



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Evaluación de antígenos de
*Trypanosoma cruzi***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:

LAURA ALEJANDRA HERNÁNDEZ LÓPEZ

ASESORA: Dra. Rebeca Georgina Manning Cela

COASESORA: M. en C. Maritere Domínguez Rojas

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES



ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Evaluación de antígenos de *Trypanosoma cruzi*

Que presenta la pasante: **Laura Alejandra Hernández López**
Con número de cuenta: **312308535** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

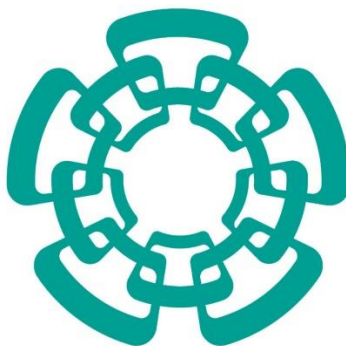
Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 30 de Agosto de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

| | NOMBRE | FIRMA |
|----------------------|--------------------------------------|-------|
| PRESIDENTE | M.V.Z. Gloria Josefina Ortiz Gasca | |
| VOCAL | M.V.Z. Angel Germán Martínez Sosa | |
| SECRETARIO | M. en C. Maritere Domínguez Rojas | |
| 1er. SUPLENTE | QFB. Nydia Berenice González Angeles | |
| 2do. SUPLENTE | LBD. Larisa Andrea González Salcedo | |

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).



El presente trabajo se realizó en el departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. Rebeca Georgina Manning Cela.

DEDICATORIA

A mis abuelos y madre.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Rebeca Manning por permitirme ser parte de su laboratorio, compartirme sus conocimientos y guiarme en este trabajo.

A la Maestra Maritere Domínguez por sus enseñanzas a lo largo de mi carrera y asesoramiento.

A mis amigos de la FESC (Aldo, Vanessa, Diana, Valeria, Diego, Javier, Alejandro y Salvador) por su apoyo, compañía y amistad a lo largo de la carrera, brindándome recuerdos inolvidables.

A Claudia, David y Maggie por su gran apoyo, paciencia y amistad.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|----|
| 1. Índice de figuras | 1 |
| 2. Índice de tablas..... | 4 |
| 3. Abreviaturas y símbolos..... | 5 |
| 4. Resumen..... | 8 |
| 5. Introducción..... | 9 |
| 5.1. Antecedentes generales..... | 9 |
| 5.1.1. Enfermedad de Chagas..... | 9 |
| 5.1.2. Epidemiología de la Enfermedad de Chagas..... | 10 |
| 5.1.3. Generalidades de <i>T. cruzi</i> | 10 |
| 5.1.4. Características estructurales de <i>T. cruzi</i> | 11 |
| 5.1.5. Genoma de <i>T. cruzi</i> | 14 |
| 5.1.6. Diversidad de <i>T. cruzi</i> | 15 |
| 5.1.6.1. Variabilidad génica..... | 16 |
| 5.1.6.2. Variabilidad biológica..... | 17 |
| 5.1.6.3. Variabilidad clínica..... | 17 |
| 5.1.6.4. Variabilidad epidemiológica..... | 18 |
| 5.2. Antecedentes directos..... | 21 |
| 5.2.1. Diagnóstico de la ECH | 21 |
| 5.2.2. Antígenos de <i>T. cruzi</i> | 22 |
| 6. Justificación..... | 27 |
| 7. Hipótesis..... | 27 |
| 8. Objetivos..... | 28 |
| 8.1. General..... | 28 |
| 8.2. Particular..... | 28 |
| 9. Materiales y Métodos..... | 29 |
| 9.1. Parásitos..... | 29 |
| 9.2. Bacterias..... | 29 |
| 9.3. Cultivos celulares | 30 |
| 9.4. Sueros humanos..... | 30 |
| 9.5. Diseño de oligonucleótidos | 30 |
| 9.6. Análisis bioinformático | 30 |
| 9.7. PCR | 31 |
| 9.8. Electroforesis de ADN en gel de agarosa..... | 32 |
| 9.9. Purificación de amplicones | 32 |

| | |
|--|-----|
| 9.10. Clonación..... | 32 |
| 9.10.1. Adenilación..... | 33 |
| 9.10.2. Reacción de ligación..... | 33 |
| 9.10.3. Transformación bacteriana | 35 |
| 9.10.4. PCR de colonia | 36 |
| 9.10.5. Extracción de ADN de plásmido por método modificado de Hirt..... | 36 |
| 9.10.6. Extracción de ADN de plásmido por lisis alcalina | 36 |
| 9.10.7. Digestión enzimática | 37 |
| 9.11. Secuenciación..... | 38 |
| 9.12. Obtención de proteínas recombinantes | 39 |
| 9.13. Purificación de proteínas recombinantes | 40 |
| 9.14. SDS-PAGE | 40 |
| 9.14.1. Tinción con azul de Coomassie | 41 |
| 9.14.2. <i>Western blot</i> | 41 |
| 9.15. Extracción de proteínas totales | 42 |
| 9.16. Cuantificación de proteínas | 42 |
| 9.17. ELISA..... | 43 |
| 10. Resultados..... | 44 |
| 10.1. Diseño de oligonucleótidos y análisis bioinformático | 44 |
| 10.2. Análisis <i>in silico</i> de las secuencias nucleótidas y de aminoácidos de Q4D2C9, Q4CY87, Q4DYC3, Q4CQ28 y Q4DC56..... | 59 |
| 10.3. Clonación de las secuencias codificantes a Q4D2C9, Q4CY87, Q4DYC3, Q4CQ28 y Q4DC56 en el vector pGEM®-T EASY | 74 |
| 10.4. Subclonación de insertos en pRSET®-A | 78 |
| 10.5. Secuenciación de construcciones pRSET-A-YC3 y pRSET-A-Q28..... | 83 |
| 10.6. Obtención y purificación de proteínas recombinantes His-Q4DYC3 e His-Q4CQ28 | 85 |
| 10.7. Evaluación de antigenicidad de la proteína recombinante His-Q4DYC3 ante sueros reactivos a <i>T. cruzi</i> | 90 |
| 11. Discusión | 95 |
| 12. Conclusión | 102 |
| 13. Perspectivas..... | 102 |
| 14. Referencias..... | 103 |

1. ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|--------------------|--|----|
| Figura 1 | Ciclo biológico de <i>T. cruzi</i> | 11 |
| Figura 2 | Estructuras celulares de <i>T. cruzi</i> en sus diferentes estadios..... | 12 |
| Figura 3 | Estructura del cinetoplasto de <i>T. cruzi</i> en sus diferentes fases | 13 |
| Figura 4 | Familias multigénicas del genoma de <i>T. cruzi</i> | 14 |
| Figura 5 | Distribución eco-epidemiológica de las seis DTU de <i>T. cruzi</i> en el continente Americano | 18 |
| Figura 6 | Mapa de restricción del vector pGEM®-T Easy | 34 |
| Figura 7 | Mapa de restricción del vector pRSET®-A | 35 |
| Figura 8 | Alineación de los oligonucleótidos diseñados para la secuencia codificante a la proteína Q4D2C9 ante el genoma de <i>T. cruzi</i> CL Brener | 46 |
| Figura 9 | Alineación de los oligonucleótidos diseñados para la secuencia codificante a la proteína Q4CY87 ante el genoma de <i>T. cruzi</i> CL Brener | 47 |
| Figura 10 | Alineación de los oligonucleótidos diseñados para la secuencia codificante a la proteína Q4DYC3 ante el genoma de <i>T. cruzi</i> CL Brener | 48 |
| Figura 11 | Alineación de los oligonucleótidos diseñados para la secuencia codificante a la proteína Q4CQ28 ante el genoma de <i>T. cruzi</i> CL Brener | 49 |
| Figura 12.1 | Alineación de los oligonucleótidos diseñados para la secuencia codificante a la proteína Q4DC56 ante el genoma de <i>T. cruzi</i> CL Brener | 51 |
| Figura 12.2 | Continuación: Alineación de los oligonucleótidos diseñados para la secuencia codificante a la proteína Q4DC56 ante el genoma de <i>T. cruzi</i> CL Brener | 52 |
| Figura 13 | Fusión de la secuencia codificante a la proteína Q4D2C9 con la bandera de histidinas presente en el vector pRSET® A | 53 |
| Figura 14 | Fusión de la secuencia codificante a la proteína Q4CY87 con la bandera de histidinas presente en el vector pRSET® A | 54 |
| Figura 15 | Fusión de la secuencia codificante a la proteína Q4DYC3 con la bandera de histidinas presente en el vector pRSET® A | 55 |
| Figura 16 | Fusión de la secuencia codificante a la proteína Q4CQ28 con la bandera de histidinas presente en el vector pRSET® A | 56 |
| Figura 17 | Fusión de la secuencia codificante a la proteína Q4DC56 con la bandera de histidinas presente en el vector pRSET® A | 57 |
| Figura 18 | Dominios conservados de las proteínas en estudio | 62 |
| Figura 19 | Estructura secundaria probable de la proteína His-Q4D2C9 de <i>T. cruzi</i> NM1- cl1..... | 66 |

| | | |
|------------------|---|----|
| Figura 20 | Estructura secundaria probable de la proteína His-Q4CY87 de <i>T. cruzi</i> NM1-cl1 | 67 |
| Figura 21 | Estructura secundaria probable de la proteína His-Q4DYC3 de <i>T. cruzi</i> NM1-cl1..... | 67 |
| Figura 22 | Estructura secundaria probable de la proteína His-Q4CQ28 de <i>T. cruzi</i> NM1-cl1..... | 68 |
| Figura 23 | Estructura secundaria probable de la proteína His-Q4DC56 de <i>T. cruzi</i> NM1-cl1 | 69 |
| Figura 24 | Estructura terciaria probable de la proteína His-Q4D2C9 de <i>T. cruzi</i> NM1-cl1 | 70 |
| Figura 25 | Estructura terciaria probable de la proteína His-Q4CY87 de <i>T. cruzi</i> NM1-cl1 | 71 |
| Figura 26 | Estructura terciaria probable de la proteína His-Q4DYC3 de <i>T. cruzi</i> NM1-cl1 | 72 |
| Figura 27 | Estructura terciaria probable de la proteína His-Q4CQ28 de <i>T. cruzi</i> NM1-cl1 | 73 |
| Figura 28 | Estructura terciaria probable de la proteína His-Q4DC56 de <i>T. cruzi</i> NM1-cl1 | 74 |
| Figura 29 | Amplificación por PCR de las secuencias codificantes a Q4D2C9, Q4CY87, Q4DYC3, Q4CQ28 y Q4DC56 | 75 |
| Figura 30 | Extracción de ADN de plásmido de las construcciones pGEM-TE-2C9, pGEM-TE-Y87, pGEM-TE-YC3, pGEM-TE-Q28 y pGEM-TE-C56 por el método modificado de Hirt | 76 |
| Figura 31 | Extracción de ADN de plásmido de las construcciones pGEM-TE-2C9, pGEM-TE-Y87, pGEM-TE-YC3, pGEM-TE-Q28 y pGEM-TE-C56 mediante lisis alcalina | 77 |
| Figura 32 | Amplificación de <i>Q4DC56</i> utilizando los oligonucleótidos específicos..... | 78 |
| Figura 33 | Purificación del vector pRSET®-A y los insertos Q4DYC3, Q4CY87 y Q4CQ28 | 79 |
| Figura 34 | Extracción de ADN de plásmido de la construcción pRSET-A-YC3 por el método modificado de Hirt | 80 |
| Figura 35 | Identificación de construcciones pRSET-A-Q28 a través de PCR de colonia | 81 |
| Figura 36 | Extracción de las construcciones pRSET-A-YC3 y pRSET-A-Q28 mediante lisis alcalina | 82 |

| | | |
|------------------|--|----|
| Figura 37 | Extracción de las construcciones a secuenciar pRSET-A-YC3 y pRSET-A-Q28 a través de QIAprep® Spin Miniprep Kit | 83 |
| Figura 38 | Identificación de construcciones pRSET-A-YC3 a través de PCR de colonia | 85 |
| Figura 39 | Identificación de construcciones pRSET-A-Q28 a través de PCR de colonia | 86 |
| Figura 40 | Curva de inducción de la proteína His-Q4DYC3 a diferentes tiempos y temperaturas | 87 |
| Figura 41 | Curva de inducción de la proteína His-Q4DYC3 a 30°C durante 1 hora con diferentes concentraciones de IPTG | 87 |
| Figura 42 | Curva de inducción de la proteína His-Q4CQ28 a diferentes tiempos y temperaturas | 88 |
| Figura 43 | Purificación de His-Q4DYC3 con perlas Ni-sefarosa | 89 |
| Figura 44 | Purificación del control negativo His-pRSET-A con perlas Ni-sefarosa | 89 |
| Figura 45 | Evaluación de reactividad de muestras serológicas ante <i>T. cruzi</i> | 91 |
| Figura 46 | Evaluación del reconocimiento de la proteína recombinante His-Q4DYC3 por sueros reactivos y no reactivos a <i>T. cruzi</i> | 92 |
| Figura 47 | Evaluación del reconocimiento de la proteína recombinante His-Q4DYC3 por sueros reactivos y no reactivos a <i>T. cruzi</i> | 94 |

