

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

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

***“Expresión y purificación de la proteína quimérica Chagasina/TSA-  
1 en E. coli”***

**T E S I S**

**Que presenta**

**Q.F.B Edgar Ezequiel Nava Pintor**

**Para obtener el grado de**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

**Director de la tesis: Dr. Jaime Ortega López**

**Ciudad de México**

**Noviembre de 2018.**

*“... I would make this prophecy: what everyone believed yesterday,  
and you believe today, only cranks will believe tomorrow.”*

— Francis Crick, *Of Molecules and Men*, 1966.

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de proteínas (No. 23) del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería (DBB) del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav) del Instituto Politécnico Nacional (IPN), bajo la dirección del **Dr. Jaime Ortega López**, Investigador Titular 3C del DBB, y con la asesoría de la **Dra. Ma. del Carmen Montes Horcasitas**, Investigadora Titular 3B en el DBB y de la **Dra. Rossana Arroyo Verástegui**, Investigadora Titular 3D adscrita al Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular (DIPM) del Cinvestav-IPN. Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo del Cinvestav-IPN, del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, proyecto 269657 a JOL) y de la Fundación Carlos Slim (convenio Baylor-JOL). Agradezco al CONACyT por el apoyo económico otorgado para la realización de mis estudios de maestría (Becario CONACyT No. 784949) durante el periodo septiembre 2016-agosto 2018.

# AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente a mi asesor de tesis, **Dr. Jaime Ortega López**, por su apoyo durante todo el desarrollo de este proyecto y por asegurarse de que contara con todas las facilidades para llevarlo a cabo. Asimismo, agradezco al comité tutorial conformado por la **Dra. Ma. del Carmen Montes Horcasitas** y la **Dra. Rossana Arroyo Verástegui** por sus invaluable aportes al proyecto.

Por último, mi profunda gratitud a la **M. en C. Claudia Ivonne Flores Pucheta**, por el entrenamiento en métodos cromatográficos de purificación de proteínas; al **Dr. Gerardo Reséndiz Cardiel** por su asesoría en técnicas de biología molecular y al **M. en C. Leandro Alberto Núñez Muñoz** por su valiosa asistencia técnica y por compartir conmigo en todo momento sus conocimientos.

# CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS .....	1
ÍNDICE DE TABLAS .....	3
ABREVIATURAS.....	4
RESUMEN .....	6
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 LA ENFERMEDAD DE CHAGAS .....	10
1.2 MORFOLOGÍA DE <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	12
1.3 CICLO DE VIDA DE <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	17
1.4 MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS .....	19
1.5 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS .....	20
1.6 VACUNA TERAPÉUTICA BASADA EN EL ANTÍGENO TSA-1.....	21
1.7 CHAGASINA COMO POTENCIAL ANDAMIAJE MOLECULAR PARA EXPRESAR EPÍTOPOS DE TSA-1.....	26
2. JUSTIFICACIÓN.....	29
3. HIPÓTESIS.....	30
4. OBJETIVOS.....	30
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	31
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
6.1 DISEÑO <i>IN SILICO</i> DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS MULTIEPÍTOPO .....	32
6.2 ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS MULTIEPÍTOPO.....	34
6.2.1 Determinación de propiedades fisicoquímicas y alergenicidad.....	34

6.2.2	Predicción de estructura secundaria y modelos 3D de tres quimeras multiepítipo	35
6.3	DISEÑO Y SÍNTESIS DE GENES.....	35
6.4	SUBCLONACIÓN, EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS MULTIEPÍTOPO.....	36
6.4.1	Subclonación de pUC57-Q8, pUC57-Q20 y pUC57-Q45 en el vector de expresión pCri 8a.....	36
6.4.2	Análisis de la expresión y pruebas de solubilidad de las proteínas quiméricas multiepítipo Q8, Q20 y Q45 .....	37
6.4.3	Producción de las quimeras Q8, Q20 y Q45 a una escala de 2 L.....	38
6.4.4	Purificación de la proteína quimérica Q8 por cromatografía de afinidad a níquel... ..	38
6.4.5	Lavado de cuerpos de inclusión de Q20 y Q45 .....	39
6.4.6	Purificación de proteínas quiméricas Q20 y Q45 por cromatografía de afinidad a níquel.....	40
6.5	EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TSA-1-DNH <sub>2</sub> , TSA-1-DCOOH Y CHAGASINA DE <i>T. cruzi</i> .....	41
6.5.1	Subclonación de TSA-1-DNH <sub>2</sub> , TSA-1-DCOOH en el sistema de expresión pCri 7b ...	41
6.5.2	Expresión de TSA-1-DNH <sub>2</sub> , TSA-1-DCOOH y chagasina de <i>T. cruzi</i> .....	42
6.5.3	Purificación de TSA-1-DNH <sub>2</sub> , TSA-1-DCOOH por cromatografía de afinidad a níquel	43
6.5.4	Purificación de chagasina por cromatografía de afinidad a níquel e intercambio iónico.....	43
6.6	INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS MULTIEPÍTOPO POR ENSAYOS DE WESTERN BLOT .....	44
7.	RESULTADOS .....	46
7.1	DISEÑO <i>IN SILICO</i> DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS MULTIEPÍTOPO Y EVALUACIÓN DE SU SOLUBILIDAD Y ALERGENICIDAD.....	46
7.1.1	Determinación de las propiedades fisicoquímicas estructuras secundarias y modelos 3D de las proteínas quiméricas multiepítipo .....	47
7.2	DISEÑO Y SÍNTESIS DE GENES.....	53

7.3	EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS MULTIEPÍTOPO .....	55
7.3.1	Subclonación de los genes Q8, Q20 y Q45 en el vector de expresión pCri 8a .....	55
7.3.2	Prueba de expresión y análisis de solubilidad de proteínas quiméricas Q8, Q20 y Q45.....	60
7.3.3	Purificación de la proteína quimérica Q8 a partir de la fracción soluble .....	62
7.3.4	Purificación de las proteínas quiméricas Q20 y Q45.....	65
7.1	EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TSA-1-DNH <sub>2</sub> , TSA-1-DCOOH Y CHAGASINA DE <i>T. cruzi</i> .....	73
7.2	INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS MULTIEPÍTOPO POR ENSAYOS DE WESTERN BLOT .....	74
8.	DISCUSIÓN.....	76
9.	CONCLUSIÓN .....	84
10.	PERSPECTIVAS .....	84
11.	REFERENCIAS .....	85
12.	APÉNDICES .....	95
12.1	APÉNDICE 1 .....	95
12.3	APÉNDICE 3 .....	96
12.4	APÉNDICE 4 .....	96
12.5	APÉNDICE 5 .....	97
12.7	APÉNDICE 7 .....	98
12.8	APÉNDICE 8 .....	98
12.9	APÉNDICE 9 .....	99
12.10	APÉNDICE 10 .....	100
12.11	APÉNDICE 11 .....	101
12.12	APÉNDICE 12 .....	104
12.13	APÉNDICE 13 .....	105

.....	105
12.14 APÉNDICE 14 .....	106
12.15 APÉNDICE 15 .....	107
12.16 APÉNDICE 16 .....	108
12.17 APENDICE 17 .....	109
12.18 APÉNDICE 18 .....	110
12.19 APÉNDICE 19 .....	111
13. METODOLOGÍAS GENERALES .....	112
13.1 MICROORGANISMOS, MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO .....	112
13.2 EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO POR LISIS ALCALINA .....	112
13.3 PREPARACIÓN DE CÉLULAS QUIMIOCOMPETENTES.....	113
13.4 TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS QUIMIOCOMPETENTES DE <i>E. COLI</i> .....	113
13.5 ANÁLISIS DEL DNA EN GEL DE AGAROSA .....	113
13.6 PURIFICACIÓN DE DNA A PARTIR DE GELES DE AGAROSA.....	114
13.7 SELECCIÓN DE CLONAS TRANSFORMANTES PARA CONFIRMAR LA PRESENCIA DE LA CONSTRUCCIÓN DE INTERÉS.....	114
13.8 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR SDS-PAGE.....	114



# LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Casos estimados de inmigrantes infectados con <i>Trypanosoma cruzi</i> viviendo en países no endémicos.....	11
Figura 2. Estructuras celulares compartidas por los seis linajes de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	14
Figura 3. Estadios morfológicos de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	16
Figura 4. Ciclo vital de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	18
Figura 5. Estructura química de Nifurtimox y Benznidazol.....	20
Figura 6. Estructura tridimensional del extremo NH <sub>2</sub> - de TSA-1 de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	24
Figura 7. Propiedades estructurales de Chagasina de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	28
Figura 8. Secuencia nativa de chagasina de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	32
Figura 9. Estrategias de diseño de proteínas quiméricas multiepítopo.....	33
Figura 10. Estructuras secundarias predichas para las proteínas quiméricas multiepítopo.....	51
Figura 11. Modelos tridimensionales de quimeras Q8, Q20 y Q45 obtenidas in silico con I-TASSER.....	52
Figura 12. Patrón de digestión de las construcciones pUC57-Q8, pUC57-Q20, pUC57-Q45 y pCri 8a con NcoI y XhoI.....	57
Figura 13. Mapa del vector de expresión pCri 8a.....	58
Figura 14. Análisis de restricción de clonas transformadas con pCri 8a-Q8, pCri 8a-Q20 y pCri 8a-Q45.....	59
Figura 15. Expresión y análisis de solubilidad de Q8, Q20 y Q45.....	61
Figura 16. Purificación por cromatografía de afinidad a níquel de la proteína Q8.....	63
Figura 17. Análisis electroforético de la purificación de Q8 por afinidad a níquel.....	64
Figura 18. Solubilización de proteínas quiméricas Q20 y Q45.....	66
Figura 19. Purificación por cromatografía de afinidad a níquel de la proteína Q20.....	68
Figura 20. Análisis electroforético de la purificación de Q20 por afinidad a níquel.....	69
Figura 21. Purificación por cromatografía de afinidad a níquel de la proteína Q45.....	71
Figura 22. Análisis electroforético de la purificación de Q45 por afinidad a níquel.....	72

Figura 23. <i>Inmunodetección de quimeras Q8, Q20 y Q45</i> .....	75
Figura 24. <i>Mapa del vector pUC57</i> . ....	95
Figura 25. <i>Mapa del vector de expresión pCri 7b</i> . ....	97
Figura 26. <i>Mapa del vector de clonación pGEM-T</i> .....	97
Figura 27. <i>Mapa del vector de expresión pET-19b</i> . ....	99
Figura 28. <i>Purificación por cromatografía de afinidad a níquel de la proteína chagasina de Trypanosoma cruzi</i> . ....	104
Figura 29. <i>Análisis electroforético de la purificación de chagasina por afinidad a níquel</i> . ....	105
Figura 30. <i>Purificación por cromatografía de intercambio iónico de la chagasina de Trypanosoma cruzi</i> . ....	106
Figura 31. <i>Análisis electroforético de la purificación de chagasina por intercambio iónico</i> . .....	107
Figura 32. <i>Purificación por cromatografía de afinidad a níquel de la proteína TSA-1-DNH<sub>2</sub></i> . .....	108
Figura 33. <i>Análisis electroforético de la purificación de TSA-1-DNH<sub>2</sub> por afinidad a níquel</i> . .....	109
Figura 34. <i>Purificación por cromatografía de afinidad a níquel de la proteína TSA-1-DCOOH</i> . .....	110
Figura 35. <i>Análisis electroforético de la purificación de TSA-1-DCOOH por afinidad a níquel</i> . .....	111

# LISTA DE TABLAS

Tabla 1. <i>Epítomos de linfocitos T en el extremo NH<sub>2</sub> de TSA-1</i> .....	25
Tabla 2. <i>Secuencia final de aminoácidos de las proteínas quiméricas multiepítopo clonadas en el vector pCri 8a</i> . ....	48
Tabla 3. <i>Parámetros fisicoquímicos de las proteínas recombinantes Q8, Q20 y Q45</i> . ....	49
Tabla 4. <i>Reacciones de digestión de pCri 8a, pUC57-Q8, pUC57-Q20 y pUC57-Q45 con NcoI y XhoI</i> . ....	95
Tabla 5. <i>Reacciones de ligación de los genes Q8, Q20 y Q45 en el vector de expresión pCri 8a</i> . ....	96
Tabla 6. <i>Composición de los amortiguadores de lavado y solubilización de los cuerpos de inclusión de Q20 y Q45</i> . ....	96
Tabla 7. <i>Reacciones de digestión de las construcciones pGEM-T-TSA-1-DNH<sub>2</sub>, pGEM-T-TSA-1-DCOOH y pCri 7b con NdeI y XhoI</i> . ....	98
Tabla 8. <i>Reacciones de ligación de los genes DNH<sub>2</sub> y DCOOH en el vector de expresión pCri 7b</i> . ....	98
Tabla 9. <i>Composición de amortiguadores de lavado y solubilización de los cuerpos de inclusión de DNH<sub>2</sub> y DCOOH de TSA-1</i> . ....	100
Tabla 10. <i>Evaluación bioinformática de proteínas quiméricas multiepítopo</i> . ....	101

# LISTA DE ABREVIATURAS

<b>IPTG:</b> Isopropil- $\beta$ -D-galactopiranosido	<b>Gravy:</b> Promedio general de hidrofobicidad
<b>SDS-PAGE:</b> Electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio	<b>pl:</b> Punto isoelectrico
<b>kDa:</b> Kilodalton	<b>ADNp:</b> Ácido desoxirribonucleico plasmidico
<b>NTD:</b> Enfermedades tropicales desatendidas	<b>DO<sub>600</sub>:</b> Densidad optica a 600 nm
<b>ADN:</b> Ácido desoxirribonucleico	<b>mM:</b> Milimolar
<b><math>\mu</math>m:</b> Micrómetros	<b>LB:</b> Luria-Bertani
<b>TNF-<math>\alpha</math>:</b> Factor de necrosis tumoral alfa	<b>rpm:</b> Revoluciones por minuto
<b>INF-<math>\gamma</math>:</b> Interferon gama	<b>PBS:</b> Tampón fosfato salino
<b>Cinvestav-IPN:</b> Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional	<b>PMSF:</b> Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<b>UADY:</b> Universidad Autónoma de Yucatán	<b>VC:</b> Volumen de columna
<b>GPI:</b> Glicosilfosfatidilinositol	<b>UV:</b> Ultravioleta
<b>NH<sub>2</sub>-:</b> Amino	<b>nm:</b> Nanometros
<b>COOH-:</b> Carboxilo	<b>HCl:</b> Ácido clorhídrico
<b>NCBI:</b> Centro Nacional de información Biotecnológica	<b>NaCl:</b> Cloruro de sodio
<b>PM:</b> Peso molecular	<b>H<sub>2</sub>O:</b> Agua
	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:</b> Peróxido de hidrógeno
	<b>% v/v:</b> Porcentaje volumen/volumen
	<b>DTT:</b> Ditioneitol

**$\beta$ -MeOH:**  $\beta$ -mercaptoetanol

**Q:** Quimera

**LANGEBIO:** Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad

**MBP:** Dominio de unión a maltosa

**CI:** Cuerpos de inclusión

**GST:** Glutation-S-transferasa

**Gnd-HCl:** Hidrocloruro de guanidinio

**KCl:** Cloruro de potasio

**Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>:** Fosfato de sodio monobásico

**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:** Fosfato de potasio dibásico

**TBS:** Tampón tris salino

**4CN:** 4-cloronaftol

**TEV:** Tobacco Etch Virus

**pb:** Pares de bases

**MCS:** Sitio múltiple de clonación

**GFP:** Proteína verde fluorescente

**His<sub>6</sub>:** Tag de seis histidinas

**mAu:** Miliunidades de absorbancia

**mS/cm<sup>2</sup>:** Milisiemens por centímetro cuadrado

**MHC:** Complejo mayor de histocompatibilidad

**aa:** Aminoácidos

# RESUMEN

*Trypanosoma cruzi* es el agente causal de la enfermedad de Chagas, un padecimiento cuya manifestación más grave es la falla cardíaca en estadios crónicos, lo que conduce a elevadas pérdidas económicas por incapacidad laboral y muerte. A pesar de ser una enfermedad endémica de países de centro y Sudamérica, los movimientos migratorios han expandido la enfermedad convirtiéndola en un problema de salud pública de magnitud global. Debido a la baja eficacia del tratamiento farmacológico en etapas crónicas, se buscan nuevas alternativas terapéuticas como las vacunas basadas en proteínas recombinantes. En modelos animales se ha demostrado que los antígenos recombinantes *Tc24* y *TSA-1* son capaces de conferir protección inmunológica en el hospedero y contribuyen en la disminución de la parasitemia y el daño al miocardio. Ambos antígenos se producen con alta eficiencia en *Trypanosoma cruzi*, *Tc24* en forma soluble y bien plegada, mientras *TSA-1* en agregados insolubles de proteína mal plegada conocidos como cuerpos de inclusión, por lo que se requiere de una etapa de replegamiento que pudiera ser una limitante para el desarrollo de un proceso viable para su producción a gran escala. Una alternativa para resolver este problema es el uso de una proteína de andamiaje en la que ciertos fragmentos de su secuencia se intercambien por las secuencias de los epítomos de *TSA-1* para generar proteínas quiméricas multiepítomo que se expresen en forma soluble. En el presente estudio se usó a la *chagasina*, un inhibidor de cisteína proteasas de *T. cruzi* que se expresa soluble en *E. coli*, como andamio molecular en la que la secuencia de los lazos L2, L3, L4 y L6 se intercambiaron por la de los epítomos de *TSA-1*, generándose *in silico* 51 proteínas quiméricas (Q1-Q51) con dos, tres o cinco epítomos y usando diferentes herramientas bioinformáticas se estimaron las propiedades fisicoquímicas de cada una (PM, pl, solubilidad, alergenicidad, etc.). Con base en la predicción de solubilidad se clasificaron en solubles, parcialmente solubles y mayormente insolubles. Finalmente, para probar experimentalmente, se seleccionaron tres quimeras conteniendo dos y tres epítomos, para su expresión en *E. coli*, purificación y caracterización. Las secuencias de las quimeras seleccionadas se clonaron en el vector de expresión pCri 8a, se transformaron en células de

*E. coli* BL21 (DE3) y su expresión se indujo con 1 mM de isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG) en 2 L de cultivo en matraz a 25°C por 6 horas. La purificación de las quimeras se llevó a cabo por métodos cromatográficos, analizándose todo el proceso por electroforesis en geles de poliacrilamida y dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). Finalmente, la identidad de las proteínas expresadas se analizó por ensayos de western blot con anticuerpos  $\alpha$ -TSA-1 y  $\alpha$ -chagasina, confirmando la expresión exitosa de proteínas quiméricas recombinantes de 15-16 kDa con porciones de TSA-1 y chagasina.

# ABSTRACT

*Trypanosoma cruzi* is the causative agent of Chagas' disease, a medical condition which most serious manifestation is heart failure in chronic stages, leading to big economic loss due to work incapacity and sudden death. Despite being an endemic disease of South America, migratory movements had spread the illness all around the world, becoming a global public health problem. Due to the low efficacy of pharmacological treatment, new therapeutic alternatives such as therapeutic vaccines are needed. Proximal amino portion of the surface protein TSA-1 of trypanosoma has 5 epitopes within its structure which are highly immunogenic; however, its production in *E. coli* is as inclusion bodies, making necessary an additional refolding step after purification that makes the process more expensive. In the present study, we propose the use of chagasin, an endogenous cysteine protease inhibitor from *T. cruzi*, as a biologic scaffold to generate chimeric proteins presenting immunogenic epitopes of TSA-1. The design of the encoding genes and the structural and physicochemical predictions were carried out using bioinformatic tools. Next, the chimeric genes (synthesized at *GenScript*) were subcloned into the pCri 8a expression system and transformed into *E. coli* BL21 (DE3) cells. The expression of the chimeras was induced with 1 mM isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) in 2 L culture at 25 ° C for 6 h. The purification was carried out by chromatographic methods, and analyzed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Finally, the identity of the expressed proteins was tested by western blot assays with  $\alpha$ -TSA-1 and  $\alpha$ -chagasin antibodies, confirming the successful expression of 14-15 kDa chimeric recombinant proteins with portions of TSA-1 and chagasin.

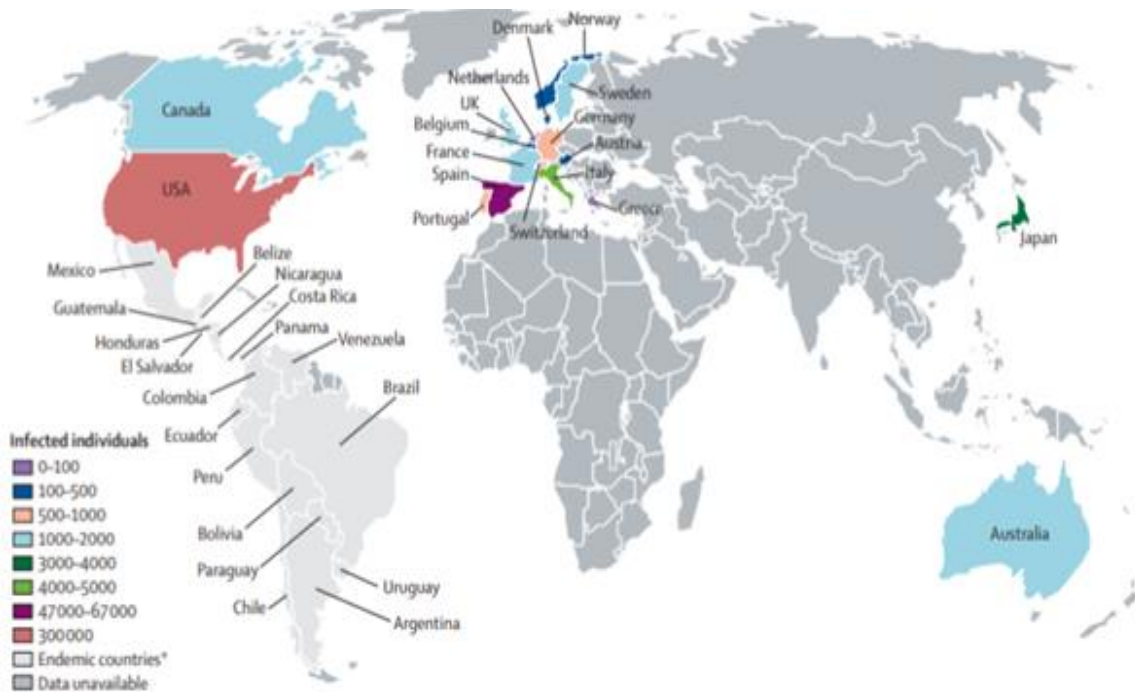


# 1. INTRODUCCIÓN

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas es endémica de países de Centro y Sudamérica y está asociada a hábitos rurales, a la pobreza y a condiciones médicas e higiénicas precarias. Esta enfermedad es causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*. En los últimos 30 años el crecimiento de mercados internacionales, el acceso a viajes al extranjero y las oleadas migratorias han favorecido la expansión de este padecimiento (Belaunzarán, 2015), ocasionando que la enfermedad de Chagas sea hoy un problema de salud pública global. Lo anterior ha atraído la atención de la comunidad científica para mejorar su diagnóstico oportuno y tratamiento. En la actualidad existen dos fármacos con actividad antitripanosomal, benznidazol y nifurtimox. No obstante, ambos presentan múltiples limitaciones en el manejo terapéutico como baja eficacia en estadios avanzados de la enfermedad, contraindicación durante el embarazo, elevado costo, prolongados regímenes de medicación y múltiples efectos secundarios que resultan en el abandono del tratamiento (Díaz de Toranzo, *et al.*, 1998; Werner, 1999). En consecuencia, existe urgencia de mejores fármacos u otros agentes terapéuticos. Una de las alternativas más promisorias es una vacuna terapéutica que al ser administrada sea capaz de ofrecer protección contra la infección por *T. cruzi*, así como inducir una respuesta inmunológica tal que promueva la disminución de la parasitemia y el daño en el miocardio sin los efectos secundarios y las restricciones durante el embarazo del tratamiento tradicional. Por lo tanto, muchos de los esfuerzos recientes se han concentrado en la investigación y el conocimiento de la biología y la genética de *Trypanosoma cruzi* con miras a desarrollar vacunas innovadoras que puedan contrarrestar el avance de la infección. A la fecha, existe evidencia sólida de protección en modelos murinos y caninos, conferida por vacunas de ADN codificante para antígenos de superficie de *T. cruzi*. Sin embargo, en la actualidad no existen estudios clínicos pertinentes que demuestren su eficacia y seguridad en seres humanos, por lo que otra alternativa consiste en el diseño de vacunas basadas en proteínas recombinantes (Zapata Estrella, *et al.*, 2006).

## 1.1 LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

La enfermedad de Chagas es una infección sistémica con efectos crónicos causada por el parásito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* que se transmite a los humanos de forma vectorial a través de la picadura de insectos hemípteros pertenecientes a la subfamilia Triatominae (*Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*), conocidos coloquialmente como “chinchas besuconas” y que se encuentran ampliamente distribuidos en el Continente Americano (Pérez Molina y Molina, 2018). Se estima que el padecimiento afecta a más de 10 millones de personas en todo el mundo, de los cuales el 90% de los casos se concentran en 21 países de Latinoamérica, en donde las grandes desigualdades socioeconómicas, la precariedad de los sistemas sanitarios y la intensa actividad agrícola han favorecido que la enfermedad de Chagas sea una infección casi exclusiva de personas en situación de pobreza extrema (Rassi, *et al.*, 2010). En el caso particular de México, en 2013 se reportaron alrededor de 1'100,000 personas diagnosticadas con la infección, siendo el país con la mayor prevalencia de pacientes chagásicos después de Brasil y Argentina (Carabarin Lima, *et al.*, 2013). No obstante, como consecuencia de los movimientos migratorios hacia países más desarrollados, la enfermedad ha logrado traspasar las barreras geográficas naturales, afectando zonas no endémicas en donde prevalecen los mecanismos de transmisión congénita y mediante transfusiones sanguíneas y trasplante de órganos. Estados Unidos es el país en el que reside el mayor número de inmigrantes con infección por *T. cruzi*, con un estimado de 300,000 casos en 2005. Además, varios países europeos, Japón y Australia también reportan casos de la enfermedad (**Figura 1**). Lo anterior ha contribuido a que actualmente la enfermedad de Chagas sea un problema de salud pública (Pérez Molina y Molina, 2018) y a ser clasificada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las principales enfermedades tropicales desatendidas (NTDs, por sus siglas en inglés). Se estima que esta enfermedad causa pérdidas económicas de alrededor de 7 mil millones de dólares al año como consecuencia de la incapacidad laboral, los elevados costos del tratamiento médico (en México el tratamiento puede llegar a costar hasta 14580 dólares por paciente al año) y la muerte repentina de pacientes con subdiagnóstico, aparentemente sanos (Dumonteil *et al.*, 2012).



**Figura 1. Casos estimados de inmigrantes infectados con *Trypanosoma cruzi* viviendo en países no endémicos.** Casos reportados de enfermedad de Chagas en diferentes países no endémicos. El mayor número de pacientes se concentran en países como Estados Unidos y España, sin embargo, Canadá, Australia, Japón y varios países europeos también han sido afectados por el proceso de “globalización” de la enfermedad de Chagas. Tomado y modificado de Pérez Molina y Molina, 2018.

## 1.2 MORFOLOGÍA DE *Trypanosoma cruzi*

La identificación de *Trypanosoma cruzi* y su clasificación taxonómica propuesta por Wendel, *et al.*, (1992) es la siguiente:

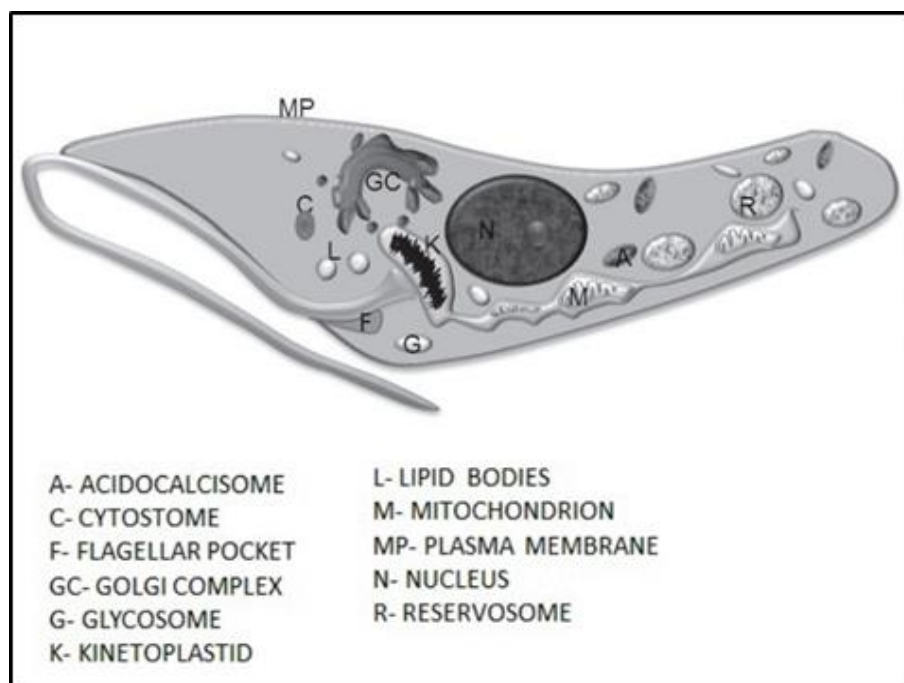
- **Reino:** Protista
  - **Subreino:** Protozoa
    - **Phylum:** Sarcomastigophora
      - **Clase:** Zoomastigophom
        - **Orden:** Kinetoplastida
          - **Familia:** Trypanosomatidae
            - **Género:** Trypanosoma
              - **Subgénero:** Schizotrypanum
                - **Especie:** cruzi

*Trypanosoma cruzi* pertenece a una población muy heterogénea de cepas que poseen una gran diversidad genética y fenotípica. Recientemente se ha propuesto su clasificación en seis grupos o linajes de importancia clínica, denominados TcI-TcVI, que comparten marcadores taxonómicos. Estudios evolutivos han conducido a la hipótesis de que a partir de los dos principales linajes ancestrales TcI y TcII, se originaron los linajes TcIII-TcVI mediante sucesivos eventos de hibridación. En todo caso, la divergencia que existe entre dichos linajes está estrechamente relacionada con las diferencias observadas en términos de patogenicidad, preferencia por vectores y hospederos, las diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad, la cinética de crecimiento del parásito y su susceptibilidad a fármacos, etc. Ejemplo de lo anterior es que, de los seis linajes de *T. cruzi*, TcI es el mayor agente infeccioso en México, América central, Brasil y la región andina, mientras que en los países del Cono Sur de Sudamérica, TcIII, TcV y TcVI son los grupos que causan la mayoría de las infecciones (Knight, *et al.*, 2014).

Las características estructurales de *Trypanosoma cruzi* (**Figura 2**) comunes en los seis linajes incluyen la presencia de una membrana plasmática compuesta principalmente por proteínas, fosfolípidos (siendo los de mayor proporción fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol) y glicocálix, que a su vez se encuentra rodeada en

su cara externa por una gruesa cubierta celular. Con respecto a los organelos intracelulares, el parásito suele tener una única mitocondria de forma irregular íntimamente relacionada con el quinetoplasto, una estructura exclusiva del orden Kinetoplastida en cuyo interior se localiza el ADN mitocondrial.

En cuanto al flagelo, este se implanta directamente al cuerpo del parásito mediante una invaginación denominada bolsillo flagelar, que tiene actividad endo y exocítica. El parásito posee también gránulos membranosos cuya principal función es la de almacenamiento: en los acidocalcisomas se almacenan protones, calcio, fósforo, sodio, potasio y zinc, mientras que en los glicosomas y reservosomas se almacenan las enzimas involucradas en el proceso glicolítico, así como proteasas y proteínas acumuladas por endocitosis, respectivamente. Otra estructura intracelular especializada del parásito está constituida por el cistosoma, una invaginación de la membrana con capacidad endocítica. Por último, tanto el aparato de Golgi como el núcleo presentan similitudes con sus respectivos homólogos en células de mamífero (Vianna Martins, *et al.*, 2012).

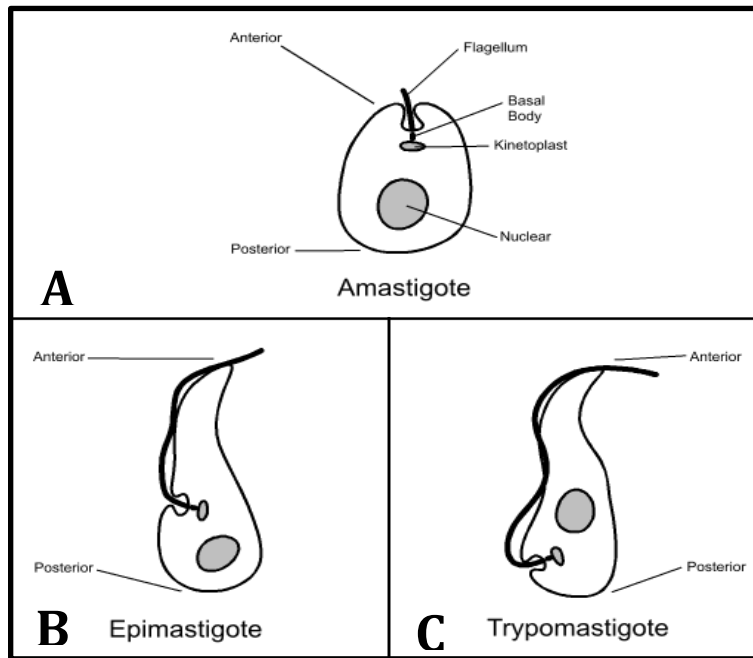


**Figura 2. Estructuras celulares compartidas por los seis linajes de *Trypanosoma cruzi*. A:** Acidocalcisoma. **C:** Cistosoma. **F:** Bolsillo flagelar. **GC:** Aparato de Golgi. **G:** Glicosoma. **K:** Quinetoplástido. **L:** Cuerpos lipídicos. **M:** Mitocondria. **MP:** Membrana plasmática. **N:** Núcleo. **R:** Reservosoma. Tomado de Vianna Martins, *et al.*, (2012).

El ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* es complejo, con tres estadios de desarrollo conocidos como amastigotes, epimastigotes y tripomastigotes (**Figura 3**) que transcurren entre el insecto vector y el hospedero mamífero. Las diferencias morfológicas propias de cada etapa del ciclo vital son consecuencia de una serie de cambios metabólicos y estructurales en respuesta a los mecanismos adaptativos que el parásito ejerce para infectar a sus diferentes hospederos y se diferencian entre sí principalmente por la posición del quinetooplasto con relación al núcleo y la presencia o no del aparato flagelar.

Los amastigotes (**Figura 3A**) son la forma intracelular del parásito, se encuentran en los tejidos de los hospederos mamíferos infectados, poseen un quinetooplasto anterior al núcleo y carecen de flagelo por lo que su movimiento es mayormente rotatorio. El diámetro del amastigote es de ~2 a 6.5  $\mu\text{m}$  y se multiplican por fisión binaria longitudinal cada 12 h, hasta provocar la lisis de las células infectadas.

Los epimastigotes de ~20 a 40  $\mu\text{m}$  (**Figura 3B**) se encuentran en el tracto digestivo de los insectos vectores. Su quinetooplasto se localiza en la porción anterior de la célula y son flagelados. Poseen una intensa actividad replicativa por fisión binaria longitudinal. El tercer estadio corresponde a los tripomastigotes, de aproximadamente 17  $\mu\text{m}$  de diámetro (**Figura 3C**). Es la etapa del ciclo vital de *T. cruzi* que carece de capacidad replicativa y es la forma extracelular e infecciosa del parásito. Se le encuentra tanto en los insectos vectores como en el hospedero final, en forma de tripomastigotes metacíclicos y tripomastigotes sanguíneos, respectivamente. El quinetooplasto presenta alta densidad de ADN en la posición terminal posterior. Al ser flagelados les confiere una gran capacidad de desplazamiento (De Souza, *et al.*, 2010; Vianna Martins, *et al.*, 2012).



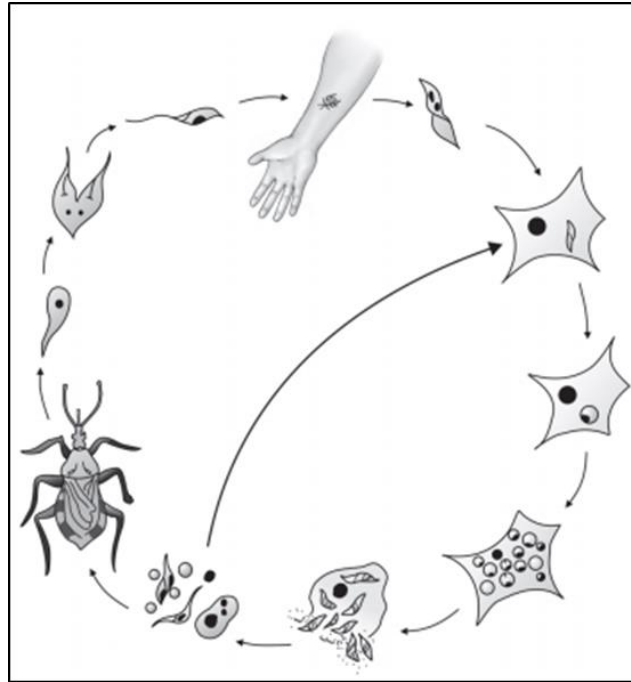
**Figura 3. Estadios morfológicos de *Trypanosoma cruzi*.** Se muestran las tres morfologías que adopta *T. cruzi* a lo largo de su ciclo vital. **A:** Amastigote. **B:** Epimastigote. **C:** Trypomastigote. Las principales características distintivas son la posición del quinetooplasto en relación al núcleo y la presencia o no de la estructura flagelar.



### **1.3 CICLO DE VIDA DE *Trypanosoma cruzi***

Durante la transmisión vectorial de la infección ocurren una serie de eventos que culminan en la diseminación del parásito en los tejidos del hospedero final. En la sección media del tracto digestivo de un triatoma infectado, los tripomastigotes se transforman en epimastigotes que proliferan a través de sucesivas divisiones por fisión binaria. A continuación los epimastigotes migran hacia la parte distal del tracto gastrointestinal en donde se diferencian en tripomastigotes metacíclicos que se adhieren a las glándulas anales del insecto. En la superficie de la piel de un hospedero mamífero, el triatoma realiza una picadura para alimentarse de sangre, lo que estimula la eliminación de excretas acumuladas liberando así a los tripomastigotes metacíclicos en las heces cerca del sitio de punción. Los tripomastigotes metacíclicos penetran al hospedero facilitado por la excoiación por rascado debida al prurito de la picadura, ejerciendo sus mecanismos de desplazamiento activo y la liberación de enzimas histolíticas. Una vez que los tripomastigotes alcanzaron los tejidos y mucosas, son endocitados por las células del sistema fagocítico mononuclear, engulléndolos en una estructura conocida como vacuola parasitófora. Dentro de la vacuola, el parásito libera proteínas citotóxicas que permiten su salida hacia el citoplasma donde pasan a su fase de amastigote. Bajo esta forma sufren múltiples divisiones celulares hasta que se producen cerca de 500 parásitos que provocan la lisis de la célula hospedera. Tras la ruptura celular, los amastigotes llegan al torrente sanguíneo y se diferencian en tripomastigotes sanguíneos que son capaces de penetrar nuevas células nucleadas, en especial las de musculatura lisa, estriada, cardíaca y de tejido nervioso.

Debido a la presencia de tripomastigotes en el torrente sanguíneo, también puede ocurrir la transmisión transfusional y congénita (debido a la proliferación del parásito en la placenta) de la enfermedad. Finalmente, cuando otro triatoma pica al hospedero infectado ingiere tripomastigotes sanguíneos, cerrando el ciclo (**Figura 4**) (de Souza, *et al.*, 2010; Rassi, *et al.*, 2010; Vianna Martins, *et al.*, 2012; Pérez Molina y Molina, 2018).



**Figura 4. Ciclo vital de *Trypanosoma cruzi*.** Se muestran los diferentes estadios de desarrollo del parásito a lo largo de su ciclo de vida durante una infección vectorial a un ser humano. Tomado de Vianna Martins, *et al.*, 2012.

## 1.4 MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

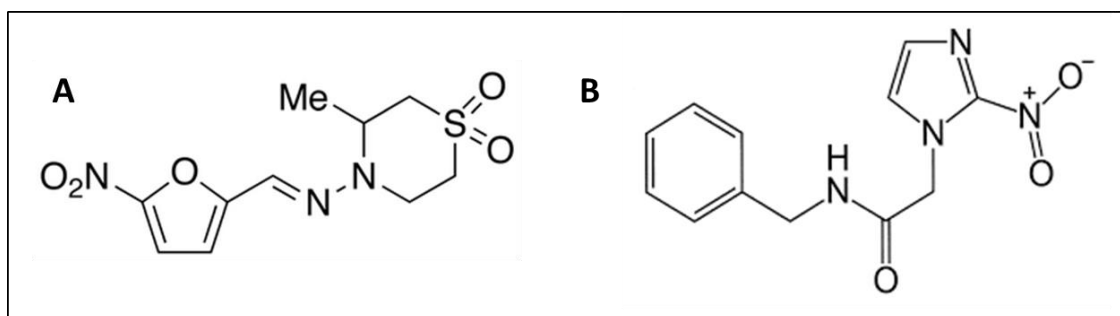
La evolución natural de la enfermedad de Chagas comprende el establecimiento de dos fases clínicas bien diferenciadas, una fase aguda de corta duración que puede progresar a una fase crónica, si no se recibe el tratamiento adecuado.

La infección aguda se caracteriza por ser asintomática en la mayoría de los casos o por presentar una sintomatología inespecífica como cuadros febriles, procesos inflamatorios diseminados, edema palpebral unilateral cuando el sitio de punción es la conjuntiva ocular (esta manifestación es conocida como signo de Romaña), linfadenopatía y hepatosplenomegalia, que frecuentemente son asociados a otros padecimientos más comunes (Pereira Nunes, *et al.*, 2013). Su duración es de entre 4 a 8 semanas, periodo tras el cual la parasitemia disminuye sustancialmente como resultado de una intensa respuesta inflamatoria con una activa producción de anticuerpos y la activación de la respuesta inmune innata por la estimulación de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Kayama & Takeda, 2010). Un alto porcentaje de pacientes con la enfermedad de Chagas permanecen en fase asintomática por 10 o 30 años, e incluso de por vida. Sin embargo, en cerca del 30-40% de los pacientes en los que se establece una infección crónica se desarrollan complicaciones orgánicas severas, principalmente cardiomiopatía y megasíndromes (megaesófago o megacolon o ambos) que ponen en riesgo la vida de los pacientes. La cardiomiopatía chagásica 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 del miocardio (miocitólisis) y daño en los cardiomiocitos debido a una reacción inmune cruzada activada contra el antígeno MXT de *T. cruzi*, el cual es homólogo a la miosina, que a su vez es un componente principal de las estructuras cardíacas. En los pacientes con daño cardíaco severo se puede producir un aneurisma ventricular, característico de esta enfermedad (Punukollu, *et al.*, 2007). Las implicaciones digestivas son menos comunes y se relacionan con el linaje TcII. Las manifestaciones

incluyen desordenes en el tránsito, disfagia, reflujo, pérdida de peso y regurgitación. Los pacientes con megaesófago están en elevado riesgo de desarrollar cáncer esofágico, mientras que aquellos que presentan síndrome de megacolon son susceptibles de desarrollar fecalomas e isquemia intestinal (Matsuda, *et al.*, 2009).

### 1.5 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

El tratamiento involucra tanto la terapia antitripanosomal como la terapia adyuvante para el manejo de la cardiomiopatía y los síndromes gastrointestinales que se presentan durante la fase crónica sintomática. Actualmente, los agentes antiparasitarios indicados son el Nifurtimox y el Benznidazol (**Figura 5**).



**Figura 5. Estructura química de Nifurtimox y Benznidazol.** Estructura química de los dos agentes antitripanosomales de elección prescritos para el tratamiento de la infección por *T. cruzi*. **A:** Nifurtimox. **B:** Benznidazol.

El Nifurtimox (**Figura 5A**) 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, como peróxido de hidrógeno y el anión superóxido. Se ha demostrado que *T. cruzi* es más sensible al estrés oxidativo que las células de vertebrados, siendo sensible al peróxido de hidrógeno. El Benznidazol (**Figura 5B**) actúa produciendo modificaciones covalentes de macromoléculas como proteínas, por nitrorreducción de intermediarios (Castro, *et al.*, 2006; Bartel, *et al.*, 2010; Carrilero, *et al.*, 2011; Nunes, *et al.*, 2013; Sperandio da Silva, *et al.*, 2014). Ambos medicamentos tienen

una actividad significativa durante la fase aguda de la enfermedad, provocando la eliminación del agente etiológico en hasta un 80% de los pacientes tratados oportunamente. Sin embargo, durante la fase crónica de la enfermedad presentan muy baja actividad tripanocida y una alta tasa de efectos adversos asociados, lo que ocasiona la suspensión prematura del tratamiento. Algunos de los efectos adversos del benznidazol son neuropatía periférica, reacciones cutáneas más o menos severas y granulocitopenia. Por otro lado, los efectos secundarios habituales del nifurtimox incluyen dolor abdominal, anorexia, náusea, vómito y pérdida de peso. Ambos tienen en común como efectos colaterales la aparición de reacciones neurológicas como inquietud, desorientación, pérdida de memoria, insomnio, espasmos, parestesias, polineuritis y convulsiones, que desaparecen al reducir la dosis o suspender el tratamiento (Castro, *et al.*, 2006).

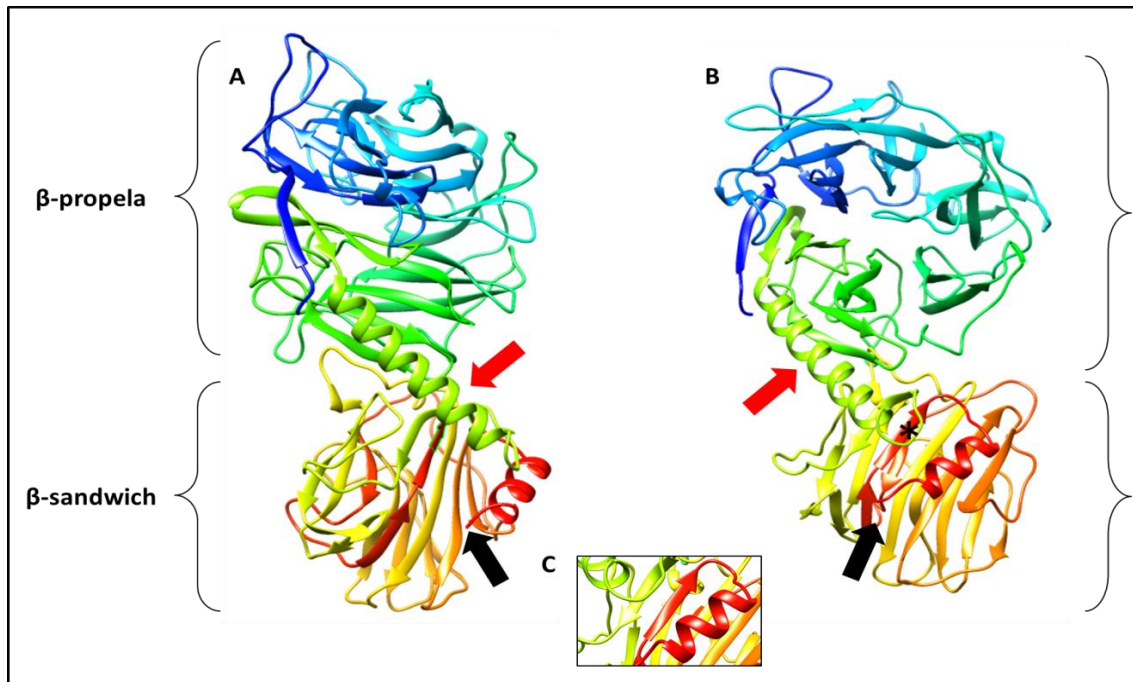
## **1.6 VACUNA TERAPÉUTICA BASADA EN EL ANTÍGENO TSA-1**

Un progreso significativo en la búsqueda de una vacuna para tratar el mal de Chagas está sin dudas representado por la secuenciación del genoma de *T. cruzi*, que codifica para aproximadamente 22,570 proteínas. Con ello, se entrevén nuevos abordajes para la identificación de nuevos antígenos que sean capaces de conferir a los hospederos protección inmunológica mediada fundamentalmente por la activación de una potente respuesta humoral, elevada producción de citocinas del tipo I y la activación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>, mecanismos críticos en el reconocimiento y eliminación de las células que han sido infectadas por *Trypanosoma cruzi* (Pang Low, *et al.*, 1998; El-Sayed, *et al.*, 2005; Teh-Poot, *et al.*, 2015).

La fase de tripomastigote sanguíneo es la forma invasiva del parásito y a su vez la que se encuentra expuesta a los mecanismos defensivos del hospedero. Por lo tanto, la mayoría de los esfuerzos se han centrado en el estudio de las proteínas de superficie presentes en dicha etapa del ciclo vital de *T. cruzi*, como posibles agentes protectores contra la infección. Particular atención han recibido las glicoproteínas implicadas en el proceso de penetración a las células del hospedero como TSA-1, Tc24, TcG1, TcG2 y TcG4 (Pettersson, *et al.*, 1989; Wrightsman, *et al.*, 1994; Beaumier, *et al.*, 2016). En una iniciativa financiada por la

Fundación Carlos Slim en alianza con Baylor College of Medicine, el Cinvestav-IPN y la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY), se propuso el desarrollo de una vacuna terapéutica basada en los antígenos TSA-1 y Tc24. Estos antígenos se seleccionaron con base en estudios previos que han demostrado que la administración terapéutica de vacunas de ADN en modelos murinos de infecciones agudas y crónicas por *T. cruzi* limitó la progresión de la enfermedad, incrementó la supervivencia de los ratones tratados y disminuyó el daño tisular cardíaco asociado a la proliferación de amastigotes (Dumonteil, *et al.*, 2004; Dumonteil, 2007; Zapata Estrella, *et al.*, 2006; Sánchez Burgos, *et al.*, 2007; Limon-Flores, *et al.*, 2010). Similares conclusiones se obtuvieron con estudios en modelos caninos, donde la vacunación preventiva y terapéutica con ADN logró reducir la carga parasitaria en sangre y tejido miocárdico, así como los procesos inflamatorios del corazón y las arritmias (Quijano Hernández, *et al.*, 2008; Quijano Hernández, *et al.*, 2013). En conjunto, estas pruebas demuestran la seguridad y eficacia de las vacunas de ADN codificantes para los antígenos Tc24 y TSA-1. Sin embargo, el estatus político, social y ético que acompaña el uso de material genético exógeno como agentes terapéuticos, limita el uso de este tipo de vacunas. Por lo que se ha optado por el uso de las proteínas recombinantes (rTc24 y rTSA-1) para el desarrollo de esta vacuna. Tc24 es una enzima de 24 kDa que se localiza en la membrana plasmática a través del anclaje glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Gunter y García, 2017). En un estudio llevado a cabo por Seid, *et al.*, (2017), se mutaron cuatro residuos de cisteína presentes en la proteína nativa por residuos de serina (Tc24-C4) con el fin de evitar la formación de puentes disulfuro que condujeran a su agregación durante el proceso de producción a gran escala, demostrando su eficacia en la producción de anticuerpos IgG2a e IFN- $\gamma$  en esplenocitos, así como en disminución de la parasitemia, el retraso de la cardiopatía chagásica y el incremento de la supervivencia en modelos murinos. Por otro lado, TSA-1, es una glicoproteína de 85 kDa que se encuentra unida a la superficie de la membrana plasmática del tripomastigote a través de un anclaje lipídico de GPI y no presenta actividad catalítica. Es codificada por el gen *tSA-1*, el primer miembro identificado y caracterizado de una súperfamilia génica de antígenos de membrana denominada Gp85/trans-sialidasa (Gp85/TS). La conformación

global de la proteína se caracteriza por la presencia de un péptido señal comprendido del residuo 1 al 29 y por los extremos  $NH_2$ - proximal (del residuo 30 al 660, con tres sitios de glicosilación) y el  $COOH$ - terminal (del residuo 661 al 835, con dos sitios de glicosilación y que consiste en una serie de repetidos sin estructura). El extremo  $NH_2$ - está constituido por dos dominios estructurales; el primero está comprendido de los residuos 30-423 y se compone de seis “motifs” del tipo  $\beta$ -propela, mientras que del residuo 452 al 660 adopta una topología similar a lectina organizada en un “motif”  $\beta$ -sandwich (**Figura 6**). Ambos dominios están interconectados por un segmento  $\alpha$ -helicoidal (residuos 424-451) y están implicados en la adhesión del parásito a la superficie de las células y en la invasión de los tejidos blanco. En el dominio  $\beta$ -propela se localizan al menos seis péptidos (N15, N17, N20, N21 y N23) con alta afinidad a laminina y otros elementos de la matriz extracelular de las células hospederas, como colágeno, vimentina vitronectina, fibronectina, heparansulfato, galectina-3, tenascina y trombospondina. Por otro lado, en el dominio lectina se localiza el péptido FLY (VTVxNVxLYNR); una secuencia conservada en todos los miembros de la familia Gp85/TS que tiene una alta capacidad de unión a citoqueratina-18 (CK-18), una proteína presente en los filamentos intermedios que componen el citoesqueleto y en menor medida, en la superficie de la membrana plasmática. Se ha propuesto que la interacción FLY-CK-18 desencadena la cascada de señalización ERK 1/2 que modifica el patrón de fosforilación de los filamentos intermedios, ocurriendo como consecuencia un rearrreglo del citoesqueleto que facilita la invasión de la célula. Hacia el término de la proteína, en el extremo  $COOH$ - se observa una segunda estructura tipo  $\alpha$ -hélice (**Figura 6**) (Alves y Coli, 2007; Mattos, *et al.*, 2014).



**Figura 6. Estructura tridimensional del extremo NH<sub>2</sub>- de TSA-1 de *Trypanosoma cruzi*.** Se muestran dos vistas de la disposición espacial de los diferentes dominios estructurales de la proteína TSA-1. Con llaves se indican los dominios  $\beta$ -propela y  $\beta$ -sandwich. Con flechas rojas se señala el “motif”  $\alpha$ -hélice que une los dos dominios. Las flechas negras muestran el extremo COOH- terminal. Con un asterisco se indica el “motif” FLY, también representado en la imagen C.



La inmunogenicidad de la proteína TSA-1, así como de polipéptidos derivados de subregiones del gen expresado en baculovirus y sistemas bacterianos se han evaluado en modelos murinos. En estos estudios se observó que a pesar de que tanto la región *NH<sub>2</sub>*-proximal (30-617) como la *COOH*-terminal (618-835) de TSA-1 contienen determinantes antigénicos, en la región *COOH*-terminal se concentran las secuencias inmunodominantes que favorecen la supresión de los 5 epítomos de linfocitos T presentes en el extremo *NH<sub>2</sub>*- (Tabla 1).

**Tabla 1. Epítomos de linfocitos T en el extremo *NH<sub>2</sub>*- de TSA-1.**

Epítomo	Secuencia (aa)	Posición
E1	KLFPEVIDL	TSA-1 <sup>192-200</sup>
E2	IVMGNGTLV	TSA-1 <sup>334-342</sup>
E3	RLTEELNTI	TSA-1 <sup>526-534</sup>
E4	FVDYNFTIV	TSA-1 <sup>617-625</sup>
E5	LLYSDDALHL	TSA-1 <sup>501-510</sup>

Se indica el nombre de cada epítomo así como su secuencia de aminoácidos y su posición dentro de la secuencia primaria de TSA-1.

Ratones inmunizados con la proteína TSA-1 completa (29-835), o sólo con la región *COOH*- (618-835) no lograron sobrevivir a la infección por *T. cruzi*. En contraste, los ratones inmunizados con el extremo *NH<sub>2</sub>*- (30-617) mostraron un 70% de sobrevivencia ante la presencia del parásito. Por lo tanto, y con el fin de evitar el enmascaramiento de su acción inmunoprotectora por parte de los epítomos de la región *COOH*-terminal, únicamente el extremo *NH<sub>2</sub>*-proximal de la proteína TSA-1 (de ~65 kDa) es considerado un antígeno adecuado para la formulación de una vacuna (Wrightsmann, *et al.*, 1994). Sin embargo, un reto metodológico asociado a la producción heteróloga de rTSA-1 en plataformas de expresión como *E. coli* es su expresión en agregados de proteína mal plegada, comúnmente

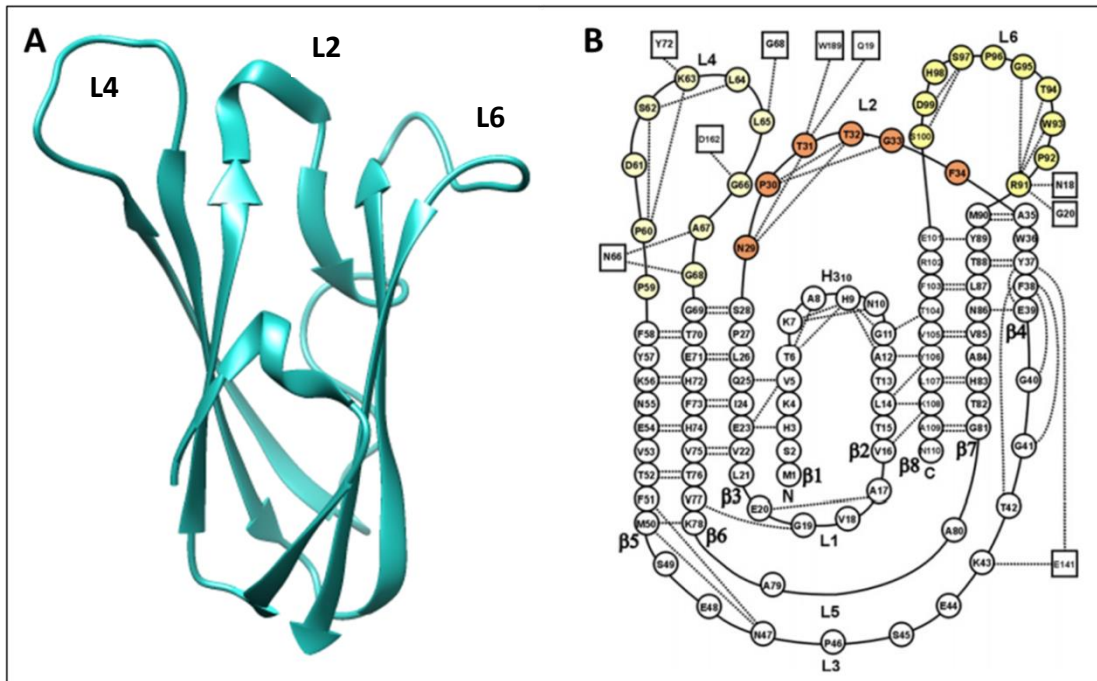
conocidos como cuerpos de inclusión. Aunque se han desarrollado protocolos de repliegamiento cromatográfico, esta etapa adicional puede limitar o encarecer la producción de TSA-1 a gran escala (Fahnert, *et al.*, 2004; Antonio-Pérez, *et al.*, 2012; Antonio-Pérez, *et al.*, 2012; de la Cruz, *et al.*, 2018).

Una alternativa novedosa es el diseño de nuevas proteínas funcionales donde secuencias de interés (como epítomos) se inserten o sustituyan por residuos específicos de proteínas empleadas como andamios moleculares. Por ejemplo, el polipéptido pancreático aviar (aPP), la cremallera de leucina GCN4 y Apamin se han utilizado como andamios proteínicos sobre los cuales se pueden insertar epítomos (Fujiwara, *et al.*, 2016). Estos andamios suelen poseer características estructurales que permitan su expresión de forma soluble en plataformas bacterianas. Por lo tanto, el uso de una proteína de *T. cruzi* que se exprese en forma soluble en *E. coli* para la expresión de los determinantes antigénicos presentes en el extremo  $NH_2$ - de TSA-1 es una estrategia potencialmente viable para resolver la problemática de la expresión de rTSA-1 en cuerpos de inclusión.

### **1.7 CHAGASINA COMO POTENCIAL ANDAMIAJE MOLECULAR PARA EXPRESAR EPÍTOPOS DE TSA-1**

Una proteína con posibilidades de funcionar como andamiaje molecular es la chagasina de *T. cruzi*. La chagasina es una proteína de 110 aminoácidos perteneciente a la familia de inhibidores de cisteína proteasas producida por *Trypanosoma cruzi* donde actúa como el principal regulador fisiológico de la cruzipaina, una cisteína proteasa expresada durante todo el ciclo vital del protozooario. La chagasina se asocia con elevada afinidad a la cruzipaina durante su tráfico a compartimientos intracelulares específicos, haciendo las veces de regulador postraduccional de la actividad de la proteasa (Wang, *et al.*, 2007). La estructura cristalina de la chagasina fue reportada en investigaciones previas (Ljunggren, *et al.*, 2007). Se trata de una proteína monomérica compuesta casi exclusivamente por láminas- $\beta$  ( $\beta 1$ - $\beta 8$ ) y seis lazos (L1-L6) que pueden ser susceptibles de mutaciones específicas que permitan la inserción de los determinantes antigénicos de TSA-1. Las láminas- $\beta$  y los lazos se disponen en una estructura tipo sándwich. Uno de los extremos de la molécula está

formado por las láminas  $\beta_1$ ,  $\beta_3$ ,  $\beta_6$  y  $\beta_5$  con una conformación predominantemente antiparalela. Por otro lado, el segundo extremo se compone de las láminas  $\beta_2$ ,  $\beta_8$ ,  $\beta_7$  y  $\beta_4$  siendo también predominantemente antiparalela. Cabe resaltar que existe una conexión entre las láminas  $\beta_1$  y  $\beta_2$  formada por una vuelta estrecha de los residuos Lis, Ala e His con configuración de hélice  $3_{10}$ . En el espacio intermedio se disponen principalmente las cadenas laterales de aminoácidos hidrofóbicos, a excepción de  $E_{71}$  que se encuentra interactuando con el átomo de nitrógeno de  $W_{236}$ . Los lazos L1, L3 y L5 son compactos (de 4, 3 y 11 residuos, respectivamente) y no protruyen hacia el exterior de la proteína; mientras que los lazos L2, L4 y L6 se encuentran en el extremo opuesto de la enzima dispuestos de manera secuencial con una alineación casi coplanar. L4 está formado por los residuos  $N_{29}$ - $P_{34}$  y en su extremo apical se forma una vuelta helicoidal de geometría  $3_{10}$ . Finalmente, L6 está compuesto por los aminoácidos  $R_{91}$ - $S_{100}$  formando dos vueltas.



**Figura 7. Propiedades estructurales de Chagasina de *Trypanosoma cruzi*.** **A:** Modelo tridimensional de la Chagasina. **B:** Secuencia aminoacídica de la Chagasina con elementos de estructura secundaria. Tomado de Ljunggren, *et al.*, 2007.

## 2. JUSTIFICACIÓN

La incidencia de la enfermedad de Chagas en las comunidades rurales y en los sectores más desprotegidos de Latinoamérica, así como su diseminación en regiones no endémicas ocasionan en conjunto alrededor de 12,000 muertes anuales a nivel mundial y pérdidas económicas cuantiosas, estimándose cerca de 7 mil millones de dólares debido a los elevados costos que implica el seguimiento médico de los pacientes, así como por la disminución de la mano de obra debido a la muerte súbita de personas subdiagnosticadas. Como consecuencia de la limitada eficacia que presentan los tratamientos farmacológicos prescritos actualmente, sobre todo en la fase crónica de la enfermedad, el desarrollo de una vacuna terapéutica es una de las alternativas más prometedoras para el manejo terapéutico de la enfermedad de Chagas.

Una opción potencial son las vacunas terapéuticas basadas en proteínas recombinantes quiméricas que exhiban en su superficie los mejores determinantes antigénicos inmunoestimulantes. La porción  $NH_2$ - proximal de la proteína TSA-1 de *T. cruzi* ha demostrado ser un antígeno que genera respuesta inmunoprotectora. Dicha región se ha logrado expresar sólo como cuerpos de inclusión en *Escherichia coli* Por lo que en este proyecto se propone la expresión de sus epítomos en un andamio molecular que se expresa soluble en dicha plataforma de expresión.

### 3. HIPÓTESIS

Las propiedades de solubilidad de la Chagasina favorecerán la expresión en forma soluble de quimeras con epítomos de TSA-1.

### 4. OBJETIVOS

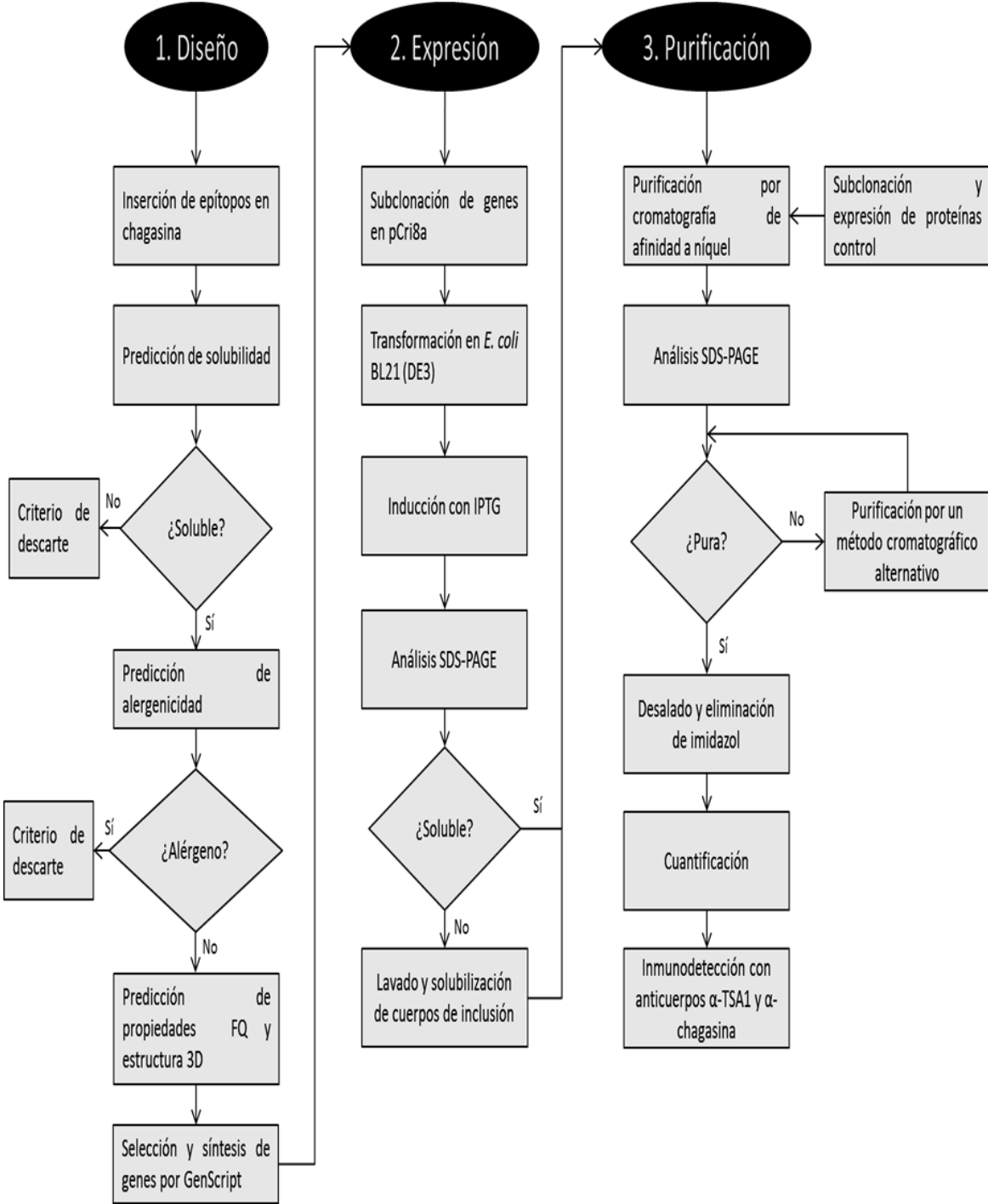
#### OBJETIVO GENERAL

Diseñar proteínas quiméricas con el inhibidor de proteasas, chagasina de *T. cruzi*, como andamiaje molecular para la inserción de los epítomos del extremo  $NH_2$ - del antígeno vacunal TSA-1 y su expresión heteróloga en *E. coli*.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Diseño de proteínas quiméricas mediante la inserción de los cinco epítomos de TSA-1 dentro de la secuencia de chagasina de *T. cruzi* y predicción de su solubilidad, alergenicidad, propiedades fisicoquímicas y estructura tridimensional.
- Selección de al menos dos quimeras para la síntesis química y clonación de la secuencia de nucleótidos optimizada para su expresión en *E. coli*
- Expresión en *E. coli* BL21 (DE3) de las quimeras seleccionadas y su purificación por métodos cromatográficos.

