



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

**EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y REPLEGAMIENTO DE LA  
PROTEÍNA RECOMBINANTE TSA-1 DE *Trypanosoma cruzi*:  
POTENCIAL ANTÍGENO PARA UNA VACUNA TERAPEÚTICA  
CONTRA LA ENFERMEDAD DE CHAGAS**

**T E S I S**

**Que presenta:**

**Ariana Guadalupe Robles Zárate**

**Para obtener el grado de:**

**MAESTRA EN CIENCIAS EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

**Director de tesis:**

**Dr. Jaime Ortega López (DBB-CINVESTAV)**

**Asesores:**

**Dra. María del Carmen Montes Horcasitas (DBB-CINVESTAV)**

**Dra. María Elena Bottazzi (BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE & SABIN VACCINE INSTITUTE)**

**Dra. Claudia Benítez Cardoza (ENMH-IPN)**

El presente trabajo se realizó en Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN en el laboratorio No. 23 del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, con el apoyo económico del CINVESTAV, del CONACYT proyecto 128624 y del Instituto Carlos Slim de la Salud a través de la “Iniciativa Slim” para el desarrollo de vacunas contra enfermedades desatendidas.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN por el apoyo otorgado para la realización de mis estudios de maestría. Becario CONACyT No. de registro 262909.

El presente trabajo se realizó en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN en el laboratorio No. 23 del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, bajo la dirección y asesoría del Comité Tutorial integrado por:

Director:

Dr. Jaime Ortega López, Investigador Titular 3C del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN. Director

Asesores:

Dra. María del Carmen Montes Horcasitas, Investigadora Titular 3B del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN. Asesora

Dra. Claudia Guadalupe Benítez Cardoza, Investigadora Titular A de Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, IPN. Asesora

Dra. Maria Elena Bottazzi, Investigadora Titular, Section of Pediatric Tropical Medicine & Molecular Virology & Microbiology, Baylor College of Medicine and Texas Children's Hospital. Asesora

*A las manos de seda que me aman  
A las manos bienhechoras que me alivian  
A las manos morenas que me acarician  
A mi madre*

## Agradecimientos

---

Al Dr. *Jaime Ortega López* por darme la oportunidad de participar en este proyecto, por su apoyo incondicional en todo momento, por sus consejos; pero sobretodo, por enseñarme que lo más importante en la vida es ser felices.

A mis asesoras, la Dra. *María del Carmen Montes Horcasitas*, la Dra. *Claudia Guadalupe Benítez Cardoza* y la Dra. *María Elena Bottazzi* por su asesoría y su dirección en el trabajo de investigación.

A la Dra. *Rossana Arroyo* por haberme permitido realizar experimentos en su laboratorio.

A mis amigos del Laboratorio 23, *Jerry, Ivonnita, Luis, Viri, Rous, Tavo, Aurora, Olga, Gus y Jimmy*, por su compañía, apoyo y alegría a lo largo de este proyecto.

A *Maru*, que gracias a su trabajo en el laboratorio y al café de las mañanas, facilitaba mis actividades diarias.

A *Vania* y a *Silvia*, por su asistencia secretarial en todo lo referente a mi estancia como alumna de maestría.

A mis amigos de maestría, *Felipe, Rebe, Emmita, Benito, Mike, Gabo, Lau, Tere, Marisa, y David* por los momentos de distracción y el apoyo moral.

A mis amigos *Francisco, Alberto, Chris, Giovanni, Daniel, José María, Sandra, Arturo, Tita, Malú y Lucy*, por su cariño y “las jaladas de oreja”.

A mi amiga *Yessy*, por acompañarme en mis triunfos y fracasos, celebrar mis alegrías y compartir mi dolor en los momentos complicados.

A la Dra. *Alejandra Juárez*, porque me ha permitido reconocer mis fortalezas y superar mis errores.

A mi tío *Héctor*, por ser clave en mi vida profesional y personal.

A mi madrina *Tere*, porque me ha enseñado que al corazón hay que alimentarlo con bondad.

A hermano *Alex*, por ser mi gran amigo y por sus palabras que evitaron que abandonara mi lucha.

A mi mamá *Angelina*, porque siempre ha estado a mi lado, dándome su amor, paciencia y cuidados.

A *Dios*, por darme la fuerza para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se me han presentado.

# INDICE GENERAL

Lista de Figuras.....	i
Lista de Tablas.....	iv
Listas de abreviaturas.....	v
Resumen.....	vii
Abstract.....	viii
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. La Enfermedad de Chagas.....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Epidemiología.....	1
1.1.2. Transmisión .....	3
1.1.3. Manifestaciones clínicas .....	5
1.1.3.1. Etapa aguda.....	5
1.1.3.2. Etapa crónica.....	6
1.1.4. Tratamiento.....	6
<b>1.2. Vacuna terapéutica contra la enfermedad de Chagas .....</b>	<b>8</b>
1.2.1. Selección de antígenos.....	8
1.2.2. Desarrollo de una vacuna bivalente basada en proteínas recombinantes.....	10
<b>1.3. Antígeno TSA-1 .....</b>	<b>11</b>
<b>1.4. Expresión de proteínas recombinantes .....</b>	<b>13</b>
1.4.1. Aislamiento y solubilización de Cl .....	15
1.4.2. Replegamiento in vitro de proteínas recombinantes .....	16
1.4.2.1. Dilución.....	18
1.4.2.2. Diálisis.....	18
1.4.2.3. Métodos cromatográficos .....	19
1.4.3. Replegamiento oxidativo .....	20
<b>2. ANTECEDENTES DIRECTOS.....</b>	<b>21</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>22</b>
<b>4. HIPOTESIS.....</b>	<b>23</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
<b>6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....</b>	<b>25</b>
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
<b>7.1. Materiales .....</b>	<b>26</b>
7.1.1. Reactivos .....	26
7.1.2. Vector de expresión .....	26
7.1.3. Cepas bacterianas .....	26
<b>7.2. Métodos .....</b>	<b>27</b>

7.2.1	Análisis bioinformático de la proteína <i>rTSA-1</i> .....	27
7.2.2	Expresión de la proteína <i>rTSA1-1</i> .....	28
7.2.3	Purificación de la proteína <i>rTSA-1</i> .....	29
7.2.4	Replegamiento de la proteína <i>rTSA-1</i> .....	30
7.2.4.1	Selección de buffer de replegamiento.....	31
7.2.4.2	Replegamiento de la proteína <i>rTSA-1</i> por diálisis .....	31
7.2.4.3	Replegamiento de la proteína <i>rTSA-1</i> por dilución .....	31
7.2.4.4	Replegamiento cromatográfico de la proteína <i>rTSA-1</i> .....	32
7.2.5	Captura de proteína replegada .....	33
7.2.6	Espectros de fluorescencia de la proteína <i>rTSA-1</i> .....	32
7.2.7	Espectros de dicroísmo circular de la proteína <i>rTSA-1</i> .....	35
7.2.8	Determinación del estado de agregación de la <i>rTSA-1</i> por cromatografía de exclusión molecular.....	35
7.2.9	Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) .....	35
7.2.10	Western-Blot .....	36
<b>8.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>
<b>8.1.</b>	<b>Análisis bioinformático de la proteína <i>rTSA-1</i>.....</b>	<b>38</b>
<b>8.2.</b>	<b>Expresión y purificación de la proteína <i>rTSA1</i>.....</b>	<b>44</b>
<b>8.3.</b>	<b>Replegamiento de <i>rTSA-1</i> .....</b>	<b>48</b>
8.3.1	Selección de buffer de replegamiento.....	48
8.3.2	Diálisis.....	54
8.3.3	Dilución.....	56
8.3.4	Métodos cromatográficos.....	59
8.3.4.1	Cromatografía de afinidad a níquel .....	599
8.3.4.2	Cromatografía de exclusión molecular.....	62
8.3.4	Ensayos de Fluorescencia.....	63
8.3.5	Dicroismo Circular.....	65
<b>9.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>66</b>
<b>10.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>71</b>
<b>11.</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>72</b>
<b>12.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>73</b>
<b>APÉNDICE A:</b>	<b>Reactivos y Soluciones.....</b>	<b>77</b>
<b>APÉNDICE B:</b>	<b>Vector de expresión.....</b>	<b>78</b>
<b>APÉNDICE C:</b>	<b>Cepas de <i>E. coli</i>.....</b>	<b>79</b>

## Lista de Figuras

---

- Figura 1.1 Número estimado de individuos infectados con *Trypanosoma cruzi* en México.** Tomado y modificado de: (Carabarin-Lima, et al., 2013).....2
- Figura 1.2 Número estimado de individuos infectados con *Trypanosoma cruzi* en áreas no endémicas.** Tomado de: (Rassi, et al., 2010).....3
- Figura 1.3 Representación del ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*.** El parásito alcanza el torrente sanguíneo e invade a diferentes tipos de células (fagocíticas y no fagocíticas); luego de varias rondas de replicación, las células infectadas revientan y los parásitos son liberados al torrente sanguíneo donde pueden dirigirse a diversos tejidos, colonizándolos y formando los denominados nidos de amastigotes, o pueden invadir nuevamente a las células. Finalmente, las formas circulantes pueden ser succionadas durante la ingesta de alimento por la chinche vector, cerrando de esta manera el ciclo biológico. Tomado de: Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades(CDC, por sus siglas en inglés) <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>.....4
- Figura 1.4 Efecto preventivo de la vacuna de ADN.** La parasitemia (A) y la inflamación de tejido cardíaco 50 días posteriores a la infección con *T. cruzi* (B) fueron evaluados en ratones Balb/c Tomado de: (Limon-Flores, et al., 2010).....10
- Figura 1.5 Efecto terapéutico de la vacuna de ADN.** La parasitemia (A) y la densidad de las células inflamadas en el corazón 50 días posteriores a la infección con *T. cruzi* (B) fueron evaluadas en ratones Balb/c tratados durante la fase aguda (días 5 y 12 después de la infección) con la vacuna de ADN. Ratones ICR infectados también fueron tratados en la fase crónica (días 70 y 77 después de la infección) y la inflamación celular de corazón fue observada en el día 180 después de ser infectados (C). Tomado de: (Limon-Flores, et al., 2010).....10
- Figura 1.6 Prototipo de cada uno de los grupos que componen la superfamilia TcS.** La longitud de las proteínas dentro de los grupos puede variar. Las representaciones gráficas no están a escala. Tomado y modificado de: (Freitas, et al., 2011).....11
- Figura 1.7 Representación esquemática de TSA-1. A)** Proteína completa de 85 kDa. **B)** Proteína recombinante de 65 kDa.....12
- Figura 1.8 Micrografía electrónica de *E. coli*.** Los CI se ven acumulados en el citoplasma y espacio periplasmático. Tomado de: (Fahnert, et al., 2004).....14
- Figura 1.9 Diagrama de flujo de producción de proteínas recombinantes a partir de CI.** Este diagrama esquematiza de forma general el proceso de obtención de proteínas acumuladas en CI.



Tomado de: (Jungbauer, et al., 2004).....15

**Figura 1.10 Solubilización química de CI.** Altas concentraciones de agentes desnaturalizantes producen la desagregación de los CI. Tomado y modificado de: (Fahnert, et al., 2004).....16

**Figura 1.11 Esquema del proceso de plegamiento de una proteína.** En el embudo energético, se muestra en color azul las múltiples conformaciones previas a la adquisición de la estructura nativa por medio de interacciones intramoleculares. La violeta muestra las conformaciones resultantes de las interacciones intermoleculares que conducen a la formación de agregados amorfos o estructuras amiloides. Tomado de: (Antonio Pérez, 2012).....17

**Figura 6.1 Esquema general de la estrategia experimental desarrollada durante la Tesis**.....25

**Figura 8.1 Estructura secundaria de la proteína TSA-1 obtenida con PSIPRED v3.3**.....38

**Figura 8.2 A) Estructura tridimensional de la proteína rTSA-1 obtenida *in silico* con i-TASSER** (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). Las láminas- $\beta$  predominan en la estructura (azul), en comparación con las hélices- $\alpha$  (rojo). B) Modelo 3D mostrando las 4 cisteínas que tiene la proteína.....41

**Figura 8.3 Área normalizada de las regiones propensas a la agregación (“hot spots”) de la proteína rTSA-1**.....42

**Figura 8.4 Análisis de expresión de la proteína rTSA-1 en diferentes cepas de *E. coli*.** A) Cepa BL21(DE3); B) Cepa C41; C) Cepa C43; D) Cepa Lemo21(DE3); E) Cepa Rosetta; F) Cepa Rosetta 2. Del lado izquierdo se presenta el análisis SDS-PAGE y del lado derecho su respectivo Western Blot anti-histidinas. NI: no inducido; PT: proteína total; FS: fracción soluble; FI: fracción insoluble.....44

**Figura 8.5 Expresión y purificación de la proteína rTSA-1 en la cepa C41 de *E. coli*.** A) Análisis SDS-PAGE de la fracciones obtenidas de la fermentación con la cepa C41 y los CI solubilizados provenientes de la cepa BL21(DE3); B) Western Blot anti-histidinas correspondiente al SDS-PAGE GGGG de la izquierda. NI: no inducido; PT: proteína total; FS: fracción soluble; FI: fracción insoluble; FE: fracción de elución de IMAC; CI: cuerpos de inclusión.....46

**Figura 8.6 Expresión y purificación de rTSA-1 en CI producidos en la cepa BL21(DE3) de *E. coli*.** 1) Fracción no inducido; 2) Proteína total; 3) Fracción soluble; 4) CI solubilizados; 5) Fracción de elución IMAC.....47

**Figura 8.7 Análisis SDS-PAGE de la proteína *rTSA-1* replegada por diferentes buffers. 1) Buffer A; 2) Buffer B; 3) Buffer C; 4) Buffer A condiciones no reductoras; 5) Buffer B condiciones no reductoras; 6) Buffer C condiciones no reductoras.....49**

**Figura 8.8 Caracterización de la proteína *rTSA-1* replegada por diferentes buffers. A) “Light scattering”. B) Espectro de fluorescencia intrínseca ( $\lambda = 295 \text{ nm}$ ).....51**

**Figura 8.9. Caracterización de la proteína *rTSA-1* replegada con diferentes buffers. A) Fluorescencia del ANS ( $\lambda = 370 \text{ nm}$ ). B) Espectro de dicroísmo circular en el UV lejano.....52**

**Figura 8.10 Replegamiento por diálisis de proteína *rTSA-1*. A) Análisis SDS-PAGE: 1) *rTSA-1* replegada; 2) *rTSA-1* filtrada por una membrana de  $0.22 \mu\text{m}$  después de replegada; 3) *rTSA-1* capturada por IEX; 4) *rTSA-1* capturada por IEX sin agente reductor 5) resina IEX. B) Perfil cromatográfico de la proteína *rTSA-1* replegada por diálisis. Estándares utilizados para el volumen vacío de la columna Azul de Dextran y para comparar el tamaño de la *rTSA-1*, BSA (66.5 KDa).....54**

**Figura 8.11. Replegamiento por dilución de proteína *rTSA-1*. A) Análisis SDS-PAGE 100 ml de reacción: 1) *rTSA-1* replegada; 2) *rTSA-1* filtrada por una membrana de  $0.22 \mu\text{m}$  después de replegada; 3) Elución de *rTSA-1* de IEX; 4) *rTSA-1* unida a la resina de IEX. B) Análisis SDS-PAGE de dilución en reactor: 1) *rTSA-1* replegada; 2) *rTSA-1* filtrada por una membrana de  $0.22 \mu\text{m}$  después de replegada; 3) Elución de *rTSA-1* de IEX; 4) *rTSA-1* capturada por IEX sin agente reductor; 5) *rTSA-1* unida a la resina de IEX.....56**

**Figura 8.12 Perfil cromatográfico de la proteína *rTSA-1* replegada por dilución. Estándares utilizados para el volumen vacío de la columna Azul de Dextran y para comparar el tamaño de la *rTSA-1*, BSA (66.5 KDa).....57**

**Figura 8.13 Replegamiento por IMAC de proteína *rTSA-1*. A) Análisis SDS-PAGE: 1) CI solubilizados; 2) *rTSA-1* replegada; 3) *rTSA-1* replegada sin agente reductor. B) Perfil cromatográfico de *rTSA-1*. Estándares utilizados para el volumen vacío de la columna Azul de Dextran y para comparar el tamaño de la *rTSA-1*, BSA (66.5 KDa).....59**

**Figura 8.14 Replegamiento cromatográfico de *rTSA-1* en Superose® 6 Prep Grade (Sigma-Aldrich). A) Análisis SDS-PAGE: 1) Elución de SEC Pico I; 2) Elución de SEC Pico II B) Perfil cromatográfico de replegamiento de *rTSA-1* por SEC.....61**

**8.15 Ensayos de fluorescencia. A) “Light scattering” de la proteína *rTSA-1* replegada por diálisis, dilución y IMAC. B) “Light scattering” de la proteína *rTSA-1* replegada por SEC. C) Espectros de Fluorescencia intrínseca ( $\lambda=295 \text{ nm}$ ) de la proteína *rTSA-1* replegada por diálisis, dilución, IMAC y SEC. D) Espectros de Fluorescencia del ANS ( $\lambda=370 \text{ nm}$ ) de la proteína *rTSA-1* replegada por diálisis, dilución, IMAC y SEC.....64**

**8.16 Espectros de dicroísmo circular de la proteína rTSA-1 obtenido a 25 °C.....65**

**Figura B.1 Vector de expresión PET-41a(+). Este vector fue usado para expresar la proteína rTSA-1 en *E. coli*.....78**

## Lista de Tablas

---

<b>Tabla 1.1</b> Reacciones adversas al Nifurtimox y Benznidazol.....	7
<b>Tabla 8.1</b> Parámetros fisicoquímicos de la proteína recombinante <i>rTSA-1</i> .....	38
<b>Tabla 8.2</b> Porcentaje de estructura secundaria de la proteína <i>rTSA-1</i> predicha por PSIPRED y i-TASSER .....	64
<b>Tabla A.1</b> Reactivos químicos utilizados en los experimentos de expresión, purificación y repliegamiento de la proteína <i>rTSA-1</i> .....	77
<b>Tabla C.1</b> Cepas de <i>E. coli</i> utilizadas en las pruebas de expresión de <i>rTSA</i> .....	79

## Lista de abreviaturas

---

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ANS</b>	1-anilinoftaleno-8-sulfónico
<b>AVAD</b>	Años de Vida Ajustados por Discapacidad
<b>BIRMEX</b>	Laboratorios de Biológicos y Reactivos de México
<b>CDC</b>	Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades
<b>CI</b>	Cuerpos de inclusión
<b>CINVESTAV</b>	Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional
<b>GPI</b>	Glicosilfosfatidilinositol
<b>IEX</b>	Cromatografía de intercambio iónico
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>IMAC</b>	Cromatografía de afinidad por metales inmovilizados
<b>NTD's</b>	Enfermedades Tropicales Desatendidas
<b>rTSA-1</b>	Proteína recombinante de superficie de tripomastigote Ag 1
<b>SEC</b>	Cromatografía de exclusión molecular
<b>Tc24</b>	Proteína de superficie de Tripomastigote Ag 24
<b>TcS</b>	Superfamilia de las transalidasas
<b>TSA-1</b>	Proteína de superficie de tripomastigote Ag 1
<b>WHO</b>	Organización Mundial de la Salud



## RESUMEN

La enfermedad de Chagas es la principal causa de enfermedades del corazón que afecta a aproximadamente 10 millones de personas en América Latina y otros lugares en todo el mundo. Los dos principales medicamentos disponibles para el tratamiento de la enfermedad de Chagas tienen una limitada eficacia y presentan efectos secundarios severos.

Una posible alternativa en la quimioterapia de esta enfermedad es una vacuna terapéutica inyectable que prevenga o retrase la cardiomiopatía chagásica en pacientes con un estado indeterminado o determinado.

Estudios recientes de inmunización en animales con vacunas de DNA han demostrado que el antígeno TSA-1, es un candidato potencial para dicha vacuna. Sin embargo, las vacunas de DNA tiene un pobre historial de inmunización y no ha sido aprobado su uso en humanos; por lo que una alternativa es producir este antígeno como proteína recombinante.

La proteína recombinante TSA-1 (*rTSA-1*) se expresa con altos rendimientos en *Escherichia coli*, pero en cuerpos de inclusión; sin embargo, se requiere que la proteína adquiera su estructura nativa para su caracterización bioquímica e inmunológica. Por lo que se implementaron cuatro métodos de replegamiento *in vitro*, los cuales permitieran producir la proteína *rTSA-1* correctamente plegada. De acuerdo con los resultados de fluorescencia intrínseca y dicroísmo circular, la proteína *rTSA-1* replegada por los cuatro métodos adquirió estructura terciaria y estructura secundaria respectivamente. Con el proceso de replegamiento mediante cromatografía de exclusión molecular se obtuvo un mayor rendimiento de replegamiento y una menor presencia de agregados. No obstante, aún no es posible saber, si la proteína replegada *in vitro* adquirió su estructura nativa; pues no se obtuvieron niveles suficientes de la proteína *rTSA-1* en forma soluble, para ser usada como control positivo en los ensayos de fluorescencia intrínseca, "Light scattering", fluorescencia de ANS y dicroísmo circular.

## ABSTRACT

Chagas disease is a leading cause of heart disease affecting approximately 10 million people in Latin America and elsewhere worldwide. The two major drugs available for the treatment of Chagas disease have limited efficacy, also they require prolonged treatment courses and are poorly tolerated.

As an alternative to chemotherapy, an injectable therapeutic Chagas disease vaccine is necessary to prevent or delay Chagasic cardiomyopathy in patients with indeterminate or determinate status.

Recent studies in animal immunization with DNA vaccines have shown that TSA-1 antigen, is a potential candidate for a vaccine. However, DNA vaccines have poor immunotherapeutic history and regulatory limitations. Therefore, an alternative is to produce this antigen as a recombinant protein.

TSA recombinant protein (*rTSA-1*) is expressed with high yields in *Escherichia coli*, but as inclusion bodies. However, *rTSA-1* protein was refolded to acquire its native structure by four methods, because a correctly folded protein is necessary to do its biochemical and immunological characterization.

According to the results of intrinsic fluorescence and the circular dichroism assays, the refolded *rTSA-1* protein acquired secondary structure and tertiary structure by the four refolding methods. The highest yield and the lowest aggregation level were obtained by size exclusion chromatography. However, it is still not possible to know if the refolded protein acquired its native structure; due to the soluble form of *rTSA-1* protein was not obtained for use it as a positive control in intrinsic fluorescence, light scattering, ANS fluorescence and circular dichroism assays.





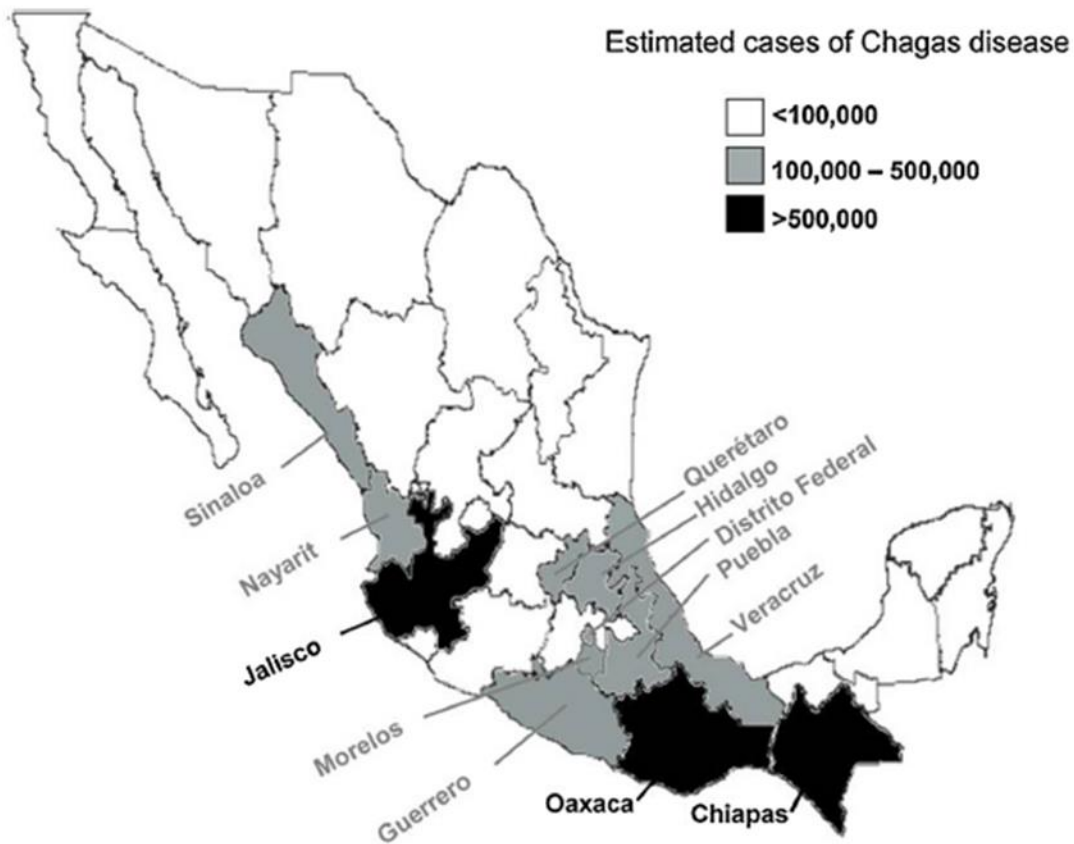
## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. La Enfermedad de Chagas

La tripanosomiasis americana (enfermedad de Chagas) es una infección parasitaria, sistémica y crónica causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, fue descubierta en 1909 por el médico brasileño Carlos Chagas (Rassi , et al., 2010). La Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés) clasifica a esta afección dentro del grupo de enfermedades tropicales desatendidas (NTD's, por sus siglas en inglés), el cual comprende afecciones parasitarias crónicas que promueven la pobreza debido al impacto que tienen sobre el desarrollo infantil, el embarazo y la productividad laboral; tan solo la enfermedad de Chagas genera pérdidas económicas anuales por \$1.2 billones aproximadamente (Dumonteil, et al., 2012).