2. ÍNDICE DE TABLAS

| | | |
|-----------------|---|----|
| Tabla 1 | Clasificación actual de <i>T. cruzi</i> | 16 |
| Tabla 2 | Cepas de <i>T. cruzi</i> presentes en México | 19 |
| Tabla 3 | Antígenos de <i>T. cruzi</i> con potencial diagnóstico | 22 |
| Tabla 4 | Enzimas de restricción flanqueantes de las secuencias codificantes en estudio | 38 |
| Tabla 5 | Enzimas de restricción utilizadas para corroborar las construcciones a secuenciar en pRSET®-A | 38 |
| Tabla 6 | Oligonucleótidos utilizados en la secuenciación de las construcciones en estudio | 39 |
| Tabla 7 | Oligonucleótidos utilizados en la amplificación por PCR de las secuencias codificantes a las proteínas Q4D2C9, Q4CY87, Q4DYC3, Q4CQ28 y Q4DC56 | 45 |
| Tabla 8 | Estructuras tipo horquilla de posible formación en los oligonucleótidos de las secuencias codificantes a las proteínas Q4D2C9, Q4CY87, Q4DYC3, Q4CQ28 y Q4DC56, obtenidas mediante el programa OligoAnalyzer | 58 |
| Tabla 9 | Valores de ΔG de homodímeros y heterodímeros de posible formación entre los oligonucleótidos de las secuencias codificantes a las proteínas Q4DYC3, Q4CQ28, Q4DC56, Q4D2C9 y Q4CY87, obtenidas mediante el programa OligoAnalyzer | 59 |
| Tabla 10 | Información general de las proteínas Q4D2C9, Q4CY87, Q4DYC3, Q4CQ28 y Q4DC56 de <i>T. cruzi</i> | 60 |
| Tabla 11 | Probables modificaciones postraduccionales de las proteínas Q4D2C9, Q4CY87, Q4DYC3, Q4CQ28 y Q4DC56 de <i>T. cruzi</i> , indicando aminoácidos involucrados y su posición | 63 |
| Tabla 12 | Genes ortólogos de las secuencias codificantes a las proteínas Q4DYC3 y Q4CQ28 | 84 |

3. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

| | |
|---------------|--|
| % | Porcentaje |
| μL | Microlitro |
| μm | Micrometro |
| ® | Marca registrada |
| °C | Grados centígrados |
| aa | Aminoácidos |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ADNr | Ácido desoxirribonucleico ribosomal |
| AMPc | Adenosín monofosfato cíclico |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ARNm | Ácido ribonucleico mensajero |
| ARNr | Ácido ribonucleico ribosomal |
| AS | Antisentido |
| BCA | Ácido bicinconínico (del inglés, <i>Bicinchoninic acid</i>) |
| BLAST | Basic Local Alignment Search Tool |
| BSA | Albúmina de suero bovino (del inglés, <i>Bovine serum albumin</i>) |
| CAMKII | Calmodulina proteín-quinasa II |
| CDC | Centros de control y prevención de enfermedades (del inglés, <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>) |
| CP | Codón de paro |
| Cu | Cobre |
| DMEM | Medio Eagle modificado de Dulbecco (del inglés, <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>) |
| dNTPs | Desoxinucleótidos trifosfatados |
| DTU | Unidades Discretas de Tipificación (del inglés, <i>Discreet Typing Units</i>) |
| ECH | Enfermedad de Chagas |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| ELISA | Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (del inglés, <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>) |
| ER | Enzima de restricción |
| ExPASy | Sistema experto de análisis de proteínas (del inglés, <i>Expert Protein Analysis System</i>) |
| FAD | Flavín adenín dinucleótido |
| FN | Falso negativo |
| FP | Falso positivo |
| G | Ges |
| GC | Guanina-Citosina |
| GMPc | Guanosín monofosfato cíclico |
| gARNs | Ácidos ribonucleicos guías no codificantes |
| His | Histidinas |
| IFI | Inmunofluorescencia indirecta |
| IgG | Inmunoglobulina G |
| IH | Inhibición de la aglutinación |

| | |
|-----------------|--|
| IMAC | Cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (del inglés, <i>Immobilized metal affinity chromatography</i>) |
| InDRE | Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos |
| IPTG | Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido |
| K-ADN | Ácido desoxirribonucleico del cinetoplasto |
| Kb | Kilobases |
| Kcal | Kilocalorias |
| KDa | Kilodaltons |
| KEGG | Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (del inglés, <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>) |
| L | Longitud |
| LB | Medio Luria Betani |
| LIT | Infusión Hígado Triptosa (del inglés, <i>Liver Infusion Tryptose</i>) |
| LSSP-PCR | Reacción en cadena de la polimerasa de baja astringencia de oligonucleótidos específicos (del inglés, <i>Low-stringency single specific primer PCR</i>) |
| M | Concentración molar |
| mA | Miliamperes |
| Mb | Mega bases |
| mL | Mililitro |
| mM | Concentración micromolar |
| N | Concentración normal |
| NAD | Nicotinamida adenina dinucleótido |
| NF | Nucleótidos flanqueantes |
| ng | Nanogramos |
| Ni | Níquel |
| nm | Nanometros |
| Nt | Nucleótidos |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| ON | Toda la noche (del inglés, <i>Over Night</i>) |
| On | Oligonucleótido |
| OPD | O-diclorhidrato de fenilendiamina |
| pb | Pares de bases |
| PBS | Buffer Fosfato Salino (del inglés, <i>Phosphate buffered saline</i>) |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, <i>Polymerase Chain Reaction</i>) |
| PIR | Expediente de información de proteínas (del inglés, <i>Protein Information Resource</i>) |
| Pre-ARNm | Pre-ácido ribonucleico mensajero |
| RAPD | Análisis de ADN polimórfico y amplificando al azar (del inglés, <i>Random amplified polymorphic DNA</i>) |
| REBASE | Base de datos de enzimas de restricción (del inglés, <i>Restriction Enzyme Database</i>) |
| RFLP | Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (del inglés, <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>) |
| Rpm | Revoluciones por minuto |
| S | Sentido |

| | |
|----------------------|---|
| SAS | Secuencia anotada por estructura (del inglés, <i>Sequence Annotated by Structure</i>) |
| SDS | Dodecilsulfato sódico (del inglés, <i>Sodium dodecyl sulfate</i>) |
| SDS-PAGE | Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (del inglés, <i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>) |
| SFB | Suero fetal bovino |
| SR | Sitio de restricción |
| TBE | Tris-Borato-EDTA |
| TE | Tris-EDTA |
| ™ | Marca no registrada |
| T_m | Temperatura de fusión |
| U | Unidades enzimáticas |
| UABJO | Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca |
| UFC | Unidades formadoras de colonias |
| UNAM | Universidad Nacional Autónoma de México |
| UniProt | Universal Protein Resource |
| UV | Ultravioleta |
| V | Volts |
| VN | Verdadero negativo |
| VP | Verdadero positivo |
| X-Gal | 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido |
| Z1 | Zimodema 1 |
| Z2 | Zimodema 2 |
| Z3 | Zimodema 3 |
| ΔG | Cambio de la energía libre de Gibbs |

4. RESUMEN

Actualmente, más de 7 millones de personas se encuentran infectadas por *Trypanosoma cruzi*, parásito causante de la Enfermedad de Chagas. El diagnóstico oportuno de esta enfermedad, tanto en fase aguda como crónica, es fundamental para su control y tratamiento; sin embargo, la fase crónica al presentar una baja e intermitente parasitemia, requiere de la identificación indirecta del parásito a través de la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi*. En México el diagnóstico se realiza mediante pruebas comerciales a base de extractos totales o purificados de proteínas del parásito provenientes de otros países endémicos, que poseen alta sensibilidad, pero baja especificidad ante sueros de individuos infectados con cepas de *T. cruzi* mexicanas. Por lo tanto, se propone el uso de antígenos recombinantes autóctonos de nuestro país para la identificación de sueros reactivos a *T. cruzi* provenientes de la misma zona endémica. En el presente trabajo se diseñó un par de oligonucleótidos específicos a cada una de las secuencias codificantes de las proteínas inmunogénicas Q4D2C9, Q4CY87, Q4DCY3, Q4CQ28 y Q4DC56 (identificadas en un trabajo previo del laboratorio en tripomastigotes de distintas cepas mexicanas), para amplificar, clonar y subclonar dichas secuencias en los vectores pGEM®-T Easy y pRSET®-A, respectivamente. Esto con la finalidad de producir proteínas recombinantes fusionadas a una bandera de histidinas y evaluar su antigenicidad ante sueros reactivos y no reactivos a *T. cruzi*. El correcto diseño de oligonucleótidos permitió la clonación de las proteínas en estudio en el vector pGEM®-T Easy, obteniendo las construcciones pGEM-TE-2C9, pGEM-TE-Y87, pGEM-TE-CY3 y pGEM-TE-Q28, a partir de las cuales se subclonaron únicamente los insertos Q4DYC3 y Q4CQ28 en pRSET®-A. Posteriormente, solo la construcción pRSET-A-YC3 fue expresada en *E. coli* BL21(DE3)pLysS, produciendo la proteína recombinante His-Q4DYC3. Finalmente, la evaluación de dicha proteína con sueros reactivos y no reactivos a *T. cruzi* de pacientes mexicanos mostró un bajo reconocimiento de anticuerpos anti-*T. cruzi*, concluyendo que la proteína recombinante His-Q4DYC3 no fue capaz de ser reconocida por muestras serológicas positivas a *T. cruzi*, por si sola.

5. INTRODUCCIÓN

5.1. ANTECEDENTES GENERALES

5.1.1. Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas (ECH), también denominada Tripanosomiasis americana, es una infección parasitaria sistémica causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi* (Rassi, Rassi y Marín, 2010). La principal vía de transmisión de esta enfermedad es vectorial, seguida por otras formas de transmisión menos frecuentes como transfusiones de sangre, trasplante de órganos, accidentes laborales con muestras biológicas de individuos infectados, transmisión congénita y oral (Organización Mundial de la Salud, 2018 y De Fuentes y colaboradores, 2019).

Dicha enfermedad cursa por dos fases, la fase aguda se presenta posterior a la infección, prolongándose por semanas o meses. En este periodo se pueden manifestar o no síntomas inespecíficos, por ejemplo, fiebre, dolor óseo y muscular. Sin embargo, también pueden aparecer lesiones características de la enfermedad como el chagoma de inoculación o el signo de Romaña, éste último consiste en la inflamación del párpado debido a la entrada en la piel y/o mucosas de las heces depositadas por el insecto infectado con *T. cruzi*. Los pacientes en fase aguda pueden aliviarse de manera espontánea o evolucionar a una fase crónica, la cual puede ser asintomática o sintomática. El 70% de los pacientes permanecen en fase crónica asintomática mientras que el 30% evolucionan a la fase sintomática de la enfermedad, desarrollando una afección a nivel cardíaco (cardiomegalia, ictus o eventos tromboembólicos), gastrointestinal (megaesófago o megacolon) o a nivel nervioso (neuritis), siendo este último el menos frecuente (Rassi, Rassi y Marín, 2010; CDC^B, 2016; Aguirre y Sarría, 2018; Murillo, 2018 y Rojo y colaboradores, 2018).

El tratamiento farmacológico prescrito para la ECH consiste en nifurtimox y/o benznidazol. El nifurtimox es un nitrofurano que inhibe la síntesis de ácidos nucleicos y, por lo tanto, el desarrollo intracelular del parásito mediante la producción de radicales libres de oxígeno y metabolitos electrofílicos. Por otra parte, el benznidazol es un compuesto nitroimidazol que genera modificaciones covalentes de biomoléculas de tripomastigotes como ADN, proteínas y lípidos. La tasa de eficacia de dichos fármacos contra la ECH es de aproximadamente 70% en fase aguda y menor al 60% en la fase crónica (Sales y colaboradores, 2017; Murillo, 2018 y Rojo y colaboradores, 2018).

5.1.2. Epidemiología de la Enfermedad de Chagas

Actualmente, se calcula que a nivel mundial de 7 a 8 millones de personas se encuentran infectadas por *T. cruzi*, mostrando un predominio en zonas endémicas de Latinoamérica, siendo México una de ellas. Sin embargo, en las últimas décadas se ha observado la infección con mayor frecuencia en Norteamérica, diversos países europeos y algunos del Pacífico Occidental, debido a la migración de población latinoamericana infectada a dichas regiones del mundo (Rassi, Rassi, Marín, 2010, Organización Mundial de la Salud, 2018 y De Fuentes y colaboradores, 2019). Con frecuencia, aunque no de manera exclusiva, esta enfermedad se desarrolla en zonas rurales y marginadas debido a que los vectores proliferan en casas con paredes de barro, adobe y techos de paja, promoviendo así el contacto humano-vector y aumentando el riesgo de contraer la infección (Rassi, Rassi y Marín, 2010; CDC^A, 2016 y Aguirre y Sarría, 2018). Otros factores que influyen en la prevalencia de la tripanosomiasis americana es la elevada adaptabilidad del insecto vector, es decir, puede habitar diferentes tipos de ambientes y tener gran capacidad de dispersión. De acuerdo con estos factores México presenta una amplia variedad de regiones endémicas de tripanosomiasis americana, siendo los estados de Oaxaca, Yucatán, Chiapas, Guerrero, Hidalgo, Nayarit y Quintana Roo los que han mostrado mayor incidencia con 32 especies de triatominos como vectores. Diecinueve de estas especies pertenecen al género *Triatoma*, 6 al género *Meccus*, 2 al género *Panstrongylus* y 1 especie de los géneros *Belminus*, *Dipetalogaster*, *Eratyrus*, *Paratriatoma* y *Rhodnius* (Medina y colaboradores, 2016, Salazar y colaboradores, 2016 y Rojo y colaboradores, 2018).

5.1.3. Generalidades de *T. cruzi*

T. cruzi, es un protozoo unicelular polimórfico flagelado que pertenece al subfilo Mastigophora, orden Kinetoplastida y familia Trypanosomatidae, que morfológicamente se distingue por la presencia de un orgánulo llamado cinetoplasto. En su ciclo de vida (**Figura 1**) este parásito utiliza como hospederos definitivos a vertebrados como humanos, perros, gatos, roedores, primates, entre otros; mientras que utiliza como vectores a los triatóminos, los cuales son artrópodos hematófagos (Palmezano y colaboradores, 2015 y CDC, 2017).