# 5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



# 6. MATERIALES Y MÉTODOS

## 6.1 DISEÑO *IN SILICO* DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS MULTIEPÍTOPO

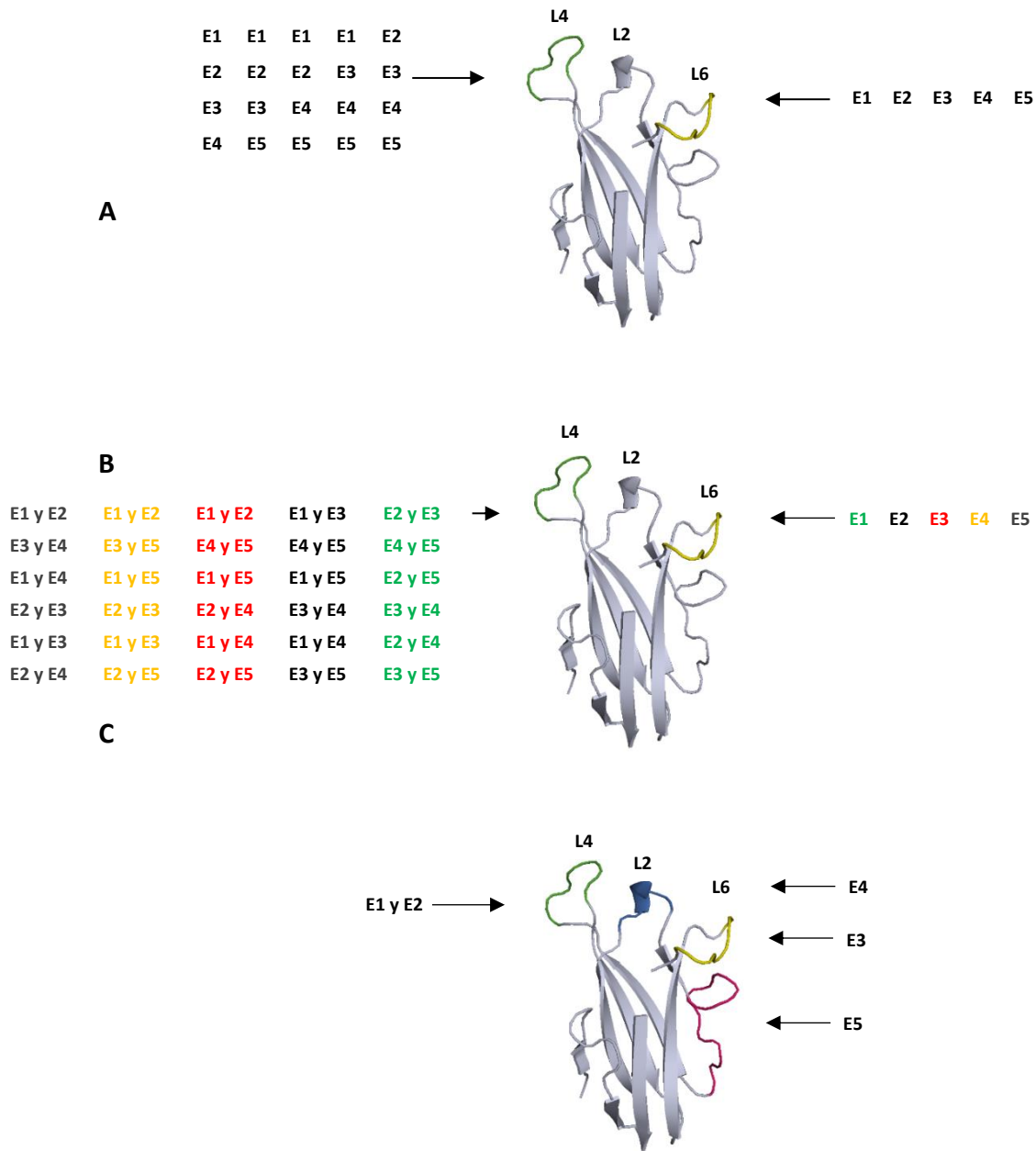
Las proteínas quiméricas multiepítipo se diseñaron mediante la sustitución de los aminoácidos de los lazos L2, L3, L4 y L6 de la chagasina de *T. cruzi* (ID: Q966X9. *Uniprot* en [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) por la de los epítomos E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, E<sub>3</sub>, E<sub>4</sub> y E<sub>5</sub> de la proteína TSA-1 (**Tabla 1**).

En las **Figuras 8 y 9** se muestran los sitios específicos de la secuencia polipeptídica de la chagasina que fueron sustituidos por los epítomos de la TSA-1.

10	20	30	40	50
MSHKVTKAHN	GATLTVAVGE	LVEIQLPS <u>NP</u>	<u>TTGFAWYFEG</u>	<u>GTKESPNE</u> SM
60	70	80	90	100
FTVENKYF <u>PP</u>	<u>DSKLLGAGG</u> T	EHFHVTVKAA	GTHAVNLTYM	<u>RPWTGPSHDS</u>
110				
ERFTVYLKAN				

**Figura 8. Secuencia nativa de chagasina de *Trypanosoma. cruzi*.** En la secuencia de aminoácidos se resaltan las secuencias de los lazos que fueron modificados para introducir la secuencia de los epítomos: L2 (**azul**), L3 (**morado**), L4 (**verde**) y L6 (**rojo**). Los aminoácidos subrayados se conservaron en la estructura final de las quimeras.





**Figura 9. Estrategias de diseño de proteínas quiméricas multiepítipo.** Se representan las estrategias seguidas en el diseño de las quimeras resaltando en diferentes colores los lazos. Las flechas indican los epítomos que se insertaron en cada caso. **A:** quimeras que contienen dos epítomos diferentes localizados en los lazos L4 (**verde**) y L6 (**amarillo**). **B:** quimeras con tres epítomos diferentes, dos localizados en L4 y uno en L6. **C:** quimera con 5 epítomos, donde L4, L6, L2 (**azul**) y L3 (**morado**) fueron modificados.

En la **Figura 9** se muestra la estrategia para el diseño de las quimeras (Qs) conteniendo dos, tres o los cinco determinantes antigénicos de TSA-1. La secuencia de la chagasina nativa en formato FASTA (ID: 2H72) se recuperó del *Centro Nacional de Información Biotecnológica* (NCBI, por sus siglas en inglés) y los residuos de los lazos seleccionados se sustituyeron por la secuencia de los epítomos de TSA-1 usando el software *CLC Main Workbench 7.7.3*. Las quimeras con dos determinantes antigénicos diferentes localizados en los lazos L4 y L6 respectivamente (**Figura 9A**) se diseñaron sustituyendo los residuos D<sub>61</sub>-G<sub>68</sub> y W<sub>93</sub>-D<sub>99</sub> por la secuencia de los cinco epítomos. Las combinaciones diferentes se obtuvieron fijando uno de los epítomos en L4 y variando los 4 restantes en el lazo L6. Para las quimeras con tres epítomos, se tomaron en cuenta los reportes en los que se describe la existencia de una proteína homóloga a la chagasina en *T. brucei* con un lazo L4 de 20 aminoácidos de extensión (Rigden, *et al.*, 2002; Wang, *et al.*, 2007; Figueiredo da Silva, *et al.*, 2007). En este caso, dos epítomos se ubicaron en el lazo L4 (e interspaciados entre sí por el linker GPGPG) y el tercero se ubicó en el lazo L6. Las diferentes combinaciones se hicieron fijando un epítomo en L6 y colocando pares de epítomos en L4 como se indica en la **Figura 9B**. Finalmente, se diseñó una proteína en la que se modificaron los lazos L2, L3, L4 y L6 para insertar los 5 epítomos simultáneamente (**Figura 9C**): E1 y E2 ubicados en lazo L4 e interspaciados entre sí por el linker GPGPG, E3 en el lazo L6, E4 en L2 y por último, E5 en L3.

Una vez obtenidas las secuencias de los péptidos quiméricos se llevó a cabo un alineamiento múltiple de secuencias usando la herramienta *Clustal W* para la determinación del porcentaje de identidad con respecto a la chagasina.

## 6.2 ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS MULTIEPÍTOPO

### 6.2.1 Determinación de propiedades fisicoquímicas y alergenicidad

Las propiedades fisicoquímicas de las quimeras, incluyendo el peso molecular (PM), el índice de estabilidad, el promedio general de hidrofobicidad (Gravy), el punto isoeléctrico teórico (pI), la composición aminoacídica (Asp+Glu y Arg+Lys) y el tiempo de vida media se

determinaron con la herramienta *ProtParam* del servidor *Expasy* en <http://web.expasy.org/protparam/>. Asimismo se realizó un análisis predictivo de la solubilidad en *E. coli* con el servidor *ccSOLomics* ([http://service.tartaglialab.com/grant\\_submission/ccsol\\_omics](http://service.tartaglialab.com/grant_submission/ccsol_omics)). Por último, con el predictor *AllergenFP v.1.0* (<http://www.ddg-pharmfac.net/AllergenFP/>) se evaluó la potencial alergenicidad de las proteínas quiméricas.

### **6.2.2 Predicción de estructura secundaria y modelos 3D de tres quimeras multiepítipo**

Tomando en cuenta como principales criterios de selección una baja alergenicidad y elevada probabilidad de expresión en forma soluble en *E. coli*, se seleccionaron tres quimeras no alergénicas y con probabilidades de expresarse solubles mayores al 99% para las predicciones estructurales y el diseño de los genes. La predicción de las estructuras secundarias se hizo a través del servidor *PSIPRED v3.3* (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>), mientras que los modelos tridimensionales se obtuvieron con la herramienta *I-TASSER* (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>).

### **6.3 DISEÑO Y SÍNTESIS DE GENES**

Teniendo como base la secuencia aminoacídica de las tres quimeras seleccionadas, los genes codificantes se diseñaron *in silico* para su posterior clonación y expresión en *E. coli* empleando las herramientas bioinformáticas en línea de traducción inversa ([www.bioinformatics.org/sms2/rev\\_trans.html](http://www.bioinformatics.org/sms2/rev_trans.html)) y de optimización de uso de codones ([www.kausa.or.jp/codon](http://www.kausa.or.jp/codon)). Para propósitos de subclonación, se añadieron en los extremos 5' y 3' de las construcciones los sitios de restricción *NcoI* y *XhoI*, respectivamente. Asimismo, se introdujo el codón de paro TAA para incrementar la eficiencia en la terminación de la traducción en el hospedero. Finalmente, la secuencia de los tres genes se envió a la compañía *GenScript* (Estados Unidos) para su síntesis química en el vector pUC57, generándose así las construcciones pUC57-Q8, pUC57-Q20 y pUC57-Q45.

## 6.4 SUBCLONACIÓN, EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS MULTIEPÍTOPO

### 6.4.1 Subclonación de pUC57-Q8, pUC57-Q20 y pUC57-Q45 en el vector de expresión pCri 8a

El plásmido pCri 8a y las construcciones pUC57-Q8, pUC57-Q20 y pUC57-Q45 (**Apéndice 1**) se transformaron en células químicamente competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  mediante el método de choque térmico. Las quimeras se sembraron en cajas con agar LB adicionado con 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ampicilina mientras que el vector pCri 8a se sembró en agar LB con 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de kanamicina. Tras 16 h de incubación a 37°C se tomaron colonias de cada plásmido y se inocularon en tubos de ensaye con 5 mL de medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes y se incubaron a 37°C y 250 rpm durante 16 h. A partir de estos cultivos se purificó el ADN plasmídico (ADNp) mediante el procedimiento de miniprep por lisis alcalina siguiendo las recomendaciones del kit *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN). El ADNp purificado se cuantificó por la medición de la absorbancia a 260 y 280 nm de longitud de onda en un equipo *NanoDROP 2000* (Thermo-Scientific). A continuación 3  $\mu\text{g}$  de cada plásmido puro fueron digeridos con 0.5  $\mu\text{L}$  de las enzimas de restricción *NcoI* y *XhoI*, respectivamente, y 5  $\mu\text{L}$  de amortiguador 3.1, generándose así los extremos cohesivos necesarios para la subclonación. Las mezclas de reacción se llevaron a un volumen final de 50  $\mu\text{L}$  con H<sub>2</sub>O grado inyectable y su composición se detalla en el **Apéndice 2**. El procedimiento se realizó a 37°C durante 16 h. Al término de la incubación, los productos de la digestión se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. Las bandas correspondientes a los insertos (genes quiméricos) y al vector pCri 8a linearizado se recuperaron según las especificaciones del kit de purificación de ADN a partir de geles de agarosa *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN). La concentración final de los ácidos nucleicos se determinó por espectrofotometría UV/Vis a 260 nm en un equipo *NanoDrop 2000*.

El siguiente paso consistió en la ligación de los genes quiméricos dentro del sistema de expresión pCri 8a. Las tres ligaciones se efectuaron en una relación 3:1 (inserto:vector) en

volúmenes de reacción de 20  $\mu$ L, con 10 unidades de ADN ligasa T4 y 2  $\mu$ L de amortiguador de ADN ligasa T4 a 16°C durante 16 h (**Apéndice 3**).

Al término de la incubación, las reacciones se detuvieron calentando las mezclas a 65°C para favorecer la desnaturalización de la enzima ligasa y enseguida se transformaron por choque térmico en células de *E. coli* DH5 $\alpha$  quimiocompetentes. Las colonias crecidas en las placas se examinaron mediante la digestión de su ADNp con *Nco*I y *Xho*I a 37°C por 16 h. El patrón de restricción se analizó en un gel de agarosa al 1.2% para discriminar las clonas recombinantes. A partir de una clona positiva se prepararon cultivos de 5 mL que se alicuotaron (1 mL) y se conservaron con glicerol al 16% y se almacenaron a -80°C.

#### **6.4.2 Análisis de la expresión y pruebas de solubilidad de las proteínas quiméricas multiepitopo Q8, Q20 y Q45**

Para comprobar la expresión de las proteínas Q8, Q20 y Q45 en *E. coli* BL21 (DE3), las construcciones pCri 8a-Q8, pCri 8a-Q20 y pCri 8a-Q45 se transformaron en células quimiocompetentes por choque térmico. Después, se inocularon 3 clonas distintas de cada construcción en tubos de ensaye con 5 mL de medio LB adicionados con 50  $\mu$ g/mL de kanamicina. Los cultivos se incubaron a 37°C con agitación orbital de 250 rpm hasta que alcanzaron una densidad óptica a 600 nm ( $DO_{600}$ ) de 0.5-1 y se indujo la expresión de las proteínas con 1 mM de IPTG. El crecimiento se continuó a 25°C durante 6 h. El análisis de la expresión se realizó por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida al 15%, para lo cual se prepararon muestras de 1 mL del medio de cultivo antes y después de las 6 h de inducción, de tal forma que tuvieron una  $DO_{600}=1$ . Cada muestra se centrifugó a 13000 rpm durante 15 min, los sobrenadantes se descartaron y se reservaron los paquetes celulares. Para las muestras denominadas “sin inducir” e “inducida”, los botones celulares se resuspendieron con 75  $\mu$ L de agua y 25  $\mu$ L de amortiguador de Leammli 4x. Por otro lado, el paquete celular restante se lisó con 250  $\mu$ L de solución *BugBuster* (Merck) en agitación durante 20 min, después la mezcla se centrifugó y el sobrenadante y el sedimento se colocaron en tubos diferentes. Del sobrenadante se tomaron 75  $\mu$ L que se mezclaron con 25  $\mu$ L de amortiguador de Laemmli 4x y se denominó “fracción soluble”. El sedimento se

resuspendió con 75  $\mu$ L de agua y 25  $\mu$ L de amortiguador de Laemmli 4x y se denominó “fracción insoluble”. Con el análisis electroforético se determinó que únicamente la quimera Q8 se expresó en forma soluble, mientras que Q20 y Q45 se concentraron en cuerpos de inclusión. A partir de estas observaciones se establecieron los métodos de purificación para cada una. Finalmente, con una clona positiva de cada construcción se prepararon cultivos de 5 mL que se alicuotaron (1 mL) y se almacenaron con glicerol al 16% a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **6.4.3 Producción de las quimeras Q8, Q20 y Q45 a una escala de 2 L**

A partir de clones de *E. coli* BL21 (DE3) con las construcciones pCri 8a-Q8, pCri 8a-Q20 y pCri 8a-Q45 se prepararon inóculos de 5 mL de medio LB con 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de kanamicina, a partir de los cuales se tomaron los volúmenes necesarios para inocular 2 L de medio LB (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de kanamicina a pH 7.2) de manera que tuvieran una  $\text{DO}_{600}$  inicial de  $\sim 0.02$ . Los matraces inoculados se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  y 250 rpm hasta que alcanzaron una  $\text{DO}_{600}$  de 0.5-1, momento en el cual se indujo la expresión de las proteínas con la adición de 1 mM de IPTG. El crecimiento se continuó a  $25^{\circ}\text{C}$  y 250 rpm por 6 h más y la biomasa resultante se recuperó por centrifugación a 8000 rpm durante 30 min.

#### **6.4.4 Purificación de la proteína quimérica Q8 por cromatografía de afinidad a níquel**

La biomasa obtenida durante la inducción de la proteína quimérica Q8 se sometió a un proceso de lisis celular a fin de liberar la proteína recombinante al medio. Para ello, cada gramo de biomasa a lisar se resuspendió con 10 mL de amortiguador A (PBS 1x, 1 mM de PMSF y 5% de glicerol) y se adicionó lisozima a una concentración final de 2 mg/mL. La mezcla se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  y 250 rpm durante 30 min y se sonicó en baño de hielo durante 8 ciclos de 30 s al 30% de amplitud de onda y 30 s de reposo. El lisado se centrifugó a 13,000 rpm durante 30 min obteniéndose una fase insoluble (que se reservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis) y una fracción soluble que se filtró a través de una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Con el filtrado se efectuó un procedimiento de cromatografía de afinidad a níquel en un equipo *NGC Chromatography System (Bio-Rad)*. Primero, una

columna pre-empacada *Bio-Scale Mini Profinity IMAC Cartridge* de *Bio-Rad* de 5 mL de volumen de columna (VC) se equilibró con 10 VC de amortiguador A, a una velocidad de flujo de 1 mL/min. En seguida se aplicó la muestra a 0.5 mL/min, la columna se lavó nuevamente con 5 VC de amortiguador A y se aplicaron concentraciones crecientes de imidazol (10, 50, 75 y 100 mM) para la eliminación de proteínas contaminantes. El paso de elución se realizó con 10 VC de amortiguador B (PBS 1X, 1 mM de PMSF, 5% de glicerol y 500 mM de imidazol). El flujo empleado durante los lavados y la elución fue de 1 mL/min. Las muestras en las que se detectaron señales de UV relevantes se reservaron para su posterior análisis por SDS-PAGE al 15%. Las fracciones positivas se aplicaron a una columna empacada con 10 mL de resina *Biogel P6* (*Bio-Rad*) con un rango de fraccionamiento de 1-6 kDa previamente equilibrada con 10 VC de PBS 1X y 5% de glicerol para la eliminación del imidazol. La concentración de proteína Q8 se determinó por espectrofotometría UV en *NanoDrop2000* y las fracciones alicuotadas y cuantificadas se almacenaron a 4°C.

#### **6.4.5 Lavado de cuerpos de inclusión de Q20 y Q45**

Cada gramo de biomasa se resuspendió en 10 mL de amortiguador de lavado I (20 mM de Tris-HCl pH 8.0, 500 mM de NaCl, 2 M de urea y 2% v/v de Tritón X-100), se lisó por acción enzimática con lisozima (2 mg/mL) y sonicación en baño de hielo. Los lisados se centrifugaron a 13,000 rpm durante 30 min. Para eliminar la mayor parte de contaminantes, las pastillas se sometieron a tres etapas de lavado con diferentes amortiguadores, se resuspendieron en 10 mL de amortiguador de lavado I por cada gramo de biomasa inicial y se sometieron a agitación orbital por 15 min. Se centrifugaron 20 min a 13,000 rpm. Los sobrenadantes se reservaron y almacenaron a 4°C para posteriores análisis y las pastillas se lavaron tres veces de la misma manera. El mismo procedimiento se repitió por triplicado con el amortiguador de lavado II (20 mM de Tris-HCl pH 8.0, 1 mM de DTT y 2% de Tritón X-114) y con el amortiguador de lavado III (20 mM de Tris-HCl pH 8.0). Para solubilizar la proteína de los cuerpos de inclusión las pastillas se resuspendieron en 10 mL de amortiguador de solubilización (20 mM de Tris-HCl pH 8.0, 500 mM de NaCl, 8 M de urea, 1 M de  $\beta$ -mercaptoetanol y 5 mM de imidazol) y se dejaron en agitación orbital por 16 h a

4°C. La composición de todas las soluciones de lavado se detalla en el **Apéndice 4**. Los solubilizados se centrifugaron a 13,000 rpm durante 30 min y se filtraron a través de una membrana de celulosa de 0.22 µm de tamaño de poro.

#### **6.4.6 Purificación de proteínas quiméricas Q20 y Q45 por cromatografía de afinidad a níquel**

Las quimeras Q20 y Q45 se purificaron de los cuerpos de inclusión solubilizados y filtrados por cromatografía de afinidad a níquel usando una columna pre-empacada *Bio-Scale Mini Profinity IMAC Cartridge de Bio-Rad* de 5 mL y un equipo *NGC Chromatography System*. Antes de cada corrida, la columna se equilibró con 10 VC de amortiguador A (20 mM de Tris-HCl pH 8.0, 500 mM de NaCl, 8 M de urea, 1 mM de β-mercaptoetanol y 5 mM de imidazol) a un flujo de 7 mL/min, se aplicó la muestra a 0.5 mL/min, se pasaron 5 VC de regulador de A seguido de cuatro lavados de 10 VC cada uno con concentraciones finales de imidazol de 20, 50, 75 y 100 mM, respectivamente. La elución de la proteína se realizó con 10 VC de amortiguador B (20 mM de Tris-HCl pH 8.0, 300 mM de NaCl, 8 M de urea, 1 mM de β-mercaptoetanol y 500 mM de imidazol). El flujo empleado para los lavados y la elución fue de 7 mL/min. Las muestras en las que se detectaron señales de UV relevantes se reservaron para su posterior análisis por SDS-PAGE al 15%. Las fracciones donde eluyó la proteína se colectaron y se aplicaron a una columna empacada con 10 mL de resina *Biogel P6* previamente equilibrada con 10 VC de amortiguador con 20 mM de Tris-HCl, 8 M de urea y 1 mM de β-mercaptoetanol para la eliminación del imidazol. La concentración de la proteína se determinó por espectrofotometría UV en *NanoDrop2000*. Las fracciones alicuotadas y cuantificadas se almacenaron a 4°C.



## 6.5 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TSA-1-DNH<sub>2</sub>, TSA-1-DCOOH Y CHAGASINA DE *T. cruzi*

### 6.5.1 Subclonación de TSA-1-DNH<sub>2</sub>, TSA-1-DCOOH en el sistema de expresión pCri 7b

El plásmido pCri 7b (**Apéndice 5**) y las construcciones pGEM-T-TSA-1-DNH<sub>2</sub> y pGEM-T-TSA-1-DCOOH (**Apéndice 6**, donados amablemente por el Dr. Gerardo Reséndiz Cardiel y por la IBt. Yosehandy Palma Leal, del DBB del Cinvestav-IPN) se transformaron en células químicamente competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  mediante el método de choque térmico. Las bacterias con las construcciones de los dominios de TSA-1 se sembraron en cajas con agar LB con 100  $\mu$ g/mL de ampicilina, mientras que el vector pCri 7b se sembró en agar LB con 50  $\mu$ g/mL de kanamicina. Tras 16 h de incubación a 37°C se tomaron colonias de cada plásmido y se inocularon en 5 mL de medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes, y se incubaron a 37°C y 250 rpm durante 16 h. A partir de estos cultivos se purificó el ADNp mediante el procedimiento de miniprep por lisis alcalina siguiendo las recomendaciones del kit *QIAprep Spin Miniprep Kit*. El ADNp purificado se cuantificó por la medición de la absorbancia a 260 y 280 nm de longitud de onda en un equipo *NanoDROp 2000*. A continuación, 3  $\mu$ g de cada plásmido puro fueron digeridos con 0.5  $\mu$ L de las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI*, respectivamente y 5  $\mu$ L de amortiguador 3.1, generándose así los extremos cohesivos necesarios para la subclonación. Las mezclas de reacción se llevaron a un volumen final de 50  $\mu$ L con H<sub>2</sub>O grado inyectable (**Apéndice 7**) y se incubaron a 37°C durante 16 h. Los productos de la digestión se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. Las bandas de los insertos (fragmentos génicos de los dominios NH<sub>2</sub>- y COOH-) y al vector pCri 7b linearizado se recuperaron según las especificaciones del kit de purificación de ADN a partir de geles de agarosa *QIAquick PCR Purification Kit*. La concentración final de los ácidos nucleicos se determinó por espectrofotometría UV/Vis a 260 nm en un equipo *NanoDrop 2000*. La ligación de los fragmentos génicos de los dominios de la proteína TSA-1 dentro del sistema de expresión pCri 7b se efectuaron en una relación 3:1 (inserto:vector) en volúmenes de reacción de 15  $\mu$ L, con 4 unidades de DNA ligasa T4 y

1.5  $\mu$ L de amortiguador de DNA ligasa T4 a 16°C durante 16 h (**Apéndice 8**). Las reacciones se detuvieron calentando las mezclas a 65°C y enseguida las construcciones se transformaron por choque térmico en células de *E. coli* DH5 $\alpha$  químicamente competentes. Las colonias crecidas en las placas se examinaron mediante la digestión de su ADNp con *Nde*I y *Xho*I a 37°C por 16 h. El patrón de restricción se analizó en un gel de agarosa al 1.2% para discriminar las clonas recombinantes. A partir de una clona positiva se prepararon cultivos de 5 mL que se alicuotaron (1 mL) y conservaron con glicerol al 16%.

### 6.5.2 Expresión de TSA-1-DNH<sub>2</sub>, TSA-1-DCOOH y chagasina de *T. cruzi*

El plásmido que contiene el inserto codificante de la chagasina de *T. cruzi* fue amablemente donado por el Dr. Luis Gabriel Brieba de Castro del *Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO)* en la Unidad Irapuato del Cinvestav-IPN. El gen se encuentra clonado en el vector pET19b entre los sitios de restricción *Nde*I y *Bam*HI (**Apéndice 9**). Las construcciones pET19b-chagasina, pCri 7b-DNH<sub>2</sub> y pCri 7b-DCOOH se transformaron en células químicamente competentes de *E. coli* BL21 (DE3) por el método del choque térmico. Las bacterias transformadas con el plásmido pET19b-chagasina se sembraron en placas de agar LB con 100  $\mu$ g/mL de ampicilina, mientras que las construcciones que codifican para los dominios de TSA-1 se sembraron en agar LB con 50  $\mu$ g/mL de kanamicina. Para la purificación de la chagasina con colonias transformados, se procedió de la forma descrita en el apartado 6.4.3. En el caso de los dominios de TSA-1, su expresión ocurre exclusivamente en forma insoluble por lo que para su purificación por cromatografía de afinidad se recurrió al lavado de los CI. La recuperación de la proteína intracelular se logró mediante lisis enzimática y sonicación y para los lavados se procedió como se describió anteriormente en la sección 6.4.5, adicionando un paso de lavado entre los lavados I y II (**Apéndice 10**) con una solución de 20 mM de Tris-HCl pH 8.0, 1 mM de DTT y 2 M de cloruro de guanidinio.

### **6.5.3 Purificación de TSA-1-DNH<sub>2</sub>, TSA-1-DCOOH por cromatografía de afinidad a níquel**

Los cuerpos de inclusión solubilizados y filtrados se hicieron pasar por un proceso de cromatografía de afinidad a níquel en un equipo *NGC Chromatography System*. Para tal efecto, una columna pre-empacada *HiTrap FF* de *GE* de VC de 10 mL se equilibró con 10 VC de amortiguador A (20 mM de Tris-HCl pH 8.0, 500 mM de NaCl, 8 M de urea, 1 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol y 5 mM de imidazol) a un flujo de 1 mL/min. La muestra a 0.5 mL/min e inmediatamente después se pasaron 10 VC de regulador de A seguido de cuatro lavados de 10 VC cada uno con concentraciones finales de imidazol de 20, 50, 75 y 100 mM, respectivamente. La elución se realizó con 10 VC de amortiguador B (20 mM de Tris-HCl pH 8.0, 500 mM de NaCl, 8 M de urea, 1 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol y 500 mM de imidazol). El flujo empleado para los lavados y la elución fue de 1 mL/min. Las muestras en las que se detectaron señales de UV relevantes se reservaron para su posterior análisis por SDS-PAGE al 15%. Las fracciones donde eluyó la proteína de interés se aplicaron a una columna empacada con 10 mL de resina *Biogel P6* previamente equilibrada con 10 VC de amortiguador con 20 mM de Tris-HCl, 8 M de urea y 1 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol para la eliminación del imidazol. La concentración de las proteínas se determinó por espectrofotometría UV en *NanoDrop2000* y las fracciones alicuotadas y cuantificadas se almacenaron a 4°C.

### **6.5.4 Purificación de chagasina por cromatografía de afinidad a níquel e intercambio iónico**

La biomasa obtenida durante la inducción de la expresión de la chagasina se resuspendió a una proporción de 10 mL de amortiguador A (20 mM Tris-HCl H 8.0, 300 mM de NaCl, 1 mM de PMSF, 5% de glicerol) por cada gramo de biomasa y se lisó con lisozima (2 mg/mL) y sonicación en baño de hielo. El lisado se centrifugó a 13,000 rpm por 30 min y el sobrenadante se filtró a través de membranas de 0.22  $\mu$ m. La fracción insoluble se reservó a -20°C. La purificación de la chagasina a partir de la fracción soluble se llevó a cabo en el equipo *NGC Chromatography System*. Una columna *HisTrap FF* se equilibró con 10 VC de

amortiguador A y posteriormente la muestra se pasó a un flujo de 1 mL/min y la fracción no unida se colectó, se hicieron lavados con concentraciones crecientes de imidazol: 10 mM, 20 mM, 50 mM y 100 mM de 10 VC cada uno y la elución de la proteína se llevó a cabo con 10 VC de regulador B (20 mM Tris-HCl H 8.0, 300 mM de NaCl, 1 mM de PMSF, 5% de glicerol y 500 mM de imidazol). Las muestras que demostraron una señal de UV se analizaron por SDS-PAGE al 15%. Las fracciones donde eluyó la chagasina se colectaron y diluyeron en relación 1:10 con amortiguador A (20 mM de Tris-HCl pH 8.0, 1 mM de PMSF y 5% de glicerol) para disminuir la fuerza iónica y someterlas a un segundo paso de purificación por intercambio iónico usando una columna *Hitrap QFF* de 1 mL (*GE-Hetlhcare*). La columna se equilibró con 5 VC de regulador A, la muestra se pasó por la columna a 1 mL/min. La chagasina se eluyó mediante un gradiente lineal de 0-1 M de NaCl a 1 mL/min. Las fracciones conteniendo la proteína se colectaron y se cambió el amortiguador de elución por PBS 1x conteniendo 5% de glicerol usando una columna empacada con 10 mL de *Biogel P6*. La concentración de proteína se estimó por absorbancia y 280 nm en *Nanodrop 2000*.

## **6.6 INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS MULTIEPÍTOPO POR ENSAYOS DE WESTERN BLOT**

La inmunodetección de las proteínas quiméricas Q8, Q20 y Q45 purificadas a partir de cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) se llevó a cabo mediante ensayos tipo Western Blot con anticuerpos  $\alpha$ -TSA1 y  $\alpha$ -chagasina, empleando como proteínas control Tc24, TSA-1, TSA1-DNH<sub>2</sub>-, TSA-1-DCOOH- de TSA-1 y chagasina. Brevemente, 3  $\mu$ g de las proteínas resueltas por SDS-PAGE en geles al 15 % fueron transferidas a dos membranas de nitrocelulosa mediante electrotransferencia durante 15 min a 30 V, seguido de 60 min a 110 V. Al término, las membranas se tiñeron con una solución de *Rojo Ponceau S* durante 5 min para verificar la completa transferencia de las proteínas. Las membranas se lavaron por 5 min con 10 mL de PBS-T (PBS 1x y 0.1% de Tween 20) para la eliminación del colorante y se enjuagaron con PBS 1x (138 Mm NaCl, 3 Mm KCl, 8.1 Mm Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 1.5 Mm KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Las membranas se incubaron durante 16 h con solución de bloqueo (PBS-T y leche descremada en polvo al 10% p/v) a una temperatura de 4°C. Tras el bloqueo, se hicieron 10 lavados de

5 min cada uno con 10 mL de PBS-T y a continuación se incubaron por 16 h con los anticuerpos primarios ( $\alpha$ -TSA1 y  $\alpha$ -chagasina, respectivamente) a una dilución de 1:5,000 en una solución de leche descremada al 10% en PBS-T, se realizaron 10 lavados con PBS-T y la membrana se incubó por 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario ( $\alpha$ -conejo y  $\alpha$ -ratón, acoplados a peroxidasa de rábano picante, respectivamente, de *Santa Cruz Biotechnology*) diluido 1:3,000 en solución de incubación (PBS-T y 2.5% p/v de leche descremada). Las membranas se lavaron 5 veces de 5 min con PBS-T. El revelado de la señal inmunoreactiva se llevó a cabo por colorimetría, incubando las membranas en 10 mL de TBS 1x (1 Mm Tris-HCl pH 7.5 y 500 Mm de NaCl) y se sometieron a agitación orbital. A cada membrana se les añadió 6  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 10 mL de solución de desarrollo de color de peroxidasa (60 mg de 4-cloronaftol de *Bio-Rad*, en 20 mL de metanol). La reacción se desarrolló durante 5 min y se detuvo con la adición de 10 mL de agua destilada.