#### 1.1.1. Epidemiología

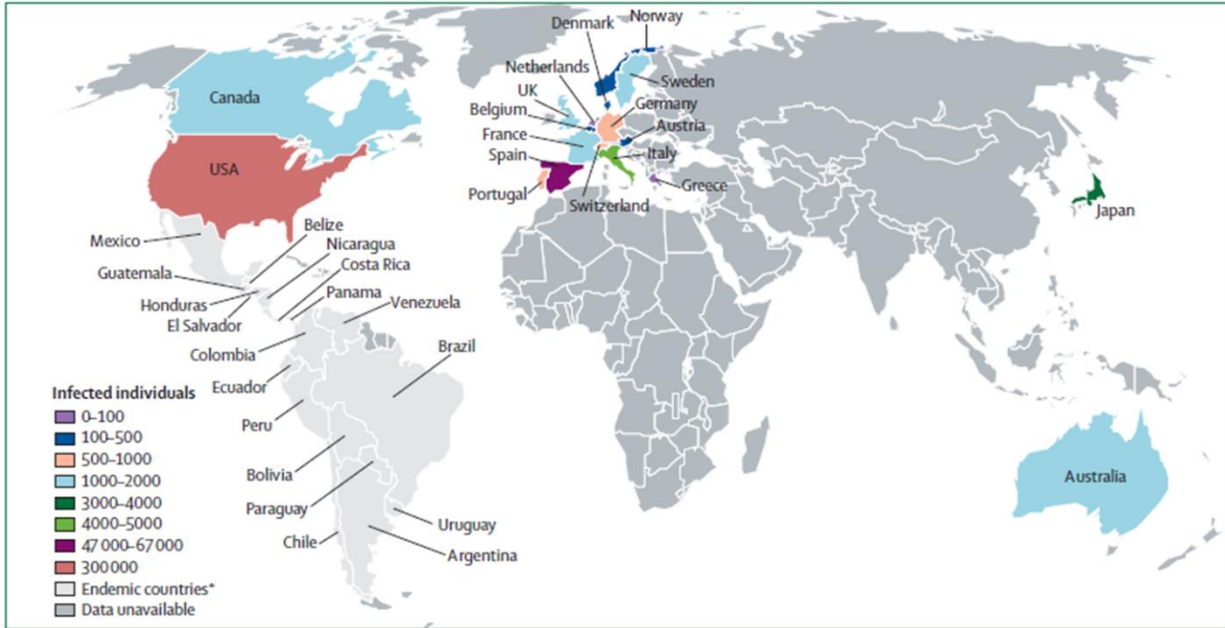
La enfermedad de Chagas es endémica de América Latina, de acuerdo con la WHO, se estima que alrededor de 10 millones de personas están infectadas en el mundo y 25 millones se encuentran en riesgo de contraer la infección en las áreas endémicas. Anualmente provoca 10,000 defunciones, el mayor número de éstas muertes es ocasionado por la cardiomiopatía chagásica crónica que se desarrolla en aproximadamente el 20-30% de las personas infectadas por *T. cruzi* (Hotez, 2008; Dumonteil, et al., 2012; WHO, 2014). Esta enfermedad, se considera de manera histórica, como un severo problema de salud en áreas rurales de México, América Central y Sudamérica, con manifestaciones clínicas y características epidemiológicas variables. En México, entre 2 y 6 millones de personas están infectadas y hay un total de 18 áreas endémicas, ubicadas en el sureste, que incluyen los estados de Oaxaca, Jalisco, Yucatán, Chiapas, Veracruz, Puebla, Guerrero, Hidalgo y Morelos (Figura 1.1) (Dumonteil, et al., 2012; Carabarin-Lima, et al., 2013; Uribarren, 2013)



**Figura 1.1** Número estimado de individuos infectados con *Trypanosoma cruzi* en México. Tomado y modificado de: (Carabarin-Lima, et al., 2013)

En las últimas décadas, el perfil epidemiológico ha cambiado debido a los movimientos migratorios, que han llevado tanto a la urbanización y la globalización de la enfermedad. Esta infección fue asociada clásicamente a la pobreza en las zonas rurales, ya que el vector crece en zonas donde las condiciones de vivienda son precarias.

La migración de las zonas rurales que se produjo en América en los años 1970 y 1980 ha cambiado el patrón tradicional epidemiológico de esta enfermedad convirtiéndola en una enfermedad urbana. En la actualidad se observa presencia de esta zoonosis en ciudades de Estados Unidos, Canadá, Japón, Australia y Europa (Figura 1.2) (Rassi , et al., 2010; Pereira Nunes, et al., 2013).



**Figura 1.2** Número estimado de individuos infectados con *Trypanosoma cruzi* en áreas no endémicas. Tomado de: (Rassi , et al., 2010)

Los centros para el control y prevención de enfermedades estiman que hay más de 300,000 personas infectadas con *T. cruzi* en Estados Unidos y alrededor de 30,000 a 45,000 individuos han sido diagnosticados con miocardiopatía chagásica (Pereira Nunes, et al., 2013).

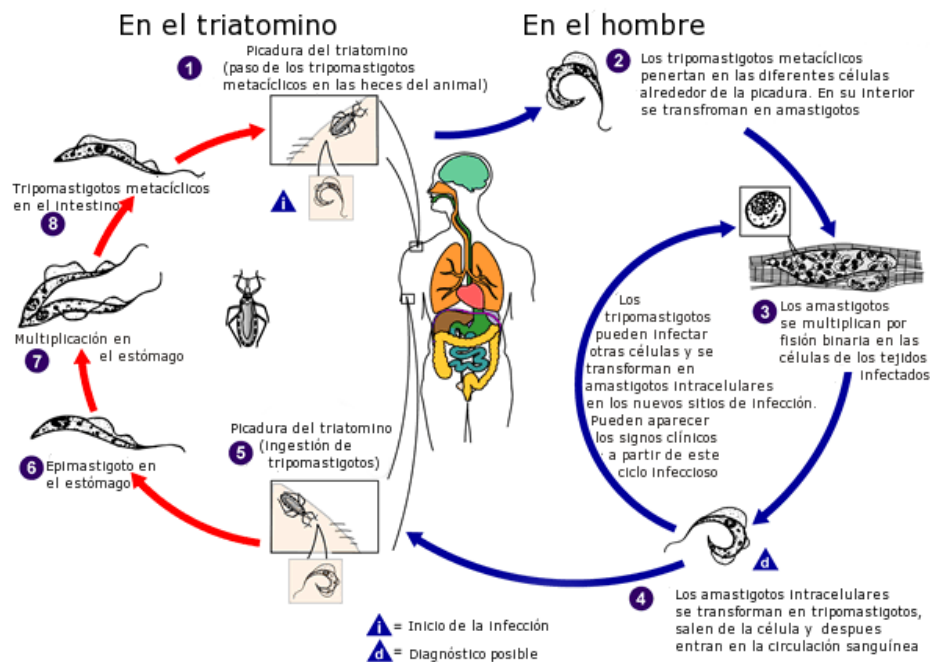
### 1.1.2. Transmisión

El agente etiológico de la enfermedad de Chagas (*T. cruzi*), es miembro de la familia *tripanosomatidae*. La mayoría de las cepas de este parásito se pueden clasificar en 2 grupos principales: *T. cruzi I* y *T. cruzi II*, que incluso se pueden subdividir en diversos linajes. Este parásito es transmitido a los humanos principalmente de manera vectorial por hemípteros (con alimentación hematófaga), también llamados insectos reducidos, “escarabajos o insectos chupasangre”, “insectos asesinos”, “chinchas besuconas” o “vinchucas”, pertenecientes a dos tribus: *Rhodniini* y *Triatomini* (Rassi , et al., 2010).

La infección vectorial se inicia cuando un hemíptero infectado deposita sus heces (en las que se encuentra el parásito) sobre la piel o mucosas de sus hospederos (esto mientras se alimenta) y, al mismo tiempo, causando una sensación de prurito con lo cual

se provoca el rascado y por consiguiente la formación de micro heridas en la piel del huésped; a través de estas heridas *T. cruzi* puede alcanzar el torrente sanguíneo.

Posteriormente el parásito invade diversas células (células no-fagocíticas y fagocíticas), se replica durante el estadio de amastigote y posteriormente se diferencia al estadio de tripomastigote. Estos tripomastigotes son liberados cuando la célula se rompe. Los tripomastigotes circulantes (sanguíneos) pueden invadir otras células del huésped o pueden ser captadas por otra chinche la cual, posteriormente podrá infectar a un nuevo huésped cerrando de esta manera el ciclo biológico (Figura 1.3) (Tyler & Engman, 2001).



**Figura 1.3 Representación del ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*.** El parásito alcanza el torrente sanguíneo e invade a diferentes tipos de células (fagocíticas y no fagocíticas); luego de varias rondas de replicación, las células infectadas revientan y los parásitos son liberados al torrente sanguíneo donde pueden dirigirse a diversos tejidos, colonizándolos y formando los denominados nidos de amastigotes, o pueden invadir nuevamente a las células. Finalmente, las formas circulantes pueden ser succionadas durante la ingesta de alimento por la chinche vector, cerrando de esta manera el ciclo biológico. Tomado de: Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>

La transmisión vectorial representa el 80% de los casos en países endémicos; sin embargo, la transfusión sanguínea y el trasplante de órganos infectados con *T. cruzi* se encuentran como las principales formas de contagio en países no endémicos.

La transmisión congénita es un problema de salud pública que afecta a todos los países incluyendo Estados Unidos y Europa, esto debido al alto flujo de inmigrantes infectados por *T. cruzi*.

Otra forma de transmisión es por vía oral, ocasionada por el consumo de jugos o alimentos contaminados con las heces de las chinches infectadas con *T. cruzi*; esta ruta de infección constituye uno de las principales modos de infección en determinadas áreas geográficas, como en la Amazonia brasileña (Nóbrega, et al., 2009; Rassi, et al., 2010)

### 1.1.3. Manifestaciones clínicas

La enfermedad de Chagas se presenta primeramente con una etapa aguda o inicial, la cual es seguida por una etapa crónica que puede ser clasificada en: forma indeterminada (forma asintomática) y forma sintomática (Pereira Nunes, et al., 2013).

#### 1.1.3.1. Etapa aguda

La etapa aguda de la infección se define como la fase en la cual se encuentran los parásitos en la sangre. La mortalidad durante esta etapa es aproximadamente del 5% de los casos y se relaciona frecuentemente con miocarditis. Dentro de la etapa aguda se consideran dos fases, una asintomática (sin evidencia clínica de enfermedad) y una sintomática. En esta fase sintomática, las manifestaciones clínicas incluyen lesión en el sitio de entrada (chagoma de inoculación) o cuando la infección es en la conjuntiva, puede formarse un edema periorbital unilateral denominado signo de Romaña; además, se presenta fiebre, sudoración, dolor muscular, nódulos linfáticos aumentados, hepatoesplenomegalia, edemas subcutáneos localizados o generalizados, miocarditis aguda y bronconeumonía. Esta sintomatología, no específica, frecuentemente suele confundirse con otros padecimientos comunes en niños y la mayoría de los pacientes son infectados durante la niñez, aunque la etapa aguda de la infección usualmente no es severa, aunque eventualmente puede ocasionarse la muerte (Prata, 2001).

### 1.1.3.2. Etapa crónica

Un alto porcentaje de pacientes con la enfermedad de Chagas permanecen en fase asintomática por 10 o 30 años, e incluso de por vida. La fase asintomática inicia entre la octava y décima semana a partir del inicio de la infección. Esta etapa se caracteriza por un silenciamiento clínico, en el cual los pacientes no tienen sintomatología alguna; no obstante, presentan anticuerpos circulantes contra *T. cruzi* y aproximadamente el 2% de los pacientes desarrollan marcadores clínicos o electrocardiográficos de daño cardiaco (Cabarán Lima, et al., 2011)

Durante la fase determinada (forma asintomática), las complicaciones cardiacas ocurren usualmente en el 20 al 30% de los casos y son el principal factor pronóstico. La cardiomiopatía chagásica crónica es la más frecuente y severa e incluye fibrosis, necrosis, vasculopatía, inmunopatología, disfunción autónoma, miocarditis difusa, progresiva y acumulativa en la cual se observan lesiones con reacción inflamatoria focal con presencia de linfocitos y degeneración fibrótica extensiva en las regiones circundantes. Estas lesiones involucran a miocitos y nervios. También se observan alteraciones microvasculares que progresivamente destruyen las células contráctiles miocárdicas (miocitólisis), daño miocárdico debido a una reacción inmune cruzada activada contra el antígeno MXT de *T. cruzi*, el cual es homólogo a miosina, que a su vez es un componente principal de las estructuras cardiacas. En los pacientes con daño cardiaco severo se puede producir un aneurisma ventricular, característico de esta enfermedad (Punukollu , et al., 2007). Además, en esta fase se pueden observar manifestaciones extracardíacas como las visceromegalias, las cuales son las manifestaciones del aparato digestivo, y se caracteriza por desórdenes motores y la dilatación de órganos como esófago y colon (Rassi , et al., 2010).

### 1.1.4. Tratamiento

El tratamiento de la enfermedad de Chagas involucra tanto la terapia contra el parásito como la terapia adyuvante para el manejo de insuficiencias cardiacas presentes durante la fase crónica sintomática.

En la actualidad los agentes antiparasitarios indicados son el Nifurtimox y el Benznidazol. El Nifurtimox actúa vía la reducción del grupo nitro para formar radicales inestables como el nitroanión, el cual es altamente reactivo y produce metabolitos de oxígeno reducido, altamente tóxicos (peróxido de hidrógeno, anión superóxido). Se ha demostrado que *T. cruzi* es más sensible al estrés oxidativo que otras células de vertebrados, siendo sensible al peróxido de hidrógeno. El Benznidazol actúa produciendo modificaciones covalentes de macromoléculas por nitrorreducción de intermediarios (Murciaa, et al., 2013; Pereira Nunes, et al., 2013).

Ambos, medicamentos, tienen una actividad significativa durante la fase aguda de la enfermedad, provocando la cura parasitológica hasta en un 80% de los pacientes tratados oportunamente. Sin embargo, durante la fase crónica de la enfermedad, estas drogas tienen muy baja actividad tripanocida. Además el tratamiento con estos antiparasitarios está contraindicado durante el embarazo y en personas con daño hepático o renal avanzado. Asimismo, la presencia de síntomas colaterales causados por la administración de estos fármacos puede llevar en algunos casos a la interrupción del tratamiento por los pacientes (Tabla 1.1) (Apt, 2010; Cabarín Lima, et al., 2011).

**Tabla 1.1 Reacciones adversas al Nifurtimox y Benznidazol**

---

**Alteraciones digestivas**

Pérdida de peso

Náusea

Vómito

Gastroenteritis

**Alteraciones hematológicas** (asociadas al síndrome de hipersensibilidad)

Leucopenia

Trombocitopenia

Agranulocitosis

**Alteraciones dermatológicas**

Erupciones eritematosas

Dermatitis atópica

Síndrome Stevens-Johnson (en estos casos se suspenden el tratamiento)

**Alteraciones neurológicas**

Polineuropatía (En general, esto aparece cuando se prescriben dosis altas. Con la dosis usual de Benznidazol, 5 mg/kg/día, del 10 al 30% de los pacientes la desarrollan, especialmente al final del tratamiento)

---

Tomado y modificado de: (Apt, 2010)



## 1.2. Vacuna terapéutica contra la enfermedad de Chagas

Actualmente, no existe una terapia efectiva para la mayoría de los pacientes que se encuentran en la etapa crónica de la enfermedad de Chagas, tanto en la fase indeterminada (70%-80%) como en la fase sintomática (10%-20%). Por lo que son necesarios nuevos fármacos con alta eficacia y sin efectos secundarios para el tratamiento de esta enfermedad, especialmente en la fase crónica (Apt, 2010). Una posible alternativa en la quimioterapia es una vacuna terapéutica inyectable que prevenga o retrase la cardiomiopatía chagásica en pacientes con un estado indeterminado o determinado, como la que está desarrollando *Sabin Vaccine Institute* y *Texas Children's Hospital Center for Vaccine Development*, en asociación con la Universidad Autónoma de Yucatán, CINVESTAV, BIRMEX y otras instituciones de México, Alemania, Japón y Estados Unidos (Dumonteil, et al., 2012).

Una vacuna terapéutica efectiva para la enfermedad de Chagas en humanos podría prevenir complicaciones cardiacas entre los 40,000 nuevos casos estimados anualmente en América Latina, además de impedir alrededor de 60,000 años de vida ajustados por discapacidad (AVAD) resultado de las cardiomiopatías y daños gastrointestinales, además de evitar 10,000 defunciones anuales.

Los análisis que han evaluado el valor económico de una vacuna que retrase o prevenga el comienzo de las cardiopatías debidas a la enfermedad de Chagas sugieren que una vacuna de este tipo sería rentable y proporcionaría un ahorro en los costos de tratamientos y beneficios en la salud de los pacientes (Dumonteil, et al., 2012).

### 1.2.1. Selección de antígenos

Para controlar esta infección han sido valoradas una amplia gama de formulaciones de vacunas a lo largo de estos años, que van desde parásitos enteros, proteínas purificadas o recombinantes, vectores virales hasta vacunas de ADN (Quijano-Hernandez & Dumonteil, 2011).

En modelos animales, se ha demostrado que el ADN plasmídico que contiene genes que codifican antígenos de interés y estimulan una respuesta humoral y celular

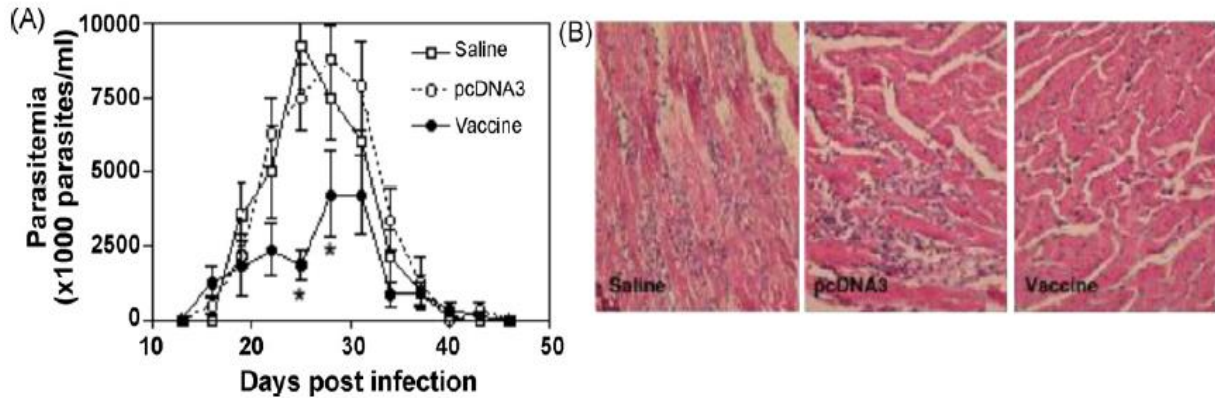
específica, así como protección inmunológica contra diversas bacterias, virus y parásitos. Estas vacunas de ADN son una herramienta muy útil en la selección antígenos para prevenir o tratar enfermedades infecciosas (Li, et al., 2012).

Desde el 2004, estudios de inmunización con ADN en animales, realizados en el Laboratorio de Parasitología de la Universidad Autónoma de Yucatán, mostraron que se puede inducir una protección significativa contra la infección por *T. cruzi* con diversos antígenos. Los antígenos *TSA-1* (proteína de superficie de *T. cruzi*) y *Tc24* (proteína excretora-secretora) fueron seleccionados como los mejores candidatos para el desarrollo de una vacuna. Estos plásmidos generan una respuesta inmune mediada por anticuerpos y linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup>; algunos ensayos resaltan que aunque la activación de las células CD8<sup>+</sup> es crítica, la ayuda de las células CD4<sup>+</sup> es también necesaria para tener una óptima protección contra *T. cruzi* (Dumonteil, 2009; Limon-Flores, et al., 2010).

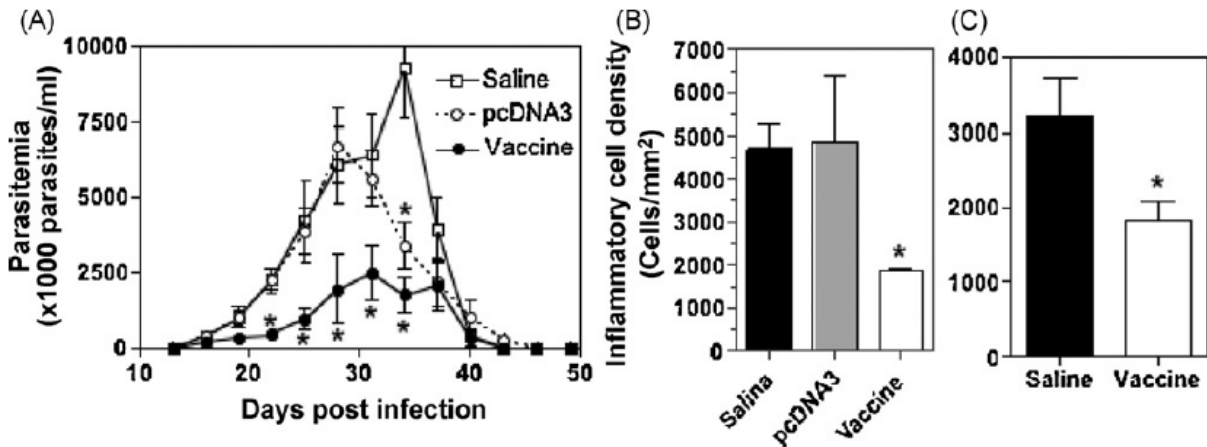
Se ha confirmado mediante estudios que la inmunoterapia con el plásmido pcDNA-3 *TSA-1* es capaz de controlar la infección experimental en el modelo murino, induciendo un aumento en el número de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y TCD8<sup>+</sup> en la fase aguda y un incremento de linfocitos CD8<sup>+</sup> productores de *IFN-γ* durante la fase crónica. Aunado a estos ensayos, también se evaluó la inmunoterapia de la vacuna pcDNA-3 *Tc24* en ratones infectados con *T. cruzi* tanto en la fase aguda como en la fase crónica de la enfermedad de Chagas. En la fase aguda se presentó una sobrevivencia del 83% y una reducción en la carga parasitaria en los ratones con inmunoterapia, así como la reducción en el número de parásitos alojados en el tejido cardíaco durante la fase crónica en contraste con sus respectivos controles (Dumonteil, et al., 2004).

Recientemente se evaluó la eficacia de una vacuna de ADN basada en la mezcla de los plásmidos pcDNA *TSA-1* y pcDNA-3 *Tc24* en ratones y perros, observándose un aumento significativo en la eficacia inmunoterapéutica al reducirse el tiempo de detección de la carga parasitaria en los animales tratados con respecto a la administración individual de cada uno de los plásmidos. Además, el tratamiento con una combinación de los antígenos *TSA-1* y *Tc24*, pudo parcialmente controlar la infección por *T. cruzi*, tanto en la fase aguda (Figura 1.4) como en la fase crónica (Figura 1.5) en ratones Balb/c y ratones

ICR, respectivamente. Asimismo, con estos ensayos se comprobó que la inmunización con plásmidos que codifican para ambos antígenos no producen interferencia o competencia antigénica entre ellos (Limon-Flores, et al., 2010; Dumonteil, et al., 2012).



**Figura 1.4 Efecto preventivo de la vacuna de ADN.** La parasitemia (A) y la inflamación de tejido cardíaco 50 días posteriores a la infección con *T. cruzi* (B) fueron evaluados en ratones Balb/c. Tomado de: (Limon-Flores, et al., 2010)



**Figura 1.5 Efecto terapéutico de la vacuna de ADN.** La parasitemia (A) y la densidad de las células inflamadas en el corazón 50 días posteriores a la infección con *T. cruzi* (B) fueron evaluadas en ratones Balb/c tratados durante la fase aguda (días 5 y 12 después de la infección) con la vacuna de ADN. Ratones ICR infectados también fueron tratados en la fase crónica (días 70 y 77 después de la infección) y la inflamación celular de corazón fue observada en el día 180 después de ser infectados (C). Tomado de: (Limon-Flores, et al., 2010)

### 1.2.2. Desarrollo de una vacuna bivalente basada en proteínas recombinantes

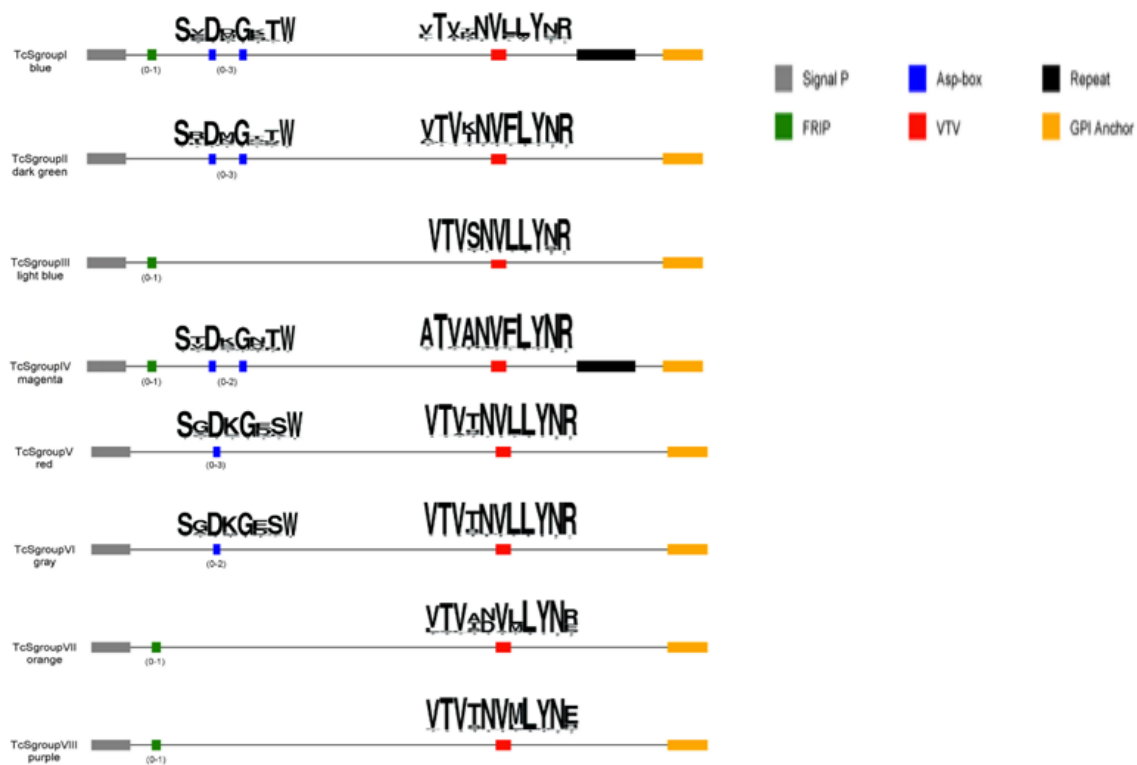
Las vacunas de ADN han evolucionado mucho en los últimos 20 años desde su invención. Sin embargo, aún no son una alternativa competitiva frente a vacunas para

humanos constituidas por proteínas o hidratos de carbono, teniendo como barreras las preocupaciones de seguridad y la pobre inmunogenicidad, en comparación con las vacunas proteicas (Li, et al., 2012).