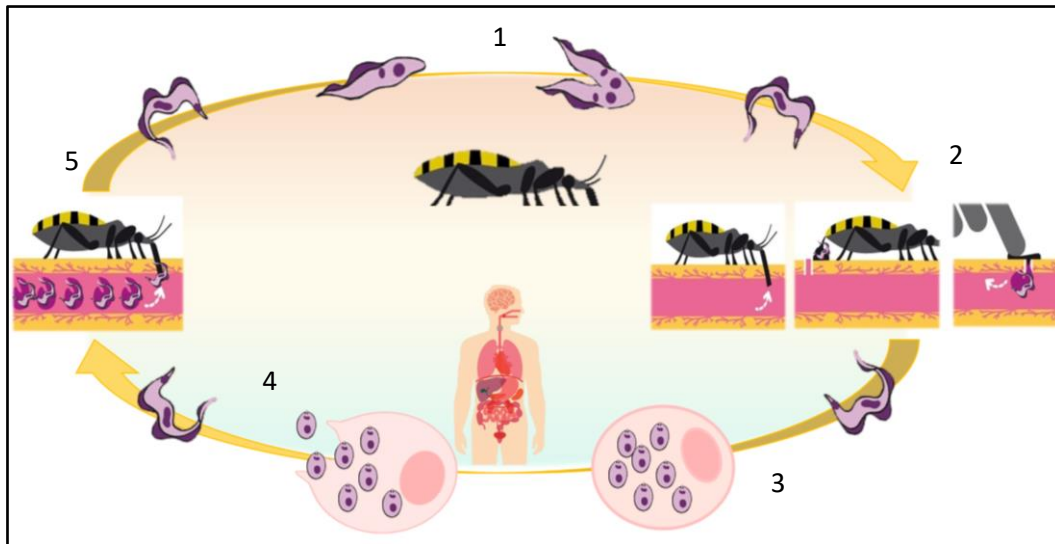


Figura 1. Ciclo biológico de *T. cruzi* (Imagen de autoría propia). En el vector, *T. cruzi* se encuentra en la parte anterior de su intestino en fase de epimastigote (1), estadio que se reproduce por fisión binaria longitudinal al migrar a la parte posterior del intestino y adherirse a la membrana perimicrovilar de las microvellosidades intestinales. Posteriormente, pasan los epimastigotes al recto transformándose en tripomastigotes metacíclicos, fase infectante para los vertebrados. Los triatóminos al entrar en contacto con los vertebrados penetran la piel de éste hasta un vaso sanguíneo para alimentarse y al mismo tiempo que ingieren sangre depositan heces en la piel, las cuales contienen tripomastigotes metacíclicos (2). Estos parásitos pueden entrar con facilidad al organismo por escoriaciones de piel o mucosas intactas e infectar diferentes tipos de células nucleadas, principalmente células nerviosas y musculares. Intracelularmente se produce la transformación de tripomastigotes metacíclicos a amastigotes (3), los cuales se multiplican por fisión binaria longitudinal hasta generar lisis celular, retornando al torrente sanguíneo y diferenciándose a tripomastigotes sanguíneos (4). Este estadio de *T. cruzi* puede infectar células vecinas o ser ingeridos por triatóminos (5) y repetir su ciclo biológico, transformándose en epimastigotes a las pocas horas post-ingestión (CDC, 2017, Rojo y colaboradores, 2018 y De Fuentes y colaboradores, 2019).

5.1.4. Características estructurales de *T. cruzi*

Las principales estructuras de *T. cruzi* (Figura 2) consisten en superficie celular, flagelo y citoesqueleto. Este último alberga diversos orgánulos como el complejo mitocondria-cinetoplasto, glicosomas, calcisomas, inclusiones lipídicas y componentes que participan tanto en vías de endocitosis como en vías de secreción (De Souza, 2009).

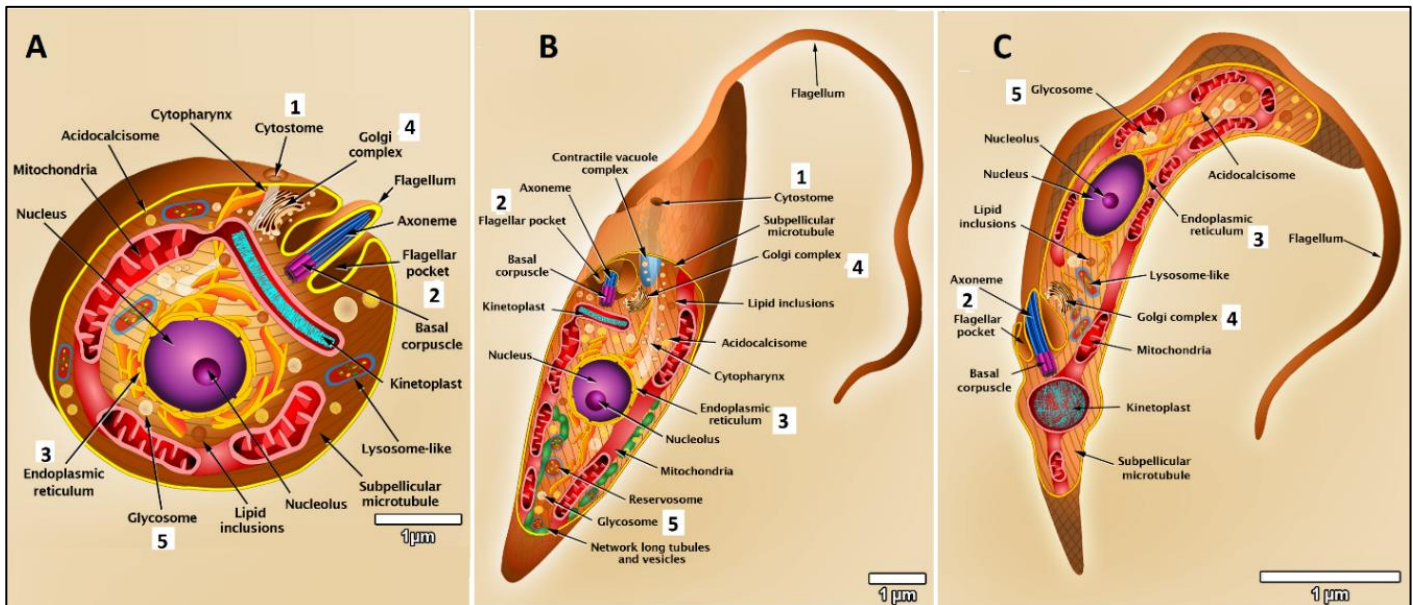


Figura 2. Estructuras celulares de *T. cruzi* en sus diferentes estadios (Teixeira y colaboradores, 2012).

Entre los organelos de este parásito se encuentra el citostoma (1), que es la invaginación de la membrana celular rodeada por microtúbulos subpelliculares en donde se lleva a cabo la vía endocítica del parásito, al igual que en la bolsa flagelar (2) (De Souza, 2009 y De Pablos, 2017). En cuanto a la vía secretora de *T. cruzi*, ésta es realizada por el retículo endoplásmico (3), aparato de Golgi (4) y vesículas del mismo liberadas a través de la bolsa paraflagelar. Mientras la ruta glucolítica se produce principalmente en el orgánulo esférico llamado glicosoma (5), el cual contiene una extensa variedad de enzimas involucradas en el metabolismo de los peróxidos, ácidos grasos, purinas, CO₂, entre otros (De Souza, 2002 y De Pablos, 2017).

A lo largo de la superficie de *T. cruzi* se pueden distinguir tres macrodominios: el cuerpo del parásito, el flagelo y la bolsa paraflagelar. A su vez dichos macrodominios presentan microdominios de acuerdo con la distribución de partículas intramembranales, encontrándose el collar flagelar en la región basal del flagelo, la zona de unión flagelo-cuerpo celular y la zona del citostoma, la cual solo se observa en fases de epimastigote y amastigote. El flagelo de *T. cruzi* se localiza en la base del cuerpo celular, formado por nueve tripletes de microtúbulos periféricos y un par central. La longitud de esta estructura varía de acuerdo con la fase en la que se encuentre el parásito, midiendo 1µm en amastigotes intracelulares y hasta 20µm en tripomastigotes. Durante los cambios de fase de *T. cruzi* el flagelo emerge lateralmente al cuerpo del parásito produciendo la imagen de una membrana ondulante. Una red de microtúbulos y microfibrillas forman el citoesqueleto del parásito, el cual ayuda a mantener y distribuir los diferentes orgánulos a lo largo del cuerpo celular. Entre estos orgánulos se encuentra el complejo mitocondria-cinetoplasto (Figura 3), situado cerca del núcleo, cuya forma y organización varía según el estadio en que se encuentre el parásito (De Souza, 2009 y De Pablos, 2017).

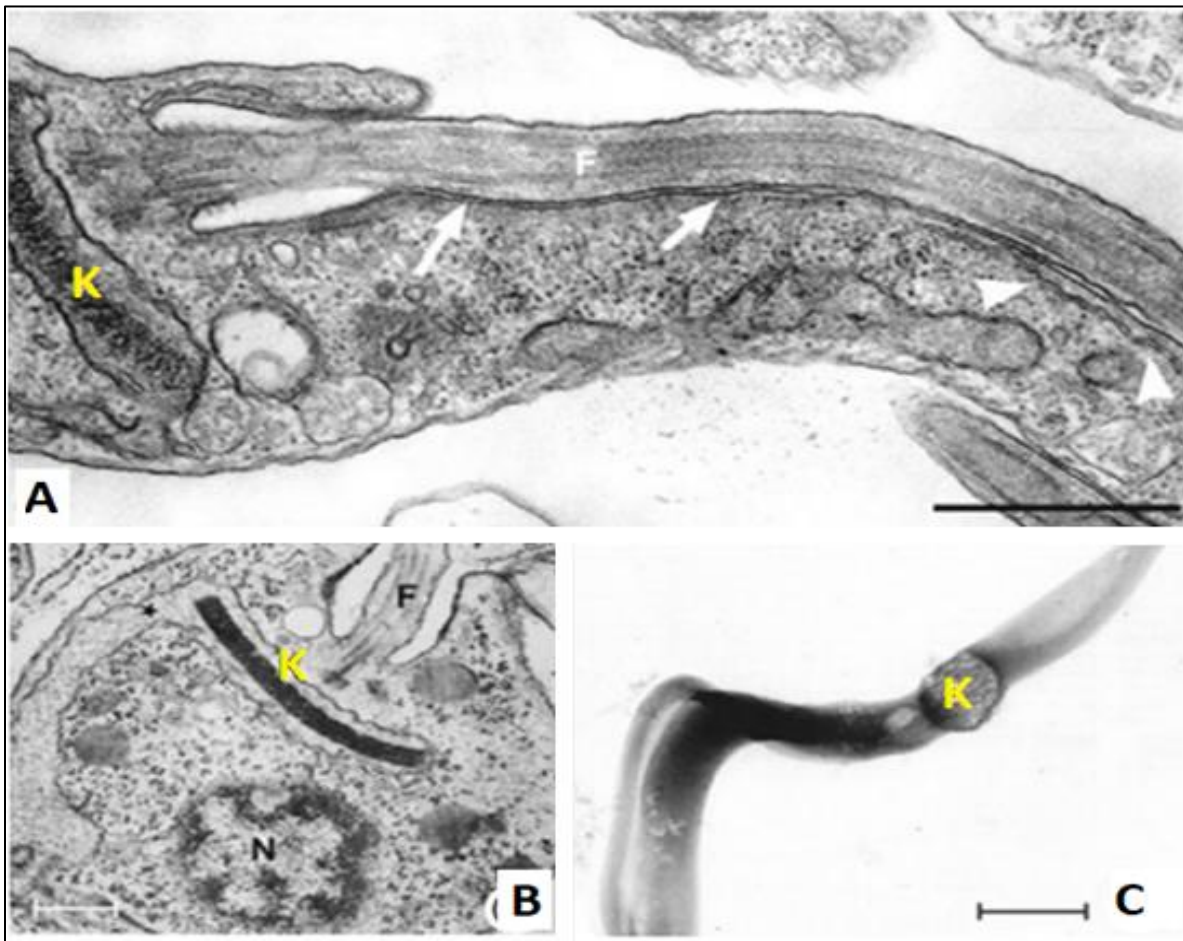


Figura 3. Estructura del cinetoplasto de *T. cruzi* en sus diferentes fases (De Souza, 2009). El cinetoplasto (K) está formado por un engrosamiento de la mitocondria en el extremo próximo a la raíz del flagelo, el cual contiene de un tipo especial de ADN (Ácido desoxirribonucleico), denominado K-ADN (ADN del cinetoplasto), organizado en maxicírculos y minicírculos (De Souza, 2009). Además de ADN, este orgánulo contiene proteínas básicas en su estructura, por lo que se especula que sirven para neutralizar la carga negativa del material genético. En la fase de epimastigote (C) y amastigote (B), las fibras de K-ADN se encuentran estrechamente compactadas en forma de disco alargado, mientras en fase de tripomastigote (A) muestran una organización más laxa en forma esférica. Otro orgánulo que alberga ADN en forma de cromatina condensada es el núcleo (De Souza, 2009; Pereira y colaboradores, 2009 y De Pablos, 2017).

