitoria parcial sobre las cisteín peptidasas de *Trypanosoma evansi*, el cual fue clonado a partir del gen que codifica para el ICP de *T. evansi*, cepa TeAp-ElFrío01. Como se explicó previamente, la actividad inhibitoria de estos inhibidores es totalmente dependiente de los motivos aminoacídicos altamente conservados y de la estructura terciaria de los lazos L2, L4 y L6 (Salmon y col., 2006; da Silva y col., 2007; Wang y col., 2007; Redzynia y col., 2009 y Costa y Lima, 2016). Por consiguiente, la proteína recombinante obtenida posee dichos motivos y lazos, confirmando la predicción de epítipo realizada (Tabla 12) y la razón de que el anticuerpo policlonal de conejo anti-ICP de *T. vivax* reconociera a esta.

Estos resultados son similares a los descritos por Brems (1997), donde indicó, en primer lugar, que las peptidasas de 28, 33 y 35 kDa son cisteín peptidasas, mientras que la de 40 kDa no lo es, explicando por qué en este estudio no se observó la inhibición de la peptidasa de 40 kDa por la proteína recombinante. En segundo lugar, demostró la inhibición de las peptidasas de 33 y 35 kDa de *T. evansi*, cepa TeAp-ElFrío01, con los inhibidores E-64 a una concentración de 10 μ M, IAA a 1 mM y leupeptina a 20 mM. Brems (1997) si observó inhibición para la peptidasa de 28 kDa con todos los inhibidores

utilizados, obteniendo mayor inhibición con E-64 y leupeptina. Yadav y col. (2011), logró inhibir las cisteín peptidasas de 33 y 35 kDa, utilizando una cepa de la India de *T. evansi*, con E-64 a concentraciones de 10-50 μ M. No observó inhibición aparente para la peptidasa de 28 kDa a estas concentraciones de E-64. Estos resultados indican que las peptidasas de 33 y 35 kDa son más susceptibles a la inhibición, bien sea por cualquier de los reconocidos inhibidores de cisteín peptidasa descrito previamente, así como de la proteína recombinante obtenida en este trabajo. Debido a que la peptidasa de 28 kDa es la que se encuentra en mayor proporción en *T. evansi*, se infiere que se necesita una mayor concentración del inhibidor para disminuir su actividad proteolítica. Esto explicaría los resultados variados con respecto a esta peptidasa, donde Brems (1997) necesitó 10 μ M de E-64, un inhibidor irreversible y comercial, para inhibir la evansaína, mientras que en este trabajo se utilizó hasta 5 μ M de la proteína recombinante obtenida. También se debe tener en cuenta que en los estudios de Brems (1997) y Yadav y col. (2011) lograron cuantificar la cantidad de peptidasas en la muestra y se realizó la inhibición en una proporción equimolar del inhibidor con las cisteín peptidasas estudiadas, mientras que en este estudio, debido al método de purificación utilizado, no se pudo cuantificar las peptidasas eluidas, ya que el isopropanol utilizado en la elución interfiere con la medición de la absorbancia a 280 nm, por lo que la inhibición se realizó variando únicamente la concentración de la proteína recombinante y con valores desconocidos de peptidasas sembradas. Los ensayos de inhibición con la chagasina recombinante reportados por Monteiro y col. (2001) y Santos y col. (2004), fueron realizados con el parásito completo y no las peptidasas purificadas, por lo cual hay que tener en cuenta alguna condición

fisiológica, aún desconocida, presente en el parásito que permiten que las peptidasas funcionen a toda su capacidad y de manera predecible. Un ejemplo de ello es el descrito por Brems (1997) y Yadav y col. (2011) en sus estudios, donde indicaron que la actividad enzimática *in vitro* de las cisteín peptidasas de *T. evansi*, aumentó en la presencia de agentes reductores como el β -mercaptoetanol o DTT, condición que no se ha visto en ningún otro tipo de peptidasa. Esto sería otra variable a tener en consideración del por qué en el ensayo de inhibición de este trabajo como en el de Yadav y col. (2011), la evansaína no se inhibió por el inhibidor ensayado. Los resultados de este trabajo también son similares a los descritos por Pérez (2008), donde se realizó un ensayo de inhibición de la evansaina por el ICpte purificado a partir de extractos de parásitos, donde se observó que la banda correspondiente a la evansaína no se alteró bajo la presencia del inhibidor, pero si se observó la aparición de bandas de mayor tamaño, con masas moleculares de 35 y 33 kDa. Esto indicaría que en el ensayo de inhibición de este trabajo, se inhibió a posibles precursores de la evansaína, que son más susceptibles a la inhibición, y que el inhibidor de estas peptidasas tiene un rol preponderante en la autorregulación de estas peptidasas, al disminuir el auto procesamiento de los intermediarios.