A pesar de los avances en los estudios de vacunas de ADN para humanos, sus limitaciones actuales todavía no han sido superadas por lo que se ha propuesto el desarrollo de una vacuna terapéutica bivalente compuesta por los antígenos recombinantes *TSA-1* y *Tc24* para contrarrestar la enfermedad de Chagas (Dumonteil, et al., 2012).

### 1.3. Antígeno TSA-1

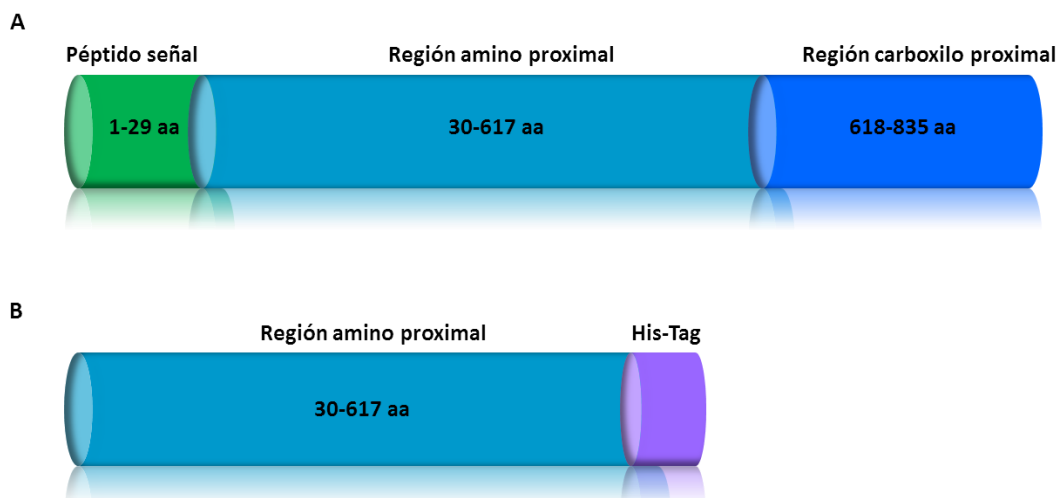
El antígeno *TSA-1* (trypomastigote surface antigen 1) es el primer miembro de la superfamilia de las trans-sialidasas (TcS) en ser identificado y caracterizado; éste pertenece al grupo II (GP85) y no presenta actividad catalítica (Figura 1.6) (Freitas, et al., 2011).



**Figura 1.6** Prototipo de cada uno de los grupos que componen la superfamilia *TcS*. La longitud de las proteínas dentro de los grupos puede variar. Las representaciones gráficas no están a escala. Tomado y modificado de: (Freitas, et al., 2011)

TSA-1 es una glicoproteína de 85 kDa unida a la superficie de la membrana plasmática de tripomastigotes sanguíneos por medio de GPI (glicosilfosfatidilinositol). Esta proteína se encuentra implicada en la unión e invasión de la célula hospedera (Fouts, et al., 1991).

Las propiedades inmunogénicas de la proteína TSA-1 y polipéptidos derivados de subregiones del gen expresado en baculovirus y sistemas bacterianos fueron investigadas en ratones. A pesar de que tanto las regiones amino como carboxilo proximal de la TSA-1, contienen epítomos de células B, la región carboxilo proximal contiene una o más secuencias inmunodominantes que suprimen los epítomos presentes en la porción amino proximal. Los ratones inmunizados con la proteína TSA-1 o la región carboxilo proximal, no sobrevivieron a la infección con *T. cruzi*. A diferencia de los ratones inmunizados con la porción amino proximal, los cuales tuvieron un 70% de sobrevivencia ante la presencia del parásito (Wrightsmann, et al., 1994). Lo anterior indica que los epítomos de la región carboxilo proximal enmascaran la acción inmunoprotectora de la parte amino proximal, por lo que así como en las vacunas de ADN, la proteína recombinante que se usará como candidato a vacuna comprenderá sólo la región amino proximal de la proteína TSA-1 (Figura 1.7).



**Figura 1.7 Representación esquemática de TSA-1. A)** Proteína completa de 85 kDa. **B)** Proteína recombinante de 65 kDa.

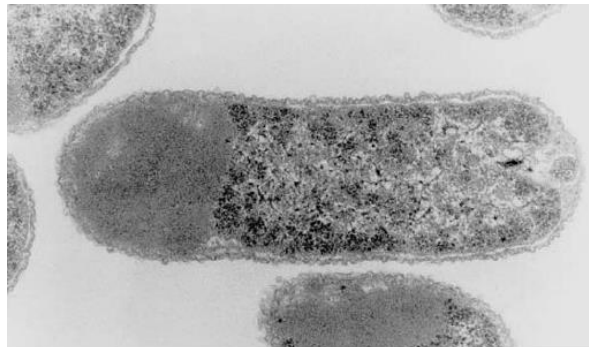
#### 1.4. Expresión de proteínas recombinantes

La expresión de proteínas recombinantes es importante para el estudio de las funciones biológicas de los genes, el desarrollo de fármacos y para procesos industriales. Hay varios sistemas de expresión de proteínas, como bacterias, levaduras, células de insecto, células de mamífero y sistemas libres de células.

La expresión en células de mamífero y células de insecto produce proteínas biológicamente activas que contienen modificaciones post-traduccionales como fosforilación, acetilación y glicosilación. Pero estos sistemas de expresión tienen rendimientos bajos y su costo es generalmente alto para su producción a escala industrial; en cuanto a los sistemas libres de células, éstos también presentan rendimientos bajos (Yamaguchi & Miyazaki, 2014).

*Escherichia coli* (*E. coli*) es la plataforma de expresión más utilizada en la producción de proteínas recombinantes cuando su actividad biológica no depende de alguna modificación post-traduccionales debido a su rápido crecimiento, sencilla manutención y capacidad para expresar grandes cantidades de proteínas heterólogas a bajo costo; no obstante, con frecuencia el producto de interés se deposita dentro de la células en agregados insolubles denominados cuerpos de inclusión (CI).

Los CI son agregados proteicos de alta densidad, localizados tanto en el citoplasma, como en el espacio periplásmico de *E. coli* durante la sobreexpresión de proteínas recombinantes (Figura 1.8). Particularmente, en *E. coli*, la formación de los CI se atribuye a la incapacidad del control de calidad de la maquinaria de plegamiento de la célula productora frente a la sobreexpresión de proteínas heterólogas (Singh & Panda, 2005).

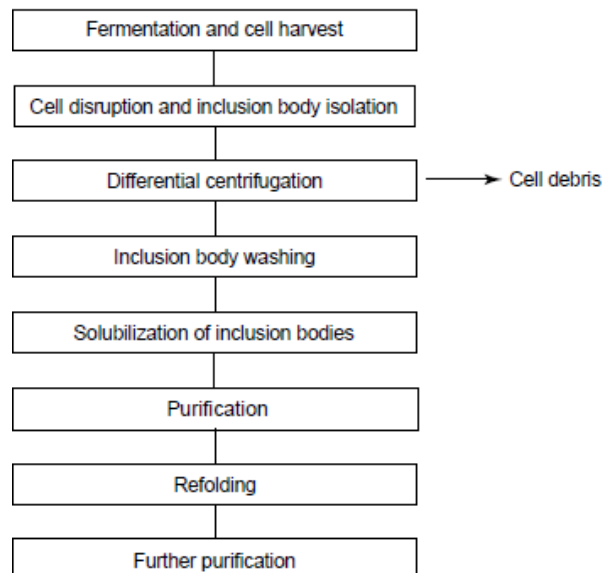


**Figura 1.8 Micrografía electrónica de *E. coli*.** Los CI se ven acumulados en el citoplasma y espacio periplasmático. Tomado de: (Fahnert, et al., 2004)

Con el objetivo de mejorar la solubilidad de una proteína, los investigadores han implementado una serie de estrategias como el cultivo de las células a temperaturas más bajas, co-expresión de la proteína de interés con chaperones y foldasas y el uso de proteínas de fusión, entre otras. Sin embargo, la expresión de proteínas recombinantes ofrece las siguientes ventajas:

1. El nivel de expresión es bastante alto ya que los CI llegan a constituir más del 30% de la proteína total de la célula.
2. La proteína de interés se protege de la degradación proteolítica de las enzimas de la célula hospedera.
3. No existe riesgo de desnaturalización durante la lisis celular y el paso inicial de purificación pues la proteína agregada en CI no tiene actividad biológica.
4. Los CI se pueden separar fácilmente de las proteínas solubles de *E. coli* por medio de centrifugación, filtración o cromatografía de exclusión molecular. Reduciéndose de esta manera el número de pasos de separación, lo cual incrementa el rendimiento del producto purificado.
5. Permite la recuperación de proteínas heterólogas tóxicas para la célula hospedera (Li, et al., 2003).

El método general utilizado en la producción de proteínas recombinantes a partir de CI se ilustra en la Figura 1.9.

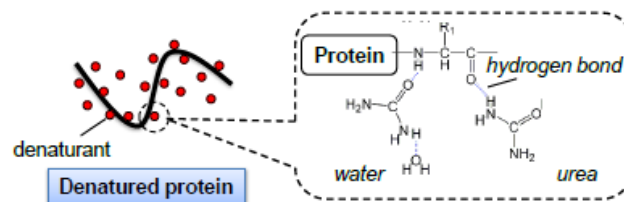


**Figura 1.9 Diagrama de flujo de producción de proteínas recombinantes a partir de CI.** Este diagrama esquematiza de forma general el proceso de obtención de proteínas acumuladas en CI. Tomado de: (Jungbauer, et al., 2004)

### 1.4.1. Aislamiento y solubilización de CI

Debido a que los CI se caracterizan por una relativamente alta densidad específica de aproximadamente 1.3 mg/mL, pueden ser cosechados después de la lisis celular por centrifugación a velocidades moderadas. Después de la lisis celular, ya sea por métodos mecánicos o enzimáticos, generalmente se tiene un alto grado de contaminantes insolubles, como proteínas integrales de membrana, por lo que los CI requieren de pasos de lavado adicionales, en éstos se puede utilizar ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), bajas concentraciones de agentes desnaturantes, tales como urea o cloruro de guanidinio (GndCl) y detergentes (Fahnert, et al., 2004; Antonio Pérez, 2012).

Posteriormente, los CI se solubilizan para lo cual se pueden usar diversos métodos; sin embargo, la elección del agente de solubilización puede afectar la etapa de repliegamiento y al costo del proceso global. Los agentes desnaturantes más usados para solubilizar los CI son el GdnHCl (6M) y urea (8M) (De Bernardez Clark, 2001). La finalidad de la solubilización es interrumpir las interacciones hidrofóbicas inespecíficas produciendo la desagregación de los CI (Figura 1.10) (Singh & Panda, 2005).





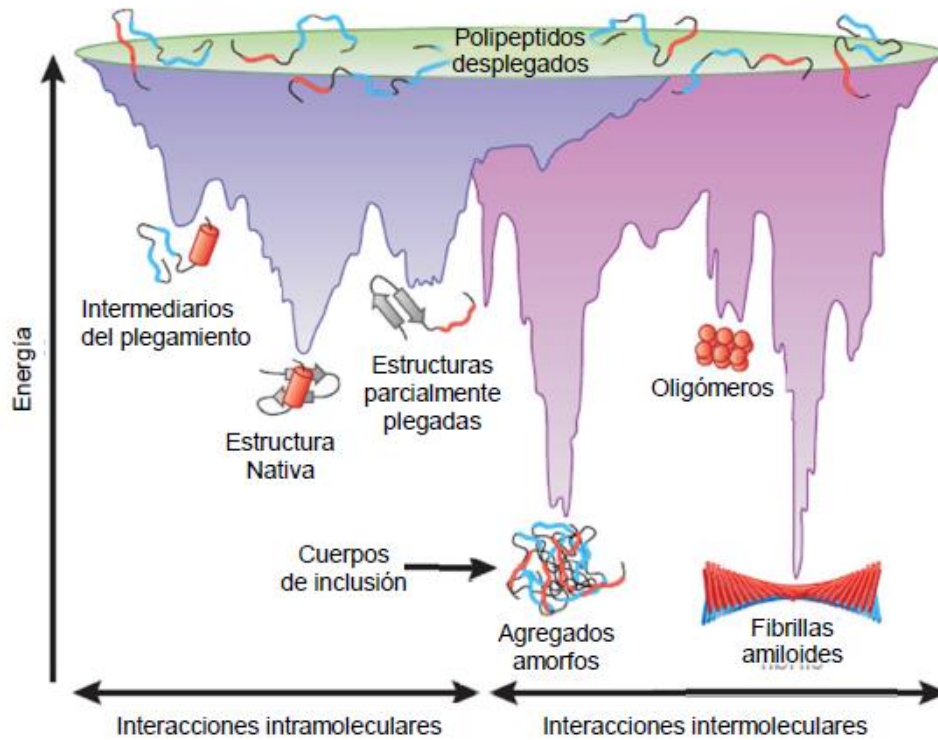
**Figura 1.10 Solubilización química de CI.** Altas concentraciones de agentes desnaturalizantes producen la desagregación de los CI. Tomado y modificado de: (Fahnert, et al., 2004).

Como resultado de la solubilización de los CI se tiene una proteína sin su configuración nativa (Antonio Pérez, 2012).

#### **1.4.2. Replegamiento in vitro de proteínas recombinantes**

El mayor reto en la producción de proteínas recombinantes a partir de CI es el de convertir estos agregados en proteínas correctamente plegadas que recuperen su función biológica.

El plegamiento está dirigido por la secuencia de aminoácidos de la proteína y comprende la secuencia de interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y de enlaces disulfuro que a través de intermediarios productivos en un proceso cooperativo formarán la estructura estable y funcional de la proteína (Antonio Pérez, 2012). En el plegamiento, se establecen interacciones intramoleculares siguiendo una reacción de primer orden y de ser necesaria la formación de oligómeros, subsecuentemente se establecerán interacciones intermoleculares ordenadas y consecutivas. No obstante, existe la posibilidad de que se establezcan interacciones intermoleculares entre dos o más moléculas de polipéptidos desplegados o bien, entre intermediarios productivos o no productivos del plegamiento, promoviendo la formación de agregados no estructurados o alternativamente, la formación de agregados fibrilares denominados “amiloides” (Figura 1.11).



**Figura 1.11 Esquema del proceso de plegamiento de una proteína.** En el embudo energético, se muestra en color azul las múltiples conformaciones previas a la adquisición de la estructura nativa por medio de interacciones intramoleculares. La violeta muestra las conformaciones resultantes de las interacciones intermoleculares que conducen a la formación de agregados amorfos o estructuras amiloides. Tomado de: (Antonio Pérez, 2012)

El replegamiento *in vitro*, es una operación unitaria en donde se deben propiciar las condiciones necesarias para llevar a cabo el correcto plegamiento de la proteína, por lo que es fundamental propiciar las condiciones de renaturalización y simultáneamente, prevenir las interacciones intermoleculares desordenadas para evitar la formación de agregados que limiten el rendimiento del proceso (Fahnert, et al., 2004; Antonio Pérez, 2012).

El replegamiento de proteínas provenientes de cuerpos de inclusión solubilizados requiere de la remoción del agente desnaturante, esto puede ser por: dilución, recambio de amortiguador a través de métodos con membranas o procesos cromatográficos.

#### 1.4.2.1. Dilución

La dilución es el método más comúnmente utilizado para la renaturalización de proteínas provenientes de CI. La proteína solubilizada es adicionada lentamente al amortiguador de replegamiento, el cual, generalmente, contienen aditivos que previenen la formación de agregados, hasta alcanzar una concentración local baja (0.001 mg/mL – 0.1 mg/mL), propiciándose así un aislamiento espacial durante el replegamiento, lo que evita su agregación.

Una consecuencia de tener una baja concentración de proteína en el replegamiento por dilución es la adición de pasos de concentración al esquema de producción. Esto se puede hacer por ultrafiltración o por etapas subsecuentes de purificación por medio de cromatografía de intercambio iónico (Jungbauer & Kaar, 2007).

A pesar de que tiene varias desventajas como la dificultad para recuperar la proteína debido a su baja concentración y a nivel operacional el volumen final de los amortiguadores empleados y las dimensiones de los tanques hacen que este proceso sea costoso, poco escalable y no controlable; es el método más usado a nivel industrial en la producción de proteínas recombinantes debido a la simplicidad del proceso (Fahnert, et al., 2004; Antonio Pérez, 2012).

#### 1.4.2.2. Diálisis

El replegamiento de proteínas mediante la aplicación de membranas está limitado a la remoción del agente desnaturizante por diálisis. Por medio de esta técnica, solo se reduce la concentración del agente desnaturizante; no obstante, la formación de agregados no se evita, ya que no contempla la disminución de las interacciones intermoleculares hidrófobas inapropiadas. Además de presentar desventajas como: tiempos de operación largos y empleo de volúmenes grandes de amortiguadores de replegamiento; ocasionando que sea un proceso poco escalable (Antonio Pérez, 2012; Yamaguchi & Miyazaki, 2014).

### 1.4.2.3. Métodos cromatográficos

Los procesos cromatográficos aplicados al replegamiento de proteínas suelen ser atractivos por la capacidad de promover simultáneamente una baja concentración local de proteína por replegar, provocando la separación espacial entre especies de replegamiento, disminuyendo así la formación de agregados. Por lo tanto, estos métodos permiten el replegamiento a concentraciones mayores de proteína que las tratadas por dilución o con membranas, lo anterior hace que estos procesos sean una alternativa potencial en el replegamiento de proteínas (Li, et al., 2003; Rathore, et al., 2013).

#### *Cromatografía de afinidad por metales inmovilizados*

La introducción de una etiqueta de poli-histidina en el amino o carboxilo terminal permite la inmovilización reversible de una proteína desnaturalizada a un soporte sólido de cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC, por sus siglas en inglés). El replegamiento se puede lograr reduciendo la concentración del agente desnaturalizante en un solo paso o por medio de un gradiente.

El replegamiento por IMAC se limita principalmente a las proteínas en las cuales la inclusión de la etiqueta de poli-histidina no interfiera con la formación de su configuración nativa.

Una desventaja adicional del replegamiento por IMAC es la unión inespecífica debida a interacciones iónicas. Concentraciones altas de sal permite un incremento en las fuerzas hidrofóbicas, favoreciendo la agregación de los intermediarios formados en el replegamiento (Li, et al., 2003; Jungbauer, et al., 2004).

#### *Cromatografía de exclusión molecular*

La cromatografía de exclusión molecular (SEC, por sus siglas en inglés) se ha utilizado extensamente desde la década de 1990 para eliminar agentes desnaturalizantes y separar intermediarios de plegamiento. Se ha hipotetizado que la remoción gradual del agente desnaturalizante a través de una columna y las diferentes propiedades de difusión entre una proteína desplegada, los intermediarios de plegamiento y los agregados en la

fase estacionaria, minimizan la probabilidad de agregación (De Bernardez Clark, 2001; Jungbauer, et al., 2004).

El tipo de gel usado para SEC tiene un efecto en el replegamiento, mientras mayor sea su intervalo de fraccionamiento, se incrementa el rendimiento y la resolución entre la proteína replegada y los agregados disminuye (Fahey , et al., 2000). Además se encontró que las condiciones de aplicación de la muestra tienen un impacto sobre la eficiencia en el replegamiento por SEC, debido a un rápido colapso estructural durante la aplicación de la muestra, lo que puede conducir a la agregación (Batas & Chaudhuri, 1999).

Los parámetros más importantes en el escalamiento de replegamiento por SEC, son las dimensiones de la columna y la velocidad de flujo, ya que ambos influyen en el rendimiento de replegamiento (Harrowing & Chaudhuri, 2003; Jungbauer, et al., 2004).

#### 1.4.3. Replegamiento oxidativo

En el caso de las proteínas que con enlaces disulfuro, los amortiguadores de replegamiento deben promover la formación de enlaces disulfuro (oxidación). El método de oxidación más simple y más barato utiliza aire en presencia de un catalizador metálico y un agente reductor para facilitar la reorganización de enlaces disulfuro. Sin embargo, la tasa de formación de enlaces disulfuro a través de la oxidación del aire puede ser limitada ~~este~~ como consecuencia de la transferencia de oxígeno lenta en soluciones acuosas. Con objeto de mejorar la transferencia de oxígeno, se puede utilizar un aumento en la agitación, pero también puede dar lugar a la agregación debido al incremento de la fuerza de corte y de la tensión superficial (De Bernardez Clark, 2001). La tasa de oxidación se puede acelerar utilizando una mezcla de reactivos oxidados y reducidos. El par más comúnmente usado es el glutatión oxidado-reducido (GSSG/GSH); sin embargo, una desventaja que tiene este sistema es el alto costo de los reactivos (De Bernardez Clark, 2001).

## 2. ANTECEDENTES DIRECTOS

Para la expresión de la proteína recombinante *rTSA-1* se han usado tres plataformas de expresión: células de insecto, *Pichia pastoris*, y *E. coli* cepa BL21(DE3). Sin embargo, los esfuerzos para obtener esta proteína de forma soluble han sido infructuosos.

En cuanto a la producción de *rTSA-1* en células de insecto, se presentan bajos rendimientos, por lo cual ha sido complicada su purificación. En la levadura *Pichia pastoris*, esta proteína no se logra expresar. Y en cuanto a la cepa BL21(DE3) de *E. coli*, la *rTSA-1*, se expresa con altos rendimientos pero en forma insoluble, es decir en CI (Zhang, 2011, datos no publicados).

### 3. JUSTIFICACIÓN

La incidencia de la enfermedad de Chagas, casi exclusivamente en las comunidades rurales y barrios urbanos pobres en países de América Latina y en el sur de Estados Unidos, ocasiona retraso del desarrollo en los niños, trastornos en los embarazos y disminución de la productividad laboral. Debido a la ineficacia de los tratamientos actuales sobretodo en la fase crónica y las limitaciones de las estrategias de control del vector han motivado el desarrollo de alternativas de tratamiento con mayor eficacia a las actuales.

Una alternativa potencial son las vacunas terapéuticas basadas en proteínas recombinantes producidas en sistemas de expresión asequibles. La porción amino proximal de la proteína *TSA-1* de *Trypanosoma cruzi* ha demostrado ser un antígeno que genera respuesta inmunoprotectora, dicha región se ha logrado expresar como cuerpos de inclusión en *Escherichia coli*; sin embargo, se requiere que la proteína adquiera su estructura nativa para su caracterización bioquímica e inmunológica. Por lo que en este proyecto se propone la implementación de un sistema de replegamiento *in vitro*, el cual permita producir proteína recombinante *rTSA-1* correctamente plegada.

## 4. HIPOTESIS

La proteína recombinante *rTSA-1* expresada en *E. coli* en cuerpos de inclusión adquirirá su estructura nativa mediante un método de replegamiento *in vitro*.



## 5. OBJETIVOS

### 5.1. GENERAL

Implementar un sistema de replegamiento *in vitro* usando las metodologías reportadas en la literatura y las desarrolladas en el grupo de trabajo para obtener la proteína recombinante *TSA-1* expresada en *E. coli* en cuerpos de inclusión, en su forma nativa

#### 5.1.1. ESPECÍFICOS

1. Expresar la proteína recombinante *rTSA-1* en *E.coli*.
2. Purificar la proteína recombinante *rTSA-1*.
3. Determinar las condiciones de replegamiento para la proteína recombinante *rTSA-1*.

## 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental que se utilizó para cumplir con los objetivos de este trabajo de investigación se dividió en 3 etapas: 1) Expresión de la proteína *rTSA-1* en diferentes cepas de *E.coli*; 2) Extracción y purificación de la proteína *rTSA-1*; y 3) Replegamiento de la proteína *rTSA-1* (Figura 6.1).