5.1.5. Genoma de *T. cruzi*

En el 2005, El-Sayed y colaboradores publicaron la secuenciación del genoma completo de *T. cruzi* de la cepa CL-Brener, estableciendo que su longitud ronda entre 106.4 y 110.7 megabases, distribuidos en 41 cromosomas. Dicho genoma contiene aproximadamente 22,000 genes codificantes y 3,590 pseudogenes. Al menos el 50% del genoma son secuencias repetitivas que corresponden a retrotransposones, secuencias subteloméricas, ADN satélite *T. cruzi* específico y familias multigénicas de proteínas de superficie. A la mitad de los genes codificantes se les asignaron funciones putativas por homología con genes y proteínas ya caracterizados (**Figura 4**) (El-Sayed y colaboradores, 2005; De Souza, 2009; Zingales y colaboradores, 2012; De Pablos, 2017 y Callejas, Gironés y Fresno, 2018).

| Gene product | Members |
|---|------------|
| trans-Sialidase (TS) | 1430 (693) |
| MASP | 1377 (433) |
| Mucin | 863 (201) |
| Retrotransposon hot spot (RHS) protein | 752 (557) |
| Dispersed gene family protein 1 (DGF-1) | 565 (136) |
| Surface protease (gp63) | 425 (251) |
| Mucinlike protein | 123 |
| Hypothetical | 117 |
| Hypothetical | 93 |
| Kinesin, putative | 79 |
| Protein kinase (CMGC group) | 77 |
| Protein kinase (several groups) | 79 |
| Hypothetical protein | 42 |
| Glycosyltransferase | 52 |
| RNA helicase (eIF-4a) | 47 |
| Protein kinase (NEK group) | 39 |
| MASP-related | 38 |
| Glycosyltransferase | 36 |
| Hypothetical | 35 |
| Amino acid permease | 28 |
| AAA ATPase | 33 |
| Protein phosphatase | 30 |
| Heat shock protein HSP70 | 21 |
| Protein kinase (STE group) | 25 |
| RNA helicase | 23 |
| Phosphatidylinositol phosphate kinase-related | 23 |
| Hypothetical | 24 |
| Elongation factor 1- γ (EF-1- γ) | 22 |
| DNA helicase (DNA repair) | 21 |
| Actin-related | 20 |
| Cysteine peptidase | 20 |

Figura 4. Familias multigénicas del genoma de *T. cruzi* (El-Sayed y colaboradores, 2005).

El ADN nuclear de *T. cruzi* se expresa de forma diferente al K-ADN. La expresión de genes codificantes a proteínas en núcleo produce pre-ARNm (pre-ácido ribonucleico mensajero) policistrónicos, los cuales al generar ARNm maduros se poliadenilan sin necesidad de una señal consenso y se unen al Cap, que es parte de un mini exón o *Splice Leader*, mediante dos reacciones de transesterificación (Trans-splicing). Dicha transcripción de genes se lleva a cabo por la ARN (ácido ribonucleico) polimerasa I a diferencia de los organismos eucariotas que utilizan la ARN polimerasa II (De Pablos, 2017). Por otra parte, el K-ADN que se encuentra organizado en maxicírculos codifica para 18 proteínas y dos ARNr (ácido ribonucleico ribosomal), mientras los minicírculos codifican para ARNg (ARN guías no codificantes). La mayoría de los genes mitocondriales se encuentran ocultos por lo que requieren de un proceso de edición post-transcripcional llevado a cabo por grandes complejos proteicos (editosoma) y pequeños ARN guías, para codificar diversas proteínas involucradas en la cadena respiratoria y una proteína ribosomal. Por lo tanto, los mecanismos de control de la expresión génica se efectúan a nivel post-transcripcional, debido a que como se dijo anteriormente los genes codificantes de proteínas en *T. cruzi* están organizados en unidades policistrónicas largas (El-Sayed y colaboradores, 2005 y De Pablos, 2017).

5.1.6. Diversidad de *T. cruzi*

Las poblaciones de *T. cruzi* son complejos multiclonales que difieren genética, molecular, bioquímica, biológica, clínica y epidemiológicamente (Coronado y colaboradores, 2006), por lo que, su clasificación a través de los años se ha realizado siguiendo diferentes enfoques. En los primeros años se realizaron análisis electroforéticos de isoenzimas generando tres grupos llamados zimodemas (Z1, Z2 y Z3). La clasificación siguiente, denominada esquizodemas, se basó en el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés) del K-ADN. También, según el comportamiento biológico del parásito en animales de experimentación, se establecieron diversos grupos nombrados biodemas. Posteriormente, surgió la clasificación de clones de acuerdo con marcadores genéticos que contienen las diferentes cepas. Así, se establecieron dos linajes principales, *T. cruzi* I y *T. cruzi* II, tras realizar técnicas de RFLP, análisis de ADN polimórfico y amplificando al azar (RAPD por sus siglas en inglés), reacción en cadena de la polimerasa de baja astringencia de oligonucleótidos específicos (LSSP-PCR, por sus siglas en inglés), análisis de microsatélites y polimorfismo de mini exones y ADNr 24S. Sin embargo, también se realizó otra clasificación que consideraba dos grupos principales, denominados Unidades Discretas de Tipificación (DTU, por sus siglas en inglés) I y II, esta última subdividida en cinco sublinajes (IIa – IIe) y DTU I subdividida en cuatro haplotipos (a – d). Finalmente, en un consenso entre representantes de los países endémicos de la ECH, se estableció una nueva clasificación

que abarca las clasificaciones anteriormente propuestas (**Tabla 1**), en la cual se designaron seis DTU denominadas TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV y TcVI (Tibayrenc, 2003; Guhl y Lazdins, 2007; Zingales y colaboradores, 2009; De Pablos, 2017 y De Fuentes y colaboradores, 2019). Recientemente, se ha añadido una nueva DTU denominada TcBat, correspondiente a un genotipo de *T. cruzi* encontrado en murciélagos del centro y sureste de Brasil, el cual no pudo ser catalogado en una de las DTU ya establecidas (Marcili y colaboradores, 2009).

Tabla 1. Clasificación actual de *T. cruzi*.

| Designación DTU | Abreviación | Equivalente de clasificaciones diferentes |
|------------------------|--------------------|--|
| I | Tc I | <i>T. cruzi</i> I y DTU I |
| II | Tc II | <i>T. cruzi</i> II y DTU IIb |
| III | Tc III | Z3/Z1 ASAT, Z3-A,DTU IIc y <i>T. cruzi</i> III |
| IV | Tc IV | Z3, Z3-B y DTU IIa |
| V | Tc V | Z2 boliviano, ADNr ½, clon 39 y DTU II d |
| VI | Tc VI | Z2 Paraguayo, Z-B y DTU IIc |

5.1.6.1. Variabilidad génica

El tamaño de los genomas de las diferentes poblaciones de *T. cruzi* llegan a variar hasta en un 48%, aproximadamente 73Mb. Estas diferencias genómicas permiten la identificación de las distintas DTU a través de diversos marcadores moleculares que presentan diferentes tamaños, de acuerdo con su cepa perteneciente. Entre ellos, se encuentran los genes SL, HSP60, GPI, COII y los ADN ribosomales 24S α y 18S (Souto y Zingales, 1993; Clark y Pung, 1994; Souto y colaboradores, 1996; Westenberger, Sturm y Campbell, 2006; Freitas y colaboradores, 2006; Zingales y colaboradores, 2012 y Zingales, 2018).

Como se mencionó con anterioridad, la mayoría de las poblaciones de este protozoo han evolucionado de forma clonal, es decir, los genotipos de las generaciones descendientes son idénticos o altamente similares al de origen, por lo que la variedad génica de la especie se debe principalmente a polimorfismos genéticos. Sin embargo, también han surgido eventos de recombinación genética entre poblaciones homocigotas de *T. cruzi*, resultando en la producción de cepas con genotipos híbridos, como los pertenecientes a TcV y TcVI, derivados de TcII y TcIII

(Vago y colaboradores, 2000; Coronado y colaboradores, 2006; Pena, Renato y Mara, 2009; Zingales y colaboradores, 2009; Zingales y colaboradores, 2012; De Pablos, 2017 y Gonçalves y colaboradores, 2019).

5.1.6.2. Variabilidad biológica

Se especula que el comportamiento biológico de cada DTU está relacionado con su variabilidad génica, por lo que presentan diversos niveles de infectividad, virulencia, patogénesis, histotropismo y susceptibilidad a fármacos. De acuerdo con lo referenciado en la literatura, TcI presenta baja virulencia, pero con alta parasitemia a los 20-30 días post-infección, invade principalmente células del miocardio y músculo esquelético; siendo la DTU que presenta mayor resistencia al benznidazol. Los niveles de parasitemia de TcII y TcV son intermitentes y aparecen entre los 12-20 días post-infección, su multiplicación puede variar e invade principalmente al tejido miocárdico y nervioso. En cambio, TcIII, TcIV y TcVI son poblaciones altamente virulentas mostrando su máximo nivel de parasitemia a los 7-11 días post-infección, en la etapa temprana de la enfermedad tienen un tropismo marcado hacia macrófagos; en estos DTU las alteraciones neuronales son más frecuentes e intensas. Cabe recalcar que características propias del hospedero pueden modificar los parámetros mencionados (Andrade y Magalhães, 1997; Zingales y colaboradores, 2012 y Zingales, 2018).

5.1.6.3. Variabilidad clínica

La heterogeneidad de las cepas de *T. cruzi* es considerada uno de los principales factores implicados en la generación de diferentes formas clínicas de la ECH, además, de las características propias del hospedero como genética, sistema inmunológico, edad y sexo (Zingales, 2018 y De Fuentes y colaboradores, 2019).

La mayoría de los casos registrados en Latinoamérica de esta enfermedad en fase aguda son causados por TcI y en menor proporción por TcIII y TcIV. No obstante, en Brasil se han llegado a reportar algunos casos por TcII. Por otra parte, la forma congénita de la enfermedad se encuentra relacionada con todas las DTU a excepción de TcIV. En cuanto a la fase crónica, TcI está implicada en casos del Amazonas, la región Andina, Centroamérica y México; generando cardiomiopatía chagásica y en individuos inmunocomprometidos, meningoencefalitis. En la región cono sur predominan TcII, TcV y TcVI, produciendo cardiomiopatía severa, megaesófago y megacolon chagásicos (Zingales, 2012 e Ihle y colaboradores, 2019).

5.1.6.4. Variabilidad epidemiológica

Diversas condiciones geo-climáticas, por ejemplo: la temperatura, precipitación y elevación, pueden afectar la transmisión vectorial, infectividad y distribución eco-epidemiológica de *T. cruzi*. En condiciones de gran altitud se reportan bajos niveles de parasitemia en individuos infectados, al igual que en invierno donde se presentan bajas temperaturas. Por el contrario, en invierno el vector posee una mayor parasitemia que en verano (Ihle y colaboradores, 2019).

Por su parte, TcII, se encuentra exclusivamente en Suramérica con un notorio predominio del ciclo doméstico, al igual que TcV y TcVI. En las DTU restantes, TcIII y TcIV, el ciclo selvático sobresale sobre el ciclo doméstico, encontrándose principalmente en Suramérica. No obstante, TcIV también se localiza en el sur de EE.UU. TcBat, hasta el momento ha sido aislado de mamíferos de Brasil, Panamá, Colombia y Chile (Marcili y colaboradores, 2009; Zingales y colaboradores, 2012; Zingales, 2018 e Ihle y colaboradores, 2019).

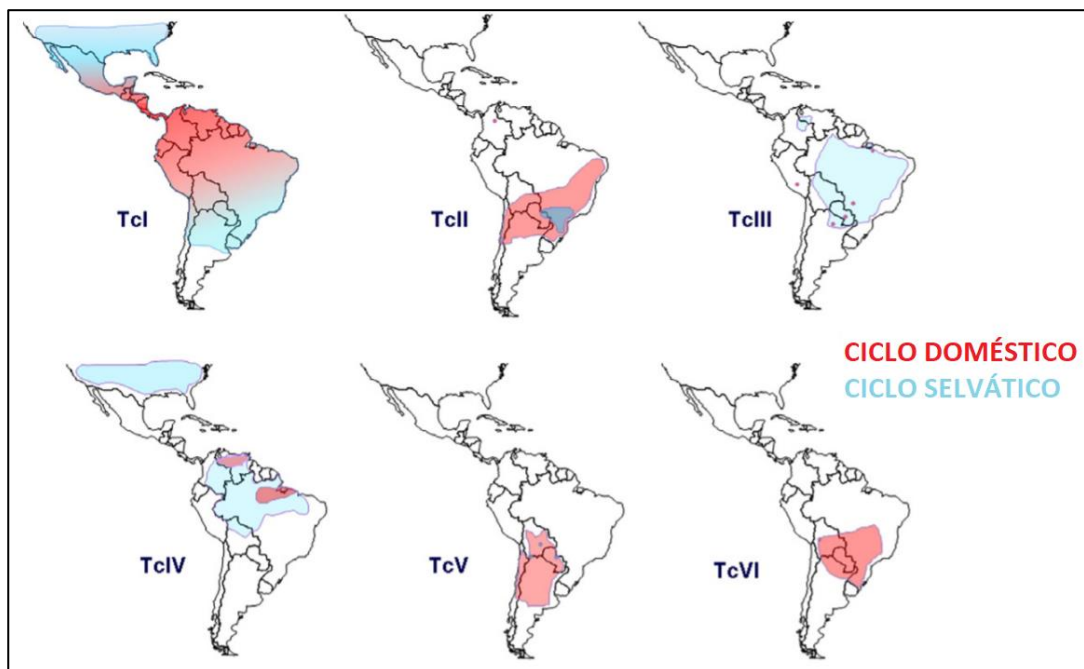


Figura 5. Distribución eco-epidemiológica de las seis DTU de *T. cruzi* en el continente americano (Zingales y colaboradores, 2012).