Está bien establecido que los altos niveles de expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* pueden resultar en la formación de agregados insolubles conocidos como cuerpos de inclusión (Thomas y Baneyx, 1996; Schlieker y col., 2002; Fruitós y col., 2005). Las chaperonas moleculares son una clase de proteínas que juegan un rol esencial en el plegamiento de las proteínas al ayudar a otros polipéptidos a llegar a su conformación tridimensional nativa o localización celular, sin ser parte de la estructura final (Thomas y

Baneyx, 1996), al unirse a la proteína no nativa en sus superficies hidrofóbicas expuestas y por consiguiente, estabilizándola en contra de agregados (Schlieker y col., 2002). Se ha indicado que cuando la célula está sometida a condiciones estresante, como la sobreexpresión de una proteína recombinante por inducción con IPTG, estas moléculas chaperonas no dan abasto para la gran cantidad de proteína recombinante sintetizada y las ultimas se agregan (Thomas y Baneyx, 1996; Schlieker y col., 2002; Fruitós y col., 2005; Sørensen y Mortensen, 2005). En *E. coli*, dos sistemas de chaperonas moleculares, DnaK-DnaJ-GrpE y GroEL-GroES, han sido extensamente estudiadas. Se propone que DnaK y sus cofactores, DnaJ y GrpE, interactúan con proteínas recién sintetizadas y facilitan su correcto plegamiento o, median la transferencia a las chaperonas GroEL-GroES si esta es muy grande para el sistema DnaK (Thomas y Baneyx, 1996; Schlieker y col., 2002; Sørensen y Mortensen, 2005). La sobreproducción de cualquiera de los componentes de las chaperonas DnaK-DnaJ-GrpE o GroEL-GroES ha mostrado mejorar la solubilidad citoplasmática y/o secreción de una gran numero de proteínas recombinantes agregadas en *E. coli* (Thomas y Baneyx, 1996; Sørensen y Mortensen, 2005). Todos estos reportes derivan de estudios donde se utilizó las cepas *E. coli* MC4100 y BL21 con sus mutantes *recA* (estabiliza secuencias repetitivas en el plásmido diana), *trxB/gor* (mejora la formación de puentes de disulfuro en el citoplasma), *rne131* (codifica una RNAasa E mutada que no puede degradar mRNA, estabilizando estos últimos en la expresión) y *pLysS* (cepa que posee el plásmido *pLysS* que reduce la expresión basal de la proteína de interés). Estas cepas son consideradas las mejores para la expresión de proteínas heterólogas. En el estudio presente se utilizó la cepa *E. coli* BL21 *rne131*, por lo que existe una posibilidad

que la proteína recombinante se haya agregado durante su expresión. Hasta la fecha, no hay una correlación que establezca la propensión a agregarse *in vivo* y a la secuencia aminoacídica de una proteína. Aunque la creencia común es que las proteínas en cuerpos de inclusión son biológicamente inactivas e insolubles, como los amiloides (Sørensen y Mortensen, 2005), reportes independientes han indicado actividad enzimática asociada a enzimas recombinantes formando cuerpos de inclusión (García-Fruitós y col., 2005) y, Thomas y Baneyx (1996) observaron que la proteína recombinante utilizada en su estudio realmente no formaba agregados insolubles, sino más bien consistía en monómeros de la proteína recombinante oligomerizados. Esta información respalda lo observado en este trabajo, donde la proteína recombinante se consiguió en la fracción soluble del lisado bacteriano.

García-Fruitós y col. (2005) en su estudio observaron similar actividad enzimática tanto en la fracción soluble como en la forma agregada de las enzimas estudiadas. Estos resultados fueron explicados a través de la presencia de proteínas con estructura nativa, o similar a la nativa, en los cuerpos de inclusión. Micro-agregados solubles también fueron descritos y caracterizados en detalle. También observaron proteínas correctamente plegadas y activas biológicamente formando cuerpos de inclusión. Estos resultados indican que no es un hecho anecdótico y que por lo tanto, los agregados formados por proteínas recombinantes en bacterias no inactivan necesariamente a estas. Con base en esta información, se podría establecer la hipótesis que la proteína recombinante de este trabajo se expresó de manera exitosa, pero debido al estrés a la que fue sometida la bacteria *E. coli* BL21 durante la inducción, la proteína recombinante se agregó en los

denominados cuerpos de inclusión. Esto también explicaría del por qué esta se consiguió en la fracción soluble de la bacteria. Villaverde y Carrió (2003) indican que estos agregados ocurren como un proceso reversible integrado profundamente en los mecanismos de la bacteria para tolerar el estrés a los que se somete durante la expresión y, guardar polipéptidos parcial o totalmente plegados hasta que puedan ser procesados por la célula. Para solucionar este problema, Bondos y Bicknell (2003) utilizaron una gran variedad de solventes que han sido identificados que pueden facilitar el plegamiento correcto de las proteínas y su solubilidad a través de la desestabilización de los agregados o, mejorando la estabilidad de la proteína nativa. Algunos ejemplos utilizados fueron: bajas concentraciones de solventes cargados y especies caotrópicas (CaCl_2 , MgCl_2 , LiCl , RbCl , Urea) que atenúan interacciones entre proteínas que ocurre en los agregados. Las especies como MgSO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Na_2SO_4 , Cs_2SO_4 y, azúcares (sacarosa, glucosa, lactosa) que estabilizan las proteínas evitando los agregados. En este trabajo se utilizó el detergente aniónico SDS, sonicación y temperaturas desnaturizantes con diferentes tiempos de exposición, más la proteína alrededor a los 45 kDa se mantuvo inalterada en los geles SDS-PAGE. En los casos de cuerpos de inclusión sumamente difíciles de disgregar, se recomienda la utilización de la Urea como solvente.