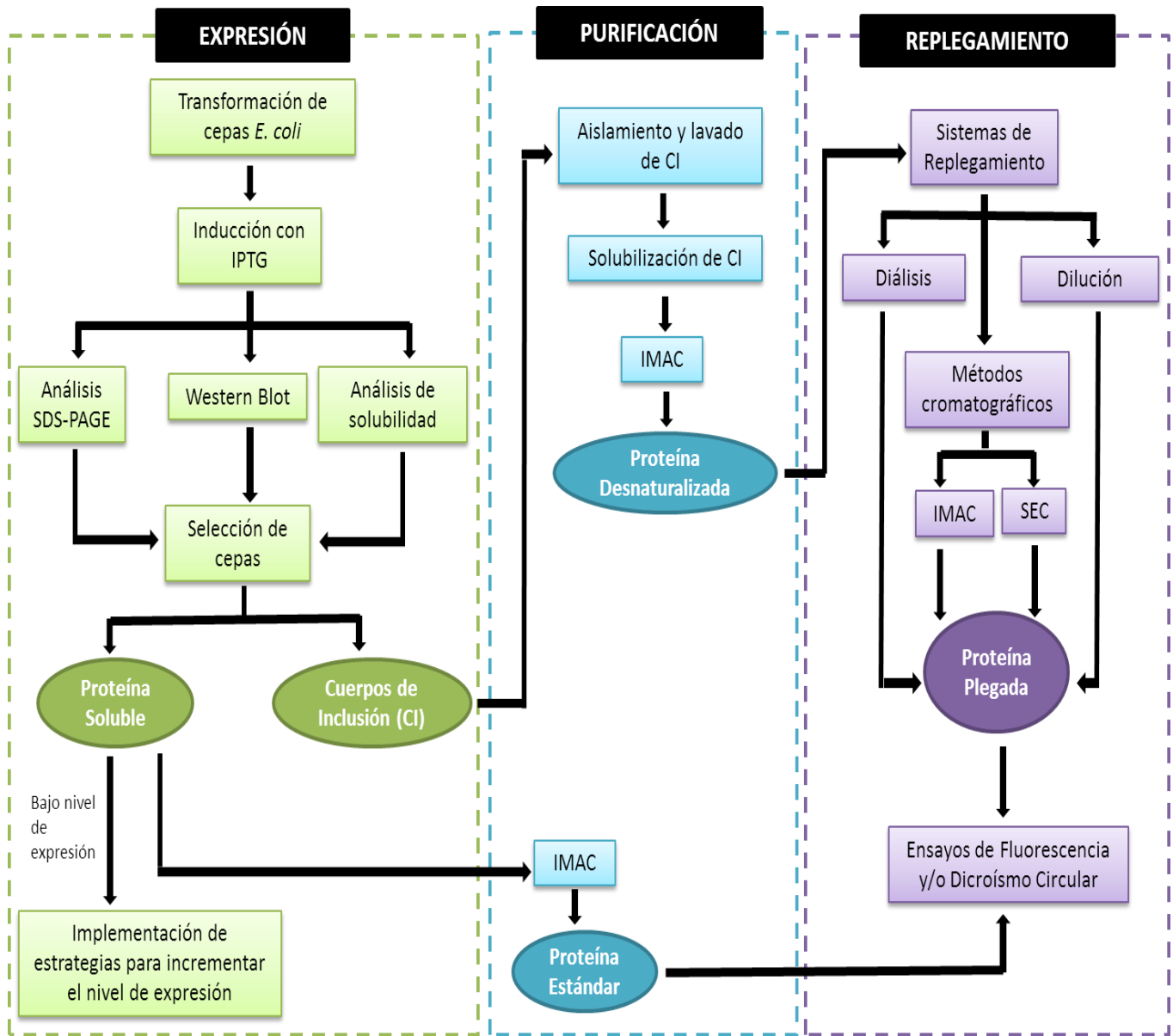


Figura 6.1 Esquema general de la estrategia experimental desarrollada durante la Tesis

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. Materiales

#### 7.1.1. Reactivos

Los reactivos químicos utilizados en los experimentos de las etapas de expresión, purificación y replegamiento de la proteína *rTSA-1* fueron de grado analítico (Tabla A.1, Apéndice A)

#### 7.1.2. Vector de expresión

Para la expresión de la proteína *rTSA-1* se utilizó el vector pET-41 $\alpha$  (Novagen) (Figura B.1, Apéndice B), conteniendo la secuencia de DNA que codifica para la región amino proximal del antígeno TSA-1 (pET-41 $\alpha$ -TSA-1)

#### 7.1.3. Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas de *E. coli* que se utilizaron para realizar los ensayos de expresión de la proteína *rTSA-1* fueron: BL21(DE3), Lemo21(DE3), C41(DE3), C43(DE3), Rosetta y Rosetta 2.

Los genotipos de *E. coli* utilizados fueron seleccionados por ser específicos para la obtención de proteína tóxicas o con baja solubilidad y sus características se enlistan en la Tabla C.1 (Ver Apéndice C)

## 7.2. Métodos

### 7.2.1 Análisis bioinformático de la proteína *rTSA-1*

La secuencia de residuos de aminoácidos del fragmento de la *TSA-1* a expresar en forma recombinante en *E. coli* y varias herramientas bioinformáticas disponibles en el Internet, se usaron para predecir las propiedades físicas y químicas, estructura secundaria y terciaria, enlaces disulfuro potenciales y propensión de agregación de la proteína recombinante.

El cálculo del punto isoelectrico teórico y el peso molecular de la proteína *rTSA-1* se hizo con **Compute pI/Mw** ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)) (Bjellqvist, et al., 1993; Bjellqvist, et al., 1994; Gasteiger, et al., 2005). Mientras que para los siguientes parámetros: coeficiente de extinción, índice de inestabilidad, índice alifático y índice de hidropaticidad se empleó el servidor **ProtParam** (<http://web.expasy.org/protparam/>) (Gasteiger, et al., 2005).

La predicción de la estructura secundaria de la proteína *rTSA-1* se realizó a través del servidor **PSIPRED v3.3** (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) (Jones, 1999).

Para modelar la estructura terciaria de la proteína *rTSA-1* se usó la herramienta **I-TASSER** (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) (Yang, 2008; Ambrish, et al., 2010; Ambrish, et al., 2012) basada en la estrategia de modelamiento “Threading” o hilado. Se evaluó la calidad del modelo calculando el Z-score con la herramienta Ramachandran plot evaluation, una opción del programa **What if**.

La formación de posibles puentes disulfuro en la proteína *rTSA-1* se hizo por medio de la aplicación informática **DiANNA 1.1** (<http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA/>) (Ferre & Clote, 2005; Ferre & Clote, 2006)

La predicción de las regiones en la secuencia de aminoácidos de la proteína *rTSA-1* propensas a la agregación (“hotspot”) se localizaron usando el programa **Aggrescan** (<http://bioinf.uab.es/aggrescan/>) (Conchillo-Solé, et al., 2007). Este servidor permite por medio de la utilización de un algoritmo rápido y sencillo, predecir y evaluar la presencia de puntos de agregación en las cadenas polipeptídicas.

### 7.2.2. Expresión de la proteína *rTSA1-1*

Se hizo un análisis de solubilidad transformando células competentes de diferentes cepas de *E. coli* con el plásmido pET-41 $\alpha$ -TSA-1 (donado por *Sabin Vaccine Institute* y *Texas Children's Center for Vaccine Development*) para tratar de obtener la proteína *rTSA-1* en forma nativa y así poder usarla como control en los ensayos de replegamiento.

Las cepas transformadas con el vector pET-41 $\alpha$ -TSA-1 fueron cultivadas en tubos conteniendo 3 mL de medio LB (Luria-Bertani) con los antibióticos correspondientes (0.05 mg/mL de kanamicina y 0.034 mg/mL de cloranfenicol dependiendo de la cepa), a 37 °C con una agitación de 200 rpm durante 16 h. Después, 0.1 mL de estos pre-inóculos fueron transferidos a tubos con 5 mL de LB con los antibióticos correspondientes, los cuales se dejaron crecer a 37 °C con una agitación de 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6-0.7 DO a 600 nm (DO<sub>600</sub>). Una vez que los cultivos tuvieron la DO<sub>600</sub> deseable se les adicionó 1 mM de IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido) para inducir la expresión de *rTSA-1* a 30 °C con una agitación constante de 200 rpm durante 16 h. Posteriormente, se hizo el análisis por medio de electroforesis SDS-PAGE y Western blot de las fracciones correspondientes a: proteína total, fracción soluble y fracción insoluble para cada uno de los cultivos siguiendo el protocolo descrito en el Manual de Sistemas de expresión pET de Novagen®.

De las cepas donde se detectó presencia de *rTSA-1* en forma soluble se escogió la cepa C41 para producirla y usarla como control positivo de replegamiento. Para lo cual se utilizó un fermentador con 2.5 L de medio LB adicionado con kanamicina (0.05 mg/mL) y 0.25% de glucosa. La inducción se hizo con 1 mM de IPTG durante 16 h a 16 °C, manteniéndose la concentración de oxígeno disuelto en 30%. Después de la inducción de 16 h en la cepa C41, las células fueron cosechadas a 4500 rpm por 20 min a 4 °C y lavadas en PBS 1X. Se realizó inmediatamente la lisis celular en buffer de lisis (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 1 mM PMFS, 20 mM de imidazol, 10% glicerol); después se le adicionó lisozima hasta una concentración final de 1 mg/mL, se dejó incubando por 30 min a 4 °C con agitación constante, luego se le agregó DNase (0.001 mg/mL) durante 15 min a

temperatura ambiente y se sonicó durante 10 min con intervalos de descanso de 40 s. La fracción soluble se recuperó por centrifugación a 13000 rpm por 30 min a 4 °C .

Por otra parte, la producción de *rTSA-1* en forma de CI para los ensayos de repliegamiento se hizo con la cepa BL21(DE3) de *E. coli* en cultivos de 1.5 L de medio LB suplementado con kanamicina (0.05 mg/mL) en matraces Fernbach. La expresión de esta proteína se indujo con 1 mM de IPTG por 16 h a 30 °C con una agitación constante de 250 rpm. La biomasa de los cultivos de derivados de la cepa BL21(DE3) fue recuperada por centrifugación a 4500 rpm por 20 min a 4 °C y resuspendida en buffer de lisis (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM PMFS, 1 mM DTT). A la suspensión anterior se le agregó lisozima (1 mg/mL) y se dejó incubar por 30 min a 4 °C con agitación constante, luego se le adicionó DNase (0.001 mg/mL) durante 15 min a temperatura ambiente; después se somete a choque térmico con hielo seco-etanol por tres veces y finalmente se centrifuga a 13000 rpm en un lapso de 30 min a 4 °C descartándose el sobrenadante.

La pastilla resultante se resuspendió en buffer de lavado I (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 2 M urea, 2% Tritón 100X) durante 15 min y después se centrifugó a 13000 rpm por 20 min a 4 °C. El segundo lavado se hizo suspendiendo la pastilla en buffer de lavado II (20 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, 2 M GndCl) en un periodo de 15 min y después se centrifugó a 13000 rpm por 20 min a 4 °C. El tercer lavado se realizó con buffer de lavado III (20 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, 2% de sarcosil) por 15 min y después se centrifugó a 13000 rpm en un lapso de 20 min a 4 °C. Cada uno de los lavados se hizo dos veces.

La solubilización de los CI se llevó a cabo con buffer de solubilización (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 8 M urea, 1 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 5 mM imidazol) en agitación constante durante 16 h a 4 °C. Después la solución de CI solubilizados fue centrifugada a 13000 rpm por 40 minutos a 4 °C y filtrada por una membrana de 0.22  $\mu$ m.

### 7.2.3. Purificación de la proteína *rTSA-1*

La fracción soluble obtenida de la lisis celular de la cepa C41 se dejó interaccionando toda la noche con 2 mL de resina Ni sepharose™ 6 Fast Flow (Amersham GE) previamente equilibrada con 10 CV de buffer de unión (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 1 mM PMFS, 20 mM de imidazol, 10% glicerol), después se hicieron lavados con

10 CV de buffer de unión y la proteína se eluyó con buffer de elución (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 1 mM PMFS, 500 mM de imidazol, 10% glicerol). Todos los pasos de la cromatografía se hicieron a un flujo de 1 mL/min

Por otro lado, los CI solubilizados de *rTSA-1* se purificaron en condiciones desnaturizantes interaccionaron con 5 ml de resina Ni sepharose™ 6 Fast Flow (Amersham GE) empacada en una columna de vidrio 1.5 x 20 cm (Biorad) y equilibrada con 10 CV de buffer de unión (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 8 M urea, 1 mM β-mercaptoetanol, 5 mM imidazol) con un flujo de 1 mL/min. Después se hicieron lavados con 3 CV de buffer de unión, 3 CV de buffer de lavado I (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 8 M urea, 1 mM β-mercaptoetanol, 50 mM imidazol; 0.1% tritón 114) y 3 CV de buffer de lavado II (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 8 M urea, 1 mM β-mercaptoetanol, 50 mM imidazol) respectivamente. La elución se hizo con 10 CV de buffer de elución (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 8 M urea, 1 mM β-mercaptoetanol, 1 M imidazol) a 1 mL/min. Este proceso se llevó a cabo en un cromatógrafo BioLogic HR-BioRad.

#### 7.2.4. Replegamiento de la proteína *rTSA-1*

##### 7.2.4.1 Selección de buffer de replegamiento.

El buffer de replegamiento es una parte esencial en el diseño de un eficiente protocolo de replegamiento. En este proyecto la selección del buffer para replegar la proteína *rTSA-1* se hizo mediante el replegamiento por filtración en gel probando 3 buffers diferentes, tal como se describe a continuación.

Primeramente, se equilibró una columna de filtración en gel PD-10 empacada con Sephadex G-25 (GE Health Care) con 25 mL de buffer replegamiento (**Buffer A:** 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 5% glicerol, 1 mM EDTA, 1 M urea y 1 mM DTT; **Buffer B:** 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 5% glicerol, 1 mM EDTA, 1 M urea, 0.4 mM GSSG y 0.2 mM GSH; **Buffer C:** 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 5% glicerol y 1 M urea), después se cargaron 2.5 mL de proteína desnaturizada y purificada con una concentración de 0.5 mg/mL y se eluyó con 3.5 mL de buffer de replegamiento respectivo en cada caso.

Posteriormente, la proteína se dializó en buffer de almacenamiento (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM NaCl), posteriormente, se filtró por una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore) y se guardó a 4 °C para su análisis posterior. La concentración final de la proteína en cada caso fue de 0.14 mg/mL.

De acuerdo a con los resultados obtenidos del replegamiento con los buffers A, B y C, fue seleccionado el buffer B para realizar experimentos de replegamiento con proteína *rTSA-1* por diálisis, dilución y cromatografía de exclusión molecular. Adicionalmente, se hizo también el ensayo de replegamiento por medio de cromatografía de afinidad a níquel.

#### **7.2.4.2. Replegamiento de la proteína *rTSA-1* por diálisis**

El replegamiento por diálisis se realizó por pasos, es decir, bajando gradualmente la concentración de urea desde 8 M hasta 0 M. Primeramente, se introdujeron 50 ml de proteína desnaturizada y purificada con una concentración de 0.1 mg/ml en una bolsa de diálisis, la cual se dejó dializando contra un volumen de 1 L de buffer de replegamiento B adicionado con 4 M de urea; luego se hizo un cambio con 1 L de buffer de replegamiento B con 2 M de urea; posteriormente, la proteína se dializó contra 1 L de buffer de replegamiento B. El tiempo de diálisis para cada etapa fue de 4 h manteniendo la temperatura a 4 °C.

Finalmente, la proteína se dializó durante toda la noche en 1 L de buffer sin urea (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM NaCl, 5% glicerol) a 4 °C, después se filtró por una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore) y se concentró por medio de cromatografía de intercambio iónico (IEX), proceso que se describe más adelante.

Para los análisis de fluorescencia y dicroísmo circular la proteína obtenida de la elución de IEX, fue dializada en buffer de almacenamiento y guardada a 4 °C.

#### **7.2.4.3. Replegamiento de la proteína *rTSA-1* por dilución**

En los ensayos de replegamiento por dilución, la proteína purificada y desnaturizada se adicionó al buffer de replegamiento B con un flujo de 0.06 ml/min manteniendo una agitación magnética moderada a 25 °C hasta alcanzar una



concentración final de 0.1 mg/ml. El volumen final de la reacción de replegamiento fue de 100 ml, el cual se filtró por una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore).

El proceso de replegamiento por dilución se escaló a 1 L de volumen final de reacción en un reactor, en el cual la proteína purificada y desnaturalizada fue adicionada con un flujo de 0.1 ml/min al buffer de replegamiento B hasta alcanzar una concentración final de 0.1 mg/ml. Durante el proceso se mantuvo la agitación entre 250 y 300 rpm, la temperatura en 25 °C y el pH entre 8.0 y 8.5. Después la proteína fue filtrada por una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore).

Tanto la proteína replegada en 100 ml como la que se replegó en el reactor fue capturada por medio de IEX, proceso que se describe más adelante.

La proteína capturada por IEX del replegamiento por dilución en 100 ml fue dializada en buffer de almacenamiento para realizar el análisis de fluorescencia y guardada a 4 °C.

#### 7.2.4.4. Replegamiento cromatográfico de la proteína *rTSA-1*

Los métodos cromatográficos que se utilizaron para replegar la proteína *rTSA-1* fueron cromatografía de afinidad a níquel (IMAC) y cromatografía de exclusión molecular (SEC).

##### *Cromatografía de afinidad a níquel*

El replegamiento por IMAC se hizo a partir de CI solubilizados en 8 M de urea, estos interaccionaron con 5 ml de resina de Ni sepharose™ 6 Fast Flow (Amersham GE) empacada en una columna de 1.5x15 cm equilibrada con 3 CV de buffer de solubilización (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 8 M urea, 1 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 5 mM imidazol) a 0.5 ml/min. Después se lavó con 3 CV de buffer de solubilización y se hizo un gradiente lineal de urea (de 4 a 0 M) e imidazol (de 50 a 125 mM) con 3 CV a 1 mL/min. En la elución se corrieron 3 CV de buffer de elución (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 500 mM imidazol). Este proceso se llevó a cabo en un cromatógrafo LP-BioRad a temperatura ambiente.

Al término del replegamiento por el método de cromatografía de afinidad a níquel, la proteína se dializó en buffer de almacenamiento a 4 °C para su análisis posterior

### *Cromatografía de exclusión molecular*

El proceso de replegamiento por SEC se llevó a cabo en una columna vidrio 2.5 x 75 cm, empacada con 70 ml de resina Superose® 6 Prep Grade (Sigma-Aldrich).

La columna fue empacada y equilibrada con 1.5 CV de buffer sin urea (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM NaCl, 5% glicerol), posteriormente, fue adicionado el buffer de replegamiento (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 5% glicerol, 1 mM EDTA, 0.4 mM GSSG, 0.2 mM GSH) con 8 M de urea en gradiente lineal en 0.4 CV, de tal forma que quedó una concentración de 8 M de urea en la parte superior de la columna, bajando gradualmente la concentración de ésta hasta 0 en la parte inferior de la columna. Después se inyectaron a la columna 5 ml de proteína desnaturalizada y purificada con una concentración de 0.5 mg/ml, una vez inyectada la proteína se pasó a la columna 1.5 CV de buffer sin urea. El flujo utilizado durante el equilibrio, la inyección de proteína y la elución de la misma fue de 0.5 ml/min. Este proceso fue realizado en un cromatógrafo NGC-Biorad a una temperatura de 25 °C. Las fracciones de elución de la proteína *rTSA-1* fueron colectadas y dializadas en buffer de almacenamiento a 4 °C para su análisis posterior.

#### **7.2.5. Captura de proteína replegada**

La proteína replegada por el método de diálisis y dilución fue capturada por medio de IEX debido a su baja concentración.

La proteína replegada por diálisis se dejó interaccionar con 1 ml de resina Q sepharose (Amersham GE) previamente equilibrada con 10 CV de buffer sin urea (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM NaCl, 5% glicerol), posteriormente, se hizo un lavado con 10 CV del mismo buffer. La elución de la proteína se llevó a cabo con 10 CV de buffer IEX-Elu (20 mM de Tris-HCl pH 8.0, 1 M de NaCl, 5% de glicerol).

Para la proteína replegada por dilución su captura se hizo en 1 ml de resina Q sepharose (Amersham GE), la cual se equilibró con buffer de unión B (1.34 M urea, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM NaCl, 5% glicerol, 1 mM EDTA, 0.4 mM GSSG, 0.2 mM GSH). Luego se hizo gradiente con 10 CV para bajar la concentración de urea hasta 0 usando el buffer IEX-GSG (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM NaCl, 5% glicerol, 1 mM EDTA, 0.4 mM GSSG, 0.2 mM GSH). Después se lavó la columna con 10 CV de buffer IEX-GSG, seguido de otro lavado con 10 CV de buffer IEX-20 (20 mM de Tris-HCl pH 8.0, 20 mM de NaCl, 5% de glicerol). Después se hizo la elución con 10 CV de buffer IEX-Elu (20 mM de Tris-HCl pH 8.0, 1 M de NaCl, 5% de glicerol).

En el proceso de IEX se utilizó un cromatógrafo BioLogic HR-BioRad a temperatura ambiente y todos los pasos de la cromatografía se hicieron a un flujo de 1 ml/min.

#### 7.2.6. Espectros de fluorescencia de la proteína *rTSA-1*

La agregación de la muestra se observó en función de “Light scattering” mediante lecturas a 320 nm (longitud de onda de excitación y emisión).

Los espectros de fluorescencia intrínseca de la *rTSA1* se obtuvieron excitando las muestras de proteína plegada a una longitud de onda de 295 nm con un barrido de emisión entre 300 y 400 nm. Las rendijas de excitación y emisión fueron de 5 nm. La señal se adquirió cada 1 nm, y el tiempo de integración fue de 1 s.

La fluorescencia del ANS (1-anilino-naphthalene-8-sulfonic) se obtuvo a longitud de onda de excitación de 370 nm con un espectro de emisión de 400 nm hasta 600 nm para lo cual se agregaron 17  $\mu$ L de un stock de ANS (10 mM) a 1.7 mL de solución de proteína plegada, luego se dejó incubar durante 30 min con agitación constante en oscuridad.

Los experimentos se realizaron a 25 °C en un fluorómetro FluoroMax-3 (Jobin Yvon Horiba) conectado a una celda Peltier, utilizando una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico (Fisherbrand) y la concentración final de la proteína en todas las muestras fue de 2.1  $\mu$ M.

### 7.2.7 Espectros de dicroísmo circular de la proteína *rTSA-1*

Los estudios de dicroísmo circular de la proteína *rTSA-1* plegada se realizaron en el **Laboratorio de Investigación Bioquímica** en el **Departamento de Biomedicina Molecular de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, Instituto Politécnico Nacional**, bajo la asesoría de la Dra. Claudia Benítez Cardoza. Se utilizó el equipo JASCO -815 (Jasco Inc., Easton, MD) con portaceldas tipo Peltier para el control de temperatura, manteniéndose ésta en 25 °C para todos los experimentos. Las celas de cuarzo usadas fueron de 0.1 cm y 1 cm de recorrido óptico dependiendo del caso. Los resultados se reportan en elipticidad molar por residuos a partir de la masa promedio de 110.22 g/mol.

### 7.2.8. Determinación del estado de agregación de la *rTSA-1* por cromatografía de exclusión molecular.

Para analizar el estado de agregación tamaño de la proteína *rTSA-1* replegada, se cargaron alícuotas de 500 µl a una columna analítica de exclusión por tamaño molecular (Superose 12 H/R 10/300 G, GE Healthcare) previamente equilibrada con 2.5 CV de buffer SEC (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM NaCl, 5% glicerol). Para resolver las muestras se utilizó un flujo de 0.5 ml/min de buffer SEC.

### 7.2.9. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

Las muestras de proteínas se cargaron en geles de poliacrilamida al 10%, previamente éstas se resuspendieron en buffer de muestra 4X (200 mM Tris-HCl pH 6.8, 5% β-mercaptoetanol, 8% SDS (sodio dodecil sulfato), 40% glicerol y 0.4% de azul de bromofenol) (*Laemmli, 1970*), se hirvieron por 5 min y se centrifugaron a 13,000 rpm por 1 min. Las corridas se hicieron en una cámara de electroforesis vertical (Bio-Rad) con buffer de corrida 1X; aplicando un voltaje constante de 85 V por 15 min y después se subió el voltaje a 100 V durante 1.5 h.

Los geles de poliacrilamida se tiñeron con una solución de azul brillante de Coomassie (50% metanol, 10% ácido acético, 0.5% azul de Coomassie) por 1 ó 2 h con agitación suave. Se retiró la solución de tinción y el exceso de colorante se eliminó, mediante incubación en solución de lavado (25% metanol, 10% ácido acético y 65% agua).

El gel se decoloró realizando varios cambios de la solución de lavado hasta que las bandas proteicas se visualizaron con nitidez.

También se corrieron muestras de proteína replegada en condiciones no reductoras, lo cual significa que no se agregó  $\beta$ -mercaptoetanol en el buffer de muestra 4X, y que no fueron calentadas a 100 °C.

Las imágenes de los geles de poliacrilamida obtenidos se capturaron a través del fotodocumentador (Bio-Rad).

#### 7.2.10. Western-Blot

La identificación de la proteína *rTSA-1* en fracciones obtenidas de la inducción en las cepas de *E. coli*, se llevó a cabo mediante ensayos tipo Western Blot. Previamente, las proteínas de las muestras fueron separadas por electroforesis SDS-PAGE, después el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa de acuerdo al método estandarizado de electrotransferencia (Towbin, et al., 1979). Una vez finalizada la transferencia, la membrana se lavó con agua destilada y se tiñó con una solución de Rojo Ponceau durante 5 minutos para visualizar las proteínas totales transferidas a la membrana. Posteriormente la membrana se lavó varias veces con agua desionizada para eliminar el colorante. Luego la membrana se bloqueó durante toda la noche con solución de bloqueo (10% leche descremada, PBS 1X y 0.1% Tween 20) a 4 °C. Al día siguiente la membrana se lavó 5 veces con solución de lavado (PBS 1X y 0.1% Tween 20) y a continuación se incubó con el anticuerpo primario anti-histidinas (Roche) con una dilución de 1:800 a 4 °C por 16 h en solución de lavado. Después se realizaron 5 lavados con solución de lavado y la membrana se incubó por 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa, diluido 1:2500 en solución de incubación (2.5% leche descremada, PBS 1X y 0.1% Tween 20), se hicieron 5 lavados con solución de lavado.

Finalmente, el revelado de la señal inmunoreactiva se llevó a cabo por colorimetría o por el método de quimioluminiscencia sobre un film rayos-X (Kodak, New Haven, NH).



## 8. RESULTADOS

### 8.1. Análisis bioinformático de la proteína rTSA-1

La proteína *rTSA-1* se compone de 596 aminoácidos que incluyen del aminoácido 30 al 617 de la proteína *TSA-1* del parásito *T. cruzi* y una etiqueta de 6 histidinas ubicada en el extremo carboxilo. El peso molecular estimado de la *rTSA-1* es de 65694.02 g/mol y su punto isoeléctrico teórico es de 5.51, lo que le confiere un carácter ácido a la proteína.