A lo largo del territorio mexicano se han aislado más de 50 diferentes cepas de *T. cruzi* (Tabla 2) a partir de diferentes especies de Triatóminos o sueros de individuos infectados, encontrando que en nuestro país las cepas con mayor prevalencia pertenecen a TcI, sin descartar la presencia de las otras cinco DTU (TcII - TcVI) (López y colaboradores, 1997; Sánchez y

colaboradores, 2001; Bosseno y colaboradores, 2002; Gómez y colaboradores, 2011; Zingales, 2018 y Pérez y colaboradores, 2019).

Tabla 2. Cepas de *T. cruzi* presentes en México.

| Procedencia geográfica | Cepa | Procedencia Biológica | Referenciado por |
|------------------------|-----------|-------------------------------|-----------------------|
| Jalisco | CGH1 | <i>Triatoma longipennis</i> | Gómez, et al., 2011 |
| | CGH2 | <i>Triatoma pallidipennis</i> | |
| | CGH3 | <i>T. longipennis</i> | |
| | CGH4 | <i>T. pallidipennis</i> | |
| | CGH6 | <i>T. pallidipennis</i> | |
| | KR1 | <i>Triatoma picturata</i> | |
| Oaxaca | NINOA | Suero humano | López, et al., 1997 |
| Guanajuato | INC5 | Suero humano | |
| Yucatán | H4 | Suero humano | |
| | H5 | Suero humano | |
| | H10 | Suero humano | |
| | H3 | Suero humano | |
| | H9 | Suero humano | |
| | HG | Suero humano | |
| Yucatán | T | <i>Triatoma</i> spp | |
| | Z10 | <i>Didelphis marsupialis</i> | |
| | Z17 | <i>D. marsupialis</i> | |
| | Z21 | <i>D. marsupialis</i> | |
| Jalisco | C4 | <i>T. barberi</i> | |
| Morelos | EA | Suero humano | |
| Zacatecas | ZACATECAS | Suero humano | |
| Oaxaca | CID | Suero humano | |
| | FRV | Suero humano | |
| Colima | COL08 | <i>T. longipennis</i> | Bosseno, et al., 2002 |
| | COL18 | <i>T. longipennis</i> | |
| | COL07 | <i>T. pallidipennis</i> | |

| | | |
|----------|---------|-----------------------------|
| Jalisco | JRA | Suero humano |
| | JJO | Suero humano |
| | TEP61 | <i>T. barberi</i> |
| | SMA230 | <i>T. longipennis</i> |
| | SMA212 | <i>T. longipennis</i> |
| | TEP22 | <i>T. longipennis</i> |
| | TEP19 | <i>T. longipennis</i> |
| Morelos | MOR11 | <i>Didelphis virginiana</i> |
| | M935 | Suero humano |
| | MOR03 | Suero humano |
| | MOR10 | <i>T. pallidipennis</i> |
| Nayarit | CARI035 | <i>Tritoma phyllosoma</i> |
| | NAY016 | <i>T. longipennis</i> |
| | PLA23 | <i>Tritoma phyllosoma</i> |
| | COM1 | <i>T. picturata</i> |
| | PLA20 | <i>T. picturata</i> |
| | CARI145 | <i>T. picturata</i> |
| Nayarit | CARI078 | <i>T. picturata</i> |
| | CARI006 | <i>T. picturata</i> |
| | CARI018 | <i>T. longipennis</i> |
| | CARI144 | <i>T. picturata</i> |
| Oaxaca | SBA026 | <i>T. barberi</i> |
| | SBA056 | <i>T. barberi</i> |
| | JVA022 | <i>T. barberi</i> |
| | SBA35 | <i>T. barberi</i> |
| Veracruz | VER04 | <i>D. marsupialis</i> |
| | VER06 | <i>D. virginiana</i> |
| | VER05 | <i>Philander opossum</i> |
| | VER03 | <i>P. opossum</i> |
| Yucatán | Z44 | <i>Didelphis sp</i> |
| | Z56 | <i>Didelphis sp</i> |
| | H1 | Suero humano |

| | | | |
|-----------|-------|-----------------------|--|
| Zacatecas | CUX24 | <i>T. longipennis</i> | |
| | CUX50 | <i>T. longipennis</i> | |
| | CUX21 | <i>T. longipennis</i> | |
| | CUX36 | <i>T. longipennis</i> | |

(López y colaboradores, 1997; Gómez y colaboradores, 2011 y Bosseno y colaboradores, 2002).

La variabilidad intraespecífica de las cepas de *T. cruzi* se refleja en una distribución geográfica diferencial y una variación en sus propiedades biológicas y antigénicas, que repercuten en los cuadros clínicos que producen y la respuesta de los pacientes al tratamiento, así como en la identificación de sueros reactivos al parásito. Por ello, el aislamiento y caracterización de las cepas del parásito es necesaria para entender la eco-epidemiología de la ECH.

5.2. ANTECEDENTES DIRECTOS

5.2.1. Diagnóstico de la ECH

El diagnóstico de la ECH debe incluir una correlación entre datos epidemiológicos, clínicos y de laboratorio. En fase aguda, el diagnóstico se realiza principalmente mediante exámenes de observación directa del parásito en sangre, xenodiagnóstico y hemocultivo, debido a la alta parasitemia presente. Sin embargo, estas técnicas requieren tiempos prolongados, poseen sensibilidad variable y su realización se debe hacer en sitios especializados. Por otra parte, durante la fase crónica de la enfermedad se presenta una carga parasitaria baja e intermitente, por lo que el diagnóstico debe basarse en pruebas serológicas buscando anticuerpos IgG anti-antígenos del parásito, las cuales también tienen una sensibilidad y especificidad variable (Umezawa y colaboradores, 1996; De Marchi y colaboradores, 2011 y Ramírez y colaboradores, 2018). Razón por la cual, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda la combinación de una prueba de alta especificidad (como IH o ELISA con antígenos recombinantes), que elimine la posibilidad de reactividad cruzada con otros parásitos co-endémicos, y una de alta sensibilidad (como IFI o ELISA con antígenos crudos) corridas en paralelo para un mejor diagnóstico. Además, se recomienda realizar una tercer prueba serológicas para reducir el nivel de resultados indeterminados a niveles menores del 2% (Duarte y colaboradores, 2014; Mucci y colaboradores, 2017; Organización Mundial de la Salud, 2018 y Rojo y colaboradores, 2018). Esto aumenta considerablemente los costos del diagnóstico, siendo un problema para el sector salud, sobre todo en países endémicos de la ECH en los que su economía es limitada.

5.2.2. Antígenos de *T. cruzi*

Se ha demostrado que el uso de péptidos sintéticos y/o proteínas recombinantes que contengan epítomos de células B aumentan la especificidad de los ensayos serodiagnósticos. Además, se ha reportado la disminución de falsos positivos y falso negativos en los mismos, mediante la implementación de preparaciones antigénicas de tripomastigotes y/o amastigotes de cepas autóctonas de *T. cruzi*, ya que se obtiene un mejor reconocimiento antigénico de sueros reactivos a dicho parásito utilizando antígenos que pertenezcan a cepas del mismo origen geográfico de los sueros en estudio (Umezawa y colaboradores, 1996; Umezawa y colaboradores, 1999; Sánchez y colaboradores, 2001; Duarte y colaboradores, 2014; Concha y colaboradores, 2017; Mucci y colaboradores, 2017 y López y colaboradores, 2019).

Diversos antígenos de *T. cruzi* con potencial diagnóstico han sido utilizados en diferentes pruebas diagnósticas (**Tabla 3**), observando que éstos juegan un papel determinante para la sensibilidad y especificidad de las mismas. Por lo tanto, la inexistencia de una prueba diagnóstica 100% efectiva para la ECH en México reside en gran parte en la elección de los antígenos utilizados.

Tabla 3. Antígenos de *T. cruzi* con potencial diagnóstico.

| Función | Antígeno | Uso diagnóstico | Descritos por |
|---|--|------------------------|---|
| Antígenos citoplasmáticos | CRA Ag30 JL8 TCR27 RP4 | Infección crónica | Lafaille et al., 1989 Ibáñez et al., 1988 Levin et al., 1989 Hoft et al., 1989 Camussone et al., 2009 |
| Proteínas asociadas al citoesqueleto | FRA Ag1 JL7 H49 RP1 | Infección crónica | Lafaille et al., 1989 Ibáñez et al., 1988 Levin et al., 1989 Cotrim et al., 1995 Camussone et al., 2009 |
| Proteínas de superficie en tripomastigote | B12 B13 Ag2 TCR39 PEP-2 RP5 | Infección crónica | Gruber et al., 1993 Ibáñez et al., 1988 Hoft et al., 1989 Peralta et al., 1994 Camussone et al., 2009 |

| | | | |
|---|---|---|--|
| | TcTASV-C Sa85-1.1 | | Caeiro, et. al., 2018 Centron, et. al., 1992 |
| Proteínas asociadas a microtúbulos | Ag36 JL9 MAP-like RP3 β -tubulina | Infección crónica y aguda ^a | Ibáñez et al., 1988 Levin et al., 1989 Kerner et al., 1991 Camussone et al., 2009 Montalvão, et. al., 2018 |
| Familia de transsialidasas | SAPA | Infección aguda y congénita | Frasch & Reyes, 1990 Russomando et al., 2010 |
| | TCNA | Infección aguda y congénita | Frasch, et. al., 1991 |
| | TS | Infección aguda y congénita | Frasch, et. al., 1991 |
| | TcLo1.2 | Infección crónica | Houghton et al., 1999 |
| | TcD Ag13 | Infección crónica y aguda | Burns, Jr. et al., 1992 |
| | Región catalítica de Transsialidasas | Confirmación de infección crónica | Buchovsky et al., 2001 |
| | ASP-1 ASP-2 | Infección crónica | Bathia, et. al., 2004 |
| Proteínas regulatorias complementarias de la familia similar a TS | FL-160 CEA CRP160 | Infección crónica y seguimiento Seguimiento | Cetron et al., 1992; Jazin et al., 1995 y Meira et al., 2004. |
| Mucina de la familia similar a TS en tripomastigote | TSSA I | Tipificación de <i>T. cruzi</i> Tc I | Di Noia et al., 2002 |
| Mucina de la familia similar a TS en tripomastigote | TSSA II | Tipificación de <i>T. cruzi</i> Tc II Confirmación | Di Noia et al., 2002; Bhattacharyya et al., 2010 y Cimino et al., 2011 |

| | | | |
|---|---|--|---|
| Últimos trece aminoácidos de una proteína ribosomal | R13 | Cardiopatía por <i>T. cruzi</i> | Aznar et al., 1995 |
| Proteína ribosomal | P2β | Cardiopatía | Diez et al., 2006; Fabbro et al., 2011 y Breniere et al., 2002 |
| | TcE JL5 | Infección crónica Cardiopatía | Houghton et al., 1999 Frasch, et. al., 1991 |
| Proteínas flagelares de unión a calcio | FcaBO | Infección crónica y aguda | Engman et al., 1989 |
| | 1F8 Tc-24 F29 Tc-29 Calflagina Tc28 FCaBP | Infección crónica Seguimiento Seguimiento Infección crónica Infección crónica Infección crónica Infección crónica Infección crónica | González et al., 1985 Krautz et al., 1995 Fabbro et al., 2007 Abate et al., 1993 Marcipar et al., 2005 Abate, et. al., 1993 Frasch, et. al., 1991 |
| Proteínas de golpe de calor | cy-hsp70 mt-hsp70 grp-hsp78 hsp85 | Infección crónica y seguimiento | Krautz et al., 1998 Montalvão, et. al., 2018 |
| Proteína reguladora de alginate | TcAg29 | Infección crónica | DaRocha et al., 2002 |
| Proteína de unión a ARN | TcAg48 | Infección crónica | DaRocha et al., 2002 |
| | A6_30_col | | De Oliveira, et al., 2013 |
| Secuencias repetitivas del genoma (obtenidas | Tc1 Tc3 Tc4 Tc9 | Infección crónica | |

| | | | |
|---|--|---------------------------|---|
| por análisis bioinformático) | Tc10 Tc12 Tc15 Tc24 Tc52 | | Goto et al., 2008 |
| Proteína hipotética | HYPO9 Porción N-terminal de rTc_N_10421.310 Tc40 | Infección crónica | Reis, et al., 2014 Lesenechal, et. al., 1997 |
| RNA polimerasa II | B9_30_cl | Infección crónica | De Oliveira, et al., 2013 |
| Glicosilfosfatidilinosito I anclado a proteínas | TcG1 TcG2 TcG3 TcG4 TcG5 TcG6 TcG7 TcG8 | Infección aguda y crónica | Bathia, et. al., 2004 Hassan, et. al, 2019 |
| Glicosilfosfatidilinosito I anclado a mucinas | Gal α 3LN | Infección aguda y crónica | Ortega, et. al., 2019 Portillo, et. al., 2019 |
| Proteínas quiméricas | IBMP-8.1 IBMP-8.2 IBMP-8.3 IBMP-8.4 CP3 | Infección crónica | Dopico, et. al., 2019 Peverengo, et. al., 2018 |
| Enzima degradadora de matriz extracelular | Tc80 | Infección crónica | Bivona, et. al., 2018 |

| | | | |
|---------------------|------------|-------------------|-----------------------|
| | | | |
| Proteína reguladora | Ubiquitina | Infección crónica | Telles, et. al., 1999 |

^a: Presentan reacciones cruzadas con proteínas del citoesqueleto de mamíferos (Da Silveira, Umezawa y Luquetti, 2001; Bhatia y colaboradores, 2004; Marcipar y Lagier, 2012; De Oliveira y colaboradores, 2013; Reis y colaboradores, 2014; Bivona y colaboradores, 2018; Caeiro y colaboradores, 2018; Montalvão y colaboradores, 2018; Peverengo y colaboradores, 2018; Dopico y colaboradores, 2019; Hegazy y colaboradores, 2019; Gómez y Buscaglia, 2019; Portillo y colaboradores, 2019).