Una de las particularidades del vector de clonación-expresión pET101 es que la etiqueta de polihistidina se encuentra en el extremo C-terminal y esta no puede ser removida por una endopeptidasa como los vectores pET100 y pET102, que poseen la etiqueta en el extremo N-terminal y son eliminadas por la enteropeptidasa bovina. Por lo que es natural preguntarse si esta particularidad del vector podría afectar también la solubilidad,

estructura, y por ende su función, de la proteína recombinante. Una de las discusiones constantes es el posible efecto de estas etiquetas sobre la proteína recombinante y si el lugar de colocación (N-terminal o C-terminal) en la proteína es de importancia (Woestenenk y col., 2004). Wu y Filutowicz (1999) demostraron que la presencia de la etiqueta de polihistidina altera las propiedades de dimerización/oligomerización de dos proteínas recombinantes estudiadas. Encontraron que la proteína recombinante dimerizaba, mientras la proteína control (proteína natural) se encontraba en forma monomérica, como previos estudios indicaban. Busso y col. (2003) en su estudio expresaron 24 proteínas con etiquetas polihistidina N-terminal y C-terminal, donde encontraron que la etiqueta afecta la solubilidad de algunas proteínas. En específico, las etiquetas N-terminal alteraron menos la solubilidad de la proteína. Woestenenk y col. (2004) confirmó los resultados de Busso y col. (2003), al observar que las etiquetas C-terminal tuvieron un efecto negativo, más frecuentemente, sobre la solubilidad de las proteínas que su contraparte N-terminal. Reyes (2014), al expresar la ICptv recombinante, utilizó una etiqueta N-terminal, provista por el plásmido pET100. Salmon y col. (2006), Dos Reis y col. (2008) y Redzynia y col. (2009) que lograron clonar la chagasina con el tamaño esperado de 12 kDa, utilizaron etiquetas N-terminal, las cuales fueron removidas una vez purificada la proteína. Por lo tanto, no hay un estudio reportado comparable respecto al presentado aquí, con el cual indicar si la presencia de la etiqueta en el extremo C-terminal afecte la solubilidad o propiedades de oligomerización de la proteína en cuestión. Para esto se recomienda la clonación y expresión del ICpte con un plásmido que provea la etiqueta de polihistidina en el extremo N-terminal o, un plásmido que provea la etiqueta

en el extremo C-terminal con un sitio reconocible por una endopeptidasa, y observar el comportamiento de la proteína recombinante durante su expresión.

Carson y col. (2007) realizaron el estudio de estructura cristalina de proteínas con y sin la etiqueta de polihistidina, donde observaron que estas etiquetas generalmente no tienen un efecto significativo en la estructura de la proteína nativa. Mason y col. (2002) indicaron en su trabajo que la etiqueta de polihistidina, tanto en el extremo N-terminal y C-terminal, no presentan un efecto aparente en la actividad de la proteína estudiada con respecto a su contraparte natural. Por consiguiente, proteínas que contenga esta etiqueta de histidina podrían variar con respecto a su fenotipo salvaje en las propiedades de dimerización/oligomerización, mas no en su estructura y función. Esta información discrepa con la información provista por los análisis *in silico*. Aunque es cierto que la proteína recombinante mantuvo su estructura terciaria tipo inmunoglobulina (Figura 33) observada también en su forma natural (Figura 32), se observó ciertas diferencias como la que se aprecia en el extremo C-terminal. Allí, la zona nueva del extremo C-terminal correspondiente a las etiquetas conferidas por el vector pET101, se produce un giro que causa que la secuencia aminoacídica atraviese la totalidad de la proteína y, del otro lado de esta, se extienda más allá de la estructura principal, donde se forma una horquilla reminiscente a un gancho (Figura 33, indicado con una flecha). Esto concuerda con lo descrito por Carson y col. (2007), donde menciona que del total de proteínas con cola de polihistidina estudiadas, un tercio de las etiquetas se acomodan en contra de la estructura nativa de la proteína, mientras que el resto se extiende hacia la región solvente, alejándose de la estructura principal. Con base a la forma tipo gancho de la etiqueta de

polihistidina observada en la proteína recombinante (Figura 33), se podría especular que esta etiqueta podría interactuar con otras etiquetas a través de contactos entre grupos polares y aromáticos, ya que el aminoácido histidina (pKa de 6,5) posee un residuo cargado positivamente a pH fisiológico constituido por un anillo aromático (imidazol). Carson y col. (2007) indican este caso, donde las etiquetas de las proteínas estudiadas interactúan con moléculas con una simetría parecida a través de interacciones no covalentes. Además, la estructura compacta tipo sándwich observada en la forma natural y en la chagasina, se pierde en la forma recombinante (Figura 33). Esto podría implicar zonas hidrofóbicas que se encuentran expuestas y promuevan que la proteína recombinante se agregue a través de interacciones hidrofóbicas.

Liu (2015) indica que la oligomerización de proteínas puede ocurrir de manera natural sin enlaces covalentes, a través de interacciones electrostáticas o hidrofóbicas, enlaces de hidrógenos o como una consecuencia del aumento de la concentración local del monómero. El caso más atípico de oligomerización del ICPte recombinante que pudo ocurrir es el propuesto a través de enlaces covalentes con base a que el ICPte tiene un plegamiento tipo inmunoglobulina. El ejemplo más conocido de oligomerización por puentes de disulfuros es el representado por los anticuerpos como las inmunoglobulinas M y A, el cual pueden formar dímeros, trímero y tetrameros (Liu, 2015).