Las propiedades fisicoquímicas obtenidas mediante **ProtParam** se enlistan en la Tabla 8.1. El coeficiente de extinción molar se usó para calcular la concentración de la proteína en procesos de purificación y replegamiento de la misma. El índice de inestabilidad estimado es menor que 40, lo que sugiere que esta proteína es estable (Guruprasad, et al., 1990). Por otra parte, el índice alifático, volumen relativo ocupado por las cadenas laterales alifáticas, permite inferir que la proteína es termoestable (Hooda, 2011). Por otra parte, el índice de hidropaticidad (GRAVY) indica que la proteína *rTSA-1* tiene carácter hidrofílico (Kyte & Doolittle, 1982)

Por otra parte, la estructura secundaria de la proteína *rTSA1-1* estimada *in silico* mediante el servidor **PSIPRED v3.3** muestra que esta proteína es rica en láminas- $\beta$  y que tiene en menor proporción hélices- $\alpha$ . Lo anterior, se puede observar en la Figura 8.1, donde se señalan los aminoácidos que están formando láminas- $\beta$  por medio de flechas amarillas; en cambio, los aminoácidos que se encuentran involucrados en hélices- $\alpha$  se indican con cilindros rosas.

Tabla 8.1 Parámetros fisicoquímicos de la proteína recombinante *rTSA-1*

Parámetro	Valor																																																																		
<b>Coefficiente de extinción molar</b>	116100 M-1cm-1 (suponiendo que todos los pares de cisteína formen cistinas) 115850 M-1 cm-1 asumiendo que todas las cisteínas se encuentran																																																																		
<b>Índice de inestabilidad</b>	34.58																																																																		
<b>Índice alifático</b>	79.61																																																																		
<b>Composición de aminoácidos</b>	<table> <tbody> <tr><td>Ala (A)</td><td>38</td><td>6.4%</td></tr> <tr><td>Arg (R)</td><td>24</td><td>4.0%</td></tr> <tr><td>Asn (N)</td><td>28</td><td>4.7%</td></tr> <tr><td>Asp (D)</td><td>28</td><td>4.7%</td></tr> <tr><td>Cys (C)</td><td>4</td><td>0.7%</td></tr> <tr><td>Gln (Q)</td><td>18</td><td>3.0%</td></tr> <tr><td>Glu (E)</td><td>44</td><td>7.4%</td></tr> <tr><td>Gly (G)</td><td>55</td><td>9.2%</td></tr> <tr><td>His (H)</td><td>14</td><td>2.3%</td></tr> <tr><td>Ile (I)</td><td>24</td><td>4.0%</td></tr> <tr><td>Leu (L)</td><td>50</td><td>8.4%</td></tr> <tr><td>Lys (K)</td><td>33</td><td>5.5%</td></tr> <tr><td>Met (M)</td><td>10</td><td>1.7%</td></tr> <tr><td>Phe (F)</td><td>22</td><td>3.7%</td></tr> <tr><td>Pro (P)</td><td>29</td><td>4.9%</td></tr> <tr><td>Ser (S)</td><td>42</td><td>7.0%</td></tr> <tr><td>Thr (T)</td><td>50</td><td>8.4%</td></tr> <tr><td>Trp (W)</td><td>17</td><td>2.9%</td></tr> <tr><td>Tyr (Y)</td><td>15</td><td>2.5%</td></tr> <tr><td>Val (V)</td><td>51</td><td>8.6%</td></tr> <tr><td>Pyl (O)</td><td>0</td><td>0.0%</td></tr> <tr><td>Sec (U)</td><td>0</td><td>0.0%</td></tr> </tbody> </table>	Ala (A)	38	6.4%	Arg (R)	24	4.0%	Asn (N)	28	4.7%	Asp (D)	28	4.7%	Cys (C)	4	0.7%	Gln (Q)	18	3.0%	Glu (E)	44	7.4%	Gly (G)	55	9.2%	His (H)	14	2.3%	Ile (I)	24	4.0%	Leu (L)	50	8.4%	Lys (K)	33	5.5%	Met (M)	10	1.7%	Phe (F)	22	3.7%	Pro (P)	29	4.9%	Ser (S)	42	7.0%	Thr (T)	50	8.4%	Trp (W)	17	2.9%	Tyr (Y)	15	2.5%	Val (V)	51	8.6%	Pyl (O)	0	0.0%	Sec (U)	0	0.0%
Ala (A)	38	6.4%																																																																	
Arg (R)	24	4.0%																																																																	
Asn (N)	28	4.7%																																																																	
Asp (D)	28	4.7%																																																																	
Cys (C)	4	0.7%																																																																	
Gln (Q)	18	3.0%																																																																	
Glu (E)	44	7.4%																																																																	
Gly (G)	55	9.2%																																																																	
His (H)	14	2.3%																																																																	
Ile (I)	24	4.0%																																																																	
Leu (L)	50	8.4%																																																																	
Lys (K)	33	5.5%																																																																	
Met (M)	10	1.7%																																																																	
Phe (F)	22	3.7%																																																																	
Pro (P)	29	4.9%																																																																	
Ser (S)	42	7.0%																																																																	
Thr (T)	50	8.4%																																																																	
Trp (W)	17	2.9%																																																																	
Tyr (Y)	15	2.5%																																																																	
Val (V)	51	8.6%																																																																	
Pyl (O)	0	0.0%																																																																	
Sec (U)	0	0.0%																																																																	
<b>Índice de hidropaticidad (GRAVY)</b>	-0.327																																																																		



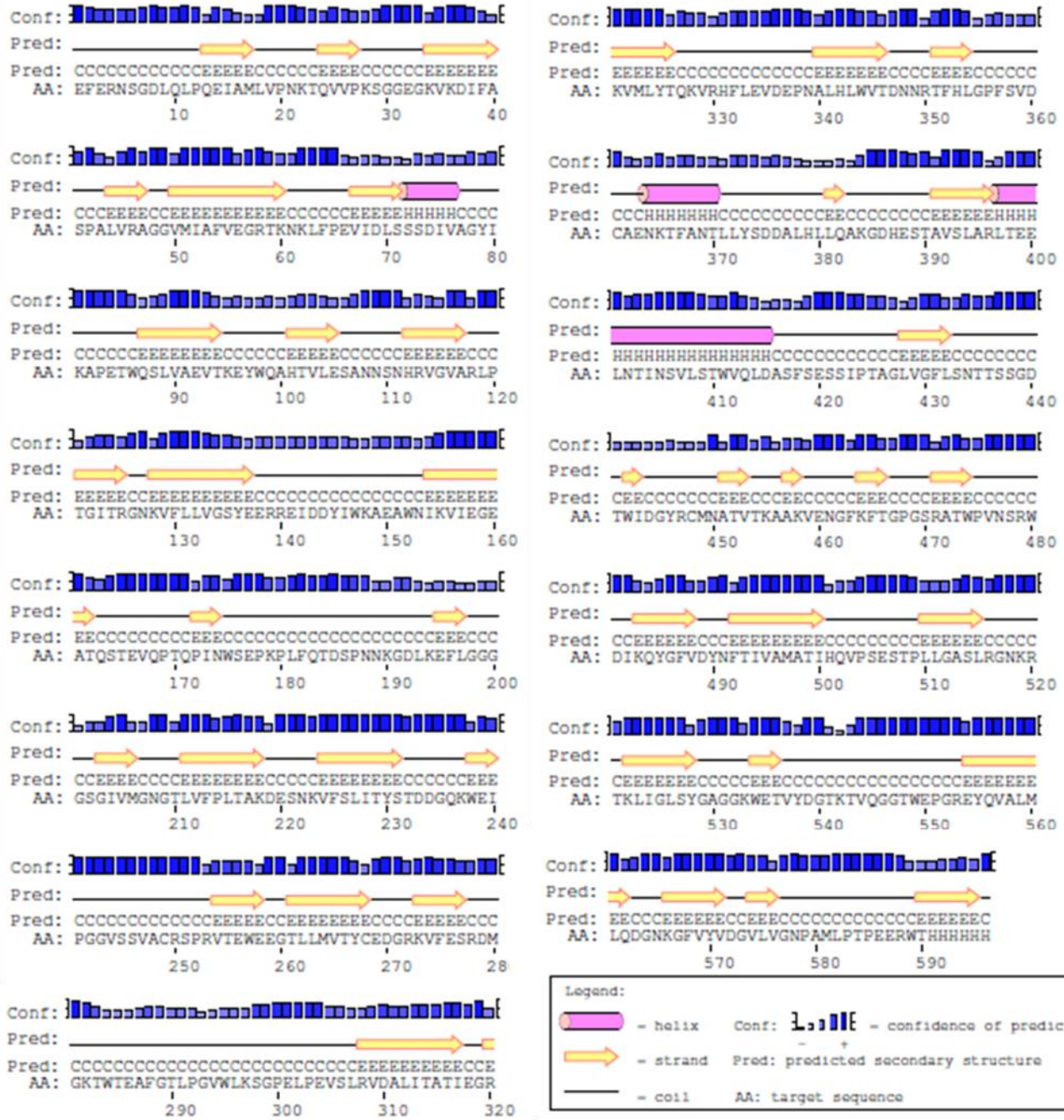


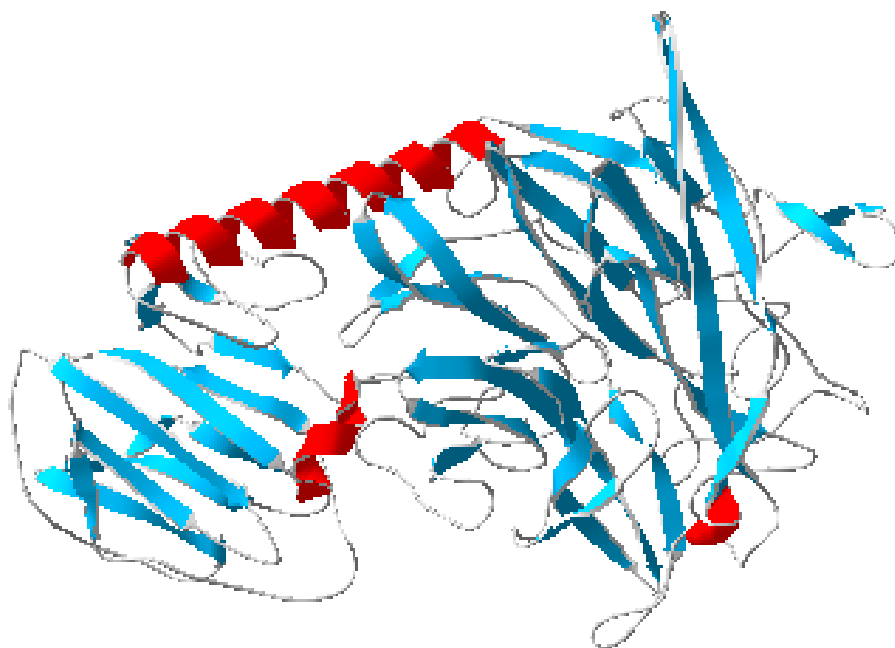
Figura 8.1 Estructura secundaria de la proteína *rTSA-1* obtenida con PSIPRED v3.3 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>).

La Figura 8.2 (A) esquematiza el modelo tridimensional de la proteína *rTSA-1* obtenido con **i-TASSER**. Este modelo sugiere que la proteína se conforma mayormente por láminas- $\beta$  (color azul), en comparación con las hélices- $\alpha$  presentes (color rojo). El *Z-score*, valor que sirve para evaluar la calidad de un modelo 3D basado en el gráfico de Ramachandran y en las estructuras reportadas en el *PDB* (*Protein Data Bank*, por sus siglas en inglés), calculado para este modelo es de -1.219, lo obtenido sugiere que el modelo es aceptable; ya que modelos de alta calidad tienen valores de *Z-scores* cercanos a cero, en tanto que valores de 4.0 o menores indican serios problemas con la estructura (Hooft, et al., 1997).

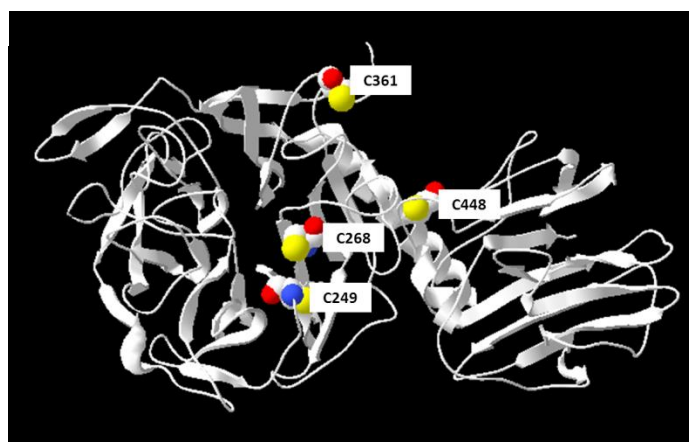
Por otra parte, el análisis resultante del servidor **DiANNA** sugiere que las cuatro cisteínas presentes en la secuencia de la *rTSA-1* participan en la formación de dos puentes disulfuro (C249-C448 y C268-C361). Sin embargo, de acuerdo al modelo 3D de la proteína se puede observar en la Figura 8.2 (B) que sólo las cisteínas C249 y C268 están lo suficiente cercanas para formar puentes disulfuro, por lo que es probable que en la proteína solo este presente un enlace disulfuro entre estas cisteínas.

El análisis de la secuencia de *rTSA-1* con programa **Aggrescan** muestra la presencia de 21 regiones propensas a la agregación que se encuentran señaladas en las áreas bajo las líneas rojas a lo largo de la secuencia de aminoácidos ("*hot spots*") susceptibles a la agregación (Figura 8.3), lo que podría explicar la dificultad para expresar esta proteína en forma soluble.

A)



B)



**Figura 8.2 A)** Estructura tridimensional de la proteína *rTSA-1* obtenida *in silico* con i-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). Las láminas- $\beta$  predominan en la estructura (azul), en comparación con las hélices- $\alpha$  (rojo). **B)** Modelo 3D mostrando las 4 cisteínas que tiene la proteína.

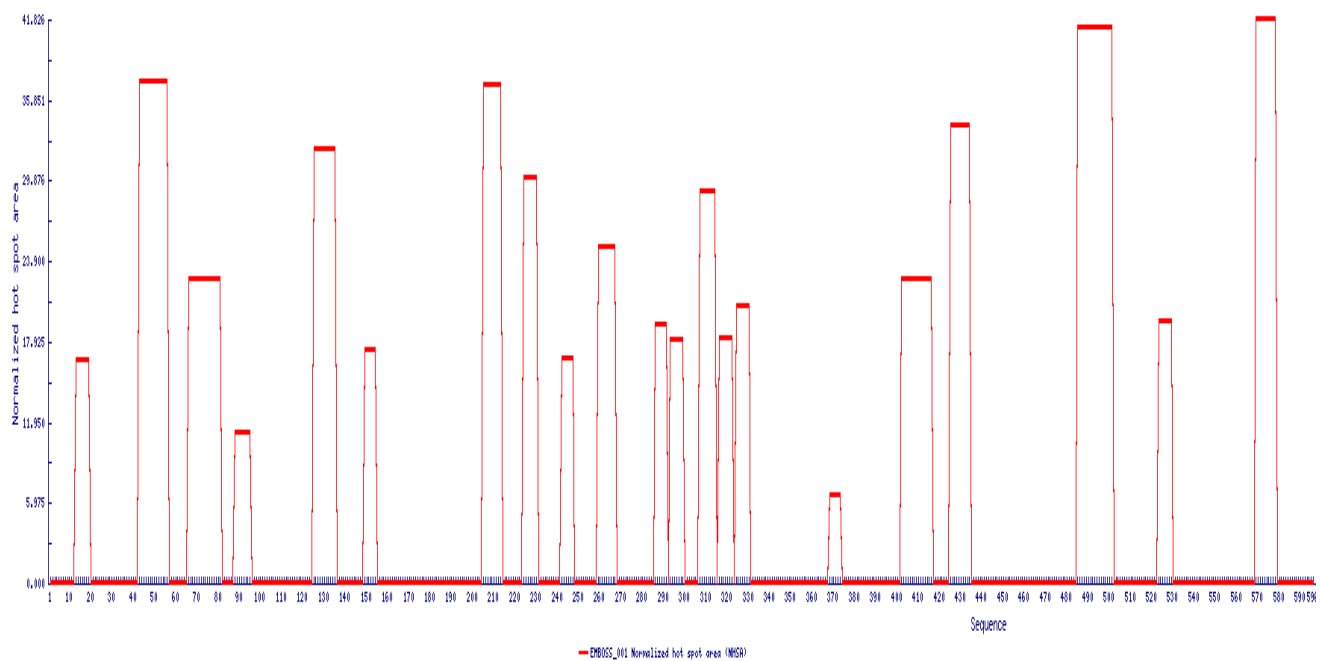


Figura 8.3 Área normalizada de las regiones propensas a la agregación (“hot spots”) de la proteína rTSA-1

## 8.2. Expresión y purificación de la proteína rTSA1

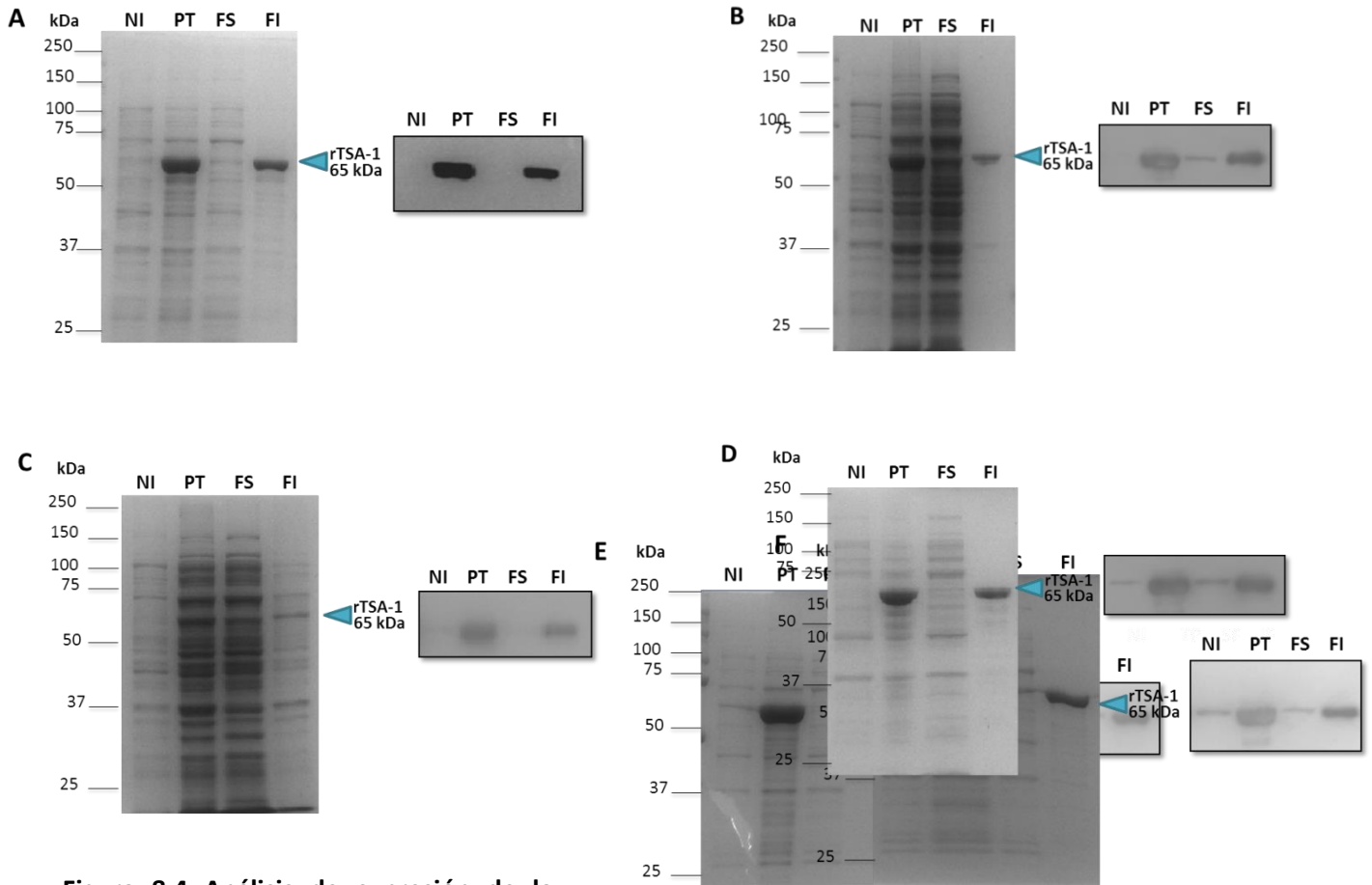
De acuerdo con los experimentos de expresión realizados anteriormente, *rTSA-1* se expresa solo en la fracción insoluble en la cepa BL21(DE3), por lo tanto fue de nuestro interés obtener una pequeña cantidad *rTSA-1* en forma soluble y en su conformación nativa, para usarla como referencia (control positivo) en los ensayos de replegamiento. Para lo cual la *rTSA-1* se expresó en 6 diferentes cepas de *E. coli*.

La sobreexpresión de la proteína *rTSA-1* se observa en la fracción correspondiente a la proteína total (PT) en todas las cepas (Fig. 8.4).

En la cepas BL21(DE3) y C43 la expresión de *rTSA-1* solo fue en CI, tal como se muestra en la Figura 8.4 (A y C respectivamente), no hubo presencia de esta proteína en la fracción soluble (FS). Mediante el análisis SDS-PAGE se puede observar que la cepa C43 presenta el menor nivel de expresión de la proteína de interés en comparación con las otras 5 cepas utilizadas.

En las cepas C41 (Figura 8.4, B), Lemo21(DE3) (Figura 8.4, D), Rosetta (Figura 8.4, E) y Rosetta 2 (Figura 8.4, F), aun cuando la *rTSA-1* se expresó mayoritariamente en forma de CI, se detectó mediante el ensayo de Western blot anti-histidinas la presencia de una mínima fracción de *rTSA-1* en forma soluble.

Asimismo, se observó expresión basal en la cepas C43 (Figura 8.4, C) Lemo21(DE3) (Figura 8.4, D), Rosetta (Figura 8.4, E) y Rosetta 2; ya que hay presencia de *rTSA-1* en la fracción no inducida; por lo que esta proteína se está expresando antes de la adición del agente inductor (IPTG) en estas cepas.



**Figura 8.4** Análisis de expresión de la proteína *rTSA-1* en diferentes cepas de *E. coli*. **A)** Cepa BL21(DE3); **B)** Cepa C41; **C)** Cepa C43; **D)** Cepa Lemo21(DE3); **E)** Cepa Rosetta; **F)** Cepa Rosetta 2. Del lado izquierdo se presenta el análisis SDS-PAGE y del lado derecho su respectivo Western Blot anti-histidinas. **NI:** no inducido; **PT:** proteína total; **FS:** fracción soluble; **FI:** fracción insoluble.

A pesar de que se detectó *rTSA-1* en forma soluble en las cepas C41, Lemo21, Rosetta y Rosetta 2, fue seleccionada la cepa C41 para producir y purificar esta proteína debido a que esta cepa tiene mayor capacidad de adaptación pues solo presenta la resistencia al antibiótico kanamicina conferida por el plásmido pET; a diferencia de las otras cepas que tienen resistencia a un antibiótico adicional (cloranfenicol). Asimismo, en la cepa C41 no hubo expresión basal (Figura 8.4, B).

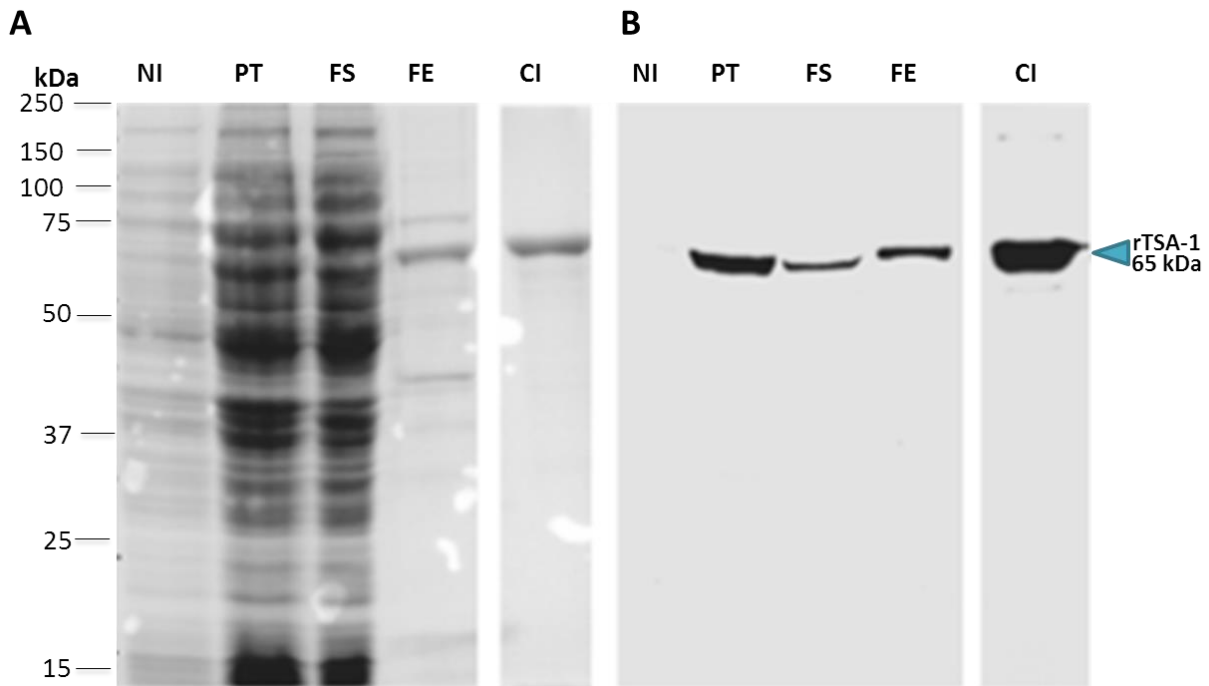
Con el fin de incrementar el nivel de expresión de *rTSA-1* se hizo la inducción a una menor temperatura (16 °C) y se mantuvo en el fermentador la concentración de oxígeno

disuelto a un 30%; sin embargo, estas modificaciones en las condiciones de cultivo no mejoraron el nivel de expresión de la proteína de interés, el cual sigue siendo pobre tal como se alcanza a apreciar en la fracción soluble (FS) (Figura 8.5) en comparación con la proteína localizada en la fracción insoluble (FI) (Figura 8.5). A pesar del nivel bajo de expresión de la proteína en forma soluble, ésta se intentó purificar pero no fue posible obtener una proteína con el grado de pureza esperado para los ensayos de fluorescencia y difracción circular; ya que como se observa en el análisis SDS-PAGE de la fracción de elución (FE) de la Figura 8.5 aún existe la presencia de proteínas contaminantes.