En los últimos años se ha buscado desarrollar nuevas pruebas serológicas para la ECH, utilizando cepas autóctonas de cada país endémico. En México, solo se cuenta con una prueba serológica desarrollada a partir de un extracto total de epimastigotes de cepas mexicanas de *T. cruzi*, estadio del parásito presente únicamente en el insecto vector, que le confiere una alta sensibilidad, pero bajos niveles de especificidad. Mostrando así la necesidad de identificar y caracterizar antígenos de cepas mexicanas para el desarrollo futuro de pruebas diagnósticas con una alta sensibilidad, y el uso de antígenos recombinantes autóctonos que mejoren su especificidad. En nuestro laboratorio se llevó a cabo el aislamiento y caracterización de cepas de *T. cruzi* autóctonas de Oaxaca (zona altamente endémica de esta enfermedad), identificando diversas proteínas y epítomos antigénicos de tripomastigotes del parásito, entre las que se encuentran las proteínas a estudiar en el presente trabajo: Q4D2C9, Q4CY87, Q4DYC3, Q4CQ28 y Q4DC56.

6. JUSTIFICACIÓN

El diagnóstico serológico de la ECH en fase crónica es fundamental para su control y tratamiento. Se ha reportado que el uso de antígenos autóctonos para el diagnóstico serológico de individuos infectados pertenecientes a las mismas regiones, es mejor y más sensible, que cuando se utilizan antígenos de cepas de otros lugares (Umezawa y colaboradores, 1996; Umezawa y colaboradores, 1999; Sánchez y colaboradores, 2001 y Concha y colaboradores, 2017). Además, el uso de antígenos recombinantes mejora la especificidad en la detección serológica de *T. cruzi*. Por lo tanto, en este trabajo evaluaremos antígenos autóctonos de cepas mexicanas identificadas por nuestro grupo de investigación, para evaluar su capacidad de reconocimiento de sueros reactivos a *T. cruzi*, provenientes de las mismas zonas endémicas de nuestro país.

7. HIPÓTESIS

Si las proteínas recombinantes de cepas autóctonas de Oaxaca son reconocidas por sueros reactivos a *T. cruzi* provenientes de las mismas zonas endémicas, entonces serán útiles para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas en fase crónica.

8. OBJETIVOS

8.1. GENERAL

Evaluar proteínas antigénicas recombinantes de cepas de *T. cruzi* autóctonas mediante pruebas de ELISA, con la finalidad de determinar su capacidad de detección de muestras serológicas reactivas a *T. cruzi*.

8.2. PARTICULARES

- Amplificar las secuencias codificantes de las proteínas antigénicas en estudio (Q4DYC3, Q4CQ28, Q4DC56, Q4D2C9 y Q4CY87) por PCR.
- Clonar y subclonar los amplicones anteriores en los vectores pGEM®-T Easy y pRSET®-A, respectivamente, para obtener proteínas antigénicas recombinantes.
- Seleccionar una de las secuencias clonadas e inducir la proteína recombinante (His-Q4DYC3) con IPTG para su posterior purificación con perlas de níquel-sefarosa.
- Evaluar el reconocimiento de la proteína antigénica recombinante obtenida (His-Q4DYC3) con sueros reactivos a *T. cruzi*, mediante la prueba de ELISA.

9. MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación, se describe tanto el método como el fundamento de las técnicas a utilizar y/o la función de los componentes y reactivos, según sea el caso.

9.1. PARÁSITOS

Durante la realización del presente trabajo se utilizaron las formas de epimastigote, tripomastigote y amastigote de *T. cruzi* de la cepa NM1-cl1 aislada en nuestro laboratorio en un trabajo previo. Para el mantenimiento de cultivos de epimastigotes se realizó la re-siembra a una razón de pase 1:10 a partir de 0.5mL de cultivos anteriores en 4.5mL de medio Infusión de hígado triptosa fresco (LIT, por sus siglas en inglés) ($C_6H_{12}O_6$ 11mM, KCl 5.36mM, NaCl 60mM, Na_2HPO_4 29mM, Infusión de hígado, Triptosa) complementado con SFB (Suero Fetal Bovino) (Gibco® 16000-044) al 10%, ampicilina (13mM) - estreptomycin (10mM) al 5% y 0.1mg/mL de hemina (Sigma-Aldrich® H9039) mantenidos en incubación a 28°C (Zingales y colaboradores, 1997).

El extracto de levadura, infusión hepática, triptosa y SFB presentes en el medio LIT proporcionan diversos factores de crecimiento, vitaminas, hormonas, proteínas, lípidos, entre otros, que participan en diversos aspectos biológicos del parásito (De Paula y colaboradores, 2014). Los antibióticos utilizados, ampicilina y estreptomycin generan un efecto bactericida en el medio de cultivo evitando la presencia de bacterias Gram positivas y Gram negativas contaminantes (Merck, 2018). Por otra parte, la adición de hemina, también conocida como grupo hemo, propicia un aumento en la proliferación de formas epimastigote al inducir condiciones de estrés oxidativo transitorias mediadas por una vía de señalización similar a Calmodulina proteín-quinasa II (CAMKII, por sus siglas en inglés) (De Almeida y colaboradores, 2011).

9.2. BACTERIAS

Las bacterias mencionadas en este trabajo fueron utilizadas para la obtención de proteínas recombinantes. Para ello se utilizaron células competentes las cuales son células bacterianas capaces de aceptar y clonar ADN extracromosomal en estudio y expresar la proteína recombinante correspondiente (Das y Ranjan, 2015).

En la presente experimentación se utilizaron células competentes *Escherichia coli* DH5α con genotipo (F- ϕ 80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1) para la clonación y subclonación de las secuencias en estudio (Q4DYC3, Q4CQ28, Q4DC56, Q4D2C9 y Q4CY87). Por otra parte, las células *E. coli* BL21(DE3)pLysS con genotipo (B F-

dcm ompT hsdS(rB – mB –) gal λ (DE3) [pLysS Camr]) se utilizaron para la expresión de las proteínas recombinantes (Invitrogen Corporation, 2006 y Agilent Technologies, 2010).

9.3. CULTIVOS CELULARES

El cultivo celular es la técnica por la cual células eucariotas nucleadas aisladas de un organismo vivo son mantenidas en medio líquido bajo condiciones controladas para promover su crecimiento y/o diferenciación (Lynn, 2009 y Sykes y Rankin, 2014).

Para la producción de tripomastigotes y amastigotes de *T. cruzi* de la cepa NM1-cl1, se infectaron cultivos celulares de fibroblastos humanos HFF-1 (ATCC® SCRC-1041™) en medio Eagles Modificado de Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés, Gibco® by life technologies™ 12100-061) Glucosa alta suplementado con SFB al 10% y penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich® P4333) (10,000U/ μ L/mL en solución salina de NaCl al 85%), manteniéndolos en incubación a 37°C con CO₂ al 5%.

9.4. SUEROS HUMANOS

Los sueros humanos reactivos y no reactivos utilizados en esta investigación fueron adquiridos de la seroteca del laboratorio y proporcionados por el banco de sangre del estado de Oaxaca y el laboratorio de *T. cruzi* de la facultad de química de la UABJO.

9.5. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS

El diseño de los oligonucleótidos correspondientes a cada una de las secuencias codificantes a las proteínas Q4DYC3, Q4CQ28, Q4DC56, Q4D2C9 y Q4CY87, se basó en los siguientes criterios: poseer una longitud mayor a 15 nucleótidos, un porcentaje de GC (Guanina-Citosina) similar entre ambos oligonucleótidos (sentido y antisentido), sitios de restricción acorde a los vectores de clonación utilizados, ser una secuencia única en el genoma de *T. cruzi* y mantener el marco de lectura adecuado para una correcta traducción. Además, se realizó el análisis bioinformático de cada oligonucleótido mediante la base de datos OligoAnalyzer tool (<https://bit.ly/2mG5LYX>), evaluando la formación de estructuras secundarias como horquillas, heterodímeros y homodímeros, que pudieran producir interferencias durante la amplificación por PCR de las secuencias codificantes.

9.6. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

El análisis *in silico* de las proteínas en estudio, se basó en la búsqueda de características generales de cada proteína en diversas bases de datos. Se determinó el tipo de proteína, número de aminoácidos, peso molecular y función biológica a través de las bases bioinformáticas UniProt (<https://bit.ly/2nA91oN>), KEGG (<https://bit.ly/2Ynlme7>), PIR (<https://bit.ly/2muu9gp>) y TriTrypDB

(<https://bit.ly/2nsT3gv>). En esta última base de datos también se realizó la búsqueda de secuencias ortólogas. La función biológica establecida se comprobó de acuerdo con los dominios de las proteínas en estudio, los cuales fueron obtenidos con la base Pfam (<https://bit.ly/2muNbTS>). Las posibles modificaciones postraduccionales fueron obtenidas a través de la herramienta ScanProsite tool (<https://bit.ly/2o7hm3G>). Mediante los programas SAS (<https://bit.ly/2muRdM0>) y SWISS-MODEL (<https://bit.ly/2mHXI3t>) se obtuvieron las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas en estudio. La información referente al gen codificador a cada proteína se adquirió en la base GenBank (<https://bit.ly/2wdxI7I>). Además, se recopiló información experimental útil mediante ProtParam tool (<https://bit.ly/2NBKbhg>) que predice la estabilidad y vida media de proteínas de diferentes organismos.

9.7. PCR

La técnica de PCR se desarrolló basándose en el proceso de replicación del ADN en los organismos eucariotas llevado a cabo por la enzima ADN polimerasa. Esta enzima realiza la síntesis de una cadena complementaria de ADN del sentido 5' al 3' usando como molde ADN de cadena sencilla, pero a partir de una región de doble cadena. Para crear esta región doble cadena se usan los denominados oligonucleótidos los cuales son una pareja de secuencias nucleotídicas cortas sintetizadas de manera que sean complementarias a cada uno de los extremos 5' del fragmento de ADN que se desea amplificar. Partiendo de este principio, la PCR se basa en la repetición de un ciclo formado por tres etapas: i) Desnaturalización del ADN de doble cadena; ii) Hibridación de los oligonucleótidos a la cadena molde de ADN; iii) Elongación de la cadena sencilla de ADN mediante la enzima ADN polimerasa, la cual incorpora los desoxinucleótidos trifosfatados presentes en el medio siguiendo la cadena molde (Cortázar y Silva, 2004 y Mas y colaboradores, 2001).

Por medio de esta técnica de PCR de punto final, se realizó la amplificación de las secuencias codificantes a las proteínas Q4DYC3, Q4CQ28, Q4DC56, Q4D2C9 y Q4CY87 utilizando un volumen final de reacción de 50µL con 10ng de ADN genómico de *T. cruzi* NM1-cl1, 5µL de Buffer Taq Platinum 10X (KCl 500mM, Tris-HCl 100mM pH 8.3), 2µL de MgSO₄ 50mM, 8µL de desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs, por sus siglas en inglés) 1.25mM (Invitrogen™ 10297018), 1µL de cada oligonucleótido diseñado y 0.2µL de enzima Taq ADN polimerasa de alta fidelidad (Invitrogen™ 11304011), aforando con agua inyectable libre de nucleasas. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Veriti® 96-Well con las siguientes condiciones: 1 ciclo inicial de 3 minutos a 94°C seguido por 30 ciclos de 45 segundos a 94°C (desnaturalización), 30 segundos a 60°C (alineamiento), 90 segundos a 68°C (extensión) y finalmente 1 ciclo de 5 minutos a 68°C. Los productos obtenidos se analizaron en un gel de agarosa al 1% como se describe a continuación.

9.8. ELECTROFORESIS DE ADN EN GEL DE AGAROSA

La electroforesis es una técnica que consiste en la migración y separación de partículas y/o moléculas cargadas de acuerdo con su tamaño, forma y carga, bajo la influencia de un campo eléctrico (Fritsch y Krause, 2003).

El análisis de diversos productos nucleotídicos se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% preparados y corridos con la solución tampón TBE 0.5X (Tris 1.3M, Ácido bórico 450mM, EDTA 25mM). Las muestras a analizar fueron previamente preparadas 1:10 con un Buffer de Carga 10X (Azul de bromofenol 0.25%, Glicerol 30%, Xilencianol 0.25%), al igual que el marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ 10787026). El corrimiento se llevó a cabo a 100V por 25 minutos. Los geles fueron teñidos 10 minutos con bromuro de etidio (1µg/mL) y analizados en un fotodocumentador MiniBIS Pro (DNR Bio-Imaging Systems).

9.9. PURIFICACIÓN DE AMPLICONES

El sistema de purificación de QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN© 28104) utilizado se basa en la adsorción de ADN por una membrana de sílice a altas concentraciones de sales, en donde los contaminantes al no unirse a dicha membrana fluyen a través de la misma. Las sales presentes son removidas con etanol al 70%, mientras el ADN puro presente en la membrana es eluido en condiciones básicas a bajas concentraciones de sal (QIAGEN, 2018).

La purificación de las secuencias amplificadas por PCR se realizó mediante cromatografía en columna con QIAquick® PCR Purification Kit, siguiendo las instrucciones del proveedor.

9.10. CLONACIÓN

En biología molecular se entiende como clonación a la inserción de un fragmento de ADN específico, que generalmente corresponde a un gen, en un vector plasmídico. Convencionalmente, se utilizan enzimas de restricción para linealizar el vector a utilizar para posteriormente facilitar su ligación al inserto de interés, el cual también debe ser cortado por dichas enzimas de restricción (Jacobus y Gross, 2015 y Tan y colaboradores, 2018).