# 7. RESULTADOS

## 7.1 DISEÑO *IN SILICO* DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS MULTIEPÍTOPO Y EVALUACIÓN DE SU SOLUBILIDAD Y ALERGENICIDAD

Siguiendo las estrategias de diseño descritas la **Figura 9**, se generaron 51 proteínas quiméricas multiepítipo diferentes (**Tabla 10, Apéndice 11**). Para los fines de la presente investigación se decidió elegir tres para su posterior expresión y purificación teniendo como principales criterios de selección una elevada probabilidad de expresión en forma soluble en *E. coli* y una baja alergenicidad en seres humanos. Durante este primer escrutinio, las 51 secuencias diseñadas se introdujeron en el servidor bioinformático *Recombinant Protein Solubility Prediction* de la universidad de Oklahoma, que emplea un modelo para la predicción de la solubilidad de proteínas expresadas en *E. coli* basado en el método estadístico de regresión logística que evalúa 32 parámetros (peso molecular, contenido de cisteínas, prolinas, residuos hidrofóbicos, índice alifático, hidrofiliidad, etc.) que están potencialmente relacionados con la solubilidad (Díaz, *et al.*, 2010). Los resultados sugieren que 6 (Q4, Q8, Q16, Q17, Q18 y Q20) de las 51 proteínas quiméricas evaluadas tienen una elevada probabilidad de expresión soluble (>99%) en la plataforma bacteriana. Por otro lado, las proteínas Q23, Q29 y Q45 tuvieron una probabilidad intermedia de solubilidad predicha (50-70%), lo que sugiere que posiblemente sean solubles cuando se expresan a temperaturas inferiores a 37°C. Asimismo, las quimeras Q28, Q44 y Q50 tuvieron un pronóstico inferior al 50%, por lo que probablemente requerirían de medios alternativos para promover su solubilidad como el uso de proteínas de fusión tales como el dominio de unión a maltosa, glutatión S-transferasa, péptido de unión a calmodulina, etc. (Douette, *et al.*, 2005). En contraste, las 39 proteínas quiméricas restantes obtuvieron muy bajas o nulas probabilidades de expresarse en forma soluble. Como consecuencia, 42 quimeras multiepítipo se descartaron para la evaluación ulterior de potencial alérgico que se practicó a las 9 quimeras que obtuvieron un pronóstico de solubilidad elevado o intermedio. Este segundo criterio de selección se realizó mediante *Allerdicator*, una herramienta

bioinformática en línea que modela las secuencias proteínicas como documentos de texto y las compara con una base de datos de 3907 alérgenos y 464101 no-alérgenos para identificar péptidos alergénicos y epítomos para IgE (Dang & Lawrence, 2014). Con los resultados de esta segunda evaluación (**Tabla 10, Apéndice 11**) se pudo identificar a la proteína Q4 como un potencial alérgeno, de manera que dejó de ser considerada candidata para su producción y purificación a pesar de haber tenido una solubilidad predicha del 99.8%. En cambio, las proteínas Q8, Q16, Q17, Q18, Q20, Q23, Q29 y Q45 cumplieron con los criterios de solubilidad y alergenicidad establecidos para la selección.

Resulta importante distinguir que las quimeras Q8, Q16, Q17, Q18 y Q20 corresponden a proteínas con dos epítomos cada una, mientras que Q23, Q29 y Q45 poseen tres. Al remitirnos al **Tabla 10 del Apéndice 11**, se advierte que las parejas de proteínas Q8/Q18 y Q16/Q20 poseen los mismos determinantes antigénicos (E1 y E5, y E4 y E5, respectivamente) difiriendo únicamente su ubicación en los lazos del andamio, eligiéndose por lo tanto a Q8 y Q20 por tener las probabilidades de solubilidad más elevadas (100% y 99.5%, respectivamente). En este caso, la proteína Q17 se descartó por poseer la probabilidad de solubilidad más baja del grupo de quimeras con dos epítomos. Con respecto al grupo con tres epítomos, se advierte también que todas poseen determinantes antigénicos idénticos (E1, E2 y E5) en distintas posiciones (lo deja entrever la posibilidad de que algún o algunos epítomos estén favoreciendo la solubilidad de las quimeras), por lo que se eligió Q45 tomando como base el criterio de solubilidad.

#### **7.1.1 Determinación de las propiedades fisicoquímicas estructuras secundarias y modelos 3D de las proteínas quiméricas multiepítomo**

Se determinaron las propiedades fisicoquímicas, las estructuras secundarias y los modelos 3D de las 51 proteínas quiméricas multiepítomo diseñadas. Sin embargo, para fines del presente manuscrito se presentan únicamente los resultados de las quimeras Q8, Q20 y Q45 seleccionadas por sus propiedades teóricas de solubilidad y alergenicidad favorables. La predicción de las características fisicoquímicas se obtuvo utilizando el servidor de predicción en línea *ProtParam* disponible en la página <https://web.expasy.org/protparam/>.

Tomando en cuenta que los genes codificantes se encuentran clonados entre los sitios de restricción *NcoI* y *XhoI*, el producto de la expresión de las proteínas constará de la secuencia codificante de la proteína flanqueada en el extremo *NH<sub>2</sub>*- por el fragmento **M G S S H H H H H H S S G E N L Y F Q G A** que incluye una His<sub>6</sub>-tag para su purificación por afinidad a níquel así como el sitio de clivaje de la proteasa TEV para su posterior eliminación. Dado que hacia el extremo 3' de los genes se colocó el codón de paro TAA, no se espera la expresión de la segunda cola de histidinas en el extremo *COOH*- de las proteínas por lo que la secuencia final de las proteínas quiméricas expresadas con pCri 8a se enlistan en la **Tabla 2**.

**Tabla 2. Secuencia final de aminoácidos de las proteínas quiméricas multiepítopo clonadas en el vector pCri 8a.**

Proteína	Secuencia de aminoácidos en vector pCri 8a
Q8	<b><u>M G S S H H H H H S S G E N L Y F Q G A</u></b> MASHKVTKAHNGATLTVAV GELVEIQLPSNPTTGFAWYFEGGTKESPNE SMFTVENKYFPP <b>L</b> <b>LYSDDALHL</b> GGTEHFHVTVKAAGTHAVNLT YMRP <b>IVMGNGT</b> <b>LV</b> SERFTVYLKANLE
Q20	<b><u>M G S S H H H H H S S G E N L Y F Q G A</u></b> MASHKVTKAHNGATLTVAV GELVEIQLPSNPTTGFAWYFEGGTKESPNE SMFTVENKYFPP <b>F</b> <b>VDYNFTIV</b> GGTEHFHVTVKAAGTHAVNLT YMRP <b>LLYSDDALH</b> <b>L</b> SERFTVYLKANLE
Q45	<b><u>M G S S H H H H H S S G E N L Y F Q G A</u></b> MASHKVTKAHNGATLTVAV GELVEIQLPSNPTTGFAWYFEGGTKESPNE SMFTVENKYFPP <b>K</b> <b>LFPEVIDLGP GPGIVMGN GTLV</b> GGTEHFHVTVKAAGTHAVNL TYMRP <b>LLYSDDALHL</b> SERFTVYLKANLE

Se muestra la secuencia de aminoácidos del producto de expresión de las construcciones pCri 8a-Q8, pCri 8a-Q20 y pCri 8a-Q45. En negritas y subrayadas se indica secuencia de la etiqueta de histidinas y el sitio de clivaje de la proteasa TEV, en color verde, las secuencias insertadas en el lazo L4 y, en color rojo, las secuencias insertadas en el lazo L6.



Dichas secuencias se introdujeron en el servidor *ProtParam* de *Expasy* para la predicción de sus propiedades fisicoquímicas. Entre los parámetros que se determinaron están el número total de aminoácidos, el peso molecular de los péptidos, sus puntos isoeléctricos teóricos (pI), los coeficientes de extensión molar, índices de inestabilidad, índices alifáticos y el promedio de hidrofobicidad e hidrofiliidad (GRAVY). De especial interés fueron los parámetros de peso molecular, punto isoeléctrico y coeficiente de extensión molar, necesarios para los procesos de purificación y cuantificación por espectrofotometría UV. En la **Tabla 3** se resumen los resultados de las predicciones.

**Tabla 3. Parámetros fisicoquímicos de las proteínas recombinantes Q8, Q20 y Q45.**

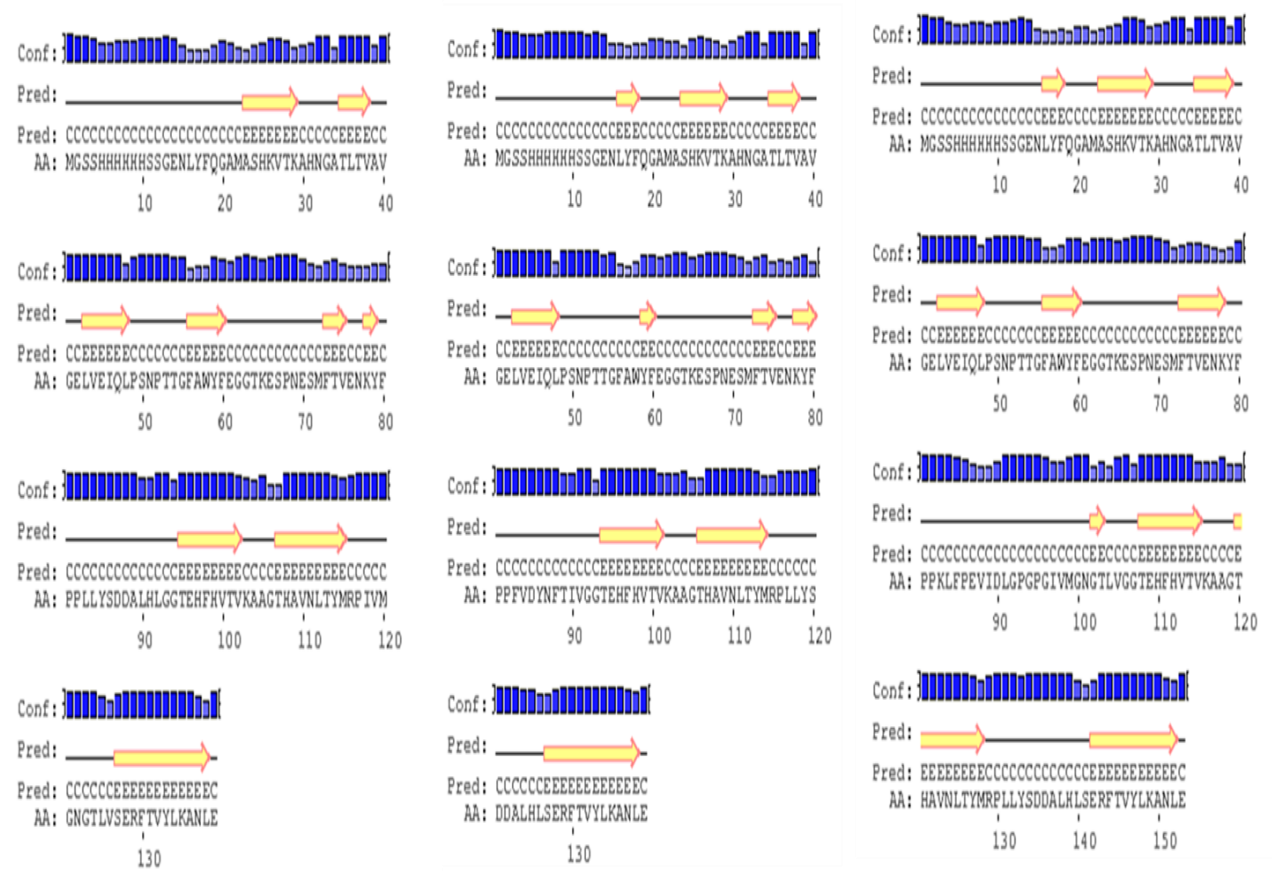
Parámetro	Proteína Q8	Proteína Q20	Proteína Q45
Número de aminoácidos	139	139	153
Peso molecular (Da)	15253.10	15467.26	16673.77
pI teórico	6.28	6.14	6.14
Coefficiente de extensión molar (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	14440	15930	14440
Índice de inestabilidad	25.45	26.37	24.77
Índice alifático	70.14	67.34	73.27
GRAVY	-0.278	-0.308	-0.239

Las proteínas quiméricas Q8 y Q20 resultaron tener el mismo número de residuos aminoacídicos, con una ligera diferencia en su peso molecular y como era de esperarse la quimera Q45, al contener 3 epítomos en su secuencia, tuvo un total de 153 aa con un peso molecular de 16.7 kDa. Como puede observarse, el pI teórico (6.28-6.14) de las tres proteínas es similar y tienden hacia la acidez. Con respecto al índice de inestabilidad, Guruprasad *et al.*, (1990), describen que un valor en el índice de inestabilidad menor a 40 se correlaciona con una elevada estabilidad de las proteínas. En el caso de las tres quimeras se obtuvieron valores por debajo de 40, lo que nos permite inferir que se tratan de proteínas estables. El volumen relativo ocupado por las cadenas laterales alifáticas de una proteína se denomina índice alifático. El índice alifático juega un papel importante en la termoestabilidad de un péptido. Este parámetro en las proteínas quimericas se encontró dentro del rango de 67.34-73.27, indicando que las tres son termoestables. Finalmente, los

promedios de hidrofobicidad e hidrofiliidad (GRAVY) indican si la proteína es de naturaleza globular (o hidrofílica) o de membrana (o hidrofóbica). La primera clasificación se da cuando se obtienen valores de GRAVY negativos, mientras que los péptidos hidrofóbicos tienen GRAVY positivos. En este caso, las tres proteínas evaluadas pueden clasificarse como hidrofílicas (Kyte y Doolittle, 1982).

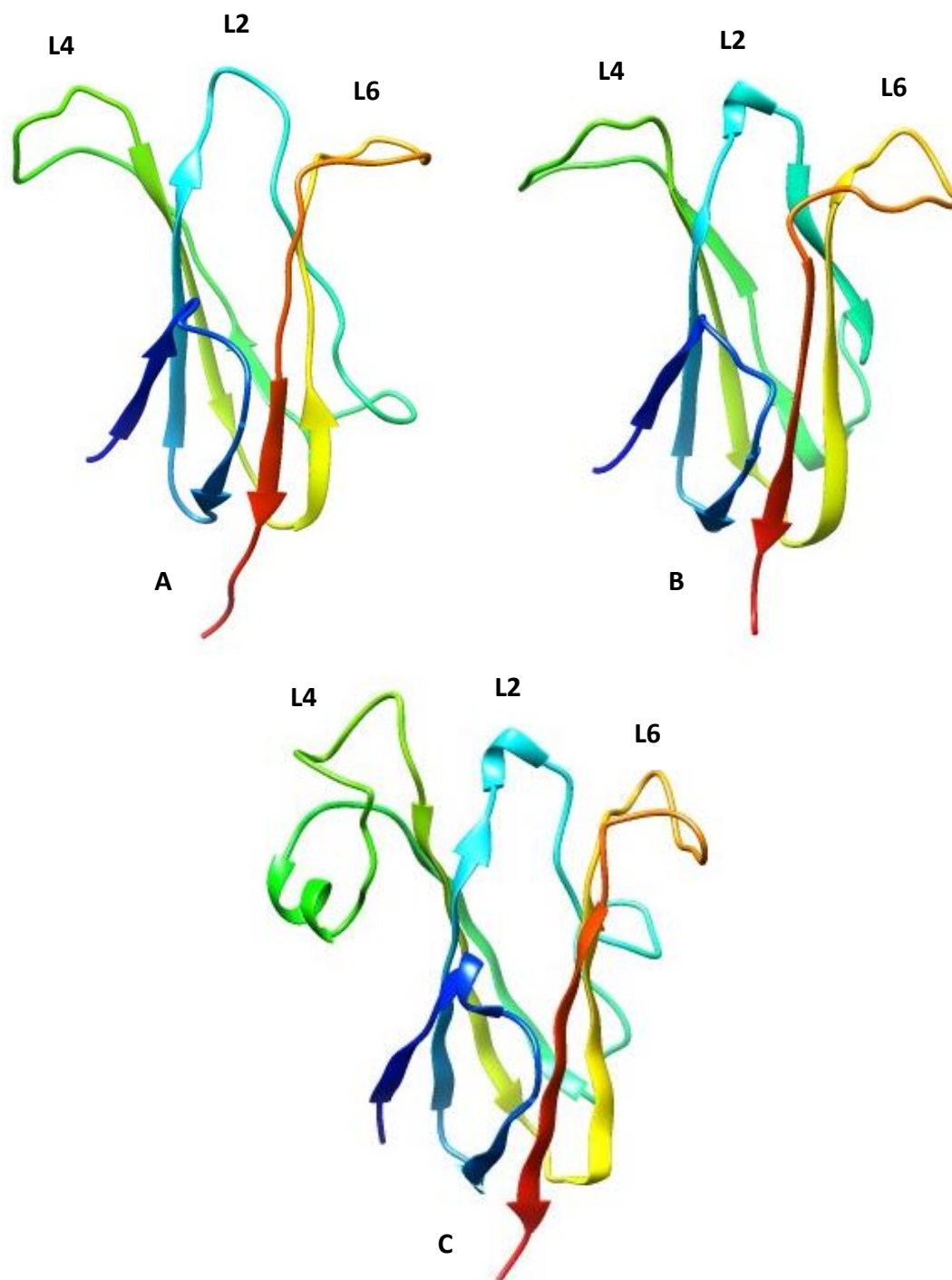
A continuación, se hizo la estimación de las estructuras secundarias que posiblemente se forman durante el plegamiento de las proteínas quiméricas multiepitopo mediante el servidor *PSIPRED* v3.3 en la página <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>. Los diagramas generados por el programa se muestran en la **Figura 10**. Resulta evidente en los tres casos la ausencia de estructuras del tipo  $\alpha$ -hélice (representados con cilindros rosas) y la predominancia de láminas  $\beta$  (representadas con flechas amarillas). En el caso de Q8 (**Figura 10A**) se predice la formación de 9 láminas  $\beta$ , mientras que en Q20 (**Figura 10B**) y Q45 (**Figura 10C**) se forman 10.

En la **Figura 11** se esquematizan los modelos tridimensionales generados con *I-TASSER* de las tres quimeras. El servidor *I-TASSER* genera 5 probables modelos a los que se les asignó un valor de C-score. C-score es un parámetro de confianza que permite estimar la calidad de los modelos tridimensionales y que usualmente se encuentra dentro del rango de -5 a 2, donde un puntaje C más cercano a 2 significa un modelo más acertado y viceversa. Por lo tanto, se eligieron los modelos con el valor de C-score más alto. El modelo tridimensional de la quimera Q8 (**Figura 11A**) tuvo un C-score de 0.10, mientras que Q20 (**Figura 11B**) y Q45 (**Figura 11C**) tuvieron valores de 0.11 y -0.47, respectivamente.



**A** **B** **C**

**Figura 10. Estructuras secundarias predichas para las proteínas quiméricas multiépítipo.** Se muestran las secuencias que se encuentran formando estructuras secundarias en las proteínas quiméricas multiépítipo. Las hélices se representan con cilindros rosas, mientras que las láminas están representadas por flechas amarilla. Por su parte, los lazos se muestran con líneas negras **A:** Proteína Q8. **B:** Proteína Q20. **C:** Proteína Q45.



**Figura 11. Modelos tridimensionales de quimeras Q8, Q20 y Q45 obtenidas in silico con I-TASSER.** Las láminas  $\beta$  predominan en la estructura de las tres proteínas. **A:** modelo 3D de quimera Q8. **B:** modelo 3D de la quimera Q20. **C:** modelo 3D de quimera Q45.

## 7.2 DISEÑO Y SÍNTESIS DE GENES

La secuencia de ADN que codifica las proteínas Q8, Q20 y Q45 se obtuvieron como se indica en la sección 6.3 de *Materiales y Métodos* añadiendo en el extremo 5' de las tres secuencias nucleotídicas dos citosinas para generar el sitio de restricción de *NcoI* (CCATG) y en el extremo 3' se añadió el sitio de restricción para *XhoI* (CTCAGG) y un codón de paro (ATT). Las secuencias resultantes se enviaron a la compañía *GenScript* (Estados Unidos) para la optimización de uso de codones para *E. coli* y su síntesis química. Asimismo, se solicitó modificar las secuencias para evitar que dentro de la secuencia existieran los sitios de restricción para *NdeI*, *NcoI*, *KpnI*, *HindIII*, *BamHI*, *XhoI*, *XbaI*, *SacI*, *NotI*, *PstI*, *EcoRI*, *EcoRV*. Las secuencias finales que *GenScript* sintetizó se muestran en la **Tabla 4**. Los caracteres subrayados se señalan los sitios de restricción para *NcoI* y *XhoI*. Los tres genes fueron clonados en el vector pUC57 y se recibieron 4 µg de cada construcción en papel filtro.

**Tabla 4. Genes codificantes de las tres quimeras multiépitipo seleccionadas.**

Proteína quimérica	Secuencia de nucleótidos
Q8	<p><b>5' <u>CCATG</u>GCGAGCCACAAGGTTACCAAGGCGCATAATGGTGCGA</b>            CCCTGACCGTTGCGGTGGGCGAACTGGTTGAAATCCAACCTGCCGA            GCAACCCGACCACCGGTTTCGCGTGGTACTTTGAGGGTGGCACCA            AGGAGAGCCCGAACGAAAGCATGTTACCGTGGAAAACAAATACT            TTCCGCCGCTGCTGTATAGCGATGATGCGCTGCACCTGGGTGGCA            CCGAGCACTTCCATGTGACCGTTAAAGCGGCGGGCACCCATGCGG            TTAACCTGACCTATATGCGTCCGATCGTGATGGGCAATGGCACCC            TGGTTAGCGAGCGTTTTACCGTTTATCTGAAGGCGAAC<u>CTCGAG</u>ATT <b>3'</b></p>
Q20	<p><b>5' <u>CCATG</u>GCGAGCCATAAAGTGACCAAGGCGCATAATGGTGCGA</b>            CCCTGACCGTGGCGGTGGGCGAACTGGTGGAGATTCAACTGCCGA            GCAACCCGACCACCGGTTTCGCGTGGTACTTTGAGGGTGGCACCA            AGGAGAGCCCGAACGAAAGCATGTTACCGTGGAAAACAAATACT            TCCCGCCGTTTGTGGACTATAACTTCACCATCGTTGGTGGCACCG            AGCACTTTCATGTGACCGTTAAAGCGGCGGGCACCCATGCGGTTA            ACCTGACCTATATGCGTCCGCTGCTGTATAGCGATGATGCGCTGC            ACCTGAGCGAACGTTTTACCGTGTATCTGAAGGCGAAC<u>CTCGAG</u>ATT <b>3'</b></p>
Q45	<p><b>5' <u>CCATG</u>GCGAGCCACAAGGTTACCAAGGCGCATAATGGTGCGA</b>            CCCTGACCGTTGCGGTGGGCGAACTGGTTGAAATCCAACCTGCCGA            GCAACCCGACCACCGGCTTCGCGTGGTACTTTGAGGGTGGCACCA            AGGAGAGCCCGAACGAAAGCATGTTACCGTGGAGAACAAGTATT            TCCCGCCGAAACTGTTTCCGGAAGTTATCGACCTGGGTCCGGGCC            CGGGTATTGTGATGGGTAACGGCACCCCTGGTGGGTGGCACCGAAC            ACTTTCACGTGACCGTTAAAGCGGCGGGCACCCATGCGGTGAACC            TGACCTACATGCGTCCGCTGCTGTATAGCGACGATGCGCTGCACC            TGAGCGAACGTTTTACCGTGTATCTGAAGGCGAAT<u>CTCGAG</u>ATT <b>3'</b></p>

Secuencias nucleotídicas optimizadas para el uso de codones de *E. coli* y los sitios de restricción para *NcoI* y *XhoI* en los sitios 5' y 3', respectivamente.

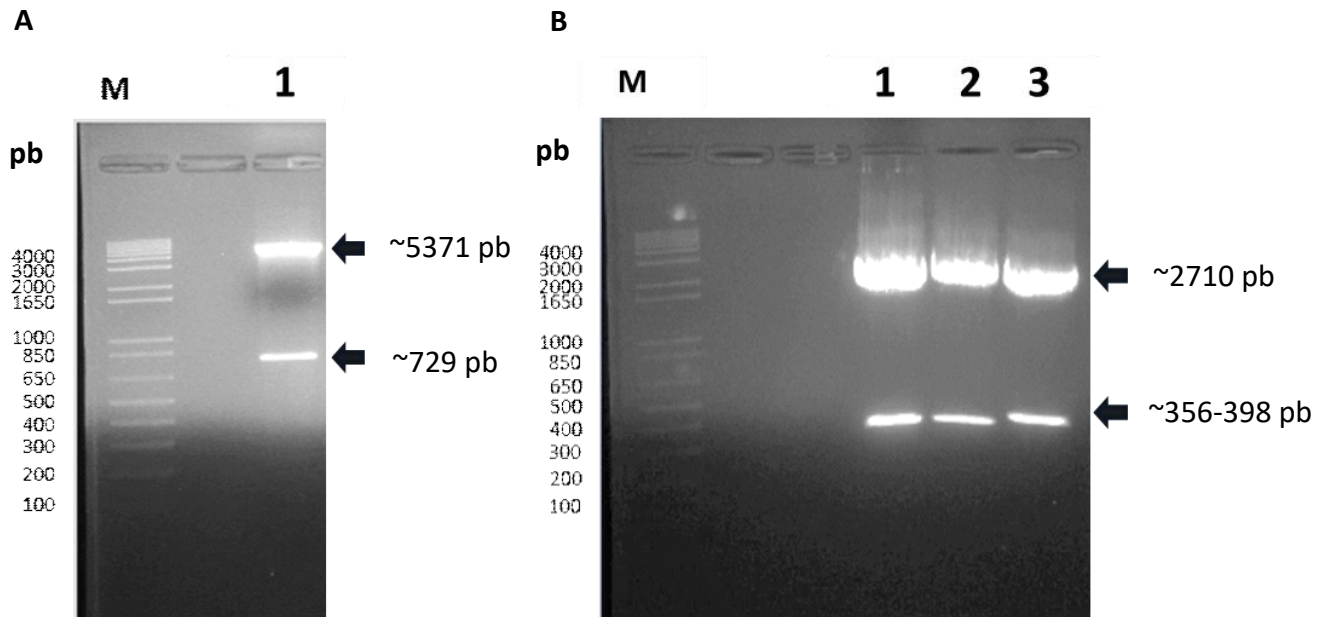
## 7.3 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS MULTIEPÍTOPO

### 7.3.1 Subclonación de los genes Q8, Q20 y Q45 en el vector de expresión pCri 8a

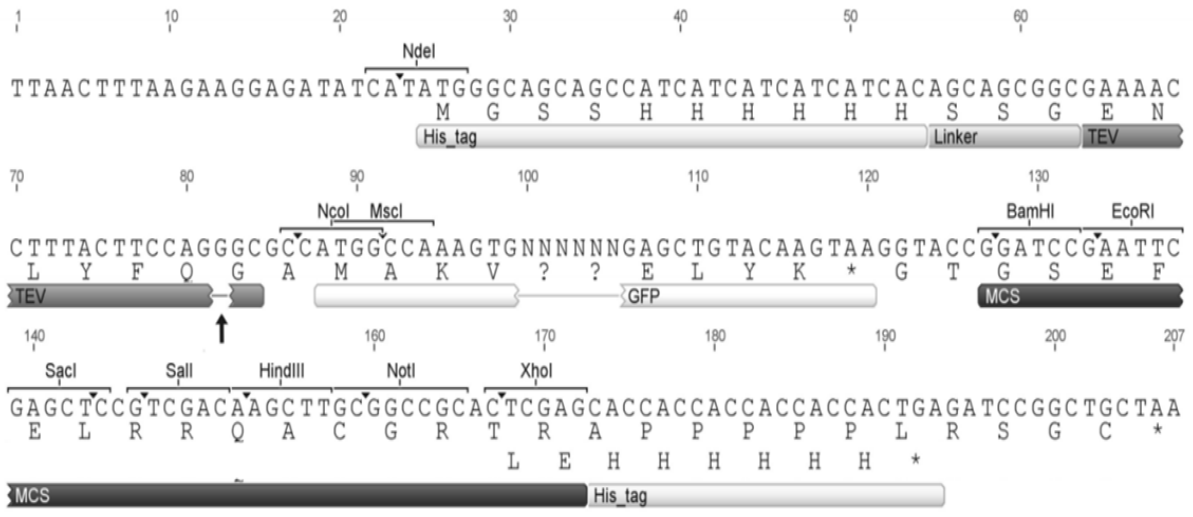
Con la finalidad de generar los extremos cohesivos necesarios para la subclonación de los genes Q8, Q20 y Q45 en el vector de expresión pCri 8a, las construcciones pUC57-Q8, pUC57-Q20, pUC57-Q45 y pCri 8a se sometieron a una doble digestión con las enzimas *NcoI* y *XhoI*. Los patrones de restricción de pUC57-Q8, pUC57-Q20 y pUC57-Q45 en gel de agarosa al 1.2% se muestran en la **Figura 12B**. Puede advertirse la presencia en los tres carriles de una banda con una movilidad electroforética de aproximadamente 2710 pb que corresponde al tamaño del plásmido pUC57 linearizado, así como los insertos liberados tras la digestión. En los carriles 1 y 2 se resolvió una banda de 356 pb que corresponde a los genes Q8 y Q20, respectivamente; mientras que en el carril 3, se observa el gen Q45 de 398 pb. En cuanto al análisis de la doble digestión de pCri 8a, para poder interpretar los resultados del perfil electroforético obtenido en el gel de agarosa al 1.2% que se muestra en la **Figura 12A**, se tuvo en cuenta el diseño de la construcción: al remitirse a la **Figura 13** puede observarse que la secuencia nucleotídica del vector está compuesta por un fragmento ubicado cerca del extremo 5' que codifica para una etiqueta de seis histidinas (His<sub>6</sub>-tag) enlazada mediante un "linker" a la región que codifica para el sitio de clivaje de la proteasa TEV (utilizada para la eliminación de His<sub>6</sub>-tag en procesos postpurificación). A continuación, se encuentra el sitio *NcoI*, que caracteriza a la clase "a" del sistema pCri y que junto con cualquier otro de los sitios de restricción presentes en el sitio múltiple de clonación (MCS) del extremo 3', puede lograrse la clonación dirigida de cualquier inserto. En seguida se localiza el fragmento de 729 pb que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP), clonada como proteína reportera en todos los vectores del sistema pCri, flanqueada inmediatamente por el MSC, cuyo último sitio de restricción es *XhoI*. Por lo tanto, las bandas observadas en la **Figura 12A** deben ser el vector linearizado (de poco más de 5300 pb) y el fragmento escindido correspondiente a la GFP y una porción del MCS. Las bandas correspondientes a los insertos y el vector linearizado se purificaron por el método

de *QIAGEN*. Los tres insertos correspondientes a las quimeras se ligaron al vector pCri 8a en una relación 3:2 inserto:vector por 16 h, se transformaron células quimiocompetentes de *E. coli* BL21 (DE3). Al analizar las placas se contabilizaron 24 colonias de la construcción pCri 8a-Q8, 8 colonias de pCri 8a-Q20 y 7 colonias de pCri 8a-Q45. Para determinar cuáles de las colonias portaban las construcciones correspondientes, se analizaron 9 de las 24 colonias de Q8, y todas las colonias de Q20 y Q45 por una doble digestión con *NcoI* y *XhoI* cuyos resultados se muestra en la **Figura 14**. En los carriles 1-9 se observa claramente la liberación de un fragmento de aproximadamente 356 pb que corresponde al inserto es esperado para la quimera Q8; en los carriles 10-17 se analizaron las clonas transformadas con la construcción pCri 8a-Q20, observándose una banda con el tamaño molecular esperado del gen Q20 en todos los carriles, exceptuando a la clona del carril 16. Por último, las digestiones de la construcción pCri 8a-Q45 (carriles 18-24) muestran también que solo una de las clonas analizadas (carril 21) no liberó el fragmento de 498 pb esperado.