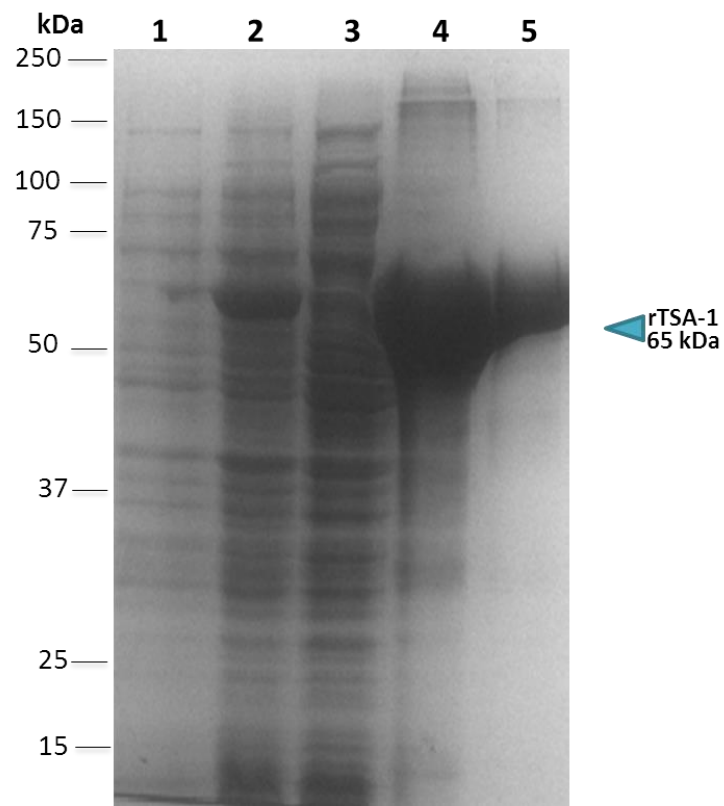
La *rTSA-1* en CI se expresa bien en la cepa BL21(DE3), por lo que esta cepa fue usada para producir la proteína utilizada en los ensayos de repliegamiento.

De acuerdo a ensayos anteriores, se obtuvieron altos niveles de expresión de *rTSA-1* en la cepa BL21(DE3) depositados en CI, lo que se puede ver en el gel de SDS-PAGE (Figura 8.6, carril 4).

Previo al repliegamiento, se procedió a purificar la proteína obtenida en CI bajo condiciones desnaturizantes después de haber hecho los lavados y solubilizado los CI como se menciona en la sección de Materiales y métodos. En la Figura 8.6, carril 5, se muestra la fracción de elución obtenida de la purificación por cromatografía de afinidad a níquel de la proteína *rTSA-1*. El rendimiento típico de obtenido de *rTSA-1* fue de 90 mg/L de cultivo, presentando un 85% de pureza aproximadamente.



**Figura 8.5** Expresión y purificación de la proteína *rTSA-1* en la cepa C41 de *E. coli*. **A)** Análisis SDS-PAGE de la fracciones obtenidas de la fermentación con la cepa C41 y los CI solubilizados provenientes de la cepa BL21(DE3); **B)** Western Blot anti-histidinas correspondiente al SDS-PAGE de la izquierda. **NI:** no inducido; **PT:** proteína total; **FS:** fracción soluble; **FI:** fracción insoluble; **FE:** fracción de elución de IMAC; **CI:** cuerpos de inclusión





**Figura 8.6 Expresión y purificación de *rTSA-1* en CI producidos en la cepa BL21(DE3) de *E. coli*. 1) Fracción no inducido; 2) Proteína total; 3) Fracción soluble; 4) CI solubilizados; 5) Fracción de elución IMAC.**

### **8.3. Replegamiento de *rTSA-1***

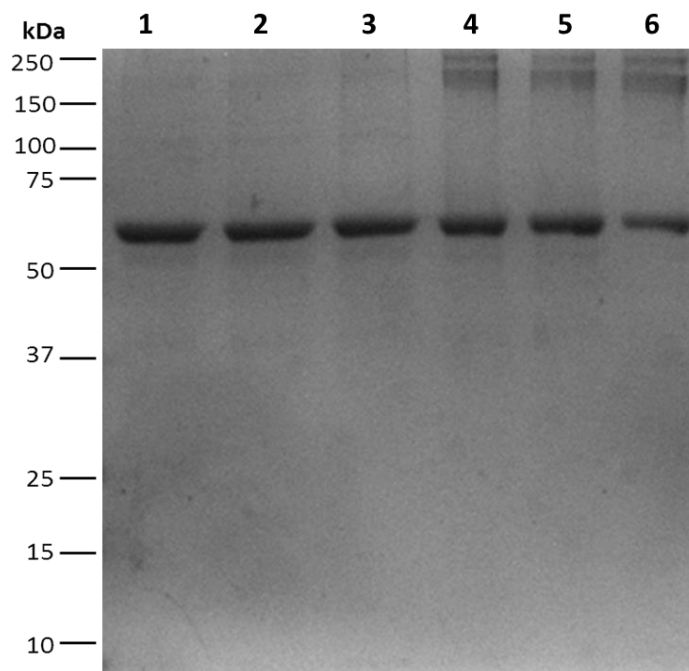
Debido a los altos rendimientos obtenidos de la expresión de *rTSA-1* en CI se decidió recurrir a la implementación de estrategias de replegamiento *in vitro* a partir de la proteína purificada en condiciones desnaturalizantes.

### 8.3.1 Selección de buffer de replegamiento

En el replegamiento *in vitro* de una proteína se tiene que seleccionar las condiciones como composición del buffer de replegamiento, pH, temperatura, agente desnaturizante, etc., que favorezcan la obtención de su estructura nativa. El buffer de replegamiento es una variable significativa dentro de este proceso pues existen una variada cantidad de aditivos, tales como arginina, par glutatión reducido-oxidado, detergentes, que podrían beneficiar el correcto plegamiento.

En este trabajo se evaluó el efecto de 3 buffers en el replegamiento de la proteína *rTSA-1*. El buffer A contenía DTT y EDTA, el buffer B estaba compuesto por el par glutatión oxidado reducido (0.4 mM y 0.2 mM respetivamente) y EDTA; mientras que el buffer C no contenía algún aditivo que favoreciera el replegamiento.

La Figura 8.7 se puede ver el análisis SDS-PAGE de la proteína replegada con los 3 buffers (buffer A: carril 1; buffer B: carril 2 y buffer C: carril 3), en el cual se aprecia principalmente una banda única de aproximadamente 65 kDa, la cual es la proteína interés. Asimismo, las muestras de proteína replegada fueron corridas en el gel pero sin la adición del agente reductor observándose la presencia de unas bandas con una tamaño entre 250 kDa y 150 kDa en los tres buffers de replegamiento (buffer A: carril 1; buffer B: carril 2; buffer C: carril 3), mismas que no aparecen en condiciones reductoras; por lo que se puede sugerir que durante el proceso de replegamiento se forman incorrectamente puentes intercaterios, ya sea entre la misma *rTSA-1* o con las proteínas contaminantes que se encuentran en menor proporción, los cuales producen agregados de peso molecular alto.



**Figura 8.7 Análisis SDS-PAGE de la proteína *rTSA-1* replegada por diferentes buffers. 1) Buffer A; 2) Buffer B; 3) Buffer C; 4) Buffer A condiciones no reductoras; 5) Buffer B condiciones no reductoras; 6) Buffer C condiciones no reductoras**

Mediante “light scattering” se logró detectar que la proteína replegada con los 3 buffers presenta agregación; aunque el nivel de agregación fue menor en el buffer B (Figura 8.8, A).

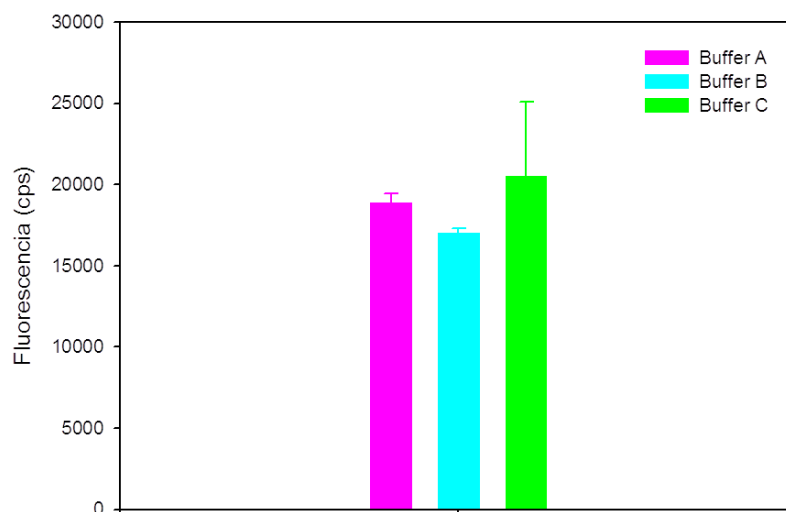
Adicionalmente el espectro de fluorescencia intrínseca sugiere la formación de estructura terciaria no existiendo diferencia alguna entre los buffers utilizados pues en todos los casos, los espectros de la proteína replegada muestran un desplazamiento hacia la izquierda con respecto al espectro de la proteína desnaturalizada en 8 M de urea. Tanto el buffer A como el buffer B muestran un máximo de emisión a 343 nm, mientras que el buffer C tiene un máximo de emisión a 346 nm; en contraste con el máximo de emisión a 356 nm que se observa en el espectro de la proteína desnaturalizada (Figura 8.8, B).

El ANS es un fluoróforo extrínseco que se utiliza para caracterizar la hidrofobicidad en la superficie de una proteína, la unión del ANS a sitios hidrofóbicos de una proteína incrementa su emisión de fluorescencia (Hawe, et al., 2008). La fluorescencia extrínseca del ANS unido a la proteína replegada con los tres buffers es mayor con respecto a la fluorescencia de ANS en el buffer de almacenamiento sin la presencia de la proteína, lo puede indicar que hay sitios hidrofóbicos debido a que al plegamiento parcial de la proteína o bien que es una proteína de naturaleza hidrofóbica (Figura 8.9, A). Asimismo, se puede observar que la fluorescencia del ANS es menor en la proteína desnaturalizada.

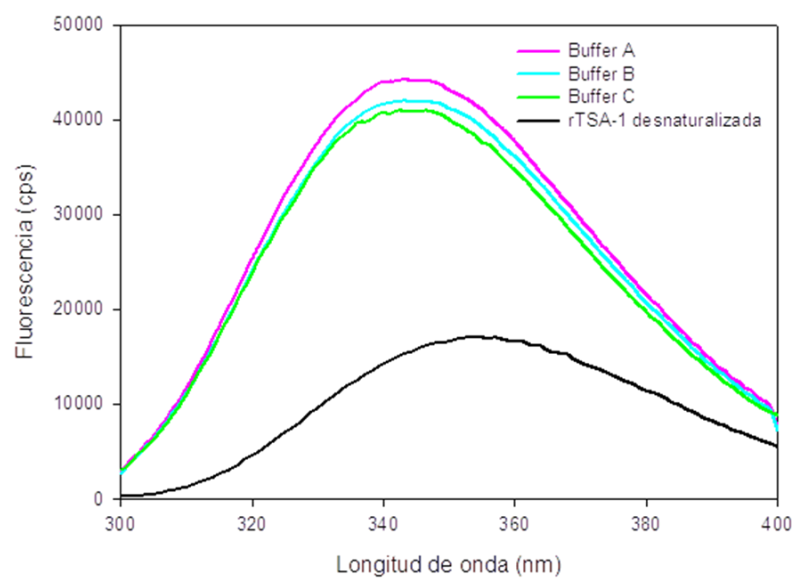
Por otra parte, el espectro de dicroísmo circular (Figura 8.9, D) nos muestra que la estructura secundaria de la proteína replegada con estos buffers está compuesta mayoritariamente por hojas  $\beta$ -plegada. Los espectros de la proteína replegada con el buffer A y el buffer C son muy similares; sin embargo, el espectro obtenido con el buffer C sugiere que con este buffer se obtiene una mejor estructura secundaria.

Los resultados obtenidos de "Light scattering", fluorescencia intrínseca, fluorescencia del ANS y dicroísmo circular sugieren que el buffer de replegamiento B confiere un mejor replegamiento de la proteína *rTSA-1*

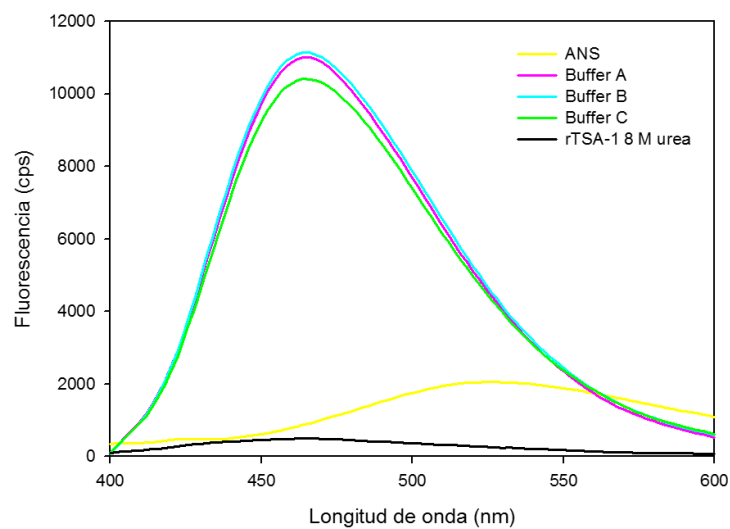
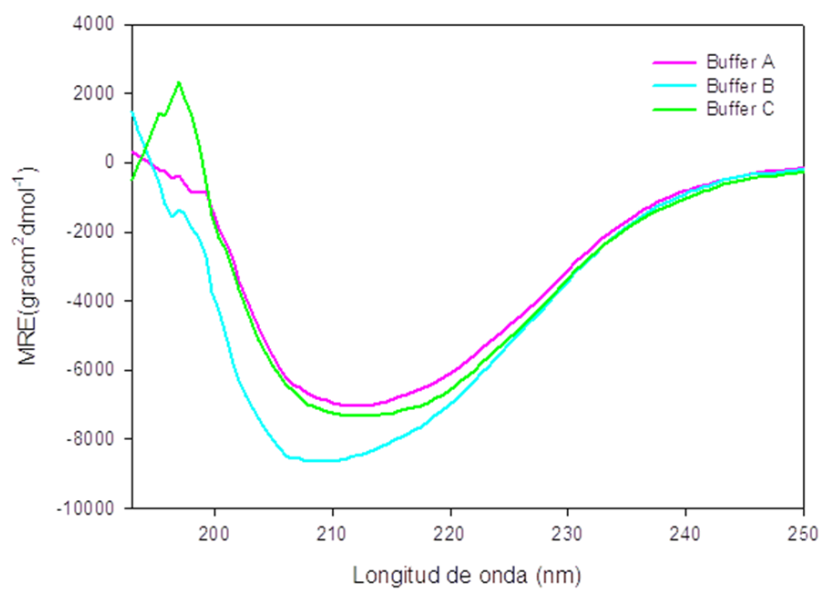
A



B



**Figura 8.8** Caracterización de la proteína *rTSA-1* replegada por diferentes buffers. **A)** “Light scattering”. **B)** Espectro de fluorescencia intrínseca ( $\lambda = 295 \text{ nm}$ ).

**A****B**

**Figura 8.9. Caracterización de la proteína rTSA-1 replegada con diferentes buffers. A) Fluorescencia del ANS ( $\lambda = 370 \text{ nm}$ ). B) Espectro de dicroísmo circular en el UV lejano.**

### 8.3.2. Diálisis

En la Figura 8.10 se muestra el perfil del análisis SDS-PAGE de la proteína replegada por el método de diálisis. En el gel de poliacrilamida se puede observar una banda de 65

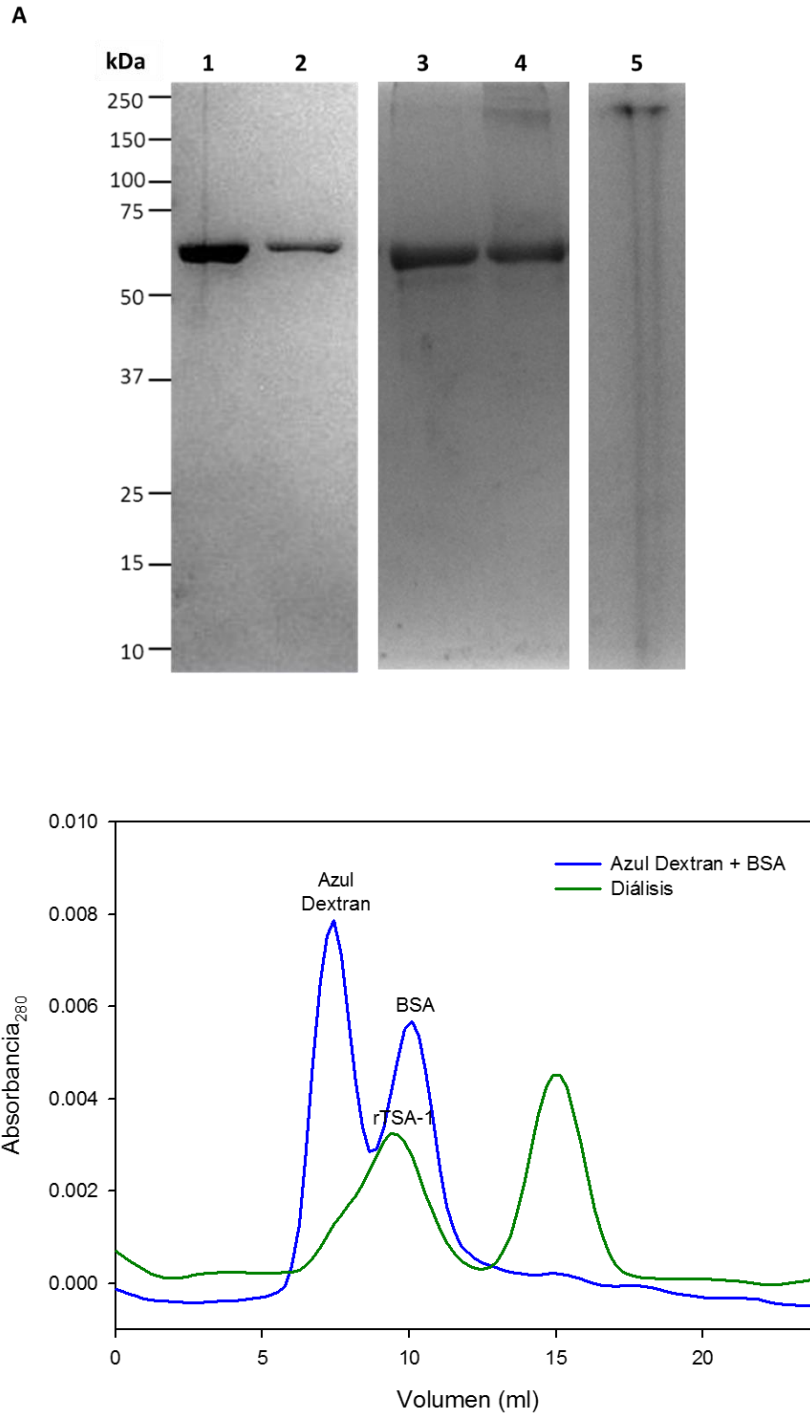
kDa que corresponde a la *rTSA-1* (carril 1) y en el carril 2 se puede ver que se pierde proteína después de que ésta es filtrada por una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ . La proteína se logra concentrar por medio de IEX (carril 3) después de haberla filtrado; sin embargo, se puede observar la presencia de agregados en su mayoría de alto peso molecular cuando esta muestra no contiene agente reductor (carril 4). Después del paso de concentración de proteína por medio de IEX, se quedan agregados de proteína unidos a la resina (carril 5).

El rendimiento de replegamiento por diálisis fue de 12.02 %, el cual es bajo debido a que se forman agregados los cuales se unen a la membrana de 22  $\mu\text{m}$  y a la resina utilizada en IEX.

Para analizar el tamaño resultante de la proteína *rTSA-1* del proceso de replegamiento por diálisis y su estado de agregación, se corrió una cromatografía de exclusión molecular analítica (Figura 8.10, B). En el cromatograma se aprecia que la proteína *rTSA-1* replegada no es un pico definido sino que tiene un “hombrito” en el lado izquierdo, esto debido a la presencia de agregados los cuales se observaron en la muestra corrida en condiciones no reductoras. Asimismo, la proteína eluye en un volumen aproximado de 10 ml, lo que nos indica que es una proteína monomérica de 65 kDa; pues es casi el mismo volumen de elución que tiene la proteína *BSA* (*Bovine serum albumin*, por sus siglas en inglés) de 66.5 kDa que se utiliza como control.

La proteína replegada por el método de diálisis, adquiere estructura tridimensional y presenta el tamaño molecular esperado; pero durante el proceso de replegamiento se forman agregados.

Por otra parte, la proteína se mantiene estable en buffer de almacenamiento a 4 °C, por lo menos durante 3 meses.



**Figura 8.10 Replegamiento por diálisis de proteína *rTSA-1*.** **A)** Análisis SDS-PAGE: 1) *rTSA-1* replegada; 2) *rTSA-1* filtrada por una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  después de replegada; 3) *rTSA-1* capturada por IEX; 4) *rTSA-1* capturada por IEX sin agente reductor 5) resina IEX. **B)** Perfil cromatográfico de la proteína *rTSA-1* replegada por diálisis. Estándares utilizados para el



volumen vacío de la columna Azul de Dextran y para comparar el tamaño de la *rTSA-1*, BSA (66.5 kDa).

### 8.3.3. Dilución

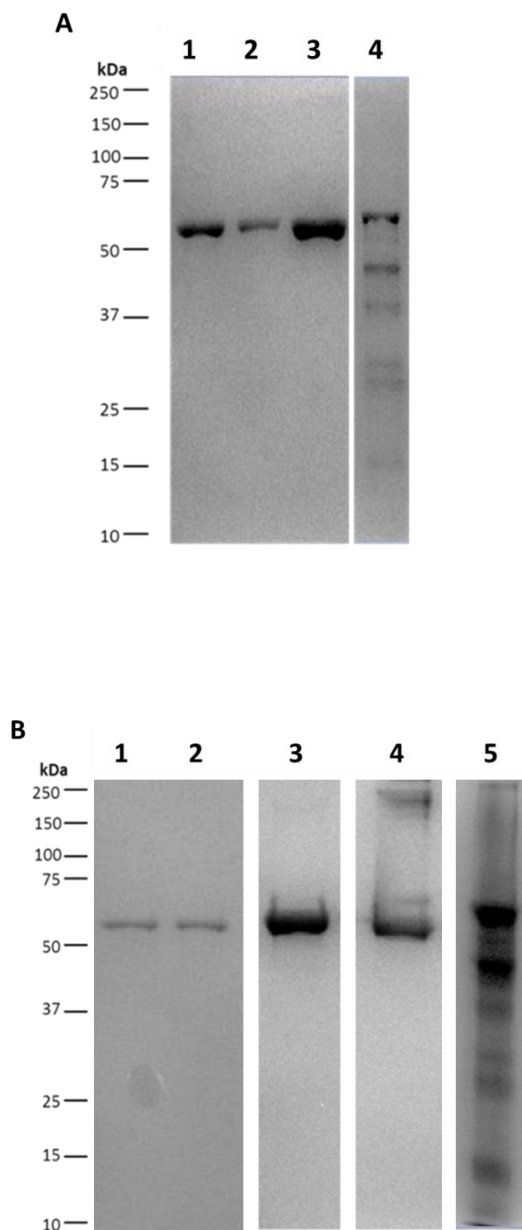
El replegamiento por dilución en 100 ml de buffer de replegamiento B (Figura 8.11, A) se observa una banda de 65 kDa que corresponde a la *rTSA-1* (carril 1). Parte de la proteína replegada (carril 1) se pierde cuando se pasa por una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  (carril 2) y finalmente, es capturada por cromatografía de intercambio iónico (carril 3), donde es concentrada; sin embargo, la mayor cantidad de proteína se pierde en este paso, pues ésta se queda adherida a la resina (carril 4).

El análisis SDS-PAGE de la proteína replegada por dilución en el reactor se muestra en la Figura 8.11 (B), en el carril 1 del gel se ve la banda de proteína correspondiente a la *rTSA-1* mientras que en el carril 2 se encuentra la proteína replegada después de haberla filtrado por la membrana de 22  $\mu\text{m}$ , aparentemente no se quedó proteína retenida en la membrana. La proteína fue concentrada por IEX (carril 3), también se alcanza a apreciar presencia de agregados de tamaño mayor a 65 kDa cuando la muestra se corre en condiciones no reductoras (carril 4). La resina usada para concentrar la proteína fue analizada y se puede observar que un alto nivel de proteína se encuentra adherida a ésta, incluso hay proteínas de menor peso molecular que 65 kDa lo cual podría indicar que la proteína de interés se degrada o bien que la presencia de proteínas contaminantes se concentra.

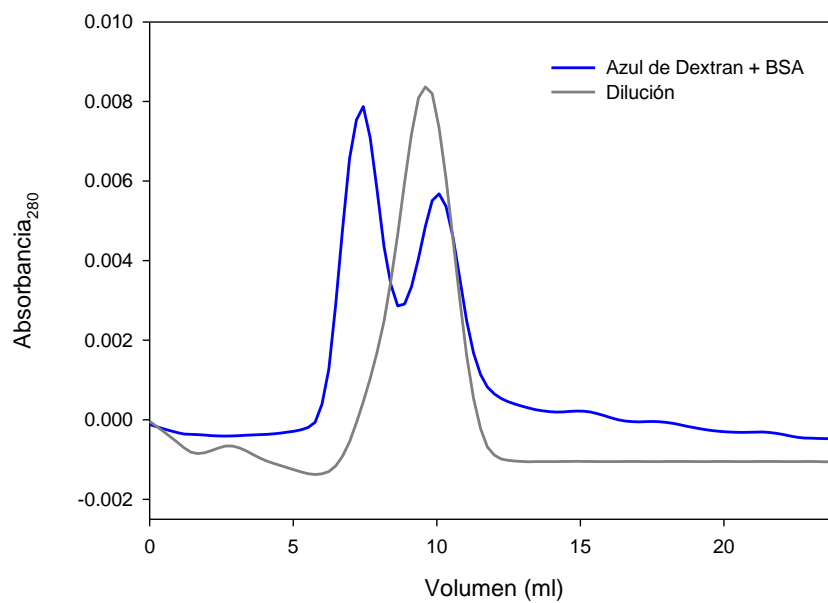
El rendimiento obtenido con el método de dilución en 100 ml fue de 15.7%; en cambio el rendimiento en el reactor fue entre 5-7%.