Para indicar la posibilidad de que efectivamente la proteína recombinante se oligomerizó, se realizó la predicción *in silico* de oligómeros con base en la secuencia aminoacídica del ICPte recombinante, a través del paquete de programas GalaxyWeb (Shin y col., 2014), disponible en línea (<http://galaxy.seoklab.org/index.html>). El servidor en línea predijo tres

modelos de oligomerización de la proteína recombinantes (Figura 34, panel inferior). En el panel superior de la figura 34 se observa el modelo 3 predicho por este programa con un 80% de probabilidad. Este modelo es un dímero del ICPte recombinante el cual presentó la región de los lazos L2, L4 y L6 expuestos de tal forma que le permite interactuar con la peptidasa diana, como se observó en los ensayos de inhibición (Figura 30). Los modelos 1 y 2, que son tetrámeros de la proteína recombinantes, interactúan justamente por la región de los lazos. Esto imposibilitaría la interacción con la peptidasa diana, a pesar de obtener una probabilidad más alta. Por lo tanto se indica que la proteína recombinante obtenida en este estudio es de hecho una proteína con actividad inhibidor de cisteín peptidasa clonado a partir del gen que codifica para el ICP de *T. evansi*, cepa TeAp-ElFrío01, y que lo más probable es que se haya oligomerizado durante su expresión, por lo cual se ve un patrón de banda con un tamaño mayor al esperado en la cinética de inducción (Figura 22) y en la cinética de purificación (Figura 26). Debido a que la actividad inhibitoria de estas proteínas es dependiente de la estructura terciaria de los lazos L2, L4 y L6 (Salmon y col., 2006; da Silva y col., 2007; Wang y col., 2007; Redzynia y col., 2009 y Costa y Lima, 2016), los monómeros de la proteína recombinante que forman los agregados proteicos, deben presentar una estructura nativa, o muy similar a esta, donde los lazos L2, L4 y L6 estén expuestos para interactuar con la peptidasa diana. Esto le permite insertarse en la hendidura del sitio catalítico de la peptidasa diana, inhibiendo a esta. Esto confirma los resultados de Thomas y Baneyx (1996) y García-Fruitós y col. (2005) que indican la existencia de microagregados proteicos solubles, donde los monómeros de proteínas que las conforman están en una conformación nativa.

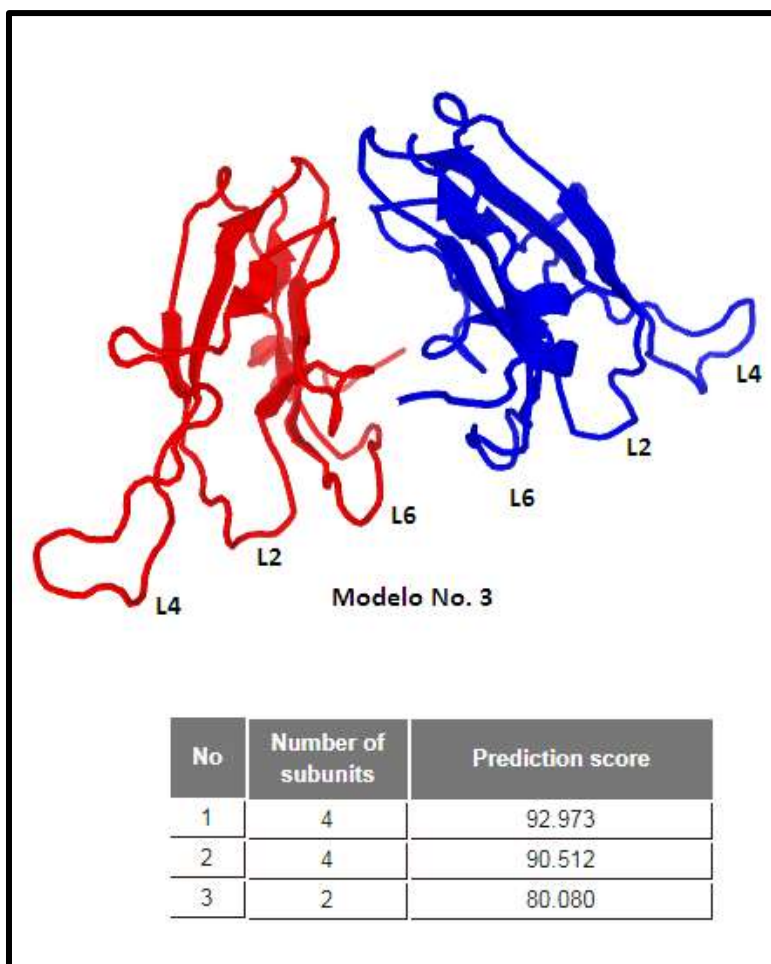


Figura 34. Predicción de oligómeros de la proteína ICPte recombinante mediante el uso del programa GalaxyWeb.