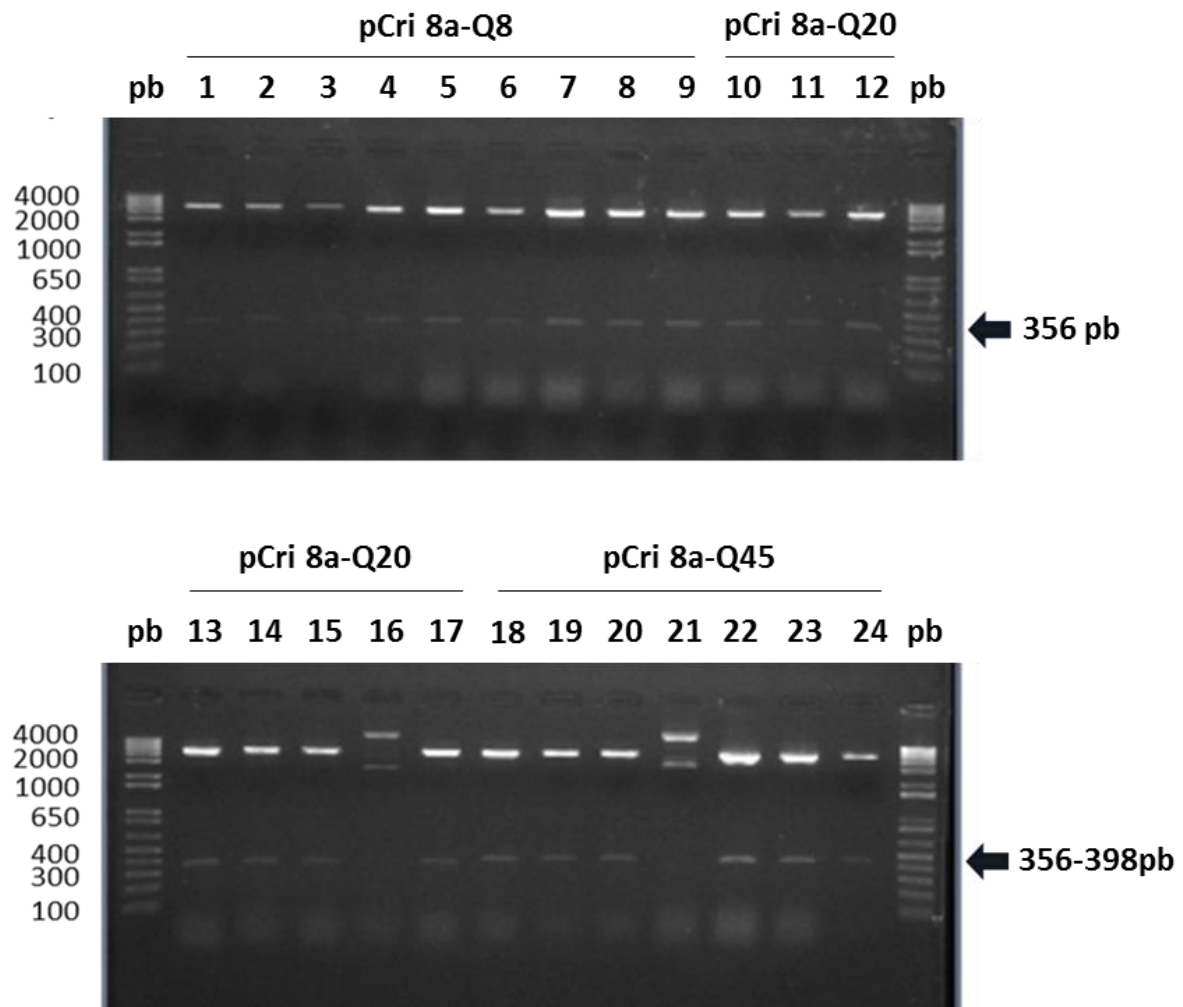




**Figura 12. Patrón de digestión de las construcciones pUC57-Q8, pUC57-Q20, pUC57-Q45 y pCri 8a con NcoI y XhoI.** Análisis de la doble digestión enzimática de las construcciones pCri 8a, pUC57-Q8, pUC57-Q20 y pUC57-Q45. **A:** Resultados de la digestión del vector de expresión pCri 8a (carril 1) donde se observa la liberación de un fragmento de 729 pb correspondiente a GFP y el plásmido linearizado de 5371 pb. **B:** Resultados de la digestión de las construcciones químeras. En los carriles 1, 2 y 3 se observan los insertos liberados de 356 o 398 pb correspondientes a los genes Q8, Q20 y Q45, respectivamente, así como la banda debida al plásmido pUC57 linearizado de 2710 pb.



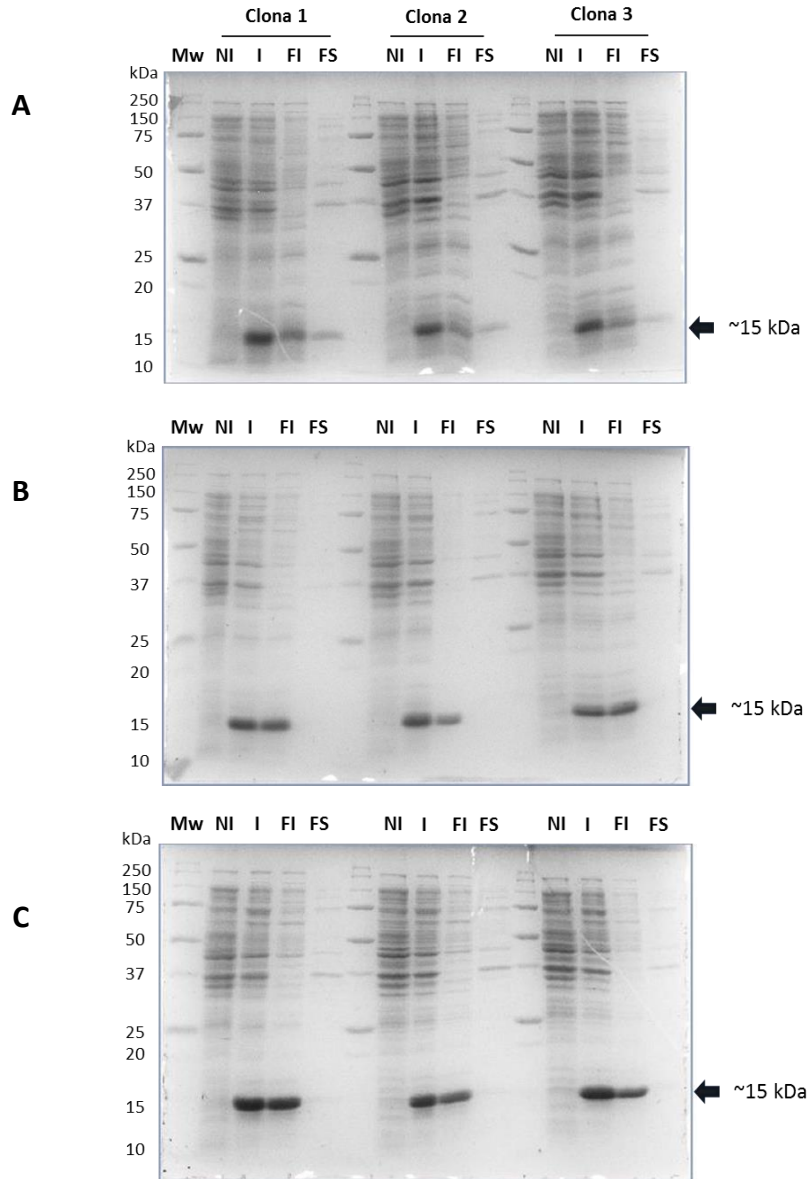
**Figura 13. Mapa del vector de expresión pCri 8a.** El sistema de expresión pCri 8a cuenta con una etiqueta de seis histidinas (His<sub>6</sub>). En la secuencia de nucleótidos se muestra el sitio de clonación múltiple del vector de expresión pCri 8a, así como su traducción a aminoácidos. Las partes de la secuencia de GFP que se omitieron están marcados con "?". Con una flecha se indica el sitio de clivaje de la proteasa TEV.



**Figura 14. Análisis de restricción de clonas transformadas con pCri 8a-Q8, pCri 8a-Q20 y pCri 8a-Q45.** Perfil electroforético de la doble digestión con *NcoI* y *XhoI* de ADN plásmidico extraído de las clonas transformadas con pCri 8a-Q8 (carriles 1-9), pCri 8a-Q20 (carriles 10-16) y pCri 8a-Q45 (carriles 18-24). El carril **pb** corresponde al marcador de tamaño molecular.

### 7.3.2 Prueba de expresión y análisis de solubilidad de proteínas quiméricas Q8, Q20 y Q45

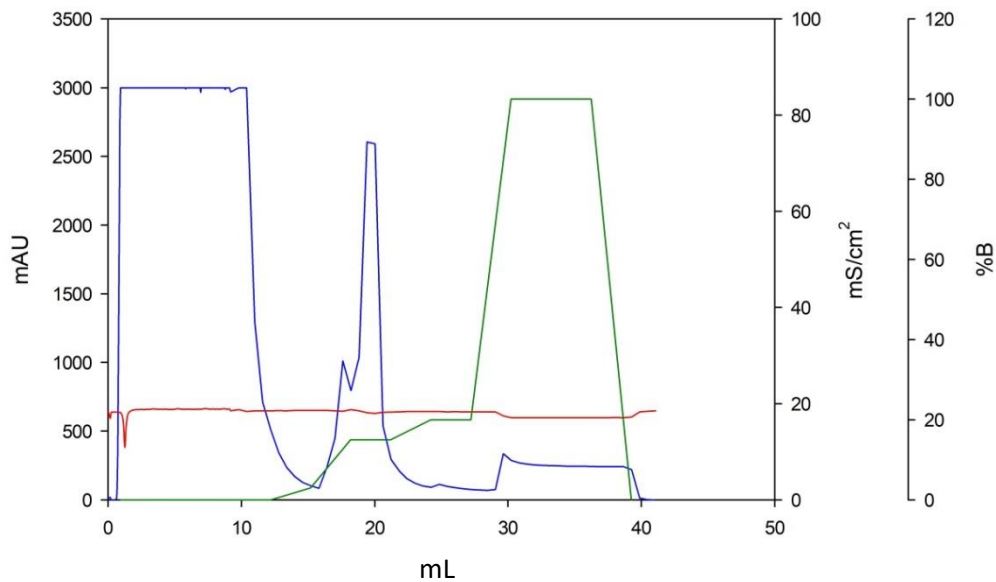
Previo a los procesos de purificación se analizó la expresión y la solubilidad de las tres proteínas quiméricas en una escala de 5 mL, evaluando tres clonas diferentes de cada construcción como se describió en el apartado 6.4.2 de la sección *Materiales y Métodos*. En la **Figura 15A** se muestra el análisis de expresión y solubilidad de la quimera Q8. En la fracción no inducida (carril NI) no se observó expresión basal. Dicha banda de sobreexpresión aparece una vez que se llevó a cabo la inducción con IPTG (carril I). Para saber si la proteína se encuentra correctamente plegada o formando cuerpos de inclusión, se analizaron las fracciones soluble (carril FS) e insoluble (FI) del extracto proteico, determinándose que Q8 se acumula en ambas fracciones, pero en particular, resulta ser casi la única banda presente en la fracción soluble. Por su parte en el análisis de Q20 (**Figura 15B**) tampoco se presentó el fenómeno de expresión basal (carril NI). Por lo tanto, se deduce que la producción de la proteína comienza posterior a la inducción (carril I). Asimismo, resulta evidente que la proteína se expresó en forma de cuerpos de inclusión (carril FI). Claramente se observa una banda de ~15.5 kDa y su ausencia en la fracción soluble de las tres clonas (carriles FS). Un perfil similar se aprecia para la proteína Q45 (**Figura 15C**) donde la proteína recombinante también se acumuló principalmente en la fase insoluble, a pesar de que, al igual que Q20, las predicciones *in silico* sugirieron con elevado grado de confianza para su producción soluble en *E. coli*. En consecuencia, se optó por purificar Q8 a partir de la fracción soluble, mientras que Q20 y Q45 se recuperarán a partir de la fracción insoluble.



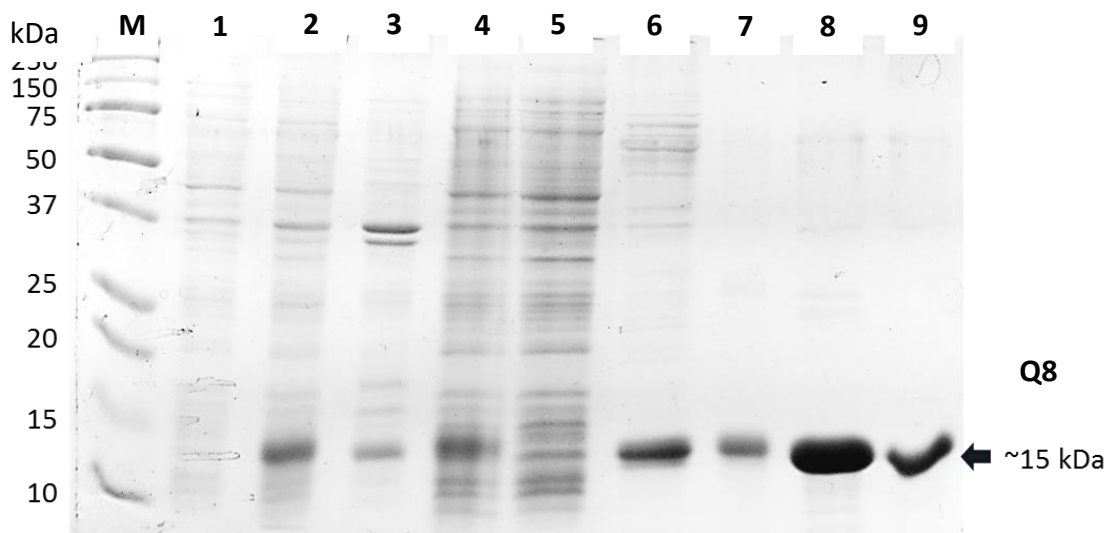
**Figura 15. Expresión y análisis de solubilidad de Q8, Q20 y Q45.** Análisis por SDS PAGE al 15% de la expresión de las proteínas Q8 (A), Q20 (B) y Q45 (C). Tres clones de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con pCri 8a-Q8, pCri 8a-Q20 y pCri 8a-Q45 se inocularon en 5 mL de LB (50 µg/mL de kanamicina). Los cultivos se incubaron a 37°C y 250 rpm, y a una DO<sub>600</sub> de 0.5-1 se adicionó 1 mM IPTG. Se mantuvo el cultivo durante 6 horas a 25°C. Muestras de extracto total antes y después de la adición de IPTG (carriles NI e I, respectivamente), y de las fracciones insoluble y soluble (carriles FI y FS, respectivamente).

### 7.3.3 Purificación de la proteína quimérica Q8 a partir de la fracción soluble

El perfil de purificación por cromatografía de afinidad a níquel se esquematiza en la **Figura 16**. Dos señales de absorbancia a 280 nm se observaron a concentraciones 15 y 75 mM imidazol. Para determinar si alguna de las señales es debida a la desorción de Q8, se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% las fracciones 19-22, así como la fracción proteica no unida (fracciones 1-16) y el extracto proteico soluble. Los resultados se muestran en la **Figura 17**. El análisis electroforético de las fracciones 19-22 (**Figura 17**, carriles F19-F22) demostró la presencia de una única banda con movilidad electroforética de ~15 kDa, siendo este muy cercano al peso molecular predicho para Q8, indicando que la proteína comenzó a desorberse de la superficie de la resina a concentraciones de imidazol tan bajas como 15 mM. Asimismo, resulta evidente que las proteínas contaminantes fueron eliminadas durante el procedimiento de aplicación de la muestra (**Figura 17**, carril 2), lo que permite deducir que la proteína quimérica fue capaz de interactuar selectivamente con la resina de la columna través de su etiqueta de histidinas. Al presentar un elevado grado de pureza, las fracciones 20-22 se mezclaron dando un volumen final de 6 mL, que se aplicaron a una columna de filtración en gel a fin de cambiar la proteína a PBS 1x al 5% de glicerol, eliminando con ello interferentes para la cuantificación (imidazol) y reduciendo la fuerza iónica y se determinó un rendimiento final de 2.8 mg/L de proteína Q8 purificada.



**Figura 16. Purificación por cromatografía de afinidad a níquel de la proteína Q8.** La fracción soluble de 5 g de biomasa obtenida después de 6h de inducción se aplicó a una columna *Bio Scale Profinity IMAC* de 5 ml (VC) y después de una etapa de lavado con el amortiguador A (PBS 1x, 1 mM de PMSF y 5% de glicerol) la proteína unida a la columna se eluyó con diferentes concentraciones de imidazol. En el cromatograma se muestra la absorbancia a 280 nm (mAu; línea azul), la fuerza iónica (mS/cm<sup>2</sup>; línea roja) y concentración de imidazol (%B; línea verde) en función del volumen (mL). Para mayor detalle consultar el apartado 6.4.4 de la sección *Materiales y Métodos*.



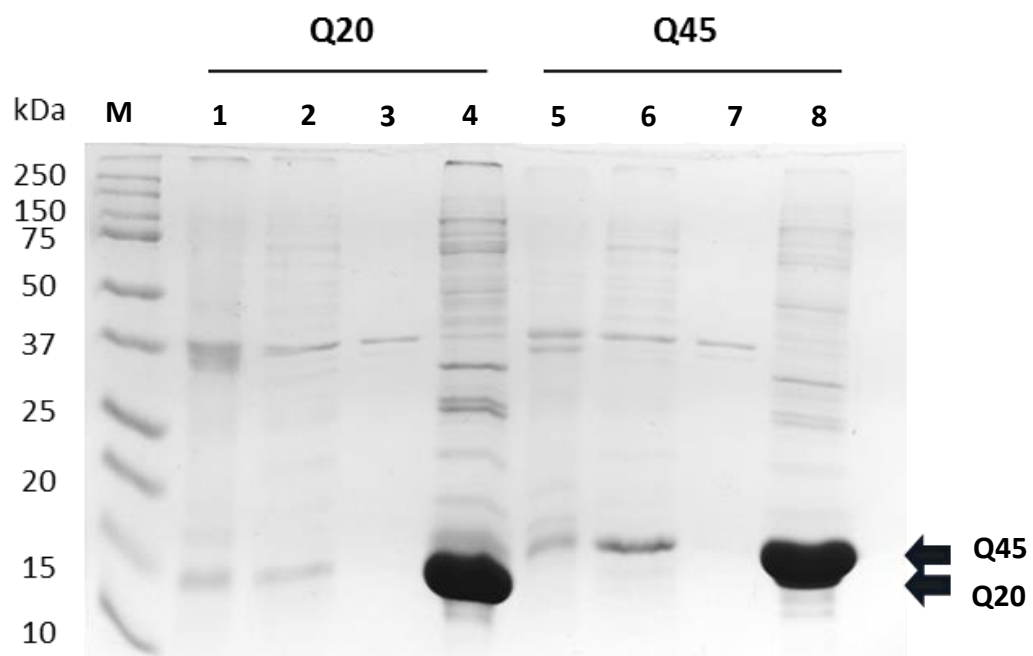
**Figura 17. Análisis electroforético de la purificación de Q8 por afinidad a níquel.** Análisis por SDS PAGE al 15% de fracciones representativas de la purificación de Q8 por cromatografía de afinidad a níquel (**Figura 16**). **M:** Marcador de peso molecular. **1:** Fracción no inducida. **2:** Fracción inducida. **3:** Fracción insoluble. **4:** Fracción soluble. **5:** Fracción no unida. **6:** Fracción 19. **7:** Fracción 20. **8:** Fracción 21. **9:** Fracción 22.



### 7.3.4 Purificación de las proteínas quiméricas Q20 y Q45

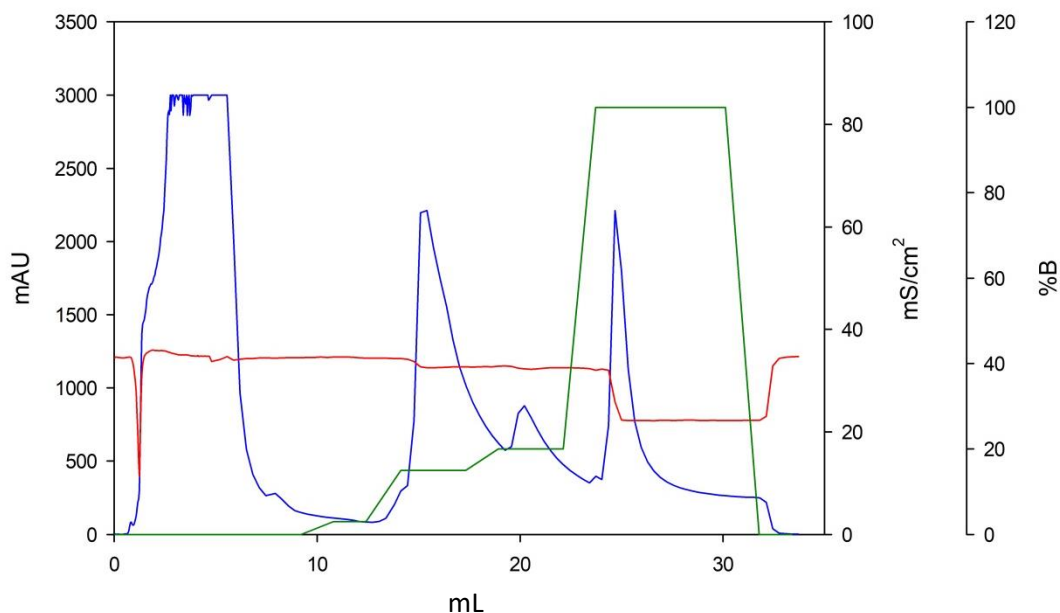
Una vez que se determinó que la expresión heteróloga de las proteínas quiméricas Q20 y Q45 ocurre en forma de cuerpos de inclusión, se llevó a cabo la primera etapa de purificación. Tras la expresión de las proteínas en 2 L de medio LB se procesaron 5 g de biomasa (peso húmedo) por acción enzimática y física, recuperándose la fracción insoluble y se procedió según lo descrito en la sección 6.4.3 de *Materiales y Métodos*. El análisis de los sobrenadantes de cada lavado se muestra en la **Figura 18**. En ambos casos, en los sobrenadantes de los lavados LI y LII se reveló la presencia de una banda con la movilidad electroforética predicha para las proteínas recombinantes, indicando que hubo una proporción de Q20 y Q45 que logró solubilizarse en presencia de 2 M de urea y 2 M de Tritón X-114 (**Figura 18**, carriles 1 y 2, y 5 y 6, respectivamente). También es importante resaltar que con dichos lavados no fue posible la completa remoción de proteínas contaminantes, pues el patrón de las bandas debidas a las proteínas interferentes mostró un aspecto más bien difuso, siendo la más abundante una proteína con un peso molecular de ~37 kDa, encontrada en ambos amortiguadores, la cual se eliminó durante el lavado LIII (**Figura 18**, carriles 3 y 7, respectivamente). No obstante, la totalidad de las proteínas recombinantes Q20 y Q45 (y proteínas contaminantes no eliminadas) se extrajeron por completo con el amortiguador de solubilización (**Figura 18**, carriles 4 y 8).

Después del lavado de cuerpos de inclusión, se obtuvieron 50 mL de extracto proteico solubilizado de cada proteína, con los que se llevó a cabo el segundo paso de purificación de las proteínas quiméricas Q20 y Q45 por cromatografía de afinidad a níquel.

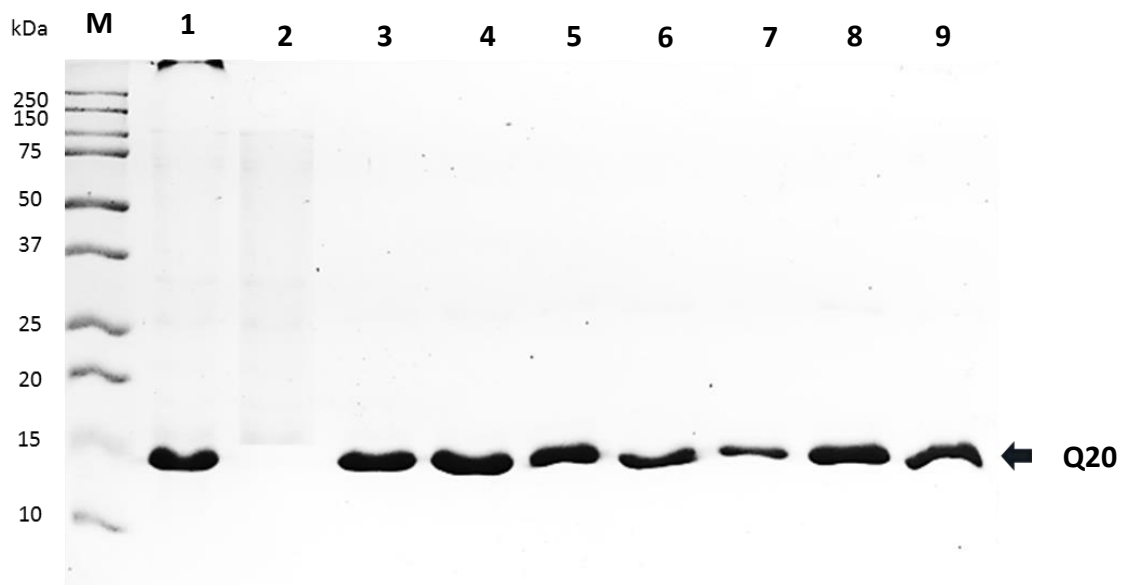


**Figura 18. Solubilización de proteínas quiméricas Q20 y Q45.** Monitoreo por SDS-PAGE al 15% de los lavados de la fracción insoluble de las proteínas Q20 (carriles 1-3) y Q45 (carriles 5-7), así como la solubilización de las mismas (carriles 4 y 8, respectivamente). **M:** Marcador de peso molecular. **1 y 5:** LI (20 mM de Tris-HCl pH 8.0, 500 mM de NaCl, 2 M de urea y 2% v/v de Tritón X-100). **2 y 6:** LII (20 mM de Tris-HCl pH 8.0, 1 mM de DTT y 2% v/v de Tritón X-114). **3 y 7:** LIII (20 mM de Tris-HCl pH 8.0). **4 y 8:** Solubilización (20 mM de Tris-HCl pH 8.0, 500 mM de NaCl, 8 M de urea, 1 M de  $\beta$ -mercaptoetanol y 5 mM de imidazol).

En la **Figura 19** se representa el perfil de elución de la proteína Q20 durante el procedimiento cromatográfico por afinidad a níquel. Se observa la absorbancia a 280 nm durante los lavados con 75 y 100 mM de imidazol y un pico correspondiente a la elución con 500 mM de imidazol que se extendió en las fracciones 24 y 25. Ante esta situación cabía esperar que las fracciones eluidas con 75 y 100 mM de imidazol se debieran a proteínas contaminantes que lograron interactuar con la resina y que las fracciones 24 y 25, producto de la elución, se trataran de la proteína Q20 purificada o al menos en una proporción importante. Para corroborar estas hipótesis se analizaron dichas fracciones, así como el extracto proteico solubilizado y la fracción no unida mediante electroforesis en gel de acrilamida al 15% (**Figura 20**). Interesantemente, después del análisis electroforético se pudo constatar que la totalidad de proteínas contaminantes se eliminó durante el proceso de aplicación de la muestra. La totalidad de la proteína recombinante interactuó con la resina (**Figura 20**, carril 2). De la misma manera se confirmó que todas las señales de absorción UV correspondieron a la proteína quimérica Q20 con un alto grado de pureza. Por lo que todas las fracciones positivas se juntaron dando un volumen final de 7 mL, mismos que se sometieron a un paso cromatográfico de filtración en gel para la remoción de imidazol y NaCl, con un rendimiento final de 3.1 mg/L de proteína Q20 purificada.

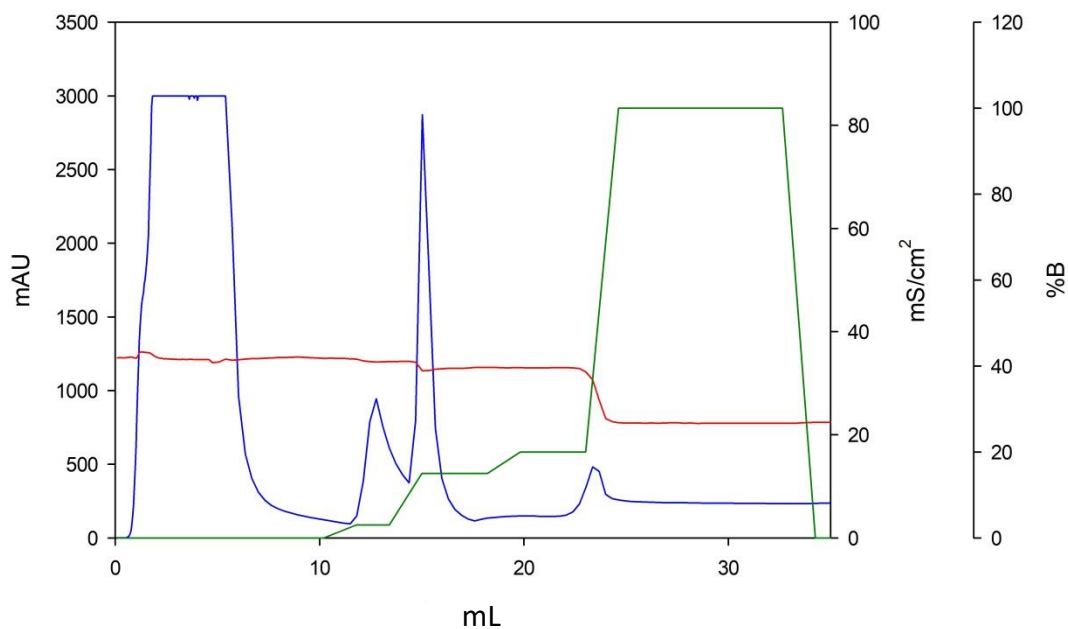


**Figura 19. Purificación por cromatografía de afinidad a níquel de la proteína Q20.** El extracto proteico solubilizado de 5 g de biomasa obtenida después de 6 h de inducción se aplicó a una columna *Bio Scale Profinity IMAC* de 5 ml (VC) y después de una etapa de lavado con el amortiguador A (20 mM de Tris-HCl pH 8.0, 500 mM de NaCl, 8 M de urea, 1 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol y 5 mM de imidazol) la proteína unida a la columna se eluyó con diferentes concentraciones de imidazol. En el cromatograma se muestra la absorbancia a 280 nm (mAu; línea azul), la fuerza iónica (mS/cm<sup>2</sup>; línea roja) y concentración de imidazol (%B; línea verde) en función del volumen (mL). Para mayor detalle consultar el apartado 6.4.6 de la sección *Materiales y Métodos*.

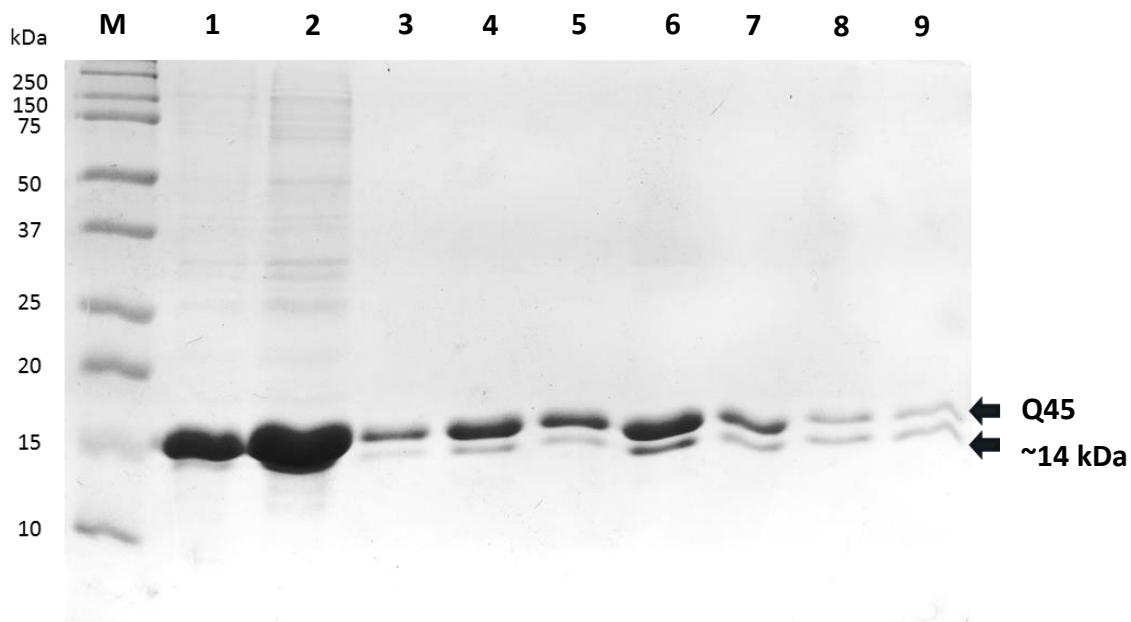


**Figura 20. Análisis electroforético de la purificación de Q20 por afinidad a níquel.** Análisis por SDS PAGE al 15% de fracciones representativas de la purificación de Q20 (carriles 3-9) por cromatografía de afinidad a níquel (**Figura 19**). **M:** Marcador de peso molecular. **1:** Fracción soluble. **2:** Fracción no unida. **3:** Fracción 16. **4:** Fracción 17. **5:** Fracción 18. **6:** Fracción 21. **7:** Fracción 26. **8:** Fracción 27. **9:** Fracción 28.

Por otro lado, en la purificación de Q45 (**Figura 21**) se observaron dos picos de absorción Uv que se extendieron desde la fracción 13 hasta la 17, mientras que durante la elución con 500 mM de imidazol se desarrolló una señal menos intensa de aproximadamente 200 mAu. Para identificar cuál de las señales observadas fue debida a la proteína quimérica, las fracciones 13-17 y 24-25 se separaron por electroforesis en gel de acrilamida al 15% teniéndose los resultados que se muestran en la **Figura 22**. A diferencia de lo observado con Q20, una proporción importante de la proteína Q45 no se unió a la resina (**Figura 22**, carril 2). No obstante, la proteína que sí logró ser retenida por los iones  $\text{Ni}^{+2}$  eluyó desde una concentración de imidazol de 15 mM. Además se hizo un hallazgo importante en el perfil electroforético de las fracciones evaluadas: todas se caracterizaron por la presencia de dos bandas con un peso molecular aproximado de entre 14 y 16 kDa, respectivamente. Particularmente, en el caso de las fracciones 13-17 la especie predominante fue la de 16 kDa, presumiblemente debida a la proteína Q45. Sin embargo, en las fracciones 24 y 25 correspondientes al paso de elución con 500 mM de imidazol, ambas bandas se observan con una intensidad muy similar. Para poder discernir si la especie de menor tamaño molecular es debida a alguna proteína contaminante o a que Q45 esté siendo procesada de forma prematura por alguna proteasa, es necesario llevar a cabo ensayos de inmunodetección. En todo caso, las fracciones 13-17 se juntaron en un volumen final de 4 mL para el cambio de amortiguador y la eliminación de imidazol y NaCl mediante cromatografía por filtración en gel.