En la Figura 8.12 se visualiza el perfil cromatográfico de la proteína *rTSA-1* replegada por el método de dilución en 100 ml, la cual sale en un pico ligeramente recorrido hacia la izquierda en un volumen de elución de aproximadamente 10 ml, el cual es asemeja al pico de elución de la proteína BSA lo que sugiere que la proteína de interés se compone principalmente por un monómero de 65 kDa; no obstante, se puede ver la presencia de agregados con de mayor peso molecular, los cuales no se alcanzan a separar.

Asimismo, la proteína replegada por este método es estable en buffer de almacenamiento a 4 °C al menos por 3 meses.



**Figura 8.11. Replegamiento por dilución de proteína *rTSA-1*.** **A) Análisis SDS-PAGE 100 ml de reacción:** 1) *rTSA-1* replegada; 2) *rTSA-1* filtrada por una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  después de replegada; 3) Elución de *rTSA-1* de IEX; 4) *rTSA-1* unida a la resina de IEX. **B) Análisis SDS-PAGE de dilución en reactor:** 1) *rTSA-1* replegada; 2) *rTSA-1* filtrada por una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  después de replegada; 3) Elución de *rTSA-1* de IEX; 4) *rTSA-1* capturada por IEX sin agente reductor; 5) *rTSA-1* unida a la resina de IEX.



**Figura 8.12 Perfil cromatográfico de la proteína *rTSA-1* replegada por dilución.** Estándares utilizados para el volumen vacío de la columna Azul de Dextran y para comparar el tamaño de la *rTSA-1*, BSA (66.5 KDa).

### 8.3.4. Métodos cromatográficos

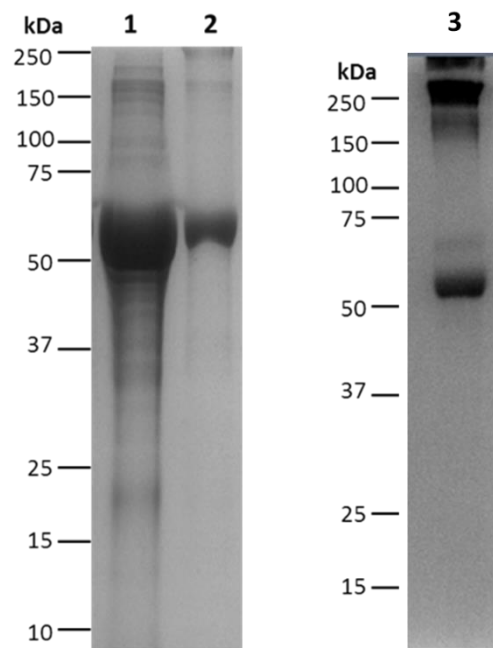
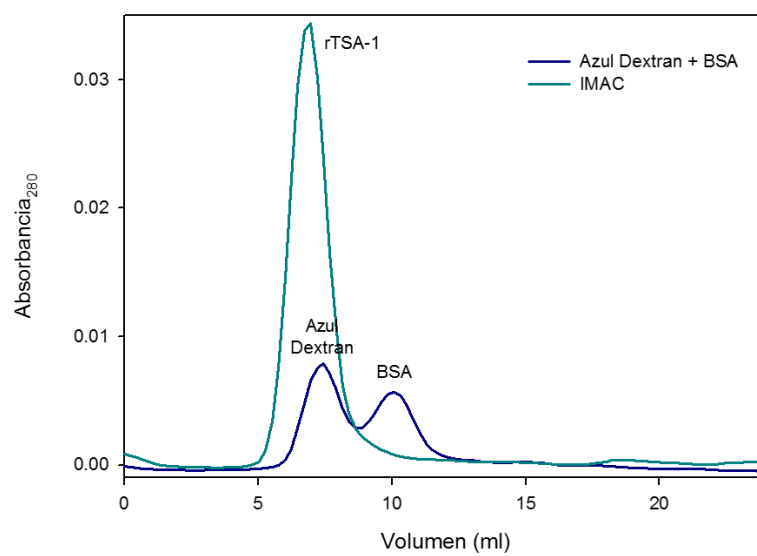
#### 8.3.4.1. Cromatografía de afinidad a níquel

Se llevó a cabo la purificación y el replegamiento de *rTSA-1* en un solo paso, mediante el empleo de cromatografía de afinidad a níquel a partir de CI solubilizados en 8 M de urea.

La figura 8.13 (A) muestra el perfil electroforético en un gel de poliacrilamida de los CI solubilizados en 8 M de urea (carril 1), en el siguiente carril se aprecia la proteína *rTSA-1* replegada por IMAC (carril 2). Sin embargo, en el carril 3 se observa la muestra de proteína replegada pero a ésta no se le adicionó el agente reductor durante la corrida electroforética (carril 3) alcanzando a apreciar agregados de alto peso molecular, que ni siquiera entran al carril del gel. El rendimiento de proteína replegada por este método fue de 8.0%.

Al pasar muestra de proteína replegada con este método en la columna de cromatografía analítica de exclusión molecular, ésta sale en volumen vacío; lo anterior, se puede observar el perfil cromatográfico (Figura 8.13, B), pues sale prácticamente en el mismo volumen que el azul de dextran, molécula de alto peso molecular que sirve para estimar el volumen vacío en las columnas de cromatografía de exclusión molecular. Esto indica que probablemente la *rTSA-1* replegada por este proceso forme multímeros de alto peso molecular durante el proceso de replegamiento por IMAC, lo cual se corrobora con la electroforesis de la proteína en condiciones no reductoras.

La proteína replegada por este método se ha mantenido sin precipitación por 6 meses almacenada a 4 °C.

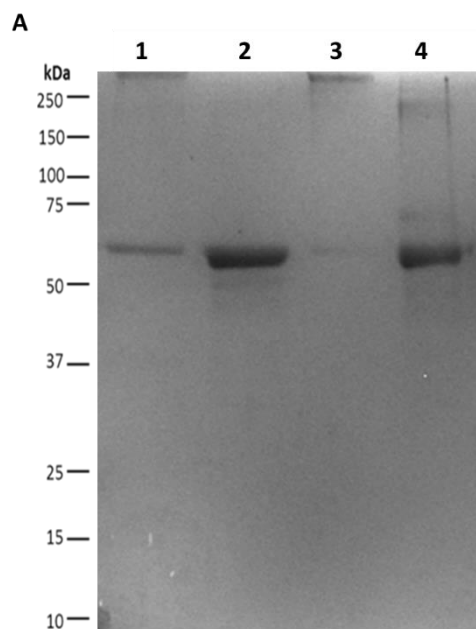
**A****B**

**Figura 8.13 Replegamiento por IMAC de proteína *rTSA-1*. A) Análisis SDS-PAGE:** 1) CI solubilizados; 2) *rTSA-1* replegada; 3) *rTSA-1* replegada sin agente reductor. **B) Perfil cromatográfico de *rTSA-1*.** Estándares utilizados para el volumen vacío de la columna Azul de Dextran y para comparar el tamaño de la *rTSA-1*, BSA (66.5 KDa).

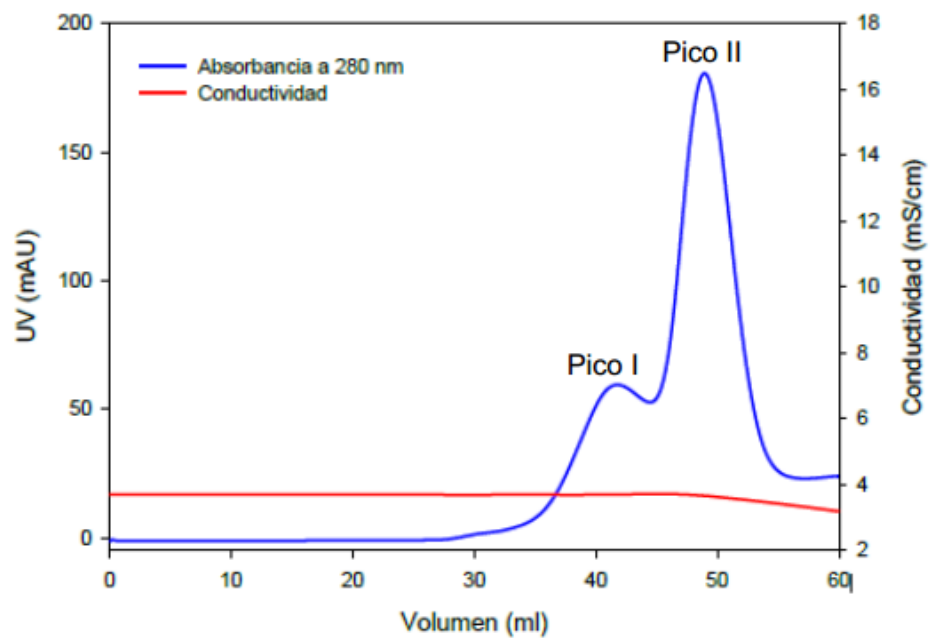
### 8.3.3.2. Cromatografía de exclusión molecular

En el replegamiento por SEC utilizando la matriz de Superose® 6 Prep Grade se forman dos picos de elución de proteína, que se observan en el cromatograma (Figura 8.14, B), el pico I (Figura 8.14, A, carril 1) está compuesto principalmente por agregados de alto peso molecular, lo que se puede observar en la muestra resultante de la corrida electroforética en condiciones no reductoras (Figura 8.14, A, carril 3). Mientras que el pico II corresponde a la proteína *rTSA-1* (Figura 8.14, A, carril 2); sin embargo, ésta también presenta agregados de alto peso molecular aunque en menor proporción, lo cual se puede apreciar en el gel de poliacrilamida cuando la muestra se corre sin la presencia del agente reductor.

El rendimiento que se alcanza con este método es de 38% en el replegamiento de la proteína *rTSA-1*, siendo éste el rendimiento más alto comparado con él se obtiene mediante los otros procesos de replegamiento *in vitro*.



**B**



**Figura 8.14 Replegamiento cromatográfico de *rTSA-1* en Superose® 6 Prep Grade (Sigma-Aldrich). A) Análisis SDS-PAGE, 1) Elución de SEC Pico I; 2) Elución de SEC Pico II B) Perfil cromatográfico de replegamiento de *rTSA-1* por SEC.**

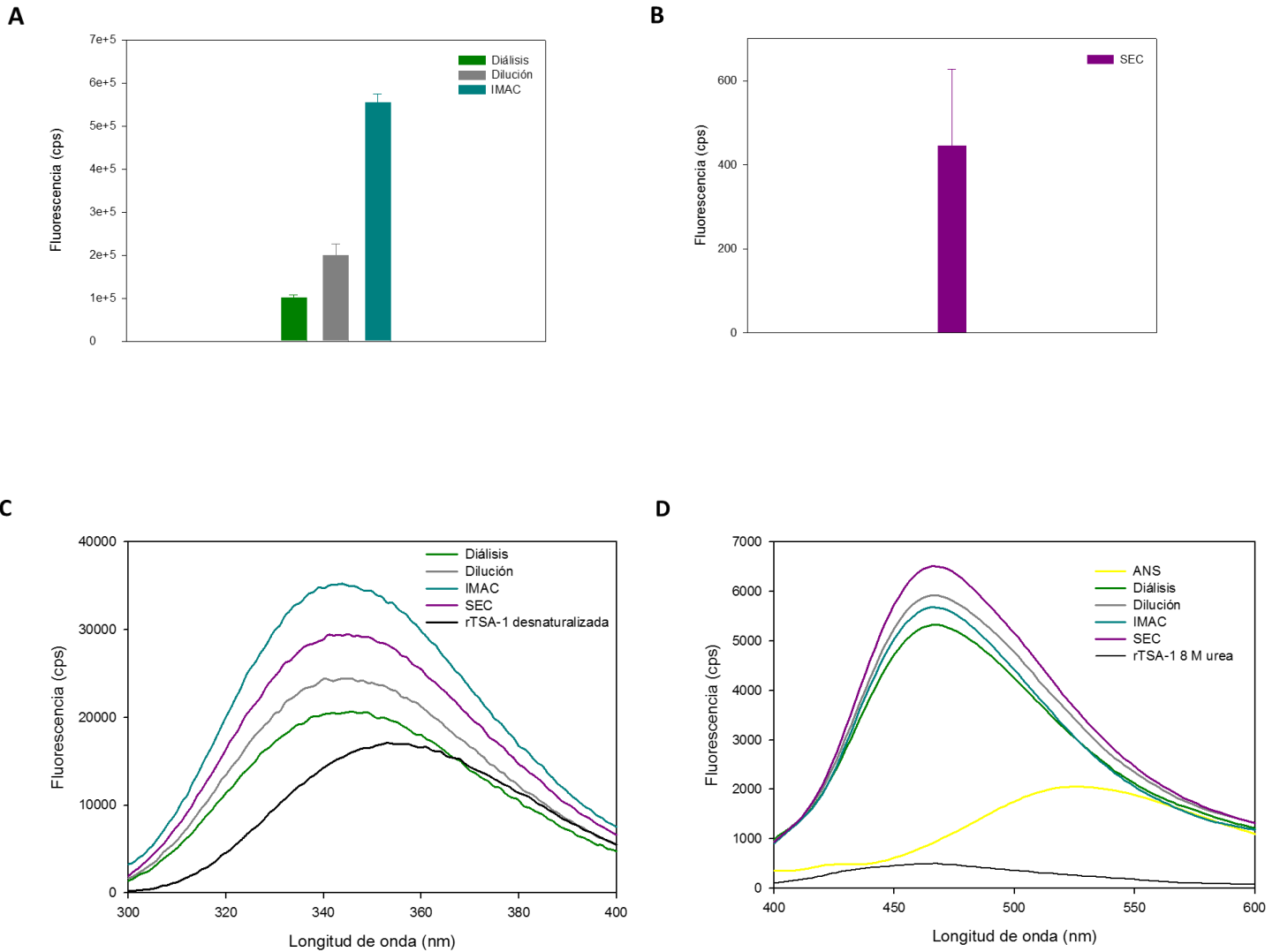
### 8.3.5 Fluorescencia de *rTSA-1*

El estado de agregación de las muestras replegadas por medio de diálisis, dilución y los procesos cromatográficos se evaluó por medio de “*light scattering*”. La mayor agregación se observó en la proteína replegada por IMAC debido a que tuvo la emisión más alta de fluorescencia con respecto a la emisión de la proteína replegada por los otros métodos (Figura 8.15, A). La muestra que presentó menos agregación fue la proteína que se replegó mediante SEC (Figura 8.15, B); seguida de la proteína replegada por diálisis y por dilución respectivamente (Figura 8.15, A).

Los espectros de fluorescencia intrínseca nos sugieren que la proteína *rTSA-1* adquirió estructura terciaria debido a que estos presentaron un recorrido hacia izquierda con respecto al espectro obtenido de la proteína desnaturalizada (Figura 8.15, C). No se encontró diferencia entre los espectros de fluorescencia de los métodos de replegamiento utilizados, los cuales presentan máximos de emisión cercanos; en el caso de la proteína replegada por diálisis, ésta tiene su máximo de emisión en 346 nm; mientras que la proteína replegada por dilución, IMAC y SEC muestran su máximo de emisión en 345 nm (Figura 8.15, C).

Los espectros de emisión de fluorescencia del ANS sugieren que la proteína *rTSA-1* replegada presenta sitios hidrofóbicos debido al incremento en fluorescencia con respecto a la emita por el ANS en buffer de almacenamiento sin proteína (Figura 8.15, D). Asimismo, se observa que la emisión del ANS unido a la proteína *rTSA-1* en condiciones desnaturalizantes es menor incluso que la fluorescencia emita por el ANS solo, lo cual sugiere que la urea en alta concentración ocupa los sitios de unión en la proteína a los cuales pudiera tener acceso el ANS (Kumar, Jayaraman, Lin, & Yu, 1996).





**8.15 Ensayos de fluorescencia.** A) “Light scattering” de la proteína *rTSA-1* replegada por diálisis, dilución y IMAC. B) “Light scattering” de la proteína *rTSA-1* replegada por SEC. C) Espectros de Fluorescencia intrínseca ( $\lambda=295$  nm) de la proteína *rTSA-1* replegada por diálisis, dilución, IMAC y SEC. D) Espectros de Fluorescencia del ANS ( $\lambda=370$  nm) de la proteína *rTSA-1* replegada por diálisis, dilución, IMAC y SEC.

### 8.3.6. Dicroísmo Circular

El espectro de dicroísmo circular obtenido de las muestras de proteína replegada por medio de diálisis, IMAC y SEC nos indica que la estructura secundaria de la proteína *rTSA-1* se compone principalmente de láminas- $\beta$  (Figura 8.16). Lo cual coincide con lo obtenido en la predicción de la estructura secundaria y con el modelo tridimensional de proteína (Tabla 8.2).

El espectro de la proteína replegada por SEC, sugiere que por este método, la proteína *rTSA-1* adquiere una mejor estructura secundaria con respecto a la proteína replegada por los otros métodos (Figura 8.16).

**Tabla 8.2 Porcentaje de estructura secundaria de la proteína *rTSA-1* predicha por PSIPRED y i-TASSER**

Servidor	Hélices- $\alpha$	Láminas- $\beta$	Coil
PSIPRED v 3.3	5.2 %	35.5 %	59.2 %
i-TASSER	5.0 %	50.5 %	44.4 %

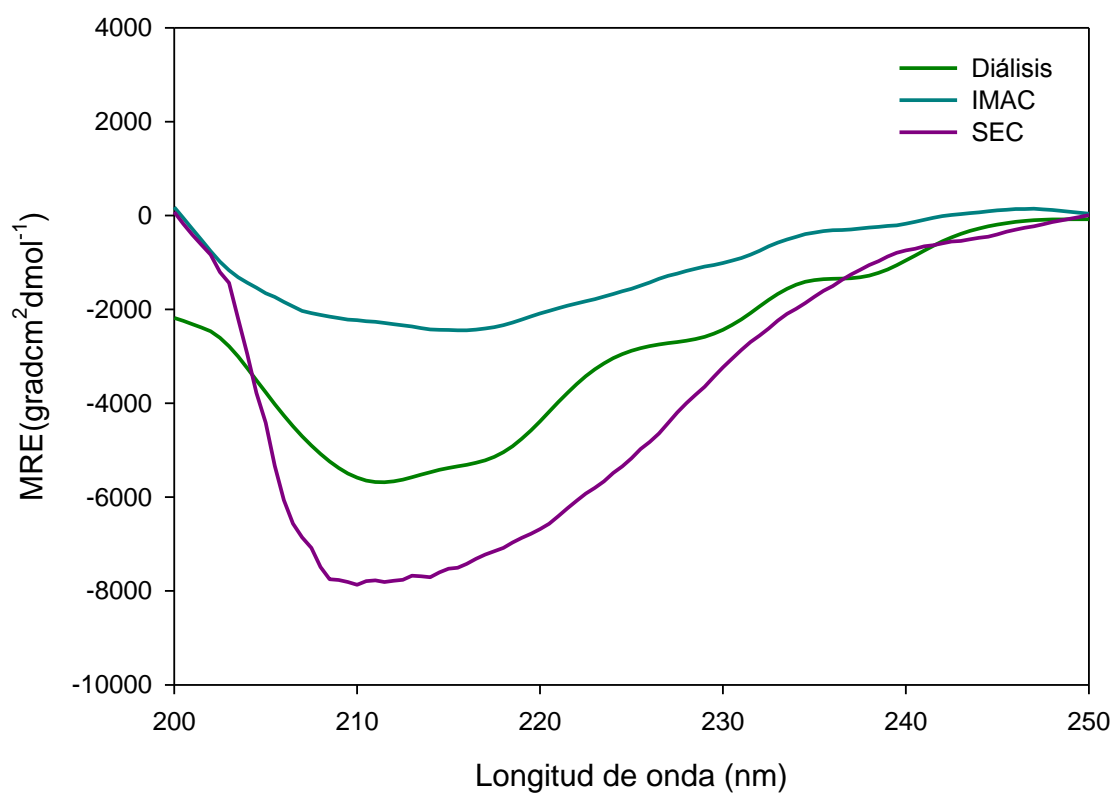


Figura 8.16 Espectros de dicroísmo circular de la proteína *rTSA-1* obtenido a 25 °C

## 9. DISCUSIÓN

El antígeno recombinante *rTSA-1* es un candidato potencial para el desarrollo de una nueva vacuna para combatir la enfermedad de Chagas (Dumonteil, et al., 2012); sin embargo, se han obtenido resultados infructuosos en su obtención en forma soluble en las plataformas de expresión utilizadas hasta el momento (células de insecto, *Pichia pastoris* y *E. coli*) para realizar su caracterización bioquímica e inmunológica (Zhang, 2011, datos no publicados).

Una alternativa para solucionar esta problemática es expresar esta proteína en *E. coli*; ya que en este sistema se produce con altos rendimientos pero de manera insoluble, e implementar un sistema de replegamiento *in vitro* eficiente.

De la proteína *rTSA-1* no se tiene algún antecedente acerca de su estructura por lo que se procedió a realizar análisis bioinformáticos a partir de su secuencia de aminoácidos, que proporcionaran información estructural. La proteína *rTSA-1* presenta mayor homología con dos enzimas, la sialidasa de *Trypanosoma rangeli* y la Trans-sialidase TcTS de *Trypanosoma cruzi*, ambas pertenecen a la superfamilia de las transialidasas; a pesar de que la TSA-1 de *T. cruzi* pertenece a esta misma familia (aunque se encuentra en distinto grupo) esta proteína no presenta actividad catalítica (Watts, et al., 2006; Buchini, et al., 2008).

Debido a que la *rTSA-1* no es una enzima y a falta de estudios sobre la estructura tridimensional de la proteína nativa resulta difícil monitorear su replegamiento. Por lo tanto se intentó expresar *rTSA-1* de manera soluble, aunque sea en cantidades pequeñas, que permitiera usarla control positivo para los ensayos de replegamiento. Para lo cual se utilizaron cepas de *E. coli* con genotipos que ayudan a expresar proteínas heterólogas que le son tóxicas a *E. coli* o bien que tienen problemas de solubilidad (Gopal & Kumar, 2013). La proteína *rTSA-1* se obtuvo de forma soluble en las cepas Lemo21(DE3), C41, Rosetta y Rosetta 2 ( Berrow, et al., 2006); no obstante, el nivel de expresión fue bajo, predominando su producción en forma insoluble en todas las cepas. Para producir la proteína *rTSA-1* soluble como estándar se utilizó la cepa C41; de acuerdo, con la literatura

modificar condiciones de cultivo durante la inducción incrementa el nivel de producción de una proteína en forma soluble, a pesar de disminuir la temperatura y mantener la demanda de oxígeno, no se consiguió incrementar el nivel de expresión de *rTSA-1* soluble (Sorensen & Mortensen, 2005). El análisis realizado mediante Aggrescan sugirió la expresión de la proteína *rTSA-1* en cuerpos inclusión; pues conforme a su cadena lineal de aminoácidos, esta proteína tiene 21 regiones propensas a la agregación conocidas como “Hot spots”; tal vez esta sea la causa por la que no se ha podido obtener *rTSA-1* en forma soluble con altos rendimientos.

Los esfuerzos por obtener nuestra proteína soluble pura mediante cromatografía de afinidad a níquel no rindieron frutos pues la proteína recuperada de las fracciones de elución aún presentaba contaminantes que no permitieron usarla como control positivo en los ensayos de fluorescencia intrínseca, “Light scattering”, fluorescencia de ANS y difracción circular. Lo anterior se puede deber a que la concentración de la proteína de interés fue baja en comparación con las proteínas contaminantes, que posiblemente interfirieron la interacción entre la *rTSA-1* con la resina; otra razón por la que aún la *rTSA-1* presente impurezas es que proteínas celulares propias de *E. coli*, contengan dos o más residuos de histidinas adyacentes, lo cual se produce con poca frecuencia, y esto provoca afinidad no específica (Bornhorst & Falke, 2000).

Aprovechando las ventajas que se tienen cuando se expresa una proteína recombinante en CI, se optó por producir la proteína *rTSA-1* en forma insoluble e implementar un sistema de replegamiento que le permita adquirir su estructura nativa. Se obtuvieron rendimientos de 90 mg de *rTSA-1* por cada litro cultivo, lo cual concuerda con lo que se reporta en la literatura (Misawa & Kumagai, 1999). Sin embargo, el cuello de botella en la producción de proteínas terapéuticas provenientes de CI es el replegamiento *in vitro*, lo que se traduce en bajos rendimientos de replegamiento o bien la formación de intermediarios que no se encuentran correctamente plegados.

Uno de los factores importantes en el diseño de un protocolo de replegamiento es la selección del buffer que se ocupará para replegar la proteína de interés. Por lo que se evaluó el efecto de tres diferentes buffers en el replegamiento de la proteína *rTSA-1*. El

replegamiento de *rTSA-1* fue evaluado por: “light scattering”, técnica que permite conocer el nivel de agregación; fluorescencia intrínseca, estudio que permite conocer la conformación terciaria de una proteína; fluorescencia del ANS, que indica la presencia de sitios hidrofóbicos en una proteína; y dicroísmo circular en el UV lejano, con el cual se puede conocer la estructura secundaria (Hawe, Sutter, & Jiskoot, 2008 ; Kelly, Jess, & Price, 2005; Qadeer, et. al, 2012). El replegamiento de la proteína *rTSA-1* con el buffer B presentó menos nivel de agregación y una mejor conformación de estructura secundaria respecto a los otros buffers probados. Sin embargo, la proteína replegada con los tres buffers presentó agregados de alto peso molecular que se observaron en muestras corridas en geles poliacrilamida en condiciones no reductoras, lo que puede sugerir una incorrecta formación de puentes disulfuro, ya sea entre la misma *rTSA-1* o con contaminantes que se encuentran en menor proporción durante el proceso de replegamiento.