VII. CONCLUSIONES

1. Se amplificó un fragmento de aproximadamente 360 pb, correspondiente con el gen que codifica para el inhibidor de cisteín peptidasa (ICP) de *Trypanosoma evansi*, aislado TeAp-ElFrío01, a una temperatura de hibridación óptima de 56,5 °C.
2. La proteína recombinante, purificada mediante cromatografía de afinidad, se expresó como un agregado proteico soluble de un tamaño próximo a los 45 kDa en un tiempo de inducción óptimo de 3 horas, la cual fue reconocida por el anticuerpo monoclonal de ratón anti-polihisitidina y presento reactividad cruzada con el anticuerpo policlonal de conejo anti-ICP de *Trypanosoma vivax*.
3. La proteína recombinante inhibió parcialmente las cisteín peptidasas con pesos moleculares de 33 y 35 kDa provenientes de *Trypanosoma evansi*, aislado TeAp-ElFrío01, a una concentración de 5 μ M.
4. La predicción de la estructura terciaria de la proteína recombinante, a través del programa en línea Phyre2, muestran la presencia de los lazos L2, L4 y L6 importantes para la actividad inhibitoria y, que las etiquetas recombinantes, presentes en el extremo C-terminal, pudieran alterar la estructura nativa del inhibidor de cisteín peptidasa de *Trypanosoma evansi*, aislado TeAp-ElFrío01.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Repetir los ensayos de inducción a mini escala con el propósito de lisar las células con urea y ver si el agregado proteico propuesto para la proteína recombinante es deshecho.
2. Repetir la purificación de las cisteín peptidasas utilizando una columna de Concanavalina A-Sepharosa con el propósito de poder cuantificar la cantidad de peptidasas en la muestra.
3. Repetir los ensayos de inhibición utilizando concentraciones más acorde a estudios previos de la proteína recombinante ICP de *T. evansi*, y teniendo en cuenta la cantidad de peptidasas en la muestra con el propósito de poder visualizar inhibición en todas las peptidasas.
4. Realizar ensayos de inhibición con otras cisteín peptidasas tipo papaína y ver si la proteína recombinante ICP de *T. evansi* tiene efecto inhibitorio en ellas.
5. Secuenciar el plásmido pET101 ligado con el producto de PCR del gen que codifica para el inhibidor de cisteín peptidasa de *T. evansi*.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Lane, C. E., Lukes, J., Bass, D., Bowser, S. S., Brown, M. W. y colaboradores (2012). The revised classification of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. **59(5)**: 429-514.
- Barret, A. J. (1987). The cystatins: a new class of peptidase inhibitors. *Trends in Biochemical Sciences*. **12**: 193-196.
- Barrett, A. J. (1987). The cystatins: a new class of peptidase inhibitors. *Trends in Biochemical Sciences*. **12**: 193-196.
- Birmboim, H. C., Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*. **7 (6)**.
- Bondos, S. E., Bicknell, A. (2003). Detection and prevention of protein aggregation before, during, and after purification. *Analytical biochemistry*. **316(2)**: 223-231.
- Borst, P., Fase-Fowler, F., Gibson, W. C. (1987). Kinetoplast DNA of *Trypanosoma evansi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **23**: 31-38.
- Bowen, D. J., Keeney, S. (2003). Unleashing the long-distance pcr for detection of the intron 22 inversion of the factor VIII gene in severe haemophilia A. *Thrombosis and Haemostasis*. **89 (1)**: 201-202.
- Bremo, A. (1997). Identificación y caracterización de proteasas presentes en un aislado venezolano de *Trypanosoma evansi* (cepa Apure). Tesis Maestría. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Brun, R., Hecker, H., Lun, Z. R. (1998). *T. evansi* and *T. equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). *Vet Parasitol*. **79(2)**: 95-107.
- Busso, D., Kim, R., Kim, S. H. (2003). Expression of soluble recombinant proteins in a cell-free system using a 96-well format. *Journal of biochemical and biophysical methods*. **55(3)**: 233-240.
- Carnes, J., Anupama. A., Balmer. O., Jackson. A., Lewis. M., Brown. R., Cestari. I. y colaboradores. (2015). Genome and phylogenetic analyses of *Trypanosoma evansi* reveal extensive similarity to *T. brucei* and multiple independent origins for dyskinetoplasty. *PLoS Negl Trop Dis*. **9(1)**: 34-04.
- Carson, M., Johnson, D. H., McDonald, H., Brouillette, C., DeLucas, L. J. (2007). His-tag impact on structure. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. **63(3)**: 295-301.
- Casados-Vázquez, L. E., Lara-González, S., Brieba, L. G. (2011). Crystal structure of the cysteine protease inhibitor 2 from *Entamoeba histolytica*: functional convergence of a common protein fold. *Gene*. **471(1-2)**: 45-52.
- Cazzulo, J. J. J., Franke de Cazzulo, B. (1990). *Biochim. Biophys*. **1037**: 186-191.
- Costa, T. F., Lima, A. P. C. (2016). Natural cysteine protease inhibitors in protozoa: Fifteen years of the chagasin family. *Biochimie*. **122**: 197-207.
- da Silva, A. A. F., de Carvalho Vieira, L., Krieger, M. A., Goldenberg, S., Zanchin, N. I. T., Guimarães, B. G. (2007). Crystal structure of chagasin, the endogenous cysteine-protease inhibitor from *Trypanosoma cruzi*. *Journal of structural biology*. **157(2)**: 416-423.