**Figura 21. Purificación por cromatografía de afinidad a níquel de la proteína Q45.** El extracto proteico solubilizado de 5 g de biomasa obtenida después de 6 h de inducción se aplicó a una columna *Bio Scale Profinity IMAC* de 5 ml (VC) y después de una etapa de lavado con el amortiguador A (20 mM de Tris-HCl pH 8.0, 500 mM de NaCl, 8 M de urea, 1 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol y 5 mM de imidazol) la proteína unida a la columna se eluyó con diferentes concentraciones de imidazol. En el cromatograma se muestra la absorbancia a 280 nm (mAu; línea azul), la fuerza iónica (mS/cm<sup>2</sup>; línea roja) y concentración de imidazol (%B; línea verde) en función del volumen (mL). Para mayor detalle consultar el apartado 6.4.6 de la sección *Materiales y Métodos*.



**Figura 22. Análisis electroforético de la purificación de Q45 por afinidad a níquel.** Análisis por SDS PAGE al 15% de fracciones representativas (carriles 3-9) de la purificación de Q45 por cromatografía de afinidad a níquel (**Figura 21**). **M:** Marcador de peso molecular. **1:** Fracción soluble. **2:** Fracción no unida. **3:** Fracción 13. **4:** Fracción 14. **5:** Fracción 15. **6:** Fracción 16. **7:** Fracción 17. **8:** Fracción 24. **9:** Fracción 25.



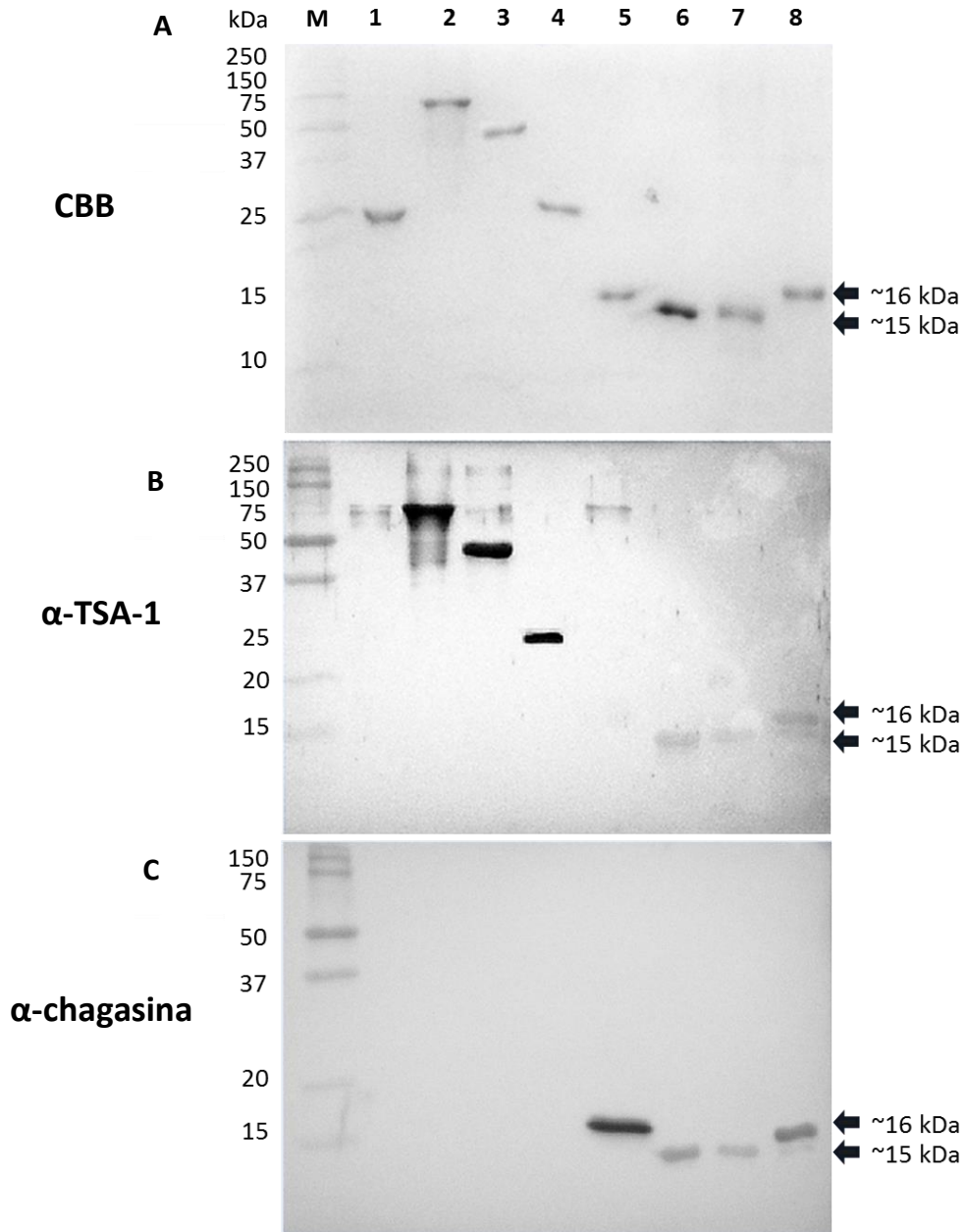
#### 7.4 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TSA-1-DNH<sub>2</sub>, TSA-1-DCOOH Y CHAGASINA DE *T. cruzi*

La expresión de las proteínas TSA-1-DNH<sub>2</sub>, TSA-1-DCOOH y chagasina de *T. cruzi* se indujo a una escala de 2 L de medio LB y 5 g de biomasa (peso húmedo) de cada construcción se lisaron mediante acción enzimática y física. La chagasina se purificó directamente a partir del extracto proteico soluble mientras que los CI de los dominios  $\beta$ -propela y neuroaminidasa de TSA-1 se sometieron al proceso de lavado descrito en la sección 6.5.2 de *Materiales y Métodos*. Las tres proteínas se purificaron como se detalló en los apartados 6.5.3 y 6.5.4 de *Materiales y Métodos*, respectivamente. En la **Figura 28** del **Apéndice 12** se muestra el patrón cromatográfico de la purificación de chagasina por afinidad a níquel. Tres señales de absorbancia se observaron a concentraciones de imidazol de 75, 100 y 500 mM. Dichas fracciones se evaluaron por electroforesis SDS PAGE al 15%. (**Figura 29B** del **Apéndice 13**, carriles 5, 6 y 7) y además se determinó que la totalidad de la chagasina se adsorbió a la resina (**Figura 29A** en el **Apéndice 13**, carril 7) y que comenzó su desorción con una concentración de imidazol de 75 mM. Asimismo, se observaron proteínas contaminantes por lo que las fracciones positivas para chagasina se juntaron y se hicieron pasar por un proceso de intercambio iónico (**Figura 31** del **Apéndice 15**, carril 1) obteniéndose un único pico de aproximadamente 600 mAu correspondiente a la chagasina pura (**Figura 30** en el **Apéndice 14**, carriles 3, 4, 5 y 6). Las fracciones positivas se mezclaron dando un volumen final de 6 mL, que se aplicaron a una columna de filtración en gel a fin de cambiar la proteína a PBS 1x con 5% de glicerol con un rendimiento final de 1.9 mg/L de proteína purificada.

Por otro lado, durante la purificación de las proteínas TSA-1-DNH<sub>2</sub> y TSA-1-DCOOH se observaron señales a 75, 100 y 500 mM de imidazol (**Figuras 32 y 34** en los **Apéndices 16 y 18**, respectivamente), el análisis por electroforesis SDS PAGE al 15% demostró, en ambos casos, la presencia de las proteínas de interés en dichas fracciones con una elevada pureza (**Figuras 33 y 35** en los **Apéndices 17 y 19**, respectivamente). Las fracciones se juntaron y se eliminaron los interferentes de cuantificación (imidazol) por filtración en gel, con un rendimiento de 6.2 mg/mL para TSA-1-DNH<sub>2</sub> y 5.8 mg/mL de TSA-1-DCOOH.

## 7.5 INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS MULTIEPÍTOPO POR ENSAYOS DE WESTERN BLOT

En la **Figura 22A** se muestra la expresión de las proteínas control (Tc24 como control negativo, TSA-1, TSA-1-DNH<sub>2</sub>, TSA-1-DCOOH y chagasina), así como de las proteínas quiméricas Q8, Q20 y Q45. Para confirmar que las quimeras estuvieran correctamente diseñadas se realizaron ensayos de inmunodetección por western blot utilizando los anticuerpos  $\alpha$ -TSA-1 (**Figura 22B**) y  $\alpha$ -chagasina (**Figura 22C**). Como era de esperarse, no hubo reconocimiento de la proteína de 25 kDa Tc24, por parte de los anticuerpos  $\alpha$ -TSA-1 y  $\alpha$ -chagasina (Carril 1 de **Figuras 22B y 22C**). Por otro lado, los anticuerpos  $\alpha$ -TSA-1 reconocieron a la proteína TSA-1 de 75 kDa (**Figura 22B**, carril 2), así como a los dominios amino y carboxilo de 50 y 25 kDa respectivamente (**Figura 22B** carriles 3 y 4), pero no se observó reconocimiento cruzado con la chagasina (**Figura 22B**, carril 5). De igual forma, los anticuerpos  $\alpha$ -chagasina reconocieron a la chagasina de 15 kDa (**Figura 22C**, carril 5), pero no a TSA-1 o alguno de sus dominios (**Figura 22C**, carriles 2, 3 y 4). De forma interesante, en el ensayo se pudo constatar la detección cruzada de las tres proteínas quiméricas por ambos anticuerpos (**Figuras 22B y 22C**, carriles 6, 7 y 8). En cuanto al reconocimiento de las quimeras por los anticuerpos  $\alpha$ -chagasina, dichos resultados eran los esperados tomando en consideración que más del 70% de la estructura de Q8, Q20 y Q45 corresponde a la secuencia nativa de la chagasina. Sin embargo, lo relevante de este ensayo fue el hecho de que los anticuerpos  $\alpha$ -TSA-1 lograron reconocer los epítomos insertados dentro de la secuencia de las quimeras a pesar de constituir una proporción menor en la estructura de las proteínas. Estas observaciones sugieren que las proteínas quiméricas fueron diseñadas exitosamente.



**Figura 23. Inmunodetección de quimeras Q8, Q20 y Q45.** Se transfirieron 3  $\mu$ g de cada proteína a dos membranas de nitrocelulosa que fueron tratadas con anticuerpos  $\alpha$ -TSA-1 y  $\alpha$ -chagasina. La detección fue colorimétrica con 4-cloro-1-naftol. **A:** Gel de poliacrilamida al 15% teñido con azul de Comassie. **B:** Membrana tratada con  $\alpha$ -TSA-1. **C:** Membrana tratada con  $\alpha$ -Chagasina. **Mw:** Marcador de peso molecular. **1:** Tc24. **2:** TSA-1. **3:** TSA-1-DNH<sub>2</sub>. **4:** TSA-1-DCOOH. **5:** Chagasina. **6:** Q8. **7:** Q20. **8:** Q45.

## 8. DISCUSIÓN

Un avance reciente en el diseño racional de vacunas terapéuticas es el uso de las denominadas *vacunología estructural* y *diseño basado en epítomos*. Estas tecnologías se enfocan en la generación de antígenos capaces de despertar en un hospedero respuestas inmunológicas eficaces ante una infección. En estos antígenos múltiples epítomos o determinantes antigénicos se presentan en un andamiaje biológico con la intención de incrementar su potencial inmunoestimulante, o bien, de facilitar su producción en forma recombinante a escala industrial, como una alternativa a la producción de uno o más antígenos completos. Para lo anterior, se deben hacer varias consideraciones de índole inmunológica y estructural (tanto de los epítomos como del andamio molecular) que determinarán en gran medida la eficacia y estabilidad de los antígenos quiméricos resultantes (Banta, *et al.*, 2013; Correia, *et al.*, 2014; Gourlay; Gourlay, *et al.*, 2017). Las evidencias experimentales indican que los antígenos Tc24 y TSA-1 son excelente candidatos para el desarrollo de una vacuna terapéutica contra la enfermedad de Chagas (Dumonteil, *et al.*, 2012). Sin embargo, mientras que Tc24 se produce en forma soluble y con altos rendimientos en *E. coli*, TSA-1 solo se produce eficientemente en *E. coli* formando cuerpos de inclusión constituyendo, un reto metodológico y haciendo necesario recurrir a operaciones adicionales para obtener proteínas correctamente replegadas (de la Cruz, *et al.*, 2018). Como alternativa para resolver este problema, en la presente investigación se diseñaron proteínas quiméricas multiepítomo siguiendo las pautas de la vacunología estructural y el diseño basado en epítomos. Se sabe, que el establecimiento de una respuesta celular mediada por linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> es crucial para la identificación y eliminación de células infectadas con *T. cruzi*. No obstante, durante la etapa aguda, el parásito ejerce mecanismos de evasión de la respuesta celular a través de epítomos para linfocitos B que suprimen el efecto de los epítomos para linfocitos T, con lo que se genera una respuesta inmunitaria desequilibrada en la que predomina la producción de anticuerpos que resultan insuficientes para combatir la infección, y a su vez se deprime la producción de citocinas estimulantes de la respuesta inmune celular (Wrightsmann, *et al.*,

1994). Tomando en cuenta lo anterior, se seleccionaron los determinantes antigénicos E<sub>1</sub>-E<sub>5</sub> localizados en el extremo NH<sub>2</sub>- de la proteína de superficie de *T. cruzi*, TSA-1. La capacidad de los epítomos E<sub>1</sub>-E<sub>5</sub> para activar la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> *in vitro* en modelos murinos y caninos de la enfermedad de Chagas y en muestras de sangre de pacientes chagásicos, ha sido ampliamente demostrado por varios grupos de investigación (Wrightsmann, *et al.*, 1994; Wizel, *et al.*, 1998; Garg y Tarlenton, 2002; Dumonteil, *et al.*, 2004; Zapata Estrella, *et al.*, 2006; Sanchez Burgos, *et al.*, 2007; Quijano Hernandez, *et al.*, 2008; Cazorla, *et al.*, 2009; Villanueva Lizama, *et al.*, 2018). De acuerdo con la literatura, la importancia de la proliferación de células T CD4<sup>+</sup> (en particular del subtipo Th1) mediada por los epítomos E<sub>1</sub>-E<sub>5</sub>, radica en la producción de citocinas como la interleucina-2 (IL-2) e interferón-γ (IFN-γ) que son responsables de la diferenciación y expansión de linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos que reconocen y destruyen a las células infectadas a través del reconocimiento de los determinantes antigénicos unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHCII) (Okada, *et al.*, 2008; Ceballos Pomares, *et al.*, 2017). Asimismo, otra de las características fundamentales que poseen los epítomos E<sub>1</sub>-E<sub>5</sub> que los hacen buenos candidatos para el diseño de los antígenos quiméricos es la limitada variación antigénica que presentan a lo largo de todos los linajes de *T. cruzi* clínicamente relevantes. De acuerdo con Knight, *et al.*, (2014), estos epítomos poseen secuencias altamente conservadas en los linajes TcI-TcVI, lo que aumenta la probabilidad de generar quimeras capaces de conferir protección cruzada en infecciones causadas por cepas diferentes de *T. cruzi* (Gourlay, *et al.*, 2017).

En lo que respecta a la selección del andamio molecular, no existe un consenso acerca de la topología tridimensional adecuada para el diseño de quimeras estables, sin embargo, varios autores coinciden en que las proteínas que actúan a través de lazos en su superficie penetrando en hendiduras en sus sustratos (característica generalmente cumplida por péptidos con plegamiento del tipo dominio de inmunoglobulina) pueden ser objeto de modificaciones estructurales para generar construcciones con secuencias exógenas (Nuttall, *et al.*, 1999; Banta, *et al.*, 2013). Con base en lo anterior, se optó por el uso de la chagasina de *T. cruzi* como andamiaje para la expresión de los epítomos E<sub>1</sub>-E<sub>5</sub>. En la

estructura de la chagasina pueden distinguirse claramente dos elementos: el “core” de la proteína compuesta por ocho láminas- $\beta$ , y seis lazos que no poseen un patrón regular en su conformación tridimensional (Figuereido da Silva, *et al.*, 2007; Ljunggren, *et al.*, 2007; Wang, *et al.*, 2007; Regad, *et al.*, 2010). De acuerdo con Pachenko y Madej (2005), la secuencia de los lazos de una proteína cambia a lo largo del proceso evolutivo a medida que moléculas homólogas divergen unas de otras, sufriendo inserciones, deleciones y sustituciones a fin de adquirir mayor afinidad por su sustrato, mientras que las hélices- $\alpha$  y las láminas- $\beta$  tienden a mantenerse constantes. Estas implicaciones resultan particularmente interesantes para nuestros objetivos, pues nos condujo a establecer la hipótesis de que el cambio de la secuencia de los lazos de la chagasina por la de los epítomos E<sub>1</sub>-E<sub>5</sub> podría llevarse a cabo sin comprometer en gran medida la estabilidad de la proteína. Si bien existen reportes acerca del uso de la chagasina de *T. cruzi* como topología base para la presentación de secuencias peptídicas de interés (Genetech Inc., 2017) hasta el momento no existe información sobre su uso como antígeno vacunal mediante la exposición de epítomos.

Para fines de la presente investigación, se tomaron como base las resoluciones cristalográficas hechas por Figueredo da Silva, *et al.*, (2007) y Ljunggren, *et al.*, (2007), para determinar las regiones de la chagasina que fueran potencialmente útiles para hacer la inserción de los epítomos. En dichos reportes, se hace énfasis en el rol que juegan los lazos L2, L4 y L6 en el mecanismo inhibitorio de la chagasina. Los lazos L4 y L6 en particular, son estructuras ampliamente protruidas hacia el exterior de la molécula de la chagasina y se encargan principalmente de la unión al sustrato mediante la interacción con la proteasa a través de puentes de hidrógeno, puentes salinos, interacciones hidrofóbicas e interacciones  $\pi$ , mientras que el lazo L2 se inserta directamente en el sitio catalítico bloqueándolo (Wang, *et al.*, 2007). Por otro lado, el lazo L3, aunque no está directamente involucrado en el mecanismo de acción de la chagasina, es el lazo más extenso (12 aa) y también se encuentra ampliamente expuesto al solvente. Contrariamente, los lazos L1 y L5 son compactos, cortos (compuestos por 3 y 4 residuos, respectivamente) y se encuentran formando parte del “core” hidrofóbico de la proteína. Tomando en cuenta lo anterior, y apoyados en reportes

de ensayos en los que se intercambian o insertan lazos y cuyos resultados sugieren que los lazos pueden ser, en cierta medida, considerados como unidades independientes que pueden ser removidos o reemplazados con mínimos cambios en la estructura y función de la proteína (Hynes, *et al.*, 1989; Pardon y Joniau, 1995), se eligieron los lazos L2, L3, L4 y L6 como las secuencias blanco para la inserción de los epítomos E<sub>1</sub>-E<sub>5</sub>. En el primer enfoque de diseño (descrito en la sección 6.1 de *Materiales y Métodos*) se modificaron los lazos L4 y L6 para generar el grupo de quimeras con dos determinantes antigénicos (quimeras Q1-Q20). En este caso, la longitud de ambos lazos (L4=11 aa y L6=10 aa) resulta ser muy similar a la de los epítomos (E<sub>1</sub>-E<sub>4</sub>= 9 aa y E<sub>5</sub>= 10 aa) por lo que la longitud final en las construcciones no varió en gran medida. Sin embargo, se tuvo el cuidado de mantener 3 residuos originales con el fin de asegurar la formación de los lazos en las quimeras, siendo estos los primeros dos y el último aminoácido de cada uno, es decir Pro, Pro y Gli, en L4 y Arg, Pro y Ser en L6, respectivamente. Existen múltiples evidencias que indican que la presencia de residuos de prolina y glicina dentro de una secuencia polipeptídica ejercen una influencia determinante en la cinética de formación de lazos de 2 a 10 aa de longitud, puesto que son capaces de adoptar la conformación de ángulo diedro necesaria para la generación de las vueltas que conectan dos láminas-β antiparalelas, como ocurre en la chagasina. Asimismo, se ha observado que la presencia de residuos de serina previene la formación de estructuras secundarias *intra-lazo*, y que la presencia de arginina es crítica para promover la movilidad y los cambios conformacionales que caracterizan a un lazo (Baumeister, *et al.*, 1992; Chou, 2000; Krieger, *et al.*, 2005; Hu, *et al.*, 2007; Carpenter, *et al.*, 2011; Messih, *et al.*, 2015). Por otra parte, el segundo enfoque de diseño se fundamentó en la evidencia de proteínas homólogas cercanas a la chagasina presentes en ciertos eucariotas, bacterias y arqueas, con las que comparte un alto grado de similitud en ciertas secuencias y “motifs”. Estas proteínas (conocidas como *chagasin-like*) tienen en común los tres lazos que participan en la inhibición de proteasas. Un dato interesante es que la longitud del lazo L4 varía entre los diferentes homólogos de la chagasina, alcanzando en *Trypanosoma brucei* una extensión de 20 aminoácidos (Rigden *et al.*, 2002; Wang, *et al.*, 2007; Figueredo da Silva, *et al.*, 2007). La existencia de un lazo con esa característica en una proteína de la misma familia que la

chagasina, producida por un parásito del mismo género que *T. cruzi*, nos condujo a suponer que dicha región pudiera ser susceptible de prolongar su secuencia mediante la inserción de más de un epítipo a la vez sin modificar su solubilidad con lo que se generaron las construcciones Q21-Q50. En este caso se hicieron las mismas consideraciones descritas previamente en cuanto a la conservación de residuos clave para la formación de lazos. Finalmente, en la quimera Q51, además de los lazos L4 y L6, se modificaron también los lazos L2 y L3. En todos los casos se obtuvieron índices de similitud mayores al 70% con respecto a la chagasina, y las predicciones acerca de sus propiedades fisicoquímicas las describen como proteínas estables, con vidas medias en *E. coli* prolongadas (>20 h) y de pesos moleculares dentro del rango de los 12.7 y 15 kDa. Las diferencias más importantes fueron los resultados de la predicción de solubilidad en la plataforma bacteriana, pues únicamente seis resultaron tener una muy alta probabilidad (>90%) de expresión soluble, mientras que otras tres más tuvieron probabilidades intermedias (>50%). Con ello, se descartaron automáticamente 42 proteínas con muy bajas (<50%) o nulas posibilidades de producirse solubles en forma recombinante. Curiosamente, las seis construcciones cuya predicción fue cercana al 100% pertenecen al grupo de quimeras con dos epítopos (Q4, Q8, Q16, Q17, Q18, Q20), mientras que las que tuvieron una probabilidad intermedia se agruparon en la clasificación con tres determinantes antigénicos (Q23, Q29, Q45). Contrario a los reportes en la literatura que indican que la modificación o elongación de lazos en proteínas muy estables (como es el caso de la chagasina) no impiden que la quimera resultante adquiera un plegamiento adecuado (Zhou, *et al.*, 1996; Nagi y Regan, 1997), predicciones de solubilidad de las quimeras con tres epítopos parecen indicar que la modificación del lazo L4 puede estar relacionada con la solubilidad de las construcciones. Experimentalmente, la quimera Q45 se expresó en *E. coli* BL21 (DE3) a 25°C y se comprobó su producción en forma de cuerpos de inclusión. De acuerdo con ensayos de elongación del lazo en la proteína Rop, llevados a cabo por Batori, *et al.*, (2002) y Wright, *et al.*, (2004), existe una correlación entre la longitud de un lazo y propiedades como la solubilidad y estabilidad. En sus observaciones se destacó el hecho de que la proteína mantuvo su plegamiento nativo y su solubilidad a medida que la longitud incrementó de uno hasta 25



residuos de glicina, momento en el cual el lazo es lo suficientemente inestable como para prevenir el correcto plegamiento de Rop. En el caso de Q45, la longitud final de lazo L4 fue de 26 aminoácidos, lo que aunado a la heterogeneidad de cadenas laterales presentes en los epítomos pudiera haber promovido su baja solubilidad. En el lazo L4 quimérico de Q45 se observan aminoácidos tanto polares como apolares y residuos voluminosos como isoleucina, treonina, triptófano y fenilalanina, que difieren con los lazos compuestos de poliglicina en los estudios de Nagi y Regan (1997). Es probable que con ello la libertad de las cadenas laterales disminuyera y aumentarían las potenciales interacciones en el lazo o entre el lazo y el “core” de la chagasina. Asimismo, existe evidencia que sugiere que los lazos de proteínas con plegamiento tipo dominio de inmunoglobulina son necesarios para darle estabilidad al “core”, por lo que posiblemente las mutaciones fueron incompatibles. Sin embargo, el hecho de que durante el proceso de lavado de los cuerpos de inclusión se observara que Q45 comienza a solubilizarse con concentraciones de urea de 2M (datos no mostrados), apunta a un plegamiento parcial de la proteína, y no se descarta la posibilidad de expresarla correctamente plegada con estrategias de fusión a dominios que favorezcan la solubilidad, o buscando condiciones de expresión distinta e incluso establecer condiciones de replegamiento, que si bien es un paso que se desea evitar, cabe la posibilidad de que el proceso de replegamiento resulte más fácil con las quimeras con probabilidades intermedias de solubilidad, que recuperar el antígeno TSA-1 con plegamiento nativo (Sorensen y Mortensen, 2005).

Otro dato interesante obtenido tras el análisis de los resultados fue que las 9 construcciones con alguna posibilidad de expresarse solubles tuvieron en común la presencia del epítomo E<sub>5</sub> en combinación con los epítomos E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> o E<sub>4</sub>, mientras que la constante en las 43 proteínas descartadas fue la presencia del epítomo E<sub>3</sub>. Estas observaciones parecen sugerir que los epítomos E<sub>5</sub> y E<sub>3</sub> ejercen efectos antagónicos en cuanto a la solubilidad de las quimeras. Al analizar la posición del epítomo E<sub>3</sub> dentro de la estructura tridimensional de la TSA-1 nativa se advierte que se encuentra formando parte de la  $\alpha$ -hélice que conecta el dominio  $\beta$ -propela (NH<sub>2</sub>-) con el dominio neuroaminidasa (COOH-).

El análisis detallado de la posición de los aminoácidos demuestra que los residuos hidrofóbicos (Phe, Leu, Ile) se encuentran dirigidos hacia el interior de la molécula, mientras que los hidrofílicos (Arg, Thr, Glu, Asn) se orientan hacia el exterior. A diferencia de los 43 diseños descartados, la secuencia del epítipo se encuentra flanqueado por aminoácidos que previenen la formación de estructuras secundarias y se localiza en una región altamente expuesta a un ambiente polar, lo que podría conducir a la formación de parches hidrofóbicos que promueven la agregación de las especies mal plegadas. Otra posibilidad consiste en que, el epítipo adquiera su estructura helicoidal nativa en el lazo lo que, por efectos de impedimento estérico, podría prevenir el correcto plegamiento del “core” hidrofóbico de la proteína, dando lugar a la formación de especies poco solubles. Varios autores coinciden en que un incremento en la superficie hidrofóbica de una proteína está relacionada en cierto grado con una disminución en su solubilidad. Por lo que, una alternativa para contrarrestar dicho efecto reside en la posibilidad de mutar residuos apolares expuestos en la superficie por aminoácidos con una mayor accesibilidad al disolvente, como Asp, Glu, Ser, y Arg (Moelbert, *et al.*, 2004; Strub, *et al.*, 2004; Malleshappa Gowder, *et al.*, 2014). Sin embargo con ello se podría comprometer la capacidad inmunogénica de los epítipos.

Por su parte, el epítipo E<sub>5</sub> podría ejercer un efecto positivo en el plegamiento de las quimeras y por ende su solubilidad. Sin embargo, los resultados experimentales no concuerdan del todo con las observaciones teóricas: dos proteínas quiméricas, Q8 y Q20, pertenecientes al grupo con dos epítipos, se expresaron en *E. coli* a 25°C en el vector de expresión pCri 8a. Ambas construcciones tienen en común la presencia del epítipo E<sub>5</sub> pero difieren en su posición, pues mientras que en Q8 se encuentra en el lazo L4, en Q20 está en el lazo L6. A pesar de que las predicciones sugieren que la sola presencia del epítipo es determinante para la solubilidad, sin hacer distinción entre su localización en L4 o L6; experimentalmente se observó que la producción soluble de la proteína recombinante se favorece si se posiciona en el lazo L4 y se previene si se localiza en L6. Una forma de corroborar esta hipótesis consiste en sintetizar una serie de proteínas con elevadas probabilidades de expresión soluble y que tengan los mismos determinantes antigénicos

pero en diferente posición (por ejemplo Q8 y Q18 y Q16 y Q20) y así evaluar la contribución de cada epítipo y la posición, al correcto plegamiento y a la solubilidad.

En cuanto a los resultados de los ensayos de inmunodetección, se hicieron hallazgos relevantes. En primera instancia se observó un importante reconocimiento a la chagasina nativa y a las quimeras Q8, Q20 y Q45, pero no a la TSA-1 o alguna de sus subunidades por el anticuerpo  $\alpha$ -chagasina. Los resultados anteriores correspondieron con lo esperado tratándose de proteínas que conservan al menos 70% de la secuencia nativa de la chagasina. Sin embargo, los resultados más interesantes se obtuvieron con el anticuerpo  $\alpha$ -TSA-1, en donde se observó un reconocimiento intenso tanto a la proteína completa, como a sus dos subunidades. Además, no se observó reconocimiento cruzado con la chagasina, pero sí con las tres quimeras. Cabe señalar que el reconocimiento de las quimeras por parte de los anticuerpos  $\alpha$ -TSA-1 no fue tan intenso como el observado en la proteína completa y sus dos subunidades. Sin embargo, dichas observaciones podrían estar relacionadas con el poder inmunogénico de los epítipos, pues, tomando en cuenta que en las quimeras únicamente el 20-25% de la estructura corresponde a la secuencia de TSA-1, una proporción importante de los anticuerpos generados anti-TSA-1 estuvieron dirigidos específicamente a los epítipos E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, E<sub>4</sub> y E<sub>5</sub>. Además, el resultado de la inmunodetección de Q8, la única quimera expresada en forma soluble, podría sugerir que los determinantes antigénicos están expuestos en los lazos, lo que se podría relacionar con su plegamiento correcto.

## 9. CONCLUSIÓN

El inhibidor de proteasas chagasina de *T. cruzi*, que se expresa soluble en *E. coli*, es un buen candidato para ser utilizado como proteína de andamiaje en la expresión de epítomos de antígenos que forman cuerpos de inclusión en *E. coli*, como TSA-1 de *T. cruzi*.

## 10. PERSPECTIVAS

- Probar diferentes alternativas de expresión que mejoren la solubilidad de las proteínas quiméricas Q20 y Q45, incluyendo su expresión a temperaturas reducidas, en periplasma, o el uso de cepas de *E. coli* como C41 (DE3) y C43 (DE3), y la fusión a proteínas como el dominio de unión a maltosa (MBP), tioredoxina (TRX) o glutatión-S-transferasa (GST). Alternativamente, ensayar métodos de replegamiento para la obtención de las quimeras Q20 y Q45 en estado nativo y evaluar su efecto protector (junto con la quimera Q8) en un modelo murino de la enfermedad de Chagas.
- Determinar mediante ensayos de inhibición enzimática, si las quimeras Q8, Q20 y Q45 en estado nativo conservan su actividad inhibitoria tras la edición de los lazos L2, L4 y L6.
- Síntesis de los genes Q4, Q16, Q17, Q18, y estudio de la expresión de las quimeras Q4, Q8, Q16, Q17, Q18 y Q20 para evaluar el efecto de la posición del epítomo E<sub>5</sub> en la solubilidad de las quimeras.

# 11. REFERENCIAS

1. Alves, M., & Coli, W. (2007). *Trypanosoma cruzi*: adhesion to the host cell and intracellular survival. *IUBM Life*, 59(5), 274-279.
2. Antonio Pérez, A., Ramón Luíng, L., & Ortega López, J. (2012). Chromatographic refolding of rhodanese and lysozyme assisted by the GroEL apical domain, DsbA and DsbC immobilized on cellulose. *J Chromatogr A*, 1248, 122-129.
3. Antonio Pérez, A., Rivera Hernández, T., Aldaz Martínez, L., & Ortega López, J. (2012). Oxidative refolding of lysozyme assisted by DsbA, DsbC and the GroEL apical domain immobilized in cellulose. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 17(4), 703-710.
4. Banta, S., Dooley, K., & Shur, O. (2013). Replacing antibodies: engineering new binding proteins. *Annu Rev Biomed Eng.*, 93-113.
5. Bartel, L., Montalto de Mecca, M., & de Castro, J. (2010). Metabolization of nifurtimox and benznidazole in cellular fractions of rat mammary tissue. *Hum. Exp. Toxicol.*, 29, 813-822.
6. Baumeister, R., Müller, G., Hecht, B., & Hillen, W. (1992). Functional roles of amino acid residues involved in forming the alpha-helix-turn-alpha-helix operator DNA binding *motif* of Tet repressor from Tn10. *Proteins*, 14(2), 168-177.
7. Beaumier, C., Gillespie, P., Strych, U., Hayward, T., Hotez, P., & Bottazzi, M. (2016). Status of vaccine research and development of vaccines for Chagas disease. *Vaccine*, 34(26), 2996-3000.
8. Belaunzarán, M. L. (2015). Enfermedad de Chagas: Globalización y nuevas esperanzas para su cura. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(2), 85-87.