El buffer B fue seleccionado para realizar el replegamiento de la proteína *rTSA-1* mediante diálisis, dilución y SEC. Adicionalmente, la proteína se replegó también por IMAC. Con el proceso de SEC se obtuvo el mayor rendimiento de replegamiento, el cual fue de 37%. A pesar de que el replegamiento por IMAC parecía una buena alternativa, desde el punto de vista de proceso, pues en un solo paso se hace la purificación y el replegamiento de la proteína *rTSA-1*, se obtuvo un bajo rendimiento de 8%. En el replegamiento por diálisis se logró un rendimiento de 12.02%; mientras que por dilución el rendimiento alcanzado en 100 ml de volumen final de reacción fue de 15.7%; sin embargo, éste disminuyó entre un 5-7% cuando el proceso se escaló a 1 L de volumen de reacción. En base a los rendimientos de replegamiento obtenidos por los distintos métodos, se puede apreciar que el método de cromatografía de exclusión molecular (SEC) representa una opción rentable para el replegamiento de proteínas recombinantes producidas en CI debido a que las condiciones de replegamiento son controladas, tiene un fácil escalamiento y no se manejan volúmenes grandes de buffers de replegamiento, lo cual se podría traducir en una disminución de costos producción y de tiempo , así como reproducibilidad (Ming , et al., 2004). Por lo tanto, el método de replegamiento por SEC

podría ser una potencial alternativa para el replegamiento de la proteína *rTSA-1* en su producción a nivel piloto.

Durante el replegamiento de la proteína *rTSA-1* por los 4 métodos utilizados se forman agregados de alto peso molecular, los cuales se aprecian cuando la muestra de proteína se corre en geles de poliacrilamida en condiciones no reductoras y también se observan en los picos de elución de la cromatografía de exclusión molecular analítica proteína replegada. Lo cual sugiere que durante el proceso de replegamiento de la proteína *rTSA-1*, se forman multímeros entre la misma proteína o con las proteínas contaminantes presentes en menor cantidad, consecuencia de interacciones hidrofóbicas o de puentes disulfuro mal formados.

La proteína *rTSA-1* replegada por IMAC es la que tiene mayor presencia de agregados, de acuerdo al resultado de "*Light scattering*"; mientras que la proteína replegada por SEC es la que menor nivel de agregados presenta, lo que puede sugerir que la presencia del par glutatión oxidado-reducido y el proceso de cromatografía de exclusión molecular disminuyen la presencia de agregados durante el replegamiento. Sin embargo, habría que modificar las condiciones de replegamiento por SEC para evitar la formación de agregados de alto peso molecular o bien separar eficientemente la proteína agregada de la proteína replegada.

Los espectros de fluorescencia intrínseca de la proteína *rTSA-1* replegada mediante los diferentes sistemas desarrollados en este trabajo, indican la formación de estructura terciaria y no se encuentra significativa entre ellos. Sin embargo, aún no se tiene la certeza si la estructura tridimensional adquirida por cualquiera de los métodos de replegamiento utilizados es la que tiene la proteína nativa.

La intensidad fluorescencia de ANS obtenida de la proteína *rTSA-1* replegada por las distintas técnicas es alta, lo que pudiera ser resultado de la presencia de sitios hidrofóbicos en la proteína, los cuales se encuentran expuestos cuando una proteína está parcialmente plegada. No obstante, existen muchos casos donde se observa una intensidad de fluorescencia del ANS alta cuando éste se une a proteínas nativas, tal como ocurre con la proteína albúmina de humano (HSA, por sus siglas en inglés) (Hawe, et al.,

2008). Por lo que en la proteína *rTSA-1* no se puede determinar si la emisión del ANS es alta debido a que ésta se encuentra parcialmente plegada o bien porque la proteína nativa presenta sitios hidrofóbicos con alta afinidad al ANS; lo anterior, se resolverá hasta cuando se tenga el espectro de fluorescencia del ANS de la proteína *rTSA-1* nativa.

Por otra parte, los espectros de dicroísmo circular sugieren que la proteína replegada adquiere estructura secundaria compuesta principalmente por láminas- $\beta$ , lo cual coincide con los resultados obtenidos tanto con el servidor PSIPRED ,que predice estructura secundaria , y el programa i-TASSER, con el cual se realizan modelos tridimensionales de una proteína, en los cuales se obtuvieron altos porcentajes de láminas- $\beta$ . Siendo el método de replegamiento por SEC, el que confiere una mejor estructura secundaria, pero con este resultado no se puede afirmar si la proteína *rTSA-1* adquiera la estructura secundaria de la proteína nativa.



## 10. CONCLUSIONES

Se expresó y purificó la proteína recombinante *rTSA-1* en forma soluble en *E. coli*; sin embargo, debido a su bajo nivel de expresión, no se logró obtener una proteína lo suficientemente pura que pudiera usarse como control positivo en los ensayos de fluorescencia intrínseca, “Light scattering”, fluorescencia de ANS y dicroísmo circular

Se implementaron cuatro métodos para replegar a la proteína *rTSA-1* proveniente de cuerpos de inclusión obteniéndose una proteína estable, es decir sin signos de precipitación, en al menos un mes almacenadas a 4 °C; no obstante, hubo formación de agregados de alto peso molecular en los cuatro procesos. Con el proceso de cromatografía de exclusión molecular se obtuvo un mayor rendimiento de replegamiento y una menor presencia de agregados de alto peso molecular.

Por otra parte, de acuerdo con los resultados de fluorescencia intrínseca y dicroísmo circular la proteína de interés adquirió estructura terciaria y estructura secundaria, lo cual sugiere que ésta fue replegada; sin embargo, por el momento no es posible asegurar que la proteína *rTSA-1* replegada por los métodos implementados en este proyecto haya adquirido su estructura nativa hasta que no se tenga una proteína control con la que se compare la proteína obtenida por los procesos de replegamiento *in vitro*.

## 11. PERSPECTIVAS

Para la producción de la proteína *rTSA-1* a escala piloto se podría aplicar el método de replegamiento cromatográfico usando la matriz de Superose® 6 Prep Grade (Sigma-Aldrich); puesto que fue con este método con el que se obtuvo el mayor rendimiento de replegamiento; sin embargo, éste tendría que ser optimizado mediante la implementación de estrategias como la utilización de otras matrices, un gradiente dual de urea y pH o la adición de detergentes.

Por otra parte, también se podría implementar el replegamiento cromatográfico oxidativo asistido por chaperones moleculares diseñado en el Laboratorio de Ingeniería de Proteínas (Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV) por la Dra. Aurora Antonio

Asimismo, se podría obtener la proteína *rTSA-1* en forma nativa implementado estrategias de optimización en el nivel de expresión y en el proceso de purificación; esto con la finalidad de tener un estándar con el que se pueda comparar la proteína resultante de los procesos de replegamiento *in vitro* y asegurar así, si ésta presenta la estructura tridimensional de la proteína *rTSA-1* nativa.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Berrow, N. S. y otros, 2006. Recombinant protein expression and solubility screening in *Escherichia coli*: a comparative study. *Acta Crystallographica Section D*, Volumen 62, pp. 1218-1226.
- 2) Bornhorst, J. A. & Falke, J. J., 2000. Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. *Methods Enzymol*, Volumen 326, p. 245–254.
- 3) Carabarin-Lima, A. y otros, 2013. Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: An update. *Acta Tropica*, Volumen 127, pp. 126-135.
- 4) Ambrish, R., Alper, K. & Yang, Z., 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, Volumen 5, pp. 725-738 .
- 5) Ambrish, R., Yang, J. & Yang, Z., 2012. COFACTOR: an accurate comparative algorithm for structure-based protein function annotation. *Nucleic Acids Research*, Volumen 40, pp. W471-W477.
- 6) Antonio Pérez, A., 2012. *Replegamiento oxidativo cromatográfico de proteínas recombinantes, asistido por chaperones moleculares*. s.l.:s.n.
- 7) Apt, W., 2010. Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas disease. *Drug Design, Development and Therapy*, Volumen 4, pp. 243-253.
- 8) Batas, B. & Chaudhuri, J. B., 1999. Considerations of sample application and elution during size-exclusion chromatography-based protein refolding. *Journal of Chromatography A*, Volumen 864, p. 229–236.
- 9) Bjellqvist, B., Basse, B., Olsen, E. & Celis, J., 1994. Reference points for comparisons of two-dimensional maps of proteins. *Electrophoresis*, Volumen 15, pp. 529-539.
- 10) Bjellqvist, B., Hughes, G. J. & Pasquali, C., s.f.
- 11) Bjellqvist, B. y otros, 1993. The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis*, Volumen 14, pp. 1023-1031.
- 12) Bryson, K. y otros, 2005. Protein structure prediction servers at University College London. *Nucleic Acids Research*, Volumen 33, p. W36–W38.
- 13) Buchini, S., Buschiazzo, A. & Withers, S. G., 2008. A New Generation of Specific *Trypanosoma cruzi* trans-Sialidase Inhibitors. *Angew. Chem. Int*, Volumen 47, p. 2700 – 2703.
- 14) Cabarín Lima, A., González Vásquez, M. C., Baylon Pacheco, L. & Rosales Encina, J. L., 2011. Enfermedad de Chagas: una enfermedad olvidada. *Elementos*, Volumen 84, pp. 5-11.
- 15) Conchillo-Solé, O. y otros, 2007. AGGRESKAN: a server for the prediction and evaluation of "hot spots" of aggregation in polypeptides. *BMC Bioinformatics*, 8(65).
- 16) De Bernardez Clark, E., 2001. Protein refolding for industrial processes. *Current Opinion in Biotechnology*, Volumen 12, p. 202–207.
- 17) Dumonteil, E., 2009. Vaccine development against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* species in the post-genomic era. *Infection, Genetics and Evolution*, Volumen 9, pp. 1075-1082.
- 18) Dumonteil, E. y otros, 2012. Accelerating the development of a therapeutic vaccine for human Chagas disease: rationale and prospects. *Expert reviews vaccines*, 11(9), p. 1043–1055.
- 19) Dumonteil, E. y otros, 2004. Immunotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection with DNA Vaccines in Mice. *Infection and Immunity*, 72(1), pp. 46-53.

- 20) Fahey , E. M., Chaudhuri , J. B. & Binding, P., 2000. Refolding and purification of a urokinase plasminogen activator fragment by chromatography. *Journal of Chromatography B*, Volumen 737, p. 225–235.
- 21) Fahnert, B., Lilie, H. & Neubauer, P., 2004. Inclusion Bodies: Formation and Utilisation. En: *Physiological Stress Responses in Bioprocesses*. s.l.:Springer, p. 93–142.
- 22) Ferre , F. & Clote, P., 2005. DiANNA: a web server for disulfide connectivity prediction. *Nucleic Acids Res*, Volumen 33, pp. W230-2.
- 23) Ferre, F. & Clote, P., 2006. DiANNA 1.1: an extension of the DiANNA web server for ternary cysteine classification. *Nucleic Acids Res*.
- 24) Fouts, D. L. y otros, 1991. Nucleotide sequence and transcription of a trypomastigote surface antigen gene of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, Volumen 46, pp. 189-200.
- 25) Freitas, L. M. y otros, 2011. Genomic Analyses, Gene Expression and Antigenic Profile of the Trans-Sialidase Superfamily of *Trypanosoma cruzi* Reveal an Undetected Level of *Trypanosoma cruzi* Reveal and Undetected Level of Complexity. *Plos one*, 6(10), pp. 1-14.
- 26) Gasteiger , E. y otros, 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExpASY Server. *The Proteomics Protocols Handbook*.
- 27) Gasteiger, E. y otros, 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExpASY Server. En: *The proteomics Protocols Handbook*. s.l.:Humana Press, pp. 571-607.
- 28) Gopal, G. J. & Kumar, A., 2013. Strategies for the Production of Recombinant Protein in *Escherichia coli*. *Protein J.*
- 29) Guruprasad, K., Reddy, B. & Pandit, M., 1990. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Eng*, Volumen 4, pp. 155-161.
- 30) Harrowing, S. R. & Chaudhuri, J. B., 2003. Effect of column dimensions and flow rates on size-exclusion refolding of b-lactamase. *J. Biochem. Biophys. Methods*, Volumen 56, p. 177 – 188.
- 31) Hawe, A., Sutter, M. & Jiskoot, W., 2008. Extrinsic Fluorescence Dyes as Tools for Protein Characterization. *Pharmaceutical Research*, 25(7).
- 32) Hooda, V., 2011. Physiochemical, Functional and Structural Characterization of Wheat Germin Using In silico Methods. *Current Research Journal of Biological Sciences*, 3(1), pp. 35-41.
- 33) Hooft, R. W., Sander , C. & Vrien, G., 1997. Objectively judging the quality of a protein structure from a Ramachandran plot. *CABIOS*, 13(4), pp. 425-430.
- 34) Hotez, P. J., 2008. *Forgotten People, Forgotten Diseases: the neglected tropical diseases and their impact on global health and development*. s.l.:AMS Press.
- 35) Jones, D., 1999. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J. Mol. Biol.*, Volumen 292, pp. 195-202.
- 36) Jungbauer, A. & Kaar, W., 2007. Current status of technical protein refolding. *Journal of Biotechnology*, Volumen 128, p. 587–596.
- 37) Jungbauer, A., Kaar, W. & Schlegl, R., 2004. Folding and refolding of proteins in chromatographic beds. *Current Opinion in Biotechnology*, Volumen 15, p. 487–494.
- 38) Kelly, S. M., Jess, T. J. & Price, N. C., 2005. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta 1751* , pp. 119-139.
- 39) Kumar, T., Jayaraman, G., Lin, W. Y. & Yu, C., 1996. Effect od chaotropic denaturant on the binding of 1-anilino-8-naphthalene sulfonic acid to protein. *Biochimica et Biophysica Acta 1294*, pp. 103-105.

- 40) Kyte , J. & Doolittle , R. F., 1982. A Simple Method for Displaying the Hydrophobic Character of a Protein. *J. Mol. Biol.*, Volumen 157, pp. 105-132 .
- 41) Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, Volumen 227, pp. 680-685.
- 42) Leal, S. S. & Gomes, C. M., 2007. Studies of the molten globule state of ferredoxin: Structural characterization and implications on protein folding and iron-sulfur center assembly. *Proteins*, Volumen 68, pp. 606-616.
- 43) Li, L., Saade, F. & Petrovsky, N., 2012. The future of human DNA vaccines. *Journal of Biotechnology*, 31(162), pp. 171-182.
- 44) Limon-Flores, A. Y. y otros, 2010. Effect of a combination DNA vaccine for the prevention and therapy of *Trypanosoma cruzi* infection in mice: Role of CD4+ and CD8+ T cells. *Vaccine*, Volumen 28, pp. 7414-7419.
- 45) Li, M., Su, Z.-G. & Janson, J.-C., 2003. In vitro protein refolding by chromatographic procedures. *Protein Expression and Purification*, Volumen 33, pp. 1-10.
- 46) Ming , L., Zhi-Guo, S. & Jan-Christer , J., 2004. In vitro protein refolding by chromatographic procedures. *Protein Expression and Purification*, Volumen 33, pp. 1-10.
- 47) Misawa, S. & Kumagai, I., 1999. Refolding of Therapeutic Proteins Produced in *Escherichia coli* as Inclusion Bodies. *Biopolymers (Peptide Science)*, Volumen 51, p. 297-307.
- 48) Murcia, L. y otros, 2013. Diagnosis and treatment of Chagas disease. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, Issue 31, pp. 26-34.
- 49) Nóbrega, A. A. y otros, 2009. Oral Transmission of Chagas Disease by Consumption of Açai Palm Fruit, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, Volumen 15, pp. 663-665.
- 50) Pereira Nunes, M. C. y otros, 2013. Chagas Disease: An Overview of Clinical and Epidemiological Aspects. *JACC*, 62(9), pp. 767-776.
- 51) Prata, A., 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *THE LANCET Infectious Diseases*, Volumen 1.
- 52) Pudukkottu , G. y otros, 2007. Clinical aspects of the Chagas' heart disease. *International Journal of Cardiology*, Volumen 115, p. 279-283.
- 53) Qadeer, A. y otros, 2012. 1-Anilino-8-Naphthalene Sulfonate (ANS) Is Not a Desirable Probe for Determining the Molten Globule State of Chymopapain. *Plos one*, 7(11).
- 54) Quijano-Hernandez, I. & Dumonteil, E., 2011. Advances and challenges toward a vaccine against Chagas disease. *Human Vaccines*, 7(11), pp. 1184-1191.
- 55) Rassi , A. J., Rassi , A. & Marín-Neto, J. A., 2010. Chagas Disease. *Lancet*, Volumen 375, pp. 1388-1402.
- 56) Rathore, A. S. y otros, 2013. Refolding of biotech therapeutic proteins expressed in bacteria: review. *J Chem Technol Biotechnol*, Volumen 88, p. 1794-1806.
- 57) Rosano, G. L. & Ceccarelli , E. A., 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in microbiology*, Volumen 5, pp. 3-17.
- 58) Semisotnov, G. V. y otros, 1991. Study of the "Molten Globule" Intermediate State in Protein Folding by a Hydrophobic Fluorescent Probe. *Biopolymers*, Volumen 31, pp. 119-128.
- 59) Singh, S. M. & Panda, A. K., 2005. Solubilization and Refolding of Bacterial Inclusion Body Proteins. *Journal of bioscience and bioengineering*, 99(4), p. 303-310.
- 60) Sorensen, H. P. & Mortensen, K. K., 2005. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 4(1), pp. 1-8.
- 61) Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets-procedure and some applications. *Proc Natl Aca Sci USA*, Volumen 76, pp. 4350-4354.

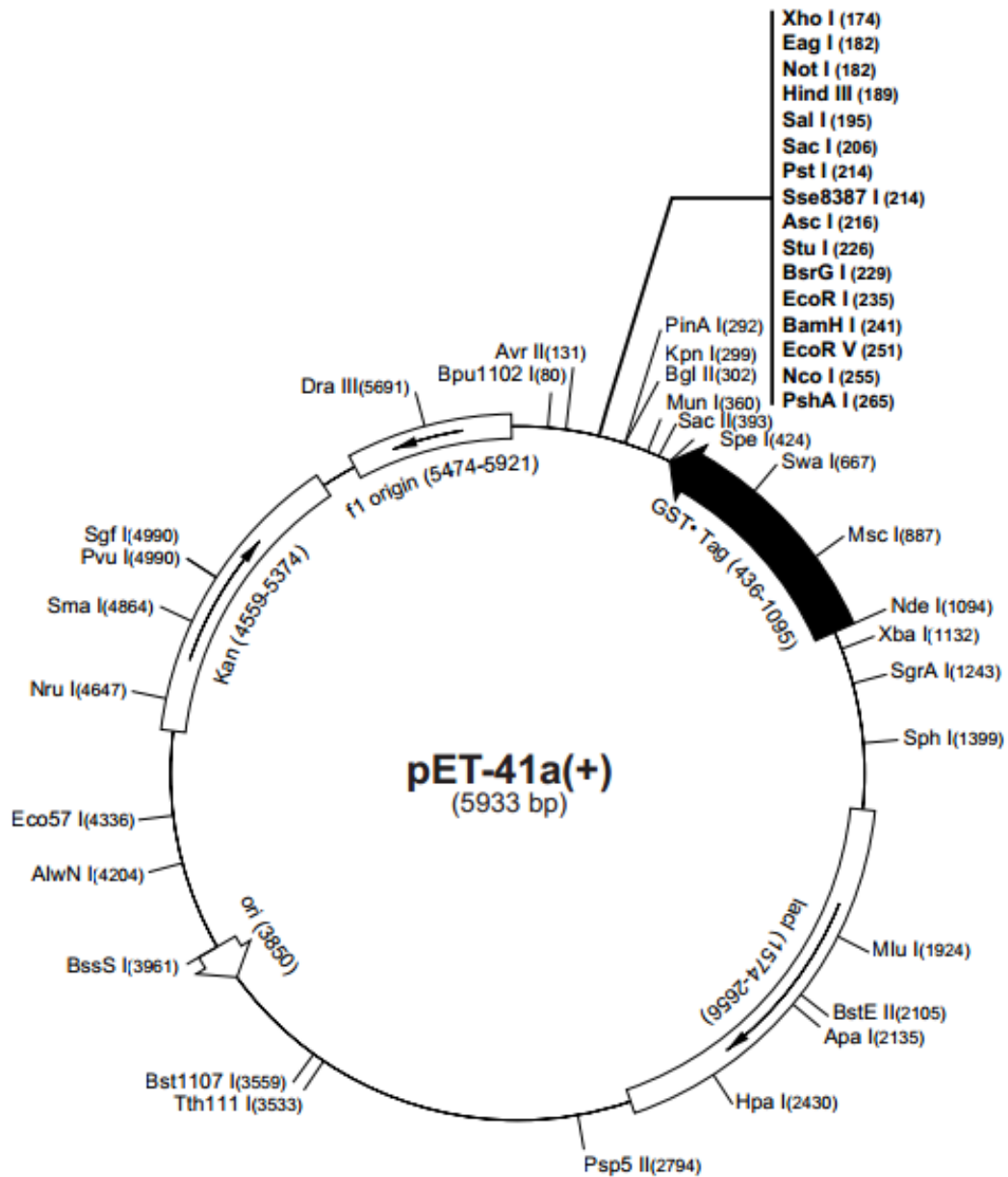
- 62) Tyler, K. & Engman, D., 2001. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology*, Volumen 31, pp. 472-481.
- 63) Uribarren, T., 2013. *Universidad Nacional Autónoma de México*. [En línea] Available at: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/trypanosomosis.html> [Último acceso: 30 abril 2014].
- 64) Watts, A. y otros, 2006. Structural and kinetic analysis of two covalent sialosyl-enzyme intermediates on *Trypanosoma rangeli* sialidase.. 281(7), pp. 149-155.
- 65) WHO, 2014. *World Health Organization*. [En línea] Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> [Último acceso: 30 abril 2014].
- 66) Wrightsman, R. A., Dawson, B. D., Fouts, D. L. & Manning, J. E., 1994. Identification of Immunodominant Epitopes in *Trypanosoma cruzi* Trypomastigote Surface Antigen-1 Protein That Mask Protective Epitopes. *The Journal of Immunology*, Volumen 94, pp. 3148-3154.
- 67) Yamaguchi, H. & Miyazaki, M., 2014. Refolding Techniques for Recovering Biologically Active Refolding Techniques for Recovering Biologically Active. *Biomolecules*, Volumen 4, pp. 235-251.
- 68) Yang, Z., 2008. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9(40), pp. 1471-2105.

## APÉNDICE A: Reactivos y Soluciones

**Tabla A.1** Reactivos químicos utilizados en los experimentos de expresión, purificación y replegamiento de la proteína rTSA-1

Reactivo	Proveedor
Ácido acético (HCH <sub>2</sub> COOH)	Mallinckrodt Chemicals
Ácido Clorhídrico (HCl)	J. T. Baker
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)	Sigma-Aldrich
Acrilamida	Bio-Rad
Azul de bromofenol	Sigma-Aldrich
Azul de Coomassie	Bio-Rad
Bis-acrilamida	Bio-Rad
Cloranfenicol	Sigma-Aldrich
Cloruro de guanidinio (GndCl)	J. T. Baker
Cloruro de potasio (KCl)	J. T. Baker
Cloruro de sodio (NaCl)	J. T. Baker
Ditiotreitol (DDT)	GBT
DNase	Sigma-Aldrich
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMFS)	Sigma-Aldrich
Fosfato de potasio monobásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	J. T. Baker
Fosfato de sodio dibásico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	J. T. Baker
Glicerol	J. T. Baker
Glicina	Bio-Rad
Glucosa	Research Organic Inc.
Glutación (forma oxidada) (GSSH)	Sigma-Aldrich
Glutación (forma reducida) (GSH)	Sigma-Aldrich
Hidróxido de Sodio (NaOH)	Merck
Imidazol	Sigma-Aldrich
Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG)	Afflymetrix
Kanamicina	Sigma-Aldrich
Lauril sarcosil	Sigma-Aldrich
Leche descremada	Nestlé
Lisozima	Sigma-Aldrich
Metanol	CIVEQ reactivos
Metanol (grado reactivo)	J. T. Baker
Rojo Ponceau	Sigma-Aldrich
Sodio dodecil sulfato (SDS)	Bio-Rad
Tris	Bio-Rad
Tritón 100X	Sigma-Aldrich
Tween 20	Sigma-Aldrich
Urea	Sigma-Aldrich
β-mercaptoetanol	Sigma-Aldrich

## APÉNDICE B: Vector de expresión



**Figura B.1 Vector de expresión PET-41a(+).** Este vector fue usado para expresar la proteína *rTSA-1* en *E. coli*



## APÉNDICE C: Cepas de *E. coli*

Tabla C.1 Cepas de *E. coli* utilizadas en las pruebas de expresión de *rTSA-1*

Cepa	Características	Antibiótico	Vectores compatibles	Fuente
<b>BL21(DE3)</b>	Deficiente en la expresión de proteasas OmpT (proteasa extracelular) y Lon (proteasa intracelular). Presenta la secuencia que codifica la RNA polimerasa T7 del fago $\lambda$ DE3 y su expresión es dependiente del promotor lacUV5 y del represor LacI <sup>q</sup> .		pET o T7 con el gen lacI y el promotor T7-lacI	Novagen
<b>Lemo21(DE3)</b>	Derivada de BL21(DE3). Varía el nivel de lisozima ( <i>lys Y</i> ), inhibidor natural de la ARN polimerasa de T7.	Cloranfenicol (0.034 mg/ml)	pET o T7 con el gen lacI y el promotor T7-lacI	New England Biolabs
<b>C41(DE3); C43(DE3)</b>	Derivada de BL21(DE3) con niveles bajos de la ARN polimerasa de T7.		pET o T7 con el gen lacI y el promotor T7-lacI	Lucigen
<b>Rosetta; Rosetta 2</b>	Derivada de BL21 <i>lacZY</i> (Tuner). Diseñada para mejorar la expresión de proteínas que codones raros para <i>E. coli</i> .	Cloranfenicol (0.034 mg/ml)	pET o T7 con el gen lacI y el promotor T7-lacI	Novagen