Para clonar y amplificar las secuencias de interés en este estudio, los productos de amplificación se clonaron en un vector de clonación pGEM®-T Easy y posteriormente se subclonaron en un vector de expresión pRSET®-A para obtener la proteína recombinante. Por lo tanto, el producto de PCR se trató

para agregar adeninas en sus extremos y se clonó en el vector pGEM®-T Easy que cuenta con timinas en sus extremos, lo que permite una alta eficiencia de clonación.

9.10.1. Adenilación

La adenilación de los amplicones purificados se llevó a cabo en una mezcla de reacción que contuvo 5µL de amplicones de ADN purificado, 2µL de Buffer para PCR 10X (KCl 500mM, Tris-HCl 200mM pH 8.4), 1µL de MgCl₂, 0.2µL de enzima ADN Taq polimerasa recombinante (Invitrogen™ 11615-010) sin actividad de endonucleasa y 5µL de desoxiadenosina trifosfatada (dATP, por sus siglas en inglés) (Invitrogen™ 10297018), en un volumen final de 20µL. Dicha mezcla fue incubada a 70°C por 30 minutos.

9.10.2. Reacción de ligación

En la reacción de ligación entre las secuencias codificantes amplificadas por PCR y el vector de clonación pGEM®-T Easy (**Figura 6**), se utilizaron 3µL de amplicones adenilados, 1µL de enzima T4 ADN ligasa, 5µL de buffer de ligación rápida pGEM®-T 2X y 1µL del vector pGEM®-T Easy (Promega© A1360) en un volumen final de 10µL. Dicha mezcla de reacción permaneció en incubación *Over Night* (ON) a 16°C. Por otra parte, en la reacción de ligación entre los insertos en estudio, previamente liberados del vector pGEM®-T Easy mediante digestión enzimática, y el vector de expresión pRSET®-A (**Figura 7**) linealizado con las mismas enzimas que el inserto, se utilizó 1µL de enzima T4 ADN ligasa, 2µL de buffer de ligación 10X (Invitrogen™ V35120) y 17µL de inserto-vector en proporción 1:3.

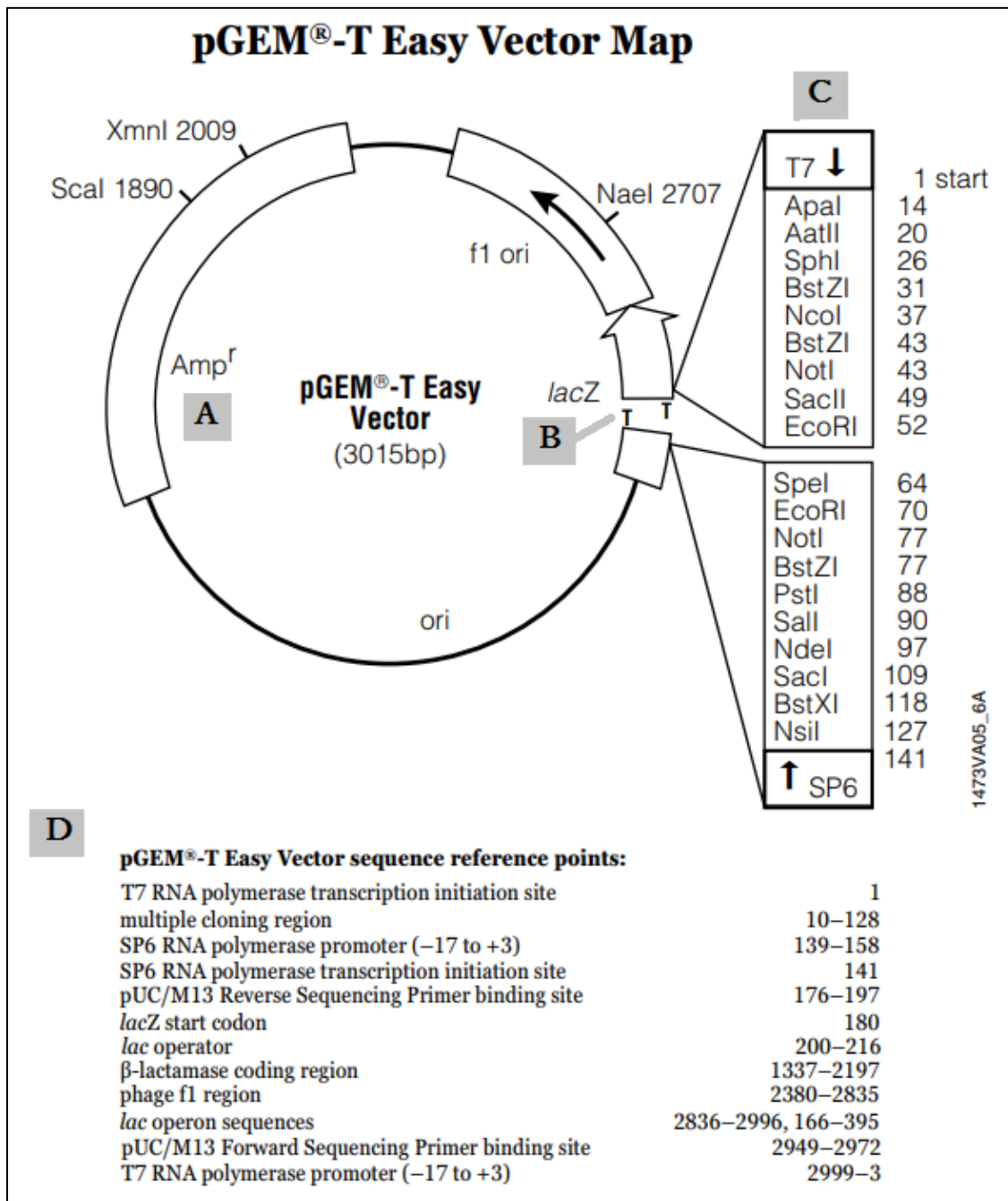


Figura 6. Mapa de restricción del vector pGEM[®]-T Easy. (A) Gen de resistencia a ampicilina. (B) Timinas 3' terminales. (C) Sitios de restricción. (D) Regiones relevantes de la secuencia de vector (Promega Corporation, 2015).

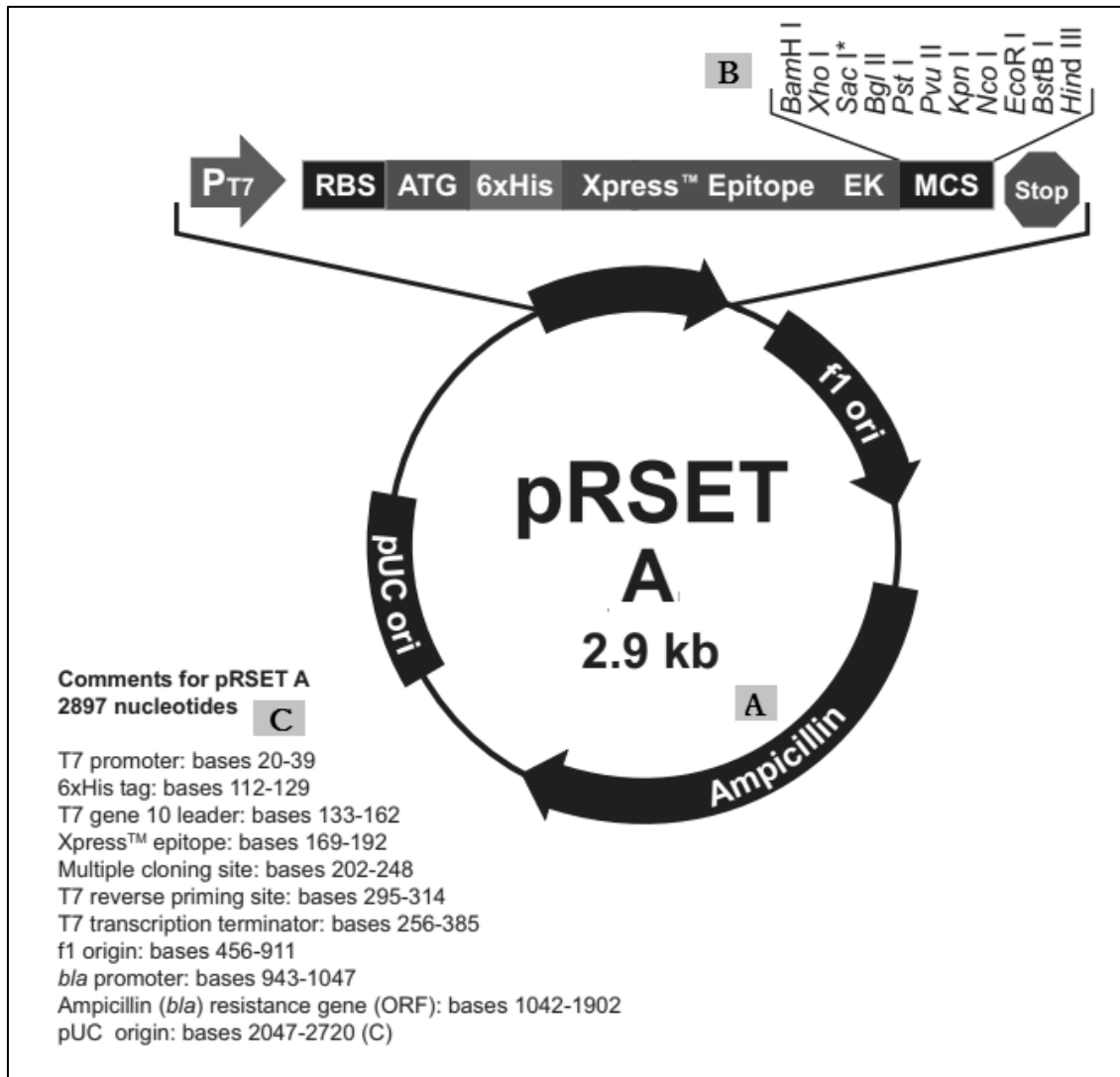


Figura 7. Mapa de restricción del vector pRSET®-A. (A) Gen de resistencia a ampicilina. **(B)** Sitios de restricción. **(C)** Regiones relevantes de la secuencia de vector (Corporate Headquarters, 2010).

9.10.3. Transformación bacteriana

El proceso en el cual ADN exógeno logrará atravesar la membrana celular e incorporarse al interior de la célula, en este caso bacteriana, es denominado transformación (Griffiths y colaboradores, 1999).

Los ADN de plásmido se utilizaron para transformar mediante choque térmico 50µL de bacterias competentes DH5α o BL21(DE3)pLysS, previamente descongeladas en hielo, con 10µL de reacción de ligación. Colocando la mezcla obtenida 10 minutos en hielo, seguido de 90 segundos a 42°C y 30 segundos en hielo, nuevamente. A continuación se añadió 1mL de medio Luria Betani

(LB) (Sigma-Aldrich® L3022) e incubó por 90 minutos a 37°C. Finalmente, 300µL de la mezcla resultante fue sembrada en una placa de Agar LB con 20µL de X-gal (50mg/mL) (Sigma-Aldrich® 7240-90-6) en el caso de construcciones en pGEM®-T Easy, ampicilina (100µg/mL) (Sigma-Aldrich® A0166), y cloranfenicol (30µg/mL) (Sigma-Aldrich® C1919) en el caso de células BL21(DE3)pLysS, e incubada *ON* a 37°C.

9.10.4. PCR de colonia

La identificación de colonias transformadas positivas, es decir, que contuvieran el plásmido con el inserto de ADN esperado de manera extracromosomal, se realizó mediante PCR de punto final. Para ello se utilizó 5µL de agua inyectable inoculada con una colonia bacteriana transformada, 1µL de Buffer PCR 10X, 0.5µL de MgCl₂ 50mM, 2.5µL de dNTPs 1.25mM, 0.3µL de cada oligonucleótido y 0.2µL de enzima Taq ADN polimerasa recombinante, aforando a un volumen final de 10µL con agua inyectable libre de nucleasas. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Veriti® 96-Well a las siguientes condiciones: 1 ciclo inicial de 3 minutos a 94°C seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 94°C (desnaturalización), 30 segundos a 60°C (alineamiento), 2 minutos a 72°C (extensión) y finalmente 1 ciclo de 7 minutos a 72°C. Los productos obtenidos fueron analizados en un gel de agarosa al 1%.

9.10.5. Extracción de ADN de plásmido por el método modificado de Hirt

Otro método utilizado para la identificación de colonias transformadas positivas fue la extracción de ADN de plásmido siguiendo el método modificado de Hirt, utilizando un detergente neutro (Tritón X-100), el cual solubiliza la membrana celular, y baja concentración de sal (NaCl) (Green, Miller y Hendler, 1971 y Gilden y colaboradores, 1982).

A partir de un cultivo de 3mL de colonias bacterianas crecido *ON* a 37°C en agitación contante, se obtuvo una pastilla bacteriana que fue resuspendida y lisada con 350µL de solución de lisis STET (EDTA 1mM, NaCl 0.1M, Tris-HCl 10mM pH 8, Tritón X-100 5%) y 250µL de lisozima (10mg/mL, Tris 10mM pH 8) (Sigma-Aldrich® L6876), posteriormente se realizó la precipitación de ADN con Acetato de Sodio 3M e isopropanol en proporción 1:10 y 1:1, respectivamente. Finalmente, la pastilla obtenida fue lavada con etanol al 70% y resuspendida en agua MilliQ®.