9. Carabarin Lima, A., González Vázquez, M., Rodríguez Morales, O., Baylón Pacheco, L., Rosales Encina, J., Reyes López, P., y otros. (2013). Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: An update. *Acta Tropica*, 127(2), 126-135.
10. Carpenter, R., Xiong, J., Robbins, J., & Ellis, H. (2011). Functional role of a conserved arginine residue located on a mobile lazo of alkanesulfonate monooxygenase. *Biochemistry*, 50(29), 6469-6477.
11. Carrilero, B., Murcia, L., Martínez-Lage, L., & Segovia, M. (2011). Side effects of benznidazole treatment in a cohort of patients with Chagas disease in non-endemic country. *Rev. Esp. Quimioter.*, 24, 123-126.
12. Castro, J., Mecca, M., & Bartel, L. (2006). Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Hum. Exp. Toxicol.*, 25, 471-479.
13. Castro, J., Montalto deMecca, M., & Bartel, L. (2006). Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American Trypanosomiasis). *Human & Experimental Toxicology*, 25, 471-479.
14. Cazorla, S., Frank, F., & Malchiodi, E. (2009). Vaccination approaches against *Trypanosoma cruzi* infection. *Expert Rev Vaccines.*, 8, 921-935.
15. Ceballos Pomares, J., Cuéllar Rufino, S., Vazquez Ortega, M., López Dominguez, J., Romero Cruz, V., & Calderon Garcidueñas, A. (2017). Inmunología de la enfermedad de Chagas congénita. *Perinatología y Reproducción Humana*, 31, 144-150.
16. Chou, K. (2000). Prediction of tight turns and their types in proteins. *Anal Biochem.*, 286(1), 1-16.
17. Correia, B., Bates, J., Johnson, P., & Schief, W. (2014). Proof of principle for epitope-focused vaccine design. *Nature*, 507(7491), 201-206.

18. Dang, H., & Lawrence, C. (2014). Allerdicator: fast allergen prediction using text classification techniques. *Bioinformatics*, 30(8), 1120-1128.
19. de la Cruz, J., Villanueva Lizama, L., Ortega López, J., Bottazzi, M., Hotez, P., & Dumonteil, E. (2018). Production of recombinant TSA-1 and evaluation of its potential for the immunotherapeutic control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*.
20. De Souza, W., de Carvalho, T., & Barrias, E. (2010). Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *Int J Cell Biol.*, 2010, 1-18.
21. de Souza, W., de Carvalho, T., & Santos Barrias, E. (2010). Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *International Journal of Cell Biology*, 47(23), 1-18.
22. Díaz de Toranzo, E., Castro, J., Franke de Cazzulo, B., & Cazzulo, J. (1998). Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplasmic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. *Experientia*, 44(10), 880-881.
23. Díaz, A., Tomba, E., Lennarson, R., Richard, R., Bagajewicz, M., & Harrison, R. (2010). Prediction of protein solubility in *Escherichia coli* using logistic regression. *Biotechnology and Bioengineering*, 105(2), 374-383.
24. Douette, P., Navet, R., Gerkens, P., Galleni, M., Levy, D., & Sluse, F. (2005). *Escherichia coli* fusion carrier proteins act as solubilizing agents for recombinant uncoupling protein 1 through interactions with GroEL. *Biochem Biophys Res Commun*, 333, 686-693.
25. Dumonteil, E. (2007). DNA Vaccines against Protozoan Parasites: Advances and Challenges. *J Biomed Biotechnol.*, 2007(6), 90520-90524.
26. Dumonteil, E., Bottazzi, M., Zhan, B., MJM, H., Jones, K., Valenzuela, J., y otros. (2012). Accelerating the development of a therapeutic vaccine for human Chagas disease: rationale and prospects. *Expert Rev Vaccines*, 11(9), 1043-1055.

27. Dumonteil, E., Bottazzi, M., Ortega López, J., & Hotez, P. (2012). Accelerating the development of a therapeutic vaccine for human Chagas disease: rationale and prospects. *Expert Rev Vaccines.*, 11(9), 1043-1055.
28. Dumonteil, E., Escobedo Ortigón, J., Reyes Rodríguez, N., Arjona Torres, A., & Ramírez Sierra, M. (2004). Immunotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection with DNA vaccines in mice. *Infect. Immunol.*, 72(1), 46-53.
29. El-Sayed, N., Myler, P., & Andersson, B. (2005). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*, 309(5733), 409-415.
30. Fahnert, B., Lilie, H., & Neubauer, P. (2004). Inclusion bodies: formation and utilisation. *Adv Biochem Eng Biotechnol.*, 89, 93-142.
31. Figueiredo da Silva, A., de Carvalho Vieira, L., Krieger, M., Goldenberg, S., Zanchin, N., & Guimarães, B. (2007). Crystal structure of chagasin, the endogenous cysteine-protease inhibitor from *Trypanosoma cruzi*. *J Struct Biol.*, 157(2), 416-423.
32. Fujiwara, D., Kitada, H., & Fuji, I. (2016). A Cyclized Helix-Lazo-Helix Peptide as a Molecular Scaffold for the Design of Inhibitors of Intracellular Protein-Protein Interactions by Epitope and Arginine Grafting. *Angew Chem Int Ed Engl.*, 55(36), 10612-10615.
33. Gourlay, L., Peri, C., Bolognesi, M., & Colombo, G. (2017). Structure and computation in immunoreagent design: from diagnostics to vaccines. *Trends in Biotechnology*, 35(12), 1208-1220.
34. Gourlay, L., Peri, C., Bolognesi, M., & Colombo, G. (2017). Structure and Computation in Immunoreagent Design: From Diagnostics to Vaccines. *Trends Biotechnol.*, 35(12), 1208-1220.



35. Gunter, S., & García, M. (2017). Likely Autochthonous Transmission of *Trypanosoma cruzi* to Humans, South Central Texas, USA. *Emerg Infect Dis.*, 23(3), 500-503.
36. 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.*, 4(2), 155-161.
37. Hu, X., Wang, H., Ke, H., & Kuhlman, B. (2007). High-resolution design of a protein lazo. *PNAS*, 104(45), 17668-17673.
38. Hynes, T., Kautz, R., Goodman, M., Gill, J., & Fox, R. (1989). Transfer of a beta-turn structure to a new protein context. *Nature*, 339(6219), 73-76.
39. Kayama, H., & Takeda, K. (2010). The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes and Infection*, 12(7), 511-517.
40. Knight, J., Zingales, B., Botazzi, M., Hotez, P., & Zhan, B. (2014). Limited antigenic variation in the *Trypanosoma cruzi* candidate vaccine antigen TSA-1. *Parasite Immunol.*, 36(12), 708-712.
41. Krieger, F., Möglich, A., & Kiehbauer, T. (2005). Effect of proline and glycine residues on dynamics and barriers of lazo formation in polypeptide chains. *J Am Chem Soc*, 127(10), 3346-3352.
42. Kyte, J., & Doolittle, R. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol.*, 157(1), 105-132.
43. Limon-Flores, A., Cervera-Cetina, R., Tzec-Arjona, J., Ek-Macias, L., Sánchez-Burgos, G., Ramirez-Sierra, M., 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*, 28(46), 7414-7419.

44. Ljunggren, A., Redzynia, I., Alvarez-Fernandez, M., Abrahamson, M., Mort, J., Krupa, J., y otros. (2007). Crystal structure of the parasite protease inhibitor chagasin in complex with a host target cysteine protease. *J Mol Biol*, 371(1), 137-153.
45. Malleshappa Gowder, S., Chatterjee, J., Chaudhuri, T., & Paul, K. (2014). Prediction and analysis of surface hydrophobic residues in tertiary structure of proteins. *Scientific World Journal*, 56(13), 45-51.
46. Matsuda, N., Miller, S., & Barbosa Evora, P. (2009). The chronic gastrointestinal manifestations of Chagas disease. *Clinics (Sao Paulo)*, 64(12), 1219-1224.
47. Mattos, E., Tonelli, R., Colli, W., & Alves, M. (2014). The Gp85 Surface Glycoproteins from *Trypanosoma cruzi*. En A. Santos, M. Branquinha, C. d'Avila-Levy, L. Kneip, & C. Sodr e, *Proteins and proteomics of Leishmania and Trypanosoma* (p ags. 151-202). Rio de Janeiro: Springer.
48. Messih, M., Lepore, R., & Tramontano, A. (2015). Lazolng: a template-based tool for predicting the structure of protein lazos. *Bioinformatics*, 31(23), 3767-3772.
49. Moelbert, S., Emberly, E., & Tang, C. (2004). Correlation between sequence hydrophobicity and surface-exposure pattern of database proteins. *Protein Sci.*, 13(3), 752-762.
50. Nagi, A., & Regan, L. (1997). An inverse correlation between lazo length and stability in a four-helix-bundle protein. *Fold Des.*, 2(1), 67-75.
51. Nuttall, S., Rousch, M., Irving, R., Hufton, S., Hoogenboom, H., & Hudson, P. (1999). Design and expression of soluble CTLA-4 variable domain as a scaffold for the display of functional polypeptides. *Proteins*, 36(2), 217-227.
52. Okada, R., Kondo, T., & Takiguchi, M. (2008). Phenotypic classification of human CD4+ T cell subsets and their differentiation. *International Immunology*, 209, 1189-1199.

53. Pachenko, A., & Madej, T. (2005). Structural similarity of lazos in protein families: toward the understanding of protein evolution. *BMC Evolutionary Biology*, 5(10), 319-325.
54. Pang Low, H., Santos, M., Wizel, B., & Tarlenton, R. (1998). Amastigote Surface Proteins of *Trypanosoma cruzi* Are Targets for CD8+ CTL. *J Immunol*, 160(4), 1817-1823.
55. Pardon, E., & Joniau, M. (1995). Unfolding Behaviour of Chimeric Proteins from Lysozyme and  $\alpha$ -Lactalbumin. *Spectroscopy of Biological Molecules*, 109-114.
56. Pereira Nunes, M., Dones, W., Morillo, C., Encina, J., & Ribeiro, A. (2013). Chagas disease: An overview of clinical and epidemiological aspects. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(9), 767-776.
57. Pérez Molina, J., & Molina, I. (2018). Chagas Disease. *The Lancet*, 391, 82-94.
58. Petterson, D., Fouts, D., & Manning, J. (1989). The 85-kd surface antigen gene of *Trypanosoma cruzi* is telomeric and a member of a multigene family. *EMBO J.*, 8(12), 3911-3916.
59. Pudukollu, G., Gowda, R., Khan, I., Navarro, V., & Vasavada, B. (2007). Clinical aspects of the Chagas' heart disease. *Int J Cardiol*, 115(3), 279-283.
60. Quijano Hernández, I., Bolio González, M., Rodríguez Buenfil, J., Ramírez Sierra, M., & Dumonteil, E. (2008). Therapeutic DNA vaccine against *Trypanosoma cruzi* infection in dogs. *Ann N Y Acad Sci.*, 1149, 343-346.
61. Quijano Hernández, I., Castro Bárcena, A., Vázquez Chagoyán, J., Bolio Gonzáles, M., Ortega López, J., & Dumonteil, E. (2013). Preventive and therapeutic DNA vaccination partially protect dogs against an infectious challenge with *Trypanosoma cruzi*. *Vaccine*, 31(18), 2246-2252.

62. Rassi, A., Rassi, A., & Marín-Neto, J. (2010). Chagas disease. *The Lancet*, 375, 1388-1402.
63. Regad, L., Martin, J., Nuel, G., & Camproux, A. (2010). Mining protein lazos using a structural alphabet and statistical exceptionalism. *BMC Bioinformatics*, 11(75), 732-737.
64. Rigden, D., Mosolov, V., & Galperin, M. (2002). Sequence conservation in the chagasin family suggests a common trend in cysteine proteinase binding by unrelated protein inhibitors. *Protein Sci.*, 11(8), 1971-1977.
65. Sánchez Burgos, G., Mezquita Vega, R., Escobedo Ortegón, J., Ramírez Sierra, M., Arjona Torres, A., Ouaisi, A., y otros. (2007). Comparative evaluation of therapeutic DNA vaccines against *Trypanosoma cruzi* in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, 50(3), 333-341.
66. Seid, C., Jones, K., Pollet, J., Keegan, B., & Hudspeth, E. (2017). Cysteine mutagenesis improves the production without abrogating antigenicity of a recombinant protein vaccine candidate for human chagas disease. *Hum Vaccin Immunother.*, 13, 621-633.
67. Sorensen, H., & Mortensen, K. (2005). Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 4(1), 1-8.
68. Sperandio da Silva, G., Felix Mediano, M., & Hasslocher-Moreno, A. (2014). A Clinical Adverse Drug Reaction Prediction Model for Patients with Chagas Disease Treated with Benznidazole. *Antimicrob Agent Chemoter.*, 58(11), 6371-6377.
69. Strub, C., Alies, A., Lougarre, F., Ladurantie, G., Czaplicki, T., & Fournier, K. (2004). Mutation of exposed hydrophobic amino acids to arginine to increase protein stability. *BMC Biochem*, 5(9), 87-94.

70. Teh-Poot, C., Tzec-Arjona, E., Martínez Vega, P., Ramírez Sierra, M., Rosado Vallado, M., & Dumonteil, E. (2015). From genome screening to creation of vaccine against *Trypanosoma cruzi* by use of immunoinformatics. *J Infect Dis.*, *211*(2), 258-266.
71. Vallejo, M., Montenegro, P., & Reyes, P. (2002). How much does the medical treatment of chronic chagasic cardiopathy cost?: Direct costs in a cardiology referral center. *Arch. Cardiol. Mex.*, *72*(2), 129-137.
72. Vianna Martins, A., Gomes, A., Gomes de Mendoza, E., Lopes Rangel Fietto, J., LA, S., de Almeida Oliveira, M., y otros. (2012). Biology of *Trypanosoma cruzi*: An update. *Infectio.*, *16*(1), 45-58.
73. Villanueva Lizama, L., Cruz Chan, J., Aguilar Cetina, A., Herrera Sanchez, L., Ortega-Lopez, J., Bottazzi, M., y otros. (2018). *Trypanosoma cruzi* vaccine candidate antigens Tc24 and TSA-1 recall memory immune response associated with HLA-A and -B supertypes in Chagasic chronic patients from Mexico. *PLoS Negl Trop Dis.*, *12*(1), 1-21.
74. Wang, S., Pandey, K., & McKerrow, J. (2007). The structure of chagasin in complex with a cysteine protease clarifies the binding mode and evolution of an inhibitor family. *Structure*, *15*(5), 535-543.
75. Wang, S., Pandey, K., Scharfstein, J., & McKerrow, J. (2007). The Structure of Chagasin in Complex with a Cysteine Protease Clarifies the Binding Mode and Evolution of an Inhibitor Family. *Structure*, *15*, 535-543.
76. Wendel, S., Brener, Z., Camargo, M., & Rassi, A. (1992). Chagas Disease (American Trypanosomiasis): Its Impact on Transfusion and Clinical Medicine. *Soc Bras Hemoter ISBT*, *572*(23), 5-12.
77. Werner, A. (1999). Tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Parasitología al día*, *23*(4), 536-540.

78. Wrightsman, R., Dawson, B., Fouts, D., & Manning, J. (1994). Identification of immunodominant epitopes in *Trypanosoma cruzi* trypomastigote surface antigen-1 protein that mask protective epitopes. *J Immunol*, 157(3), 3148-3154.
79. Zapata Estrella, H., Hummel Newell, C., Sánchez Burgos, G., Escobedo Ortegón, J., Ramírez Sierra, M., Arjona Torres, A., y otros. (2006). Control of *Trypanosoma cruzi* infection and changes in T cell populations induced by a therapeutic DNA vaccine in mice. *Immunology Letters*, 103(2), 186-191.
80. Zapata Estrella, H., Hummel-Newell, C., Sánchez Burgos, G., Escobedo Ortegón, J., Ramírez Sierra, M., Arjona Torres, A., y otros. (2006). Control of *Trypanosoma cruzi* infection and changes in T-cell populations induced by a therapeutic DNA vaccine in mice. *Imminol Lett.*, 103(2), 186-191.
81. Zhou, H., Hoess, R., & DeGrado, W. (1996). In vitro evolution of thermodynamically stable turns. *Nat Struct Biol.*, 3(5), 446-451.

# 12. APÉNDICES

## 12.1 APÉNDICE 1

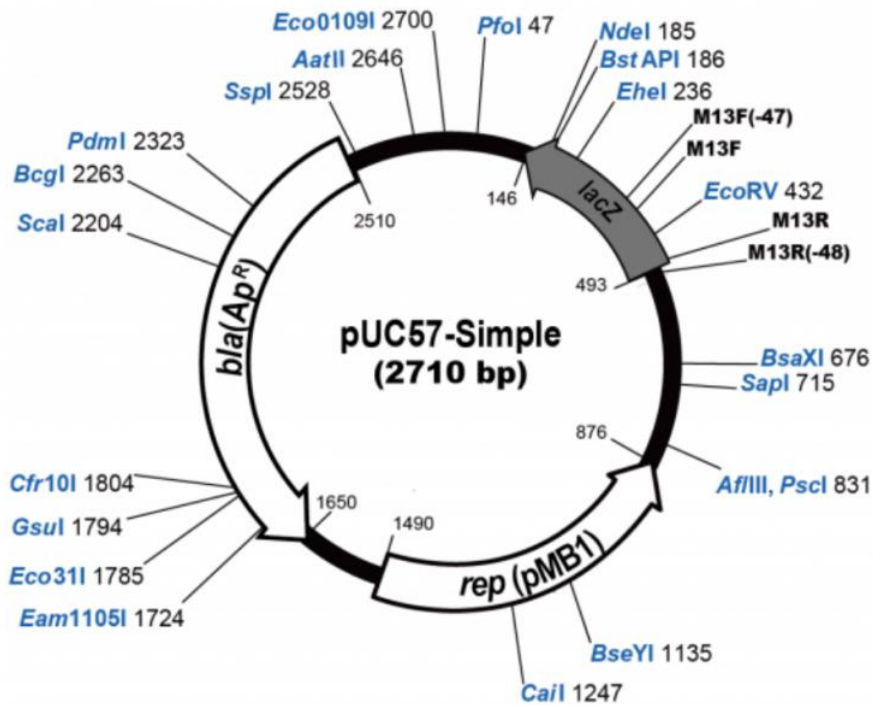


Figura 24. Mapa del vector pUC57.

## 12.2 APÉNDICE 2

Tabla 4. Reacciones de digestión de pCri 8a, pUC57-Q8, pUC57-Q20 y pUC57-Q45 con NcoI y XhoI.

Reactivo	pCri 8a (μL)	pUC57-Q8 (μL)	pUC57-Q20 (μL)	pUC57-Q45 (μL)
DNA	25	17	17	16
NcoI	0.5	0.5	0.5	0.5
XhoI	0.5	0.5	0.5	0.5
Buffer 3.1	5	5	5	5
H <sub>2</sub> O inyectable	19	27	27	28
Volumen final	50	50	50	50

### 12.3 APÉNDICE 3

Tabla 5. *Reacciones de ligación de los genes Q8, Q20 y Q45 en el vector de expresión pCri 8a.*

Reactivo	Q8 (μL)	Q20 (μL)	Q45 (μL)
Inserto	4	7	6
Vector	6	6	6
Buffer	2	2	2
DNA ligasa T4	0.5	0.5	0.5
H <sub>2</sub> O inyectable	7.5	4.5	5.5
Volumen final	20	20	20

### 12.4 APÉNDICE 4

Tabla 6. *Composición de los amortiguadores de lavado y solubilización de los cuerpos de inclusión de Q20 y Q45.*

Etapa	Componentes	Concentración
Buffer de lavado I	Tris-HCl pH 8.0	20 mM
	NaCl	500 mM
	Urea	2 M
	Tritón X-100	2% v/v
Buffer de lavado II	Tris-HCl pH 8.0	20 mM
	DTT	1 mM
	Tritón X-114*	2 M
	*Se disuelve en frío	
Buffer de lavado III	Tris-HCl pH 8.0	20 mM
Buffer de solubilización	Tris-HCl pH 8.0	20 mM
	NaCl	500 mM
	Urea	8 M
	β-MeOH	1 mM
	Imidazol	5 mM



12.5 APÉNDICE 5

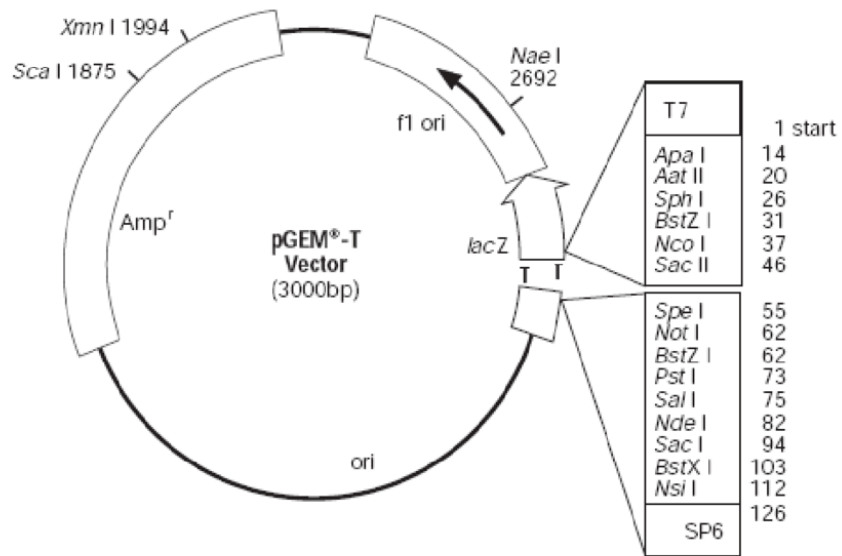


Figura 25. Mapa del vector de expresión pCri 7b.

12.6 APÉNDICE 6

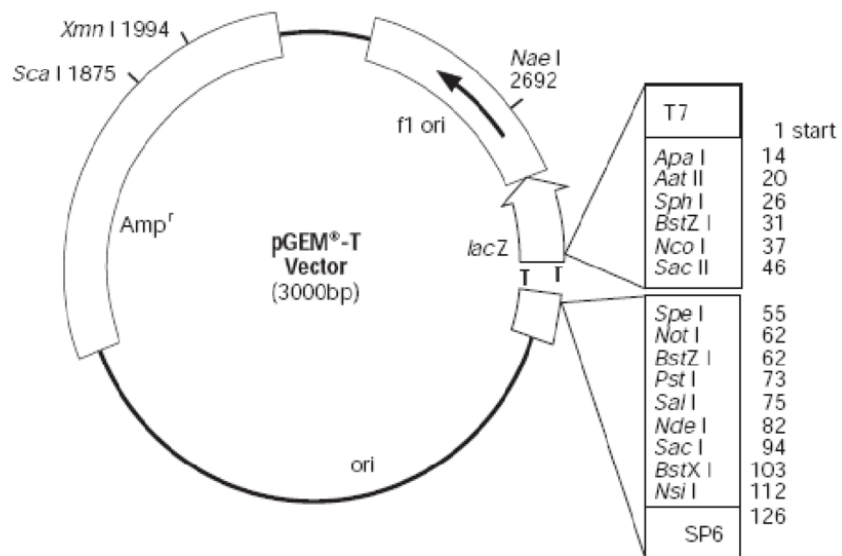


Figura 26. Mapa del vector de clonación pGEM-T.

## 12.7 APÉNDICE 7

Tabla 7. Reacciones de digestión de las construcciones *pGEM-T-TSA-1-DNH<sub>2</sub>*, *pGEM-T-TSA-1-DCOOH* y *pCri 7b* con *NdeI* y *XhoI*.

Reactivo	pCri 7b (μL)	pGEM-T-TSA-1-DNH <sub>2</sub> (μL)	pGEM-T-TSA-1-DCOOH (μL)
DNA	25	25	25
NdeI	1	1	1
XhoI	1	1	1
Buffer 3.1	5	5	5
H <sub>2</sub> O inyectable	18	18	18
Volumen final	50	50	50

## 12.8 APÉNDICE 8

Tabla 8. Reacciones de ligación de los genes *DNH<sub>2</sub>* y *DCOOH* en el vector de expresión *pCri 7b*.

Reactivo	pGEM-T-TSA-1-DNH <sub>2</sub> (μL)	pGEM-T-TSA-1-DCOOH (μL)
Inserto	1.5	2
Vector	3.9	3.9
Buffer	1.5	1.5
DNA ligasa T4	0.4	0.4
H <sub>2</sub> O inyectable	7.7	7.2
Volumen final	15	15

12.9 APÉNDICE 9

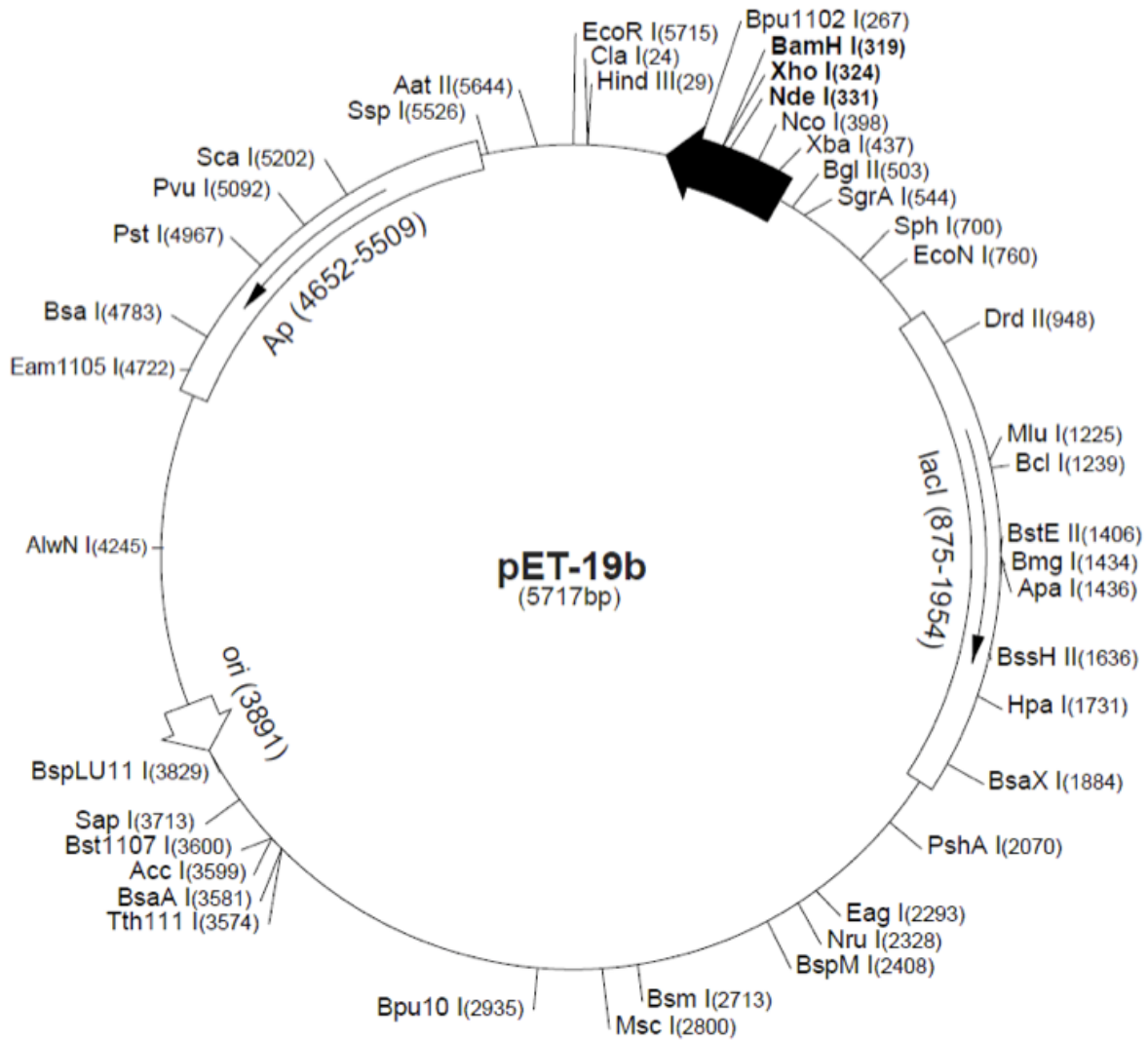


Figura 27. Mapa del vector de expresión pET-19b.

## 12.10 APÉNDICE 10

**Tabla 9. Composición de amortiguadores de lavado y solubilización de los cuerpos de inclusión de  $DNH_2$  y  $DCOOH$  de TSA-1.**

<b>Etapa</b>	<b>Componentes</b>	<b>Concentración</b>
<b>Buffer de lavado I</b>	Tris-HCl pH 8.0	20 mM
	NaCl	500 mM
	Urea	2 M
	Tritón X-100	2% v/v
<b>Buffer de lavado II</b>	Tris-HCl pH 8.0	20 mM
	DTT	1 mM
	Gnd-HCl	2 M
<b>Buffer de lavado III</b>	Tris-HCl pH 8.0	20 mM
	DTT	1 mM
	Tritón X-114	1% v/v
<b>Buffer de lavado IV</b>	Tris-HCl pH 8.0	20 mM
<b>Buffer de solubilización</b>	Tris-HCl pH 8.0	20 mM
	NaCl	500 mM
	Urea	8 M
	B-MeOH	1mM
	Imidazol	5 mM

## 12.11 APÉNDICE 11

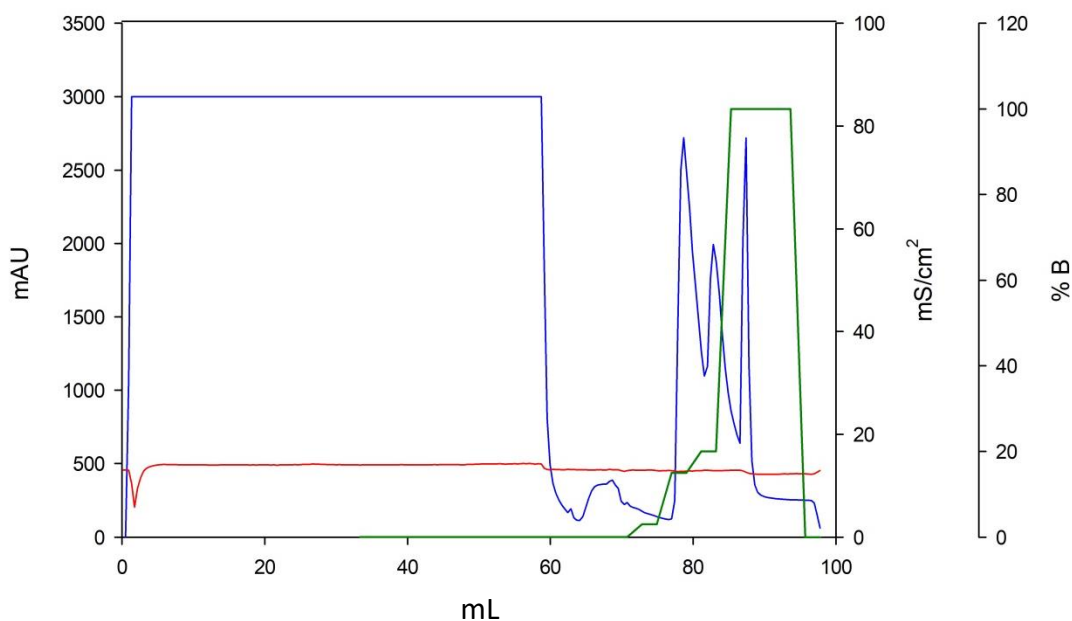
Tabla 10. Evaluación bioinformática de proteínas quiméricas multiepitopo.