- Desquesnes, M. (2004). Livestock Trypanosomoses and their Vectors in Latin America. OIE (World organisation for animal health). Paris, Francia.
- Desquesnes, M., Dargantes, A., Lai, D., Lun, Z., Holzmuller, P., Jittapalapong, S. (2013b). *Trypanosoma evansi* and Surra: A Review and Perspectives on Transmission, Epidemiology and Control, Impact, and Zoonotic Aspects. *BioMed Research International*. **2013**: 20.
- Desquesnes, M., Bengaly, Z., Millogo, L., Meme, Y., Sakande, H. (2001b). The analysis of the cross-reactions occurring in antibody-ELISA for the detection of trypanosomes can improve identification of the parasite species involved. *Ann. Trop. Med. Parasitol*. **95** (2): 141-155.
- Desquesnes, M., Biteau-Coroller, F., Bouyer, J., Dia, M. L., Foil, L. (2009). Development of a mathematical model for mechanical transmission of trypanosomes and other pathogens of cattle transmitted by tabanids. *International Journal fo Parasitology*. **39**(3): 333–346.
- Desquesnes, M., Holzmuller, P., Lai, D., Dargantes, A., Lun, Z., Jittapalapong, S. (2013a). *Trypanosoma evansi* and Surra: A Review and Perspectives on Origin, History, Distribution, Taxonomy, Morphology, Hosts, and Pathogenic Effects. *BioMed Research International*. **2013**: 22.
- Desquesnes, M., McLaughlin, G., Zoungrana, A., Dávila, A. (2001a). Detection and identification of *Trypanosoma* of African livestock through a single PCR based on internal transcribed spacer 1 of rDNA. *Int. J. Parasitol*. **31**: 610-614.
- Donelson, J. E., Turner, M. J. (1985). How the trypanosome changes its coat. *Scientific American*. **252**(2): 44-51.
- Dos Reis, F. C., Smith, B. O., Santos, C. C., Costa, T. F., Scharfstein, J., Coombs, G. H., Lima, A. P. C. (2008). The role of conserved residues of chagasin in the inhibition of cysteine peptidases. *FEBS letters*. **582**(4): 485-490.
- Fernández, C. I. (1999). Análisis de la antigenicidad de la cisteín-proteasa p28 de *Trypanosoma evansi*. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Simon Bolivar. Caracas, Venezuela.
- Garcia, K. C., Degano, M., Pease, L. R., Huang, M., Peterson, P. A., Teyton, L., Wilson, I. A. (1998). Structural basis of plasticity in T cell receptor recognition of a self peptide-MHC antigen. *Science*. **279**(5354): 1166-1172.
- García-Fruitós, E., González-Montalbán, N., Morell, M., Vera, A., Ferraz, R. M., Arís, A., Villaverde, A. (2005). Aggregation as bacterial inclusion bodies does not imply inactivation of enzymes and fluorescent proteins. *Microbial cell factories*. **4**(1): 27.
- Glasel J. (1995). Validity of nucleic acid purities monitored by 260/280 absorbance ratios. *BioTechniques*. **18** (1): 62–63.
- Hall, T. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser*. **41**:95-98.
- Harlow, E. Lane, D. (1988). Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. *Basic Microbiol*.
- Healey, A., Furtado, A., Cooper, T., Henry, R. J. (2014). Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. *Plant methods*. **10**(1): 21.

- Hengen, P. N. (1995). Purification of His-Tag fusion proteins from *Escherichia coli*. *Trends in biochemical sciences*. **20(7)**: 285-286.
- Herrera, H. M., Rocha, F. L., Lisboa, C. V., Rademaker, V., Maurão, G. M., Jansen, A. M. (2011). Food web connections and the transmission of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) in the Pantanal Region, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. **105(2011)**: 380–387.
- Hoare, C. A. (1972). *The Trypanosomes of Mammals: A Zoological Monograph*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- Holzmueller, P., Grébaud, P., Peltier, J. B., Brizard, J. P., Perrone, T., Gonzatti, Cuny, G. (2008). Secretome of animal trypanosomes: From a standard method toward new diagnostic and therapeutic targets. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **1149(1)**: 337-342.
- Hörchner, F., Schönefeld, A., Wüst, B. (1983). Experimental infection of horses with *Trypanosoma evansi*. I. Parasitological and clinical results. *Annales de la Société belge de médecine tropicale*. **63(2)**: 127-135.
- Ish-Horowicz, D., & Burke, J. F. (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Research*. **9(13)**: 2989-2898.
- Ishido, T., Ishikawa, M., Hirano, K. (2010). Analysis of supercoiled DNA by agarose gel electrophoresis using low-conducting sodium threonine medium. *Analytical biochemistry*. **400(1)**: 148-150.
- Jensen, E., Simpson, L., Englund, P. T. (2008). What happens when *Trypanosoma brucei* leaves Africa. *Trends in Parasitology*. **24(10)**: 428–431.
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., Sternberg, M. J. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature protocols*. **10(6)**: 845.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227(5259)**: 680.
- Lai, D., Hashimi, H., Lun, Z., Ayala, F. J., Lukes, J. (2008). Adaptations of *Trypanosoma brucei* to gradual loss of kinetoplast DNA: *Trypanosoma equiperdum* and *Trypanosoma evansi* are petite mutants of *T. brucei*. *PNAS*. **105(6)**: 1999–2004.
- Lanham, S. M., Godfrey, D. G. (1970). Isolation of Salivarian Trypanosomes from Man and Other Mammals using DEAE-Cellulose. *Experimental Parasitology*. **28**: 521-534.
- Lantz, M. S., Ciborowski, P. (1994). Zymographic techniques for detection and characterization of microbial proteases. *Methods in enzymology*. **235**: 563-594.
- Lehmann, C., Heitmann, A., Mishra, S., Burda, P. C., Singer, M., Prado, M., Stanway, R. (2014). A cysteine protease inhibitor of plasmodium berghei is essential for exoerythrocytic development. *PLoS pathogens*. **10(8)**.
- Linssen, B., Kinney, R. M., Aguilar, P., Russell, K. L., Watts, D. M., Kaaden, O. R., Pfeffer, M. (2000). Development of reverse transcription-PCR assays specific for detection of equine encephalitis viruses. *Journal of clinical microbiology*. **38(4)**: 1527-1535.
- Liu, S. (2015). A review on protein oligomerization process. *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing*. **16(13)**: 2731-2760.