9.10.6. Extracción de ADN de plásmido por lisis alcalina

El método de lisis alcalina desarrollado por Birnboim and Doly consiste en separar el ADN de plásmido del ADN genómico y otros componentes celulares. Las células bacterianas son lisadas

en condiciones alcalinas, liberando ADN de plásmido y ADN genómico desnaturalizados. Debido a su tamaño el ADN de plásmido se renaturaliza con mayor facilidad, mientras el ADN genómico se une a proteínas y lípidos, pudiendo ser precipitado con acetato de potasio y removido por centrifugación. Finalmente, el ADN de plásmido suspendido en el sobrenadante puede ser precipitado con un alcohol (Carson, Miller y Witherow, 2012).

Siguiendo la metodología descrita por Sambrook y Russell (2001) se realizó la extracción de ADN de plásmido a partir de 10mL de cultivos bacterianos en medio LB con antibióticos, de acuerdo con la cepa utilizada, crecidos *ON* a 37°C en agitación constante. La pastilla bacteriana obtenida por centrifugación a 4,000rpm por 10 minutos se resuspendió en 200µL de solución alcalina I fría (EDTA 10mM pH 8, Glucosa 50mM, Tris-HCl 25mM pH 8), posteriormente se agregaron 400µL de solución alcalina II (NaOH 0.2N, Dodecilsulfato sódico (SDS, por sus siglas en inglés) 1%) agitando por inversión 5 veces, inmediatamente se añadieron 300µL de solución alcalina III fría (Acetato de potasio 5M, Ácido acético glacial 11.5%) mezclando por inversión 5 veces y dejando reposar en hielo 5 minutos. El lisado bacteriano se centrifugó por 5 minutos a 12,000rpm a 4°C, al sobrenadante recuperado se le agregaron 2µL de ARNasa A (10mg/mL) (Sigma-Aldrich® R4875) y se incubó por 2 horas a 37°C. Se realizaron dos extracciones orgánicas con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), recuperando la fase acuosa en ambos casos. La precipitación de ADN de plásmido se efectuó con un volumen de isopropanol, siendo lavada con etanol al 70%, se secó la pastilla con el ADN y se resuspendió en 30µL de TE (Tris-EDTA pH 8.0).

9.10.7. Digestión enzimática

Las enzimas de restricción o endonucleasas son proteínas con actividad catalítica que reconocen y cortan de manera específica secuencias de ADN de doble cadena palindrómicas, las cuales pueden estar formadas desde 4pb hasta 8pb (Kumar y Garg, 2005).

Para comprobar la presencia de los insertos amplificados en las construcciones obtenidas en pGEM®-T Easy se llevaron a cabo digestiones enzimáticas utilizando 2µL de Buffer EcoRI 10X, 0.3µL de la enzima EcoRI (Thermo Scientific™ ER0271) y 200ng de ADN de plásmido en un volumen final de 20µL. La mezcla de reacción fue incubada 2 horas a 37°C y su análisis se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 1%. En las construcciones en pRSET®-A se llevaron a cabo digestiones enzimáticas dobles con las enzimas de restricción indicadas en la **Tabla 4**, 2µL de Buffer 10X correspondiente a cada par de enzimas y 200ng de ADN de plásmido en un volumen

final de 20µL. Además, se utilizaron las enzimas HindIII y XbaI (**Tabla 5**) para reiterar la correcta obtención de las construcciones a secuenciar en pRSET®-A.

Tabla 4. Enzimas de restricción flanqueantes de las secuencias codificantes en estudio.

| Inserto | ER1 | SR | ER2 | SR | Buffer |
|---------------|--------------------|----------------------|----------------------|----------------------|------------------------------|
| Q4D2C9 | KpnI ¹ | GGTAC [^] C | HindIII ² | A [^] AGCTT | Buffer KpnI ¹ 1X |
| Q4CY87 | KpnI ¹ | GGTAC [^] C | EcoRI | G [^] AATTC | Buffer Tango 1X |
| Q4DYC3 | BamHI ³ | G [^] GATCC | KpnI ¹ | GGTAC [^] C | Buffer BamHI ³ 1X |
| Q4CQ28 | BamHI ³ | G [^] GATCC | HindIII ² | A [^] AGCTT | Buffer BamHI ³ 2X |
| Q4DC56 | KpnI ¹ | GGTAC [^] C | EcoRI | G [^] AATTC | Buffer Tango 1X |

*ER (Enzima de Restricción), SR (Sitio de restricción). Las secuencias de reconocimiento de cada enzima de restricción fueron obtenidas en la base de datos REBASE (*Restriction Enzyme Database*).

¹(Thermo Scientific™ ER0521), ²(Thermo Scientific™ ER0505), ³(Thermo Scientific™ ER0055).

Tabla 5. Enzimas de restricción utilizadas para corroborar las construcciones a secuenciar en pRSET®-A.

| ER1 | SR | ER2 | SR | Buffer |
|-------------------|----------------------|---------|----------------------|-----------------|
| XbaI ⁴ | T [^] CTAGA | HindIII | A [^] AGCTT | Buffer Tango 1X |

* ER (Enzima de Restricción), SR (Sitio de restricción). Las secuencias de reconocimiento de cada enzima de restricción fueron obtenidas en la base de datos REBASE (*Restriction Enzyme Database*). ⁴(Thermo Scientific™ ER0681).

9.11. SECUENCIACIÓN

La secuenciación de las construcciones pRSET-A-YC3, pRSET-A-Q28 y pGEM-TE-Q28 fue realizada por la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, utilizando oligonucleótidos ubicados río arriba y río abajo de los insertos (**Tabla 6**).

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados en la secuenciación de las construcciones en estudio.

| Construcción | Oligonucleótido | Secuencia |
|--------------|-----------------|--------------------------------------|
| pRSET-A-YC3 | YC3-S | 5'- CGCGGATCCAAAGCTTTATTTGCGGCG -3' |
| | pRSETA-AS | 5'- CTAGTTATTGCTCAGCGGTGG -3' |
| pRSET-A-Q28 | Q28-S | 5'- CCGGGATCCCGCCGCGCCGCGCACCATG -3' |
| | pRSETA-AS | 5'- CTAGTTATTGCTCAGCGGTGG -3' |
| pGEM-TE-Q28 | Q28-S | 5'- CCGGGATCCCGCCGCGCCGCGCACCATG -3' |
| | Q28-AS | 5'- CCCAAGCTTTCATTTTCTTCTGCGGGC -3' |

Las muestras de ADN de plásmido a secuenciar fueron extraídas mediante QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN© 27106), siguiendo las instrucciones del proveedor. Dicho kit utiliza el método de lisis alcalina modificado por Birnboim y Doly, en donde las bacterias son lisadas bajo condiciones alcalinas, el lisado obtenido es neutralizado y sometido a altas concentraciones de sales que permiten la unión del ADN de plásmido presente a una membrana de sílice para su purificación y posterior elución (QIAGEN, 2015).

Las secuencias obtenidas fueron alineadas contra las secuencias nucleotídicas correspondientes a cada proteína de las cepas de *T. cruzi* CL Brener (Esmeraldo y No Esmeraldo) y Dm28c, utilizando las herramientas BLAST (<https://bit.ly/25Tt9Ou>) y Clustal Omega (<https://bit.ly/2Enwpul>).

9.12. OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

La expresión de proteínas recombinantes por *E. coli*, en la presente experimentación, se encuentra determinada tanto por el promotor T7 como por el operon *lac*. Ambos en presencia de IPTG son reconocidos por sus respectivas ARN polimerasas, iniciando así su transcripción y la de genes río abajo (Studier y colaboradores, 1990; Marbach y Bettenbrock, 2012 y Rosano y Ceccarelli, 2014).

Para inducir la expresión de las proteínas recombinantes fusionadas a una bandera de histidinas, 10mL de medio LB con ampicilina (100µg/mL) y cloranfenicol (30µg/mL) se inocularon con cinco colonias transformadas diferentes de *E. coli* BL21(DE3)pLysS provenientes de la misma colonia, incubando el cultivo *ON* a 37°C con agitación constante. Posteriormente, se realizó la ampliación del cultivo a 500mL de medio LB a una razón 1:100 y se incubó a 30°C con agitación hasta obtener una densidad óptica de 0.6 medida a 600nm. En este punto se adicionó IPTG (Sigma-Aldrich® I6758) a una concentración

final 1mM y se mantuvo a 30°C en agitación constante durante 1 hora. Finalmente, se centrifugó el cultivo a 8,500rpm por 10 minutos a 4°C, descartando el sobrenadante y congelando la pastilla obtenida a -70°C.

9.13. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

La purificación de la proteína recombinante His-Q4DYC3 se hizo por cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC, por sus siglas en inglés) mediante el kit Ni-Sepharose™ 6 Fast Flow (GE-Healthcare© 17-5318-01), cuyo fundamento se basa en la conocida afinidad de los metales de transición, en este caso níquel, hacia el aminoácido histidina en soluciones acuosas (Richard y Deutscher, 2009).

La pastilla obtenida anteriormente en la inducción proteica se resuspendió en 10mL de Buffer de unión 1X (Imidazol 10mM, NaCl 0.5M, NaH₂PO₄ 20mM, pH 7.4) con inhibidor de proteasas cOmplete™ 1X (Sigma-Aldrich® 10618200). Posteriormente la muestra fue sometida a tres ciclos de congelación-descongelación en nitrógeno líquido y en baño a 37°C, al término se añadieron 500µL de lisozima (10mg/mL) y se realizaron varios ciclos de sonicación por 1 minuto, 10seg ON/OFF y 50% de amplitud, hasta observar al microscopio una adecuada disgregación. Se prosiguió a centrifugar la muestra 30 minutos a 8,500rpm a 4°C, la pastilla obtenida (fracción insoluble) se resuspendió en 10mL de Buffer Fosfato Salino (PBS, por sus siglas en inglés) 1X (KCl 2.7mM, KH₂PO₄ 1.8mM, NaCl 0.14M, Na₂HPO₄ 10mM), mientras el sobrenadante (fracción soluble) se colocó en interacción ON con 2mL de perlas de Ni-sefaraosa, previamente lavadas por triplicado con agua inyectable y aforadas con Buffer de unión 1X, en una columna Poly-Prep® Chromatography Column (Bio-Rad© 7311550) a 4°C en agitación. Al siguiente día, se obtuvo por goteo la fracción soluble no unida a las perlas y posteriormente las perlas se lavaron 5 veces con 5mL de Buffer de unión 1X recuperando 1mL de cada lavado para su posterior análisis. Finalmente, se realizaron 5 eluciones de la proteína recombinante con 500µL de Buffer de elusión 1X (Imidazol 500mM, NaCl 0.5M, NaH₂PO₄ 20mM, pH 7.4), cada elusión fue recuperada en tubos Eppendorf de 1.5mL. Las perlas fueron resuspendidas en 500µL de Buffer de elusión 1X y almacenadas a -20°C.

9.14. SDS-PAGE

La electroforesis en gel de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés) es una técnica extensamente utilizada para separar proteínas de acuerdo con su peso molecular, utilizando el detergente SDS para desnaturalizarlas y proporcionarles una carga negativa en relación a su masa molecular (Brunelle y Green, 2014 y Nowakowski, Wobig y Petering, 2014).

Las muestras obtenidas durante la purificación con perlas de Ni-sefarosa (fracción insoluble, fracción soluble no unida, lavados, elusiones y perlas) recibieron un tratamiento previo, añadiéndoles Buffer de carga Laemmli 2X (Azul de bromofenol 0.004%, Glicerol 20%, SDS 4%, Tris-OH 0.125mM y β -mercaptoetanol 10%) en proporción 1:1 y siendo sometidas a ebullición violenta por 5 minutos. Una vez que las muestras fueron desnaturalizadas se cargaron en geles de poliacrilamida al 12% y fueron corridas durante dos horas a 100V y 400mA en Buffer de corrida 1X (Glicina 250mM, SDS 0.1%, Tris-HCl 25mM, pH 8.3). Los geles fueron analizados mediante tinción con Azul de Coomassie y por *Western Blot*.

9.14.1. TINCIÓN CON AZUL DE COOMASSIE

La tinción de proteínas con el colorante Azul de Coomassie se fundamenta en la generación de atracciones electrostáticas, como fuerzas de Van Der Waals, entre la molécula del colorante y los grupos amino de las proteínas, para lo cual se requiere un medio ácido proporcionado por el ácido acético (Carrillo y colaboradores, 2013).

La tinción de geles de poliacrilamida al 12% con Azul de Coomassie (Ácido acético 10%, Azul de Coomassie 3mM, Etanol 50%) se realizó durante una hora en agitación a 50rpm. Posteriormente, los geles se lavaron con agua bidestilada por 10 minutos en agitación antes de ser desteñidos con solución decolorante (Ácido acético 5%, Etanol 25%) en agitación *ON*. Los geles se fotodocumentaron en un equipo MiniBIS Pro (DNR Bio-Imaging Systems©).

9.14.2. WESTERN BLOT

La técnica de *Western Blot* se basa en la transferencia de proteínas separadas mediante SDS-PAGE a una membrana de alta afinidad, bloqueada posteriormente para reducir o evitar uniones no específicas del anticuerpo primario, que es el anticuerpo específico a la proteína de interés. Este a su vez es detectado por un segundo anticuerpo conjugado a un marcador que produce la señal a detectar (Mahmood y Yang, 2012 y Bass y colaboradores, 2016).

La electrotransferencia de las proteínas corridas en geles de poliacrilamida hacia una membrana de nitrocelulosa se llevó a cabo en una cámara electroforética MiniPROTEAN® 3 Cell (Bio-Rad©) con Buffer de transferencia 1X (Glicina 192mM, Metanol 20%, Tris-OH 25mM) durante 1 hora a 100V y 400mA. La membrana fue teñida brevemente con Rojo Ponceau (Ácido acético 5%, Rojo Ponceau S 0.1%) para verificar la eficiencia de transferencia, se