Nombre	L2	L3	L4	L6	No. a.a	Porcentaje de identidad	Alergenicidad	Mw teórico (Da)	PI teórico	Reticulocitos de mamífero	Vida media teórica (h)					Probabilidad de solubilidad en <i>E. coli</i> (%)
											Levadura	<i>E. coli</i>	Índice de estabilidad	Índice alifático	Gravy	
Q1			E2	E1	114	73	Probablemente no alérgica	12514.29	6.5	30	>20	>10	31.37	75.18	-0.121	2
Q2			E3	E1	114	77	Probablemente no alérgica	12699.41	6.18	30	>20	>10	38.81	73.51	-0.278	0
Q3			E4	E1	114	70	Probablemente no alérgica	12728.45	6.17	30	>20	>10	33.23	71.75	-0.157	0.1
Q4			E5	E1	115	80	Probable alérgeno	12770.49	6.03	30	>20	>10	35.44	77.13	-0.197	99.8
Q5			E1	E2	114	75	Probablemente no alérgica	12514.29	6.5	30	>20	>10	32.11	75.18	-0.121	2
Q6			E3	E2	114	84	Probablemente no alérgica	12529.22	6.5	30	>20	>10	32.79	72.63	-0.217	0
Q7			E4	E2	114	70	Probablemente no alérgica	12558.26	6.5	30	>20	>10	27.21	70.88	-0.096	0.6
Q8			E5	E2	115	77	Probablemente no alérgica	12600.3	6.27	30	>20	>10	29.47	76.26	-0.137	100
Q9			E1	E3	114	70	Probablemente no alérgica	12699.41	6.18	30	>20	>10	38.81	73.51	-0.278	0
Q10			E2	E3	114	77	Probablemente no alérgica	12529.22	6.5	30	>20	>10	32.04	72.63	-0.217	0
Q11			E4	E3	114	72	Probablemente no alérgica	12743.38	6.18	30	>20	>10	33.9	69.21	-0.253	0
Q12			E5	E3	115	84	Probablemente no alérgica	12785.42	6.03	30	>20	>10	36.11	74.61	-0.292	0.5
Q13			E1	E4	114	77	Probablemente no alérgica	12728.45	6.17	30	>20	>10	33.97	71.75	-0.157	0.1
Q14			E2	E4	114	87	Probablemente no alérgica	12558.26	6.5	30	>20	>10	27.21	70.88	-0.096	0.6
Q15			E3	E4	114	80	Probablemente no alérgica	12743.38	6.18	30	>20	>10	34.65	69.21	-0.253	0
Q16			E5	E4	115	84	Probablemente no alérgica	12814.46	6.02	30	>20	>10	31.32	72.87	-0.172	99.5
Q17			E1	E5	115	77	Probablemente no alérgica	12770.49	6.03	30	>20	>10	35.44	77.13	-0.197	99.8
Q18			E2	E5	115	91	Probablemente no alérgica	12600.3	6.27	30	>20	>10	28.73	76.26	-0.137	99.9

Vida media teórica (h)																
Nombre	L2	L3	L4	L6	No. a.a	Porcentaje de identidad	Alergenicidad	Mw teórico (Da)	PI teórico	Reticulocitos de mamífero	Levadura	<i>E. coli</i>	Índice de inestabilidad	Índice alifático	Gravy	Probabilidad de solubilidad en <i>E. coli</i> (%)
Q19			E3	E5	115	72	Probablemente no alérgica	12785.42	6.03	30	>20	>10	36.11	74.61	-0.292	0.5
Q20			E4	E5	115	80	Probablemente no alérgica	12814.46	6.02	30	>20	>10	30.58	72.87	-0.172	99.5
Q21			E2 Y E3	E1	128	75	Probablemente no alérgica	13949.89	6.18	30	>20	>10	32.42	76.09	-0.176	0
Q22			E4 Y E5	E1	129	77	Probablemente no alérgica	14235.13	5.8	30	>20	>10	30.53	76.28	-0.136	0.2
Q23			E2 Y E5	E1	129	70	Probablemente no alérgica	14020.97	6.03	30	>20	>10	28.88	79.3	-0.105	62.7
Q24			E3 Y E4	E1	128	77	Probablemente no alérgica	14164.05	5.92	30	>20	>10	31.98	73.05	-0.208	0
Q25			E2 Y E4	E1	128	73	Probable alérgeno	13978.93	6.17	30	>20	>10	25.36	74.53	-0.068	0
Q26			E3 Y E5	E1	129	75	Probablemente no alérgica	14206.09	5.82	30	>20	>10	35.46	77.83	-0.243	0
Q27			E1 Y E3	E2	128	76	Probablemente no alérgica	13949.89	6.18	30	>20	>10	33.08	76.09	-0.176	0
Q28			E4 Y E5	E2	129	72	Probablemente no alérgica	14064.94	6.02	30	>20	>10	25.21	75.5	-0.082	45.6
Q29			E1 Y E5	E2	129	72	Probablemente no alérgica	14020.97	6.03	30	>20	>10	29.54	79.3	-0.105	62.7
Q30			E3 Y E4	E2	128	71	Probablemente no alérgica	13993.86	6.18	30	>20	>10	26.62	72.27	-0.153	0
Q31			E1 Y E4	E2	128	78	Probablemente no alérgica	13978.93	6.17	30	>20	>10	26.02	74.53	-0.068	0
Q32			E3 Y E5	E2	129	76	Probablemente no alérgica	14035.9	6.03	30	>20	>10	30.14	77.05	-0.189	0.1
Q33			E1 Y E2	E3	128	82	Probablemente no alérgica	13949.89	6.18	30	>20	>10	31.17	76.09	-0.176	0
Q34			E4 Y E5	E3	129	82	Probablemente no alérgica	14250.06	5.81	30	>20	>10	31.12	74.03	-0.221	0
Q35			E1 Y E5	E3	129	74	Probablemente no alérgica	14206.09	5.82	30	>20	>10	35.46	77.83	-0.243	0
Q36			E2 Y E4	E3	128	76	Probable alérgeno	13993.86	6.18	30	>20	>10	25.96	72.27	-0.153	0
Q37			E1 Y E4	E3	128	82	Probablemente no alérgica	14164.05	5.92	30	>20	>10	31.98	73.05	-0.208	0
Q38			E2 Y E5	E3	129	82	Probablemente no alérgica	14035.9	6.03	30	>20	>10	29.48	77.05	-0.189	0.1

Vida media teórica (h)																
Nombre	L2	L3	L4	L6	No. a.a	Porcentaje de identidad	Alergenicidad	Mw teórico (Da)	PI teórico	Reticulocitos de mamífero	Levadura	<i>E. coli</i>	Índice de inestabilidad	Índice alifático	Gravy	Probabilidad de solubilidad en <i>E. coli</i> (%)
Q39			E1 Y E2	E4	128	82	Probablemente no alérgica	13978.93	6.17	30	>20	>10	26.86	74.53	-0.068	0
Q40			E3 Y E5	E4	129	85	Probablemente no alérgica	14250.06	5.81	30	>20	>10	31.78	74.03	-0.221	0
Q41			E1 Y E5	E4	129	90	Probablemente no alérgica	14235.13	5.8	30	>20	>10	31.19	76.28	-0.136	0.2
Q42			E2 Y E3	E4	128	90	Probablemente no alérgica	13993.86	6.18	30	>20	>10	28.71	72.27	-0.153	0
Q43			E1 Y E3	E4	128	74	Probablemente no alérgica	14164.05	5.92	30	>20	>10	34.74	73.05	-0.208	0
Q44			E2 Y E5	E4	129	78	Probablemente no alérgica	14064.94	6.02	30	>20	>10	25.21	75.5	-0.082	45.6
Q45			E1 Y E2	E5	129	76	Probablemente no alérgica	14020.97	6.03	30	>20	>10	28.22	79.3	-0.105	62.7
Q46			E3 Y E4	E5	129	82	Probablemente no alérgica	14250.06	5.81	30	>20	>10	29.63	74.03	-0.221	0
Q47			E1 Y E4	E5	129	76	Probablemente no alérgica	14235.13	5.8	30	>20	>10	29.03	76.28	-0.136	0.2
Q48			E2 Y E3	E5	129	79	Probable alérgeno	14035.9	6.03	30	>20	>10	30.06	77.05	-0.189	0.1
Q49			E1 Y E3	E5	129	78	Probablemente no alérgica	14206.09	5.82	30	>20	>10	36.04	77.83	-0.243	0
Q50			E2 Y E4	E5	129	84	Probablemente no alérgica	14064.94	6.02	30	>20	>10	23.05	75.5	-0.082	45.6
Q51	E4	E5	E1 Y E2	E3	135	77	Probablemente no alérgica	15001.23	5.8	30	>20	>10	22.88	91.63	0.09	0

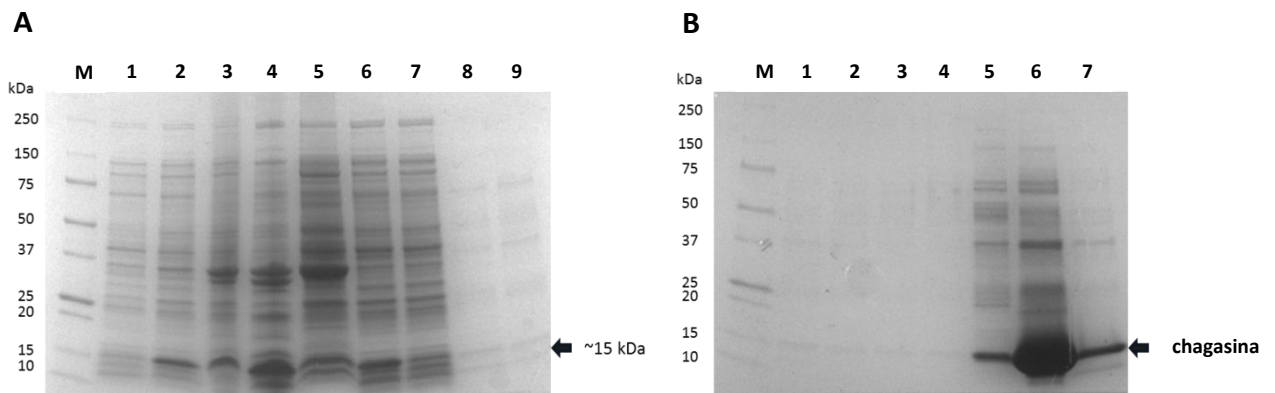
## 12.12 APÉNDICE 12



**Figura 28. Purificación por cromatografía de afinidad a níquel de la proteína chagasina de *Trypanosoma cruzi*.** La fracción soluble de 5 g de biomasa obtenida después de 6 h de inducción con IPTG (1mM), se aplicó a una columna *HisTrap FF* de 1 mL (VC) y después de una etapa de lavado con el amortiguador A (20 mM Tris-HCl H 8.0, 300 mM de NaCl, 1 mM de PMSF, 5% de glicerol) la proteína unida a la columna se eluyó con diferentes concentraciones de imidazol. En el cromatograma se muestra la absorbancia a 280 nm (mAu; línea azul), la fuerza iónica (mS/cm<sup>2</sup>; línea roja) y concentración de imidazol (%B; línea verde) en función del volumen (mL). Para mayor detalle consultar el apartado 6.5.4. de la sección *Materiales y Métodos*.



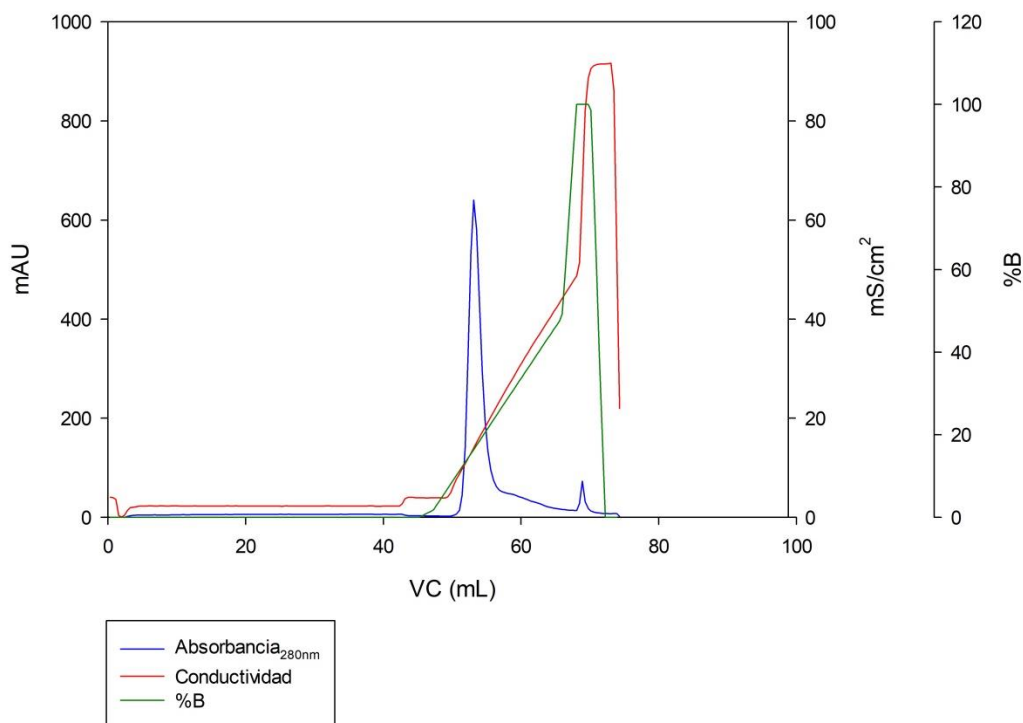
## 12.13 APÉNDICE 13



**Figura 29. Análisis electroforético de la purificación de chagasina por afinidad a níquel.**

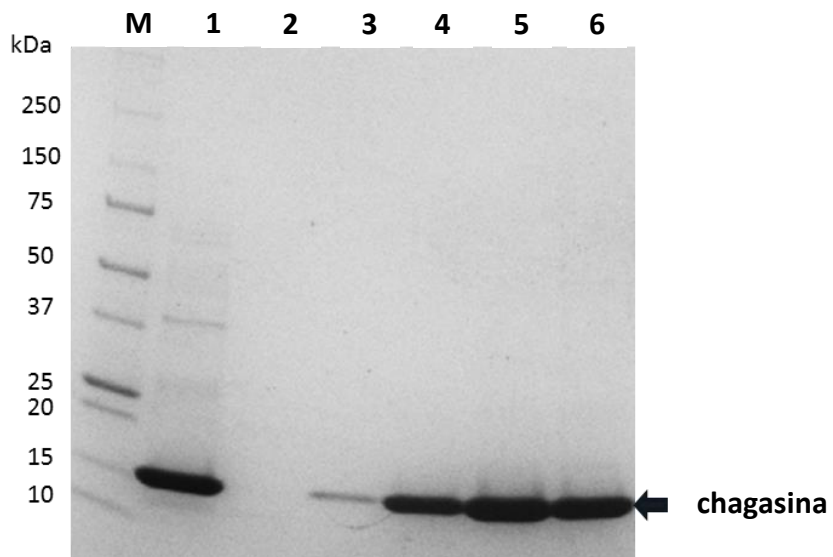
Análisis por SDS PAGE al 15% de fracciones representativas de la purificación de chagasina por cromatografía de afinidad a níquel (Figura 28). Panel **A**: **M**: Marcador de peso molecular. **1**: Sin inducir. **2**: inducida. **3**: Pellet. **4**: Fracción insoluble. **5**: Fracción soluble. **6**: Muestra aplicada al cromatógrafo. **7**: Fracción no unida. **8**: Fracción 3. **9**: Fracción 4. Panel **B**: **M**: Marcador de peso molecular. **1**: Fracción 5. **2**: Fracción 6. **3**: Fracción 7. **4**: Fracción 8. **5**: Fracción 22. **6**: Fracción 23. **7**: Fracción 24.

## 12.14 APÉNDICE 14



**Figura 30. Purificación por cromatografía de intercambio iónico de la chagasina de *Trypanosoma cruzi*.** La fracción enriquecida de chagasina y diluída 1:10 con amortiguador A (20 mM de Tris-HCl pH 8.0, 1 mM de PMSF y 5% de glicerol) se aplicó a una columna *HisTrap QFF* de 1 mL. La chagasina se eluyó mediante un gradiente lineal de 0-1 M de NaCl. En el cromatograma se muestra la absorbancia a 280 nm (mAu; línea azul), la fuerza iónica (mS/cm<sup>2</sup>; línea roja) y concentración de NaCl (%B; línea verde) en función del volumen (mL). Para mayor detalle consultar el apartado 6.5.4 de la sección *Materiales y Métodos*.

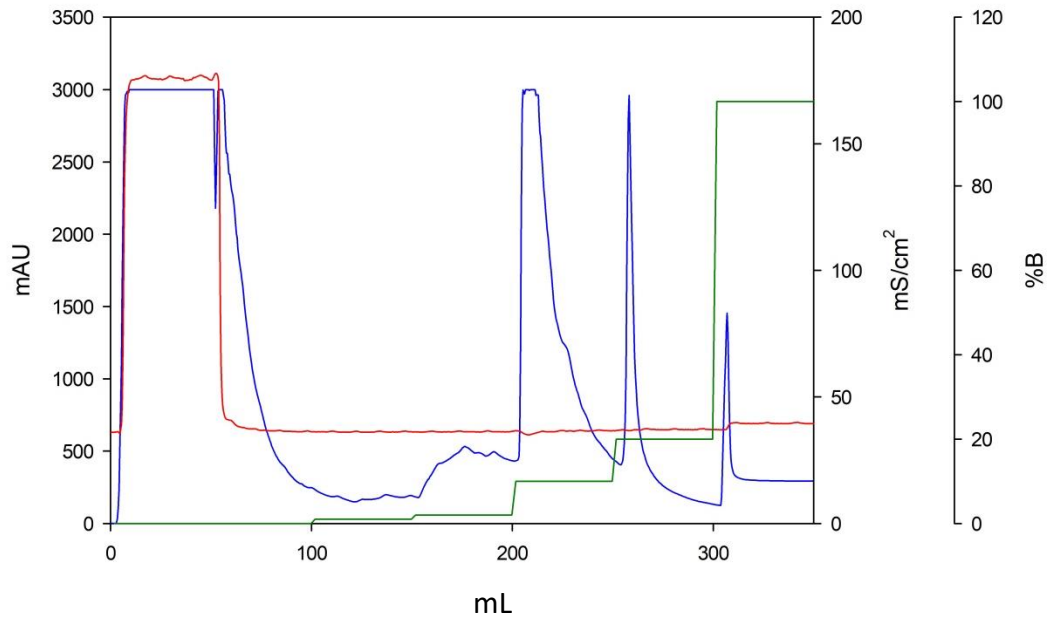
**12.15 APÉNDICE 15**



**Figura 31. Análisis electroforético de la purificación de chagasina por intercambio iónico.**

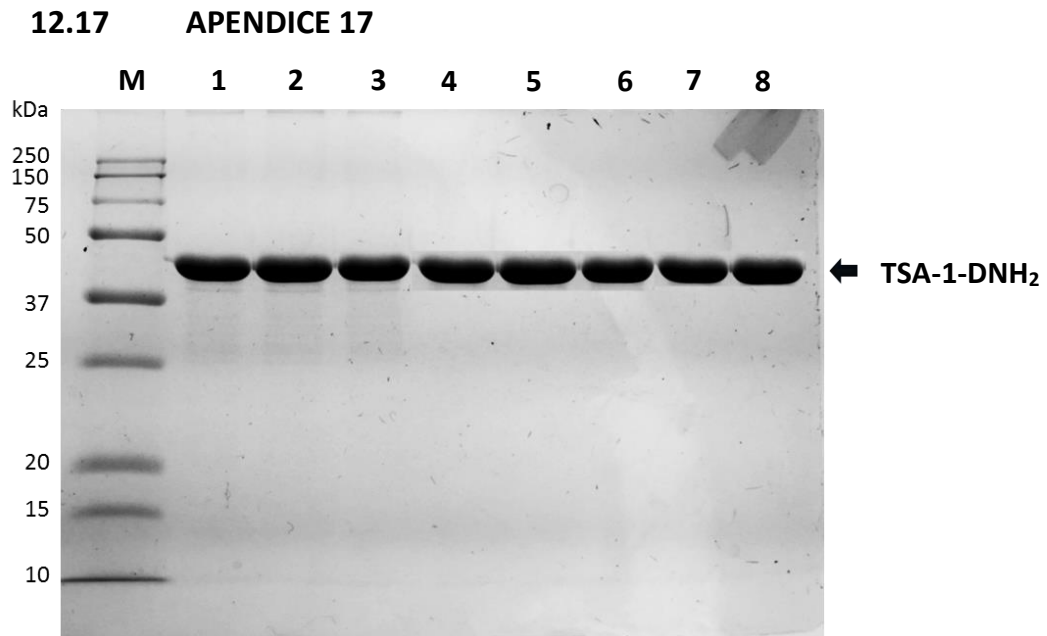
Análisis por SDS PAGE al 15% de fracciones representativas de la purificación de chagasina por cromatografía de intercambio iónico (**Figura 30**). **M**: Marcador de peso molecular. **1**: Muestra aplicada al cromatógrafo. **2**: Fracción no unida. **3**: Fracción 13. **4**: Fracción 14. **5**: Fracción 15. **6**: Fracción 16.

## 12.16 APÉNDICE 16



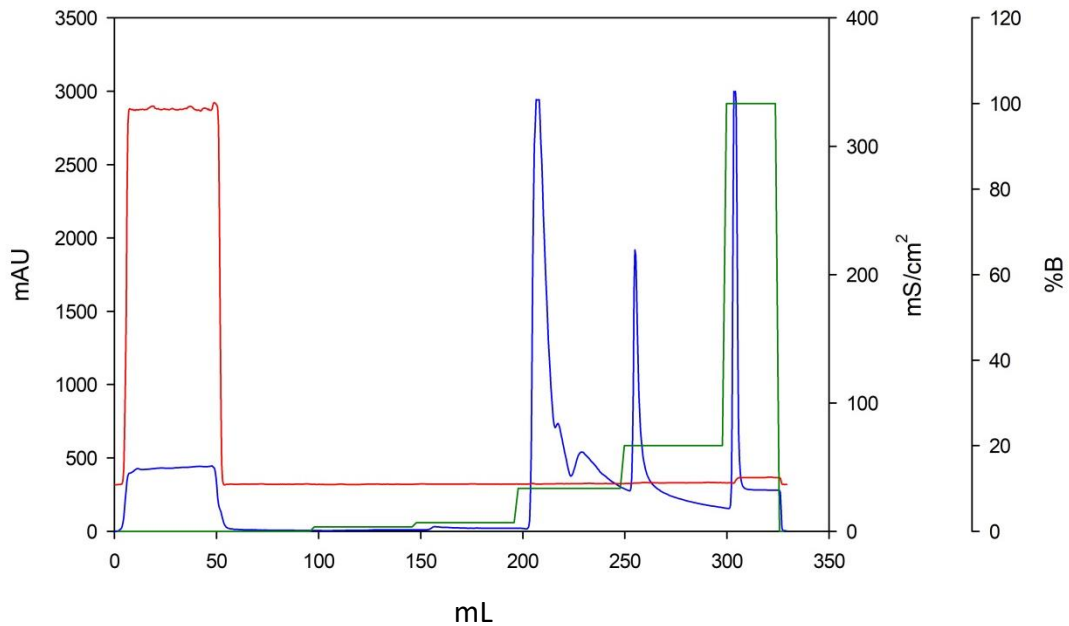
**Figura 32. Purificación por cromatografía de afinidad a níquel de la proteína TSA-1-DNH<sub>2</sub>.**

El extracto proteico solubilizado de 5 g de biomasa obtenida después de 6 h de inducción con IPTG (1 mM), se aplicó a una columna *BioScale Profinity IMAC Cartridge* de 5 mL (VC) y después de una etapa de lavado con el amortiguador A (220 mM de Tris-HCl pH 8.0, 500 mM de NaCl, 8 M de urea, 1 mM de  $\beta$ -MeOH y 5 mM de imidazol) la proteína unida a la columna se eluyó con diferentes concentraciones de imidazol. En el cromatograma se muestra la absorbancia a 280nm (mAu; línea azul), la fuerza iónica (mS/cm<sup>2</sup>; línea roja) y concentración de imidazol (%B; línea verde) en función del volumen (mL). Para mayor detalle consultar el apartado 6.5.3 de la sección *Materiales y Métodos*.

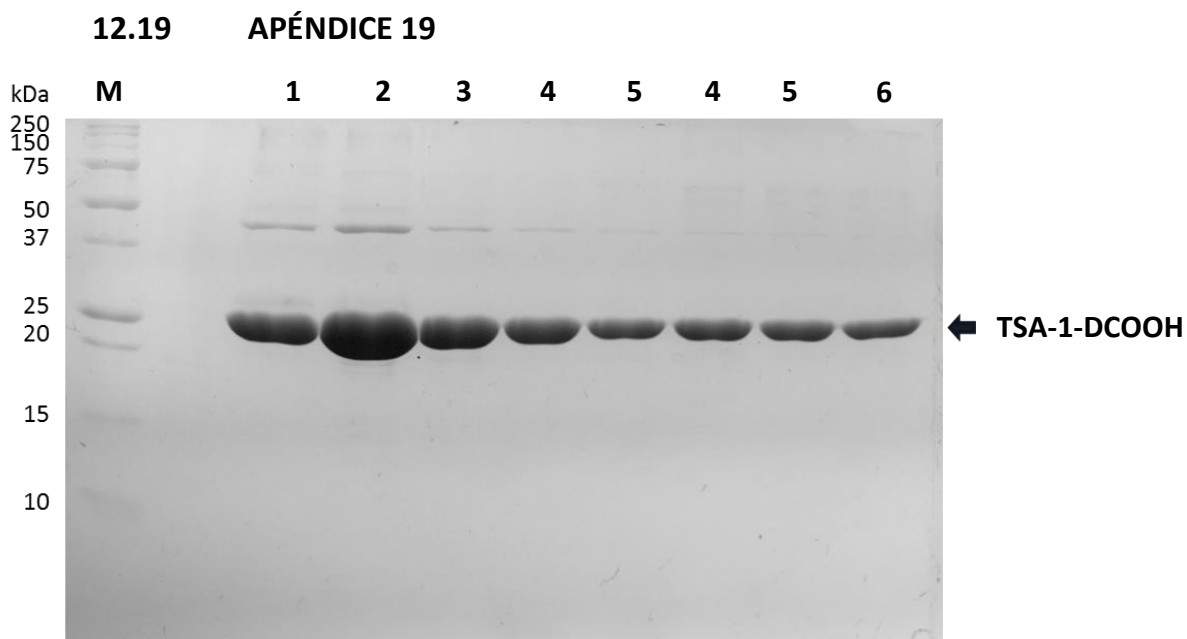


**Figura 33. Análisis electroforético de la purificación de TSA-1-DNH<sub>2</sub> por afinidad a níquel.**  
 Análisis por SDS PAGE al 15% de fracciones representativas de la purificación de TSA-1-NH por cromatografía de afinidad a níquel (**Figura 32**). **M:** Marcador de peso molecular. **1:** Fracción 32. **2:** Fracción 33. **3:** Fracción 34. **4:** Fracción 35. **5:** Fracción 42. **6:** Fracción 43. **7:** Fracción 52. **8:** Fracción 53.

## 12.18 APÉNDICE 18



**Figura 34. Purificación por cromatografía de afinidad a níquel de la proteína TSA-1-DCOOH.** El extracto proteico solubilizado de 5 g de biomasa obtenida después de 6 h de inducción con IPTG (1 mM) se aplicó a una columna *BioScale Profinity IMAC Cartridge* de 5 mL (VC) y después de una etapa de lavado con el amortiguador A (220 mM de Tris-HCl pH 8.0, 500 mM de NaCl, 8 M de urea, 1 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol y 5 mM de imidazol) la proteína unida a la columna se eluyó con diferentes concentraciones de imidazol. En el cromatograma se muestra la absorbancia a 280 nm (mAu; línea azul), la fuerza iónica (mS/cm<sup>2</sup>; línea roja) y concentración de imidazol (%B; línea verde) en función del volumen (mL). Para mayor detalle consultar el apartado 6.5.3 de la sección *Materiales y Métodos*.



**Figura 35. Análisis electroforético de la purificación de TSA-1-DCOOH por afinidad a níquel.** Análisis por SDS PAGE al 15% de fracciones representativas de la purificación de TSA-1-DCOOH por cromatografía de afinidad a níquel (**Figura 34**). **M:** Marcador de peso molecular. **1:** Fracción 32. **2:** Fracción 33. **3:** Fracción 34. **4:** Fracción 37. **5:** Fracción 42. **6:** Fracción 43. **7:** Fracción 52. **8:** Fracción 53.

# 13. METODOLOGÍAS GENERALES

## 13.1 MICROORGANISMOS, MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Las técnicas de DNA recombinante se llevaron a cabo por manipulaciones en la cepa DH5 $\alpha$  de *Trypanosoma cruzi* crecida en el medio LB (Triptona 1%, Extracto de levadura 1%, NaCl 1%) ampicilina (100  $\mu$ g / mL) o kanamicina (50  $\mu$ g / mL) como antibióticos de selección.

Las enzimas de restricción requeridas y la T4-DNA ligasa se obtuvieron de New England Biolabs (Ipswich, MA, EUA). Los anticuerpos  $\alpha$ -TSA-1 y  $\alpha$ -chagasina se produjeron en el Laboratprio de la Dra. Rossana Arroyo Verástegui. Todos los demás productos químicos fueron de grado analítico y obtenido de diversas fuentes.

## 13.2 EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO POR LISIS ALCALINA

La extracción de DNA plasmídico se llevó a cabo por el método de lisis alcalina (Sambrook 1989) utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN). Brevemente, se partió de la biomasa de un cultivo de 5 ml de *E. coli* en medio LB, la cual se separó por centrifugación a 13000 rpm por 5 min. El paquete celular obtenido se resuspendió en 250  $\mu$ L del amortiguador de resuspensión P1 frío y se le adicionaron 250  $\mu$ L del amortiguador de lisis P2, se mezcló suavemente y se dejó reposar por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 350  $\mu$ L del amortiguador de neutralización N3 frío y se incubó durante 5 min a 4°C. El lisado celular obtenido se centrifugó a 13,000 rpm por 15 min a 4°C, se descartó la pastilla y se continuó trabajando con el sobrenadante, el cual se aplicó por decantación a una columna QIAprep Spin. La columna se centrifugó por 60 s y la elución se descartó. A continuación la columna se lavó con 750  $\mu$ L de amortiguador PE y se centrifugó nuevamente a 13000 rpm por 60 s. La elución se descartó y la columna se centrifugó por un minuto más para completa eliminación del amortiguador. Finalmente se aplicaron en la columna 30  $\mu$ L de agua grado biología molecular, dejando incubar por 1 minuto, seguido del cual se centrifugó por 60 s. La elución se almacenó a -20°C.



### **13.3 PREPARACIÓN DE CÉLULAS QUIMIOCOMPETENTES**

Un cultivo de células de *E. coli* se creció en 5 mL de medio LB, si es necesario se adiciona antibiótico (Ampicilina 100 µg / mL, kanamicina 50 µg / mL) y se incubó a 37 °C a 250 rpm durante 16 h. Posteriormente, se tomaron 1.6 mL del cultivo para inocular un matraz con 50 mL de medio LB y se incubó a 37 °C a 250 rpm hasta que alcanzó una DO<sub>600</sub> de 0.6. Después, se centrifugó el cultivo a 13000 rpm durante 10 min a 4°C, la pastilla se recuperó y se resuspendió con 5 mL de CaCl<sub>2</sub> (0.1 M). Enseguida, se incubó en hielo durante 2 h. Se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min a 4°C, la pastilla se resuspendió con 5 mL de CaCl<sub>2</sub> (0.1 M) estéril y se agregaron 88 µL de DMSO por cada mililitro de células en CaCl<sub>2</sub>. Se hicieron alícuotas de 100 µL de células calcio-competentes y se almacenaron a -80 °C hasta su uso (Sambrook 1989).

### **13.4 TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS QUIMIOCOMPETENTES DE *E. COLI***

La transformación de células calcio-competentes de *E. coli* DH5α y BL21 (DE3) se realizó por el método de choque térmico. Las células competentes (50 µL) se transformaron con la mezcla transformante (ligación o plásmido) y se incubaron a 4°C por 30 min. Posteriormente, se sometieron a choque térmico por 45 s a 42°C, inmediatamente se incubaron en hielo por 3 min y después se adicionó 450 µl de medio LB sin antibiótico, la suspensión se incubó a 37°C por 1 h con agitación y se sembró en placas de agar LB con el antibiótico (ampicilina 100 µg/mL, o kanamicina 50 µg/mL) y se incubaron a 37°C por 16 h.

### **13.5 ANÁLISIS DEL DNA EN GEL DE AGAROSA**

Las diferentes muestras de DNA se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.2%, aplicándose 100 V durante 60 min en una cámara de electroforesis Owl B1A EasyCast® (ThermoFisher Scientific). Las bandas se visualizaron por tinción con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) y la captura de imágenes se realizó utilizando un fotodocumentador GelDoc™XR+ Gel Documentation System (BioRad). Como marcador de tamaño molecular se utilizaron los marcadores de 1kb DNA Ladder y 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

### **13.6 PURIFICACIÓN DE DNA A PARTIR DE GELES DE AGAROSA**

Los fragmentos de DNA correspondientes a los diferentes vectores de expresión y a los genes *Q8*, *Q20* y *Q45*, previamente digeridos con las diferentes enzimas de restricción, se purificaron a partir de un gel de agarosa al 1.2% por el método de extracción y purificación de DNA recomendado por el kit “Qiagen gel extraction kit”, para su posterior ligación.

### **13.7 SELECCIÓN DE CLONAS TRANSFORMANTES PARA CONFIRMAR LA PRESENCIA DE LA CONSTRUCCIÓN DE INTERÉS**

Las colonias resultantes de la transformación con cada una de las construcciones que presentaron resistencia al antibiótico de selección fueron crecidas en 5 mL de medio LB con la adición de antibiótico (ampicilina 100 µg/mL o kanamicina 50 µg/mL) y se incubaron por 16 h a 37°C y 200 rpm en una incubadora con agitación orbital, posteriormente se les extrajo el DNAp utilizando del kit “QIAprep Spin Miniprep” (QIAGEN). Con el DNAp obtenido se hicieron digestiones con las enzimas de restricción para confirmar la presencia del inserto correspondiente a los genes *Q8*, *Q20* y *Q45*.

### **13.8 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR SDS-PAGE**

Para el análisis de proteínas de las muestras mediante SDS-PAGE, se adicionó 100 µL del amortiguador de muestra 2x SDS-PAGE a 100 µL de muestra y se hirvieron por 5 min. Las muestras procesadas de esta manera se analizaron en un gel de poliacrilamida al 15% de 0.75 mm de espesor en una cámara de electroforesis vertical (BioRad Mini-Protean® II Cell). Se utilizaron los marcadores de peso molecular “Precision Plus Protein Standards” (BioRad), y las bandas se visualizaron por tinción con el colorante azul de Coomassie.

### **13.9 ENSAYOS DE WESTERN BLOT**

En un recipiente con amortiguador de transferencia (Tris-HCl 25 mM, Glicina 0.2M, Metanol 20%) frío se dispusieron los materiales en forma de “sandwich” (evitando la formación de burbujas) en el siguiente orden: lado oscuro de la unidad de transferencia, esponja, papel filtro Mini Trans-Blot® Filter paper (BioRad), gel de poliacrilamida a ser transferido

(colocando los marcadores de peso molecular del lado derecho), membrana de nitrocelulosa (NC) de 0.45  $\mu\text{m}$  (BioRad), papel filtro Mini Trans-Blot® Filter paper (BioRad), esponja y lado transparente de la unidad de transferencia. Enseguida, se colocó el lado negro de la unidad de transferencia coincidiendo con la cara negra de la cámara de transferencia, la cual se colocó en el tanque de transferencia junto con la unidad de enfriamiento. La transferencia se realizó con agitación suave en frío a 60 V durante 30 min y se aumentó el voltaje a 90 V durante 60 min. Para verificar la transferencia, las membranas de NC se tiñeron con solución de rojo de Ponceau (Sigma), se hizo la captura de la foto en el fotodocumentador y se destiñeron con una solución de PBS 1x; después las membranas se bloquearon con leche descremada en polvo (Svelifly, Nestlé) al 10% en una solución de PBS 1x-Tween 20 al 0.05% toda la noche en agitación suave a 4°C. Las membranas previamente bloqueadas se incubaron a 4°C con agitación durante 16 h con el respectivo anticuerpo primario (anticuerpo  $\alpha$ -TSA-1 o  $\alpha$ -chagasina policlonal [dilución 1:1000]) en PBS 1x-Tween 20 al 0.05% y leche descremada en polvo al 5%. Las membranas se lavaron cinco veces con una solución de PBS 1x-Tween 20 al 0.1% durante 10 min a temperatura ambiente, para eliminar el exceso de anticuerpo y disminuir inespecificidad durante el revelado. Las membranas de nitrocelulosa se incubaron por 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario respectivo (IgG anti-conejo o IgG anti-ratón acoplado a peroxidasa) (BioRad) a una dilución 1:3000 en PBS 1x-Tween 20 al 0.05%-leche al 2.5%. La membrana se lavó cinco veces por 10 min a temperatura ambiente con PBS 1x-Tween 20 al 0.1 % y se revelaron por colorimetría con 4-cloro-1-naftol (BioRad) y acorde a lo recomendado por el fabricante.