- Machuca, C. M. (2002). Síntesis de derivados de fenotiazin-4-ona como posibles inhibidores de cisteína proteasas del *Trypanosoma evansi*. Tesis de Licenciatura en Química. Universidad Simón Bolívar. Caracas, Venezuela.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. Sambrook, M.D. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Tercera Edición, Cold Spring Harbor, New York.
- Mason, A. B., He, Q. Y., Halbrooks, P. J., Everse, S. J., Gumerov, D. R., Kaltashov, I. A., MacGillivray, R. T. (2002). Differential effect of a His tag at the N-and C-termini: functional studies with recombinant human serum transferrin. *Biochemistry*. **41(30)**: 9448-9454.
- McKerrow, J. H. (2018). The diverse roles of cysteine proteases in parasites and their suitability as drug targets. *PLoS neglected tropical diseases*. **12(8)**
- McKerrow, J. H., Sun, E., Rosenthal, P. J., Bouvier, J. (1993). The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Annual review of microbiology*. **47(1)**: 821-853.
- McKerrow, J., Rosenthal, P., Swenerton, R., Doyle, P. (2008). Development of protease inhibitors for protozoan infections. *National Institute of Health*. **21 (6)**: 668–672.
- Monteiro, A. C. S., Abrahamson, M., Lima, A. P. C. A., Vannier-Santos, M. A., Scharfstein, J. (2001). Identification, characterization and localization of chagasin, a tight-binding cysteine protease inhibitor in *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Cell Science*. **114**: 3933-3942.
- Monteiro, A. C., Abrahamson, M., Lima, A. P., Vannier-Santos, M. A., Scharfstein, J. (2001). Identification, characterization and localization of chagasin, a tight-binding cysteine protease inhibitor in *Trypanosoma cruzi*. *Journal of cell science*. **114(21)**: 3933-3942.
- North, M. J. (1992). The characteristics of cysteine proteinases of parasitic protozoa. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*. **373(2)**: 401-406.
- North, M. J., Mottram, J. C., Coombs, G. H. (1990). Cysteine proteinases of parasitic protozoa. *Parasitology Today*. **6(8)**: 270-275.
- Orskov, I., Orskov, F., Jann, B., Jann, K. (1977). Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. *Bacteriological reviews*. **41(3)**: 667.
- Pérez, Y. G. (2008). Producción de Evansina Recombinante Caracterización Inmunológica e Identificación de su Inhibidor. Tesis Doctoral en Ciencias Biológicas. Universidad Simón Bolívar. Caracas, Venezuela.
- Perrone, T. M., Gonzatti, M. I., Villamizar, G., Escalante, A., Aso, P. M. (2009). Molecular profiles of Venezuelan isolates of *Trypanosoma* spp. by random amplified polymorphic DNA method. *Veterinary Parasitology*. **161**: 194-200.
- Qiu, X., Wu, L., Huang, H., McDonel, P. E., Palumbo, A. V., Tiedje, J. M., Ramírez-Iglesias, J. R., Eleizalde, M. C., Reyna-Bello, A., Mendoza, M. (2016). Molecular diagnosis of cattle trypanosomes in Venezuela: evidences of *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma vivax* infections. *J Parasit Dis*. **41(2)**: 450-458.
- Rawlings, N. D., Barrett, A. J. (1993). Evolutionary families of peptidases. *Biochem. J*. **290**: 205-21.
- Rawlings, N. D., Tolle, D. P., Barrett, A. J. (2014). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research*. **32**: 160-164.
- Redzyna, I., Ljunggren, A., Bujacz, A., Abrahamson, M., Jaskolski, M., Bujacz, G. (2009). Crystal structure of the parasite inhibitor chagasin in complex with papain allows

- identification of structural requirements for broad reactivity and specificity determinants for target proteases. *The FEBS journal*. **276(3)**: 793-806.
- Reyes, F. C. (2014). Clonación, expresión y evaluación del potencial diagnóstico del inhibidor de cisteín proteasa de *Trypanosoma vivax*. Tesis Magister en Ciencias Biológicas. Universidad Simón Bolívar. Caracas, Venezuela.
- Rigden, D. J., Mosolov, V. V., Galperin, M. Y. (2002). Sequence conservation in the chagasin family suggests a common trend in cysteine proteinase binding by unrelated protein inhibitors. *Protein Science*. **11(8)**: 1971-1977.
- Rottcher, D., Schillinger, D., Swaygarth, E. (1987). Trypanosomiasis in the camel. *Revue Scientifique et Technique* (Office International des Epizooties). **6**: 463-470.
- Roy, U., Mishra, A., Jana, P., Karmakar, S. (2018). A Comparative Study on Different Plasmid Isolation Procedures. *Int. J. Pure App. Biosci*. **6(5)**: 533-541.
- Saha, S., & Raghava, G. P. S. (2006). Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. **65(1)**: 40-48.
- Sajid, M., McKerrow, J. (2002). Cysteine protease of parasitic organism. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **120 (1)**: 1-21.
- Salmon, D., do Aido-Machado, R., Diehl, A., Leidert, M., Schmetzer, O., Ana, P. D. A., Pires, J. R. (2006). Solution structure and backbone dynamics of the *Trypanosoma cruzi* cysteine protease inhibitor chagasin. *Journal of molecular biology*. **357(5)**: 1511-1521.
- Sanderson, S., Westrop, G., Scharfstein, J., Mottram J., Coombs, G. (2003). Functional conservation of a natural cysteine peptidase inhibitor in protozoan and bacterial pathogens. *FEBS Letters*. **542**: 12-16.
- Santos, C. C., Sant'Anna, C., Terres, A., Cunha-e-Silva, N. L., Scharfstein, J., Lima, A. P. C. de A. (2004). Chagasin, the endogenous cysteine-protease inhibitor of *Trypanosoma cruzi*, modulates parasite differentiation and invasion of mammalian cells. *Journal of Cell Science*. **118 (5)**: 901-915.
- Schlieker, C., Bukau, B., Mogk, A. (2002). Prevention and reversion of protein aggregation by molecular chaperones in the E. coli cytosol: implications for their applicability in biotechnology. *Journal of biotechnology*. **96(1)**: 13-21.
- Schmidt, T., Friehs, K., Schleef, M., Voss, C., Flaschel, E. (1999). Quantitative analysis of plasmid forms by agarose and capillary gel electrophoresis. *Analytical biochemistry*. **274(2)**: 235-240.
- Sharifian, H. (2010). Errors induced during PCR amplification. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Suiza. Suiza.
- Shin, W. H., Lee, G. R., Heo, L., Lee, H., Seok, C. (2014). Prediction of protein structure and interaction by GALAXY protein modeling programs. *Bio Design*. **2(1)**: 1-11.
- Smith, B. O., Picken, N. C., Westrop, G. D., Bromek, K., Mottram, J. C., Coombs, G. H. (2006). The structure of *Leishmania mexicana* ICP provides evidence for convergent evolution of cysteine peptidase inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*. **281(9)**: 5821-5828.
- Sonneveld, T., Tobutt, K. R., Robbins, T. P. (2003). Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility (S) alleles S1 to S16 using consensus and allele-specific primers. *Theoretical and Applied Genetics*. **107(6)**: 1059-1070.

- Sørensen, H. P., Mortensen, K. K. (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of biotechnology*. **115(2)**: 113-128.
- Studier, F. W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**: 60-89.
- Studier, F. W., Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of molecular biology*. **189(1)**: 113-130.
- Thomas, J. G., Baneyx, F. (1996). Protein misfolding and inclusion body formation in recombinant *Escherichia coli* cells overexpressing heat-shock proteins. *Journal of Biological Chemistry*. **271(19)**: 11141-11147.
- Turcios, L. M. (1996). Cisteín-proteasas de *Trypanosoma evansi*: Purificación e inhibición por cistatina. Tesis de Licenciatura en Química. Universidad Simón Bolívar. Caracas, Venezuela.
- Turk, V., Bode, W. (1991). The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS letters*. **285(2)**: 213-219.
- Twining, S. S. (1994). Regulation of proteolytic activity in tissues. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. **29(5)**: 315-383.
- Uilenberg, G. (1998). A field guide for the diagnosis, treatment and prevention of african animal trypanosomosis [en línea]. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). <http://www.fao.org/docrep/006/x0413e/X0413E02.htm> [Consulta: 18 de noviembre de 2017].
- Van Noort, J. M., Van den Berg, P., Mattern, I. E. (1991). Visualization of proteases within a complex sample following their selective retention on immobilized bacitracin, a peptide antibiotic. *Analytical biochemistry*. **198(2)**: 385-390.
- Vandooren, J., Geurts, N., Martens, E., Van den Steen, P. E., Opdenakker, G. (2013). Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes. *Nature methods*. **10(3)**: 211.
- Vather, P. (2010). Vivapain: A cysteine peptidase from *Trypanosoma vivax*. Master of Science in the Discipline of Biochemistry, School of Biochemistry, Genetics and Microbiology, University of KwaZulu-Natal.
- Villaverde, A., Carrió, M. M. (2003). Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnology letters*. **25(17)**: 1385-1395.
- Wang, S. X., Pandey, K. C., Scharfstein, J., Whisstock, J., Huang, R. K., Jacobelli, J., Rossi, A. (2007). The structure of chagasin in complex with a cysteine protease clarifies the binding mode and evolution of an inhibitor family. *Structure*. **15(5)**: 535-543.
- Woestenenk, E. A., Hammarström, M., van den Berg, S., Härd, T., Berglund, H. (2004). His tag effect on solubility of human proteins produced in *Escherichia coli*: a comparison between four expression vectors. *Journal of structural and functional genomics*. **5(3)**: 217-229.
- Wu, J., Filutowicz, M. (1999). Hexahistidine (His₆)-tag dependent protein dimerization: A cautionary tale. *Acta Biochim. Pol.* **46(3)**: 591-599.
- Yadav, S. C., Kumar, R., Kumar, S., Tatu, U., Singh, R. K., Gupta, A. K. (2011). Identification and characterization of cysteine proteinases of *Trypanosoma evansi*. *Parasitology research*. **109(3)**: 559-565.

Zhou, J. (2001). Evaluation of PCR-generated chimeras, mutations, and heteroduplexes with 16S rRNA gene-based cloning. *Applied and environmental microbiology*. **67(2)**: 880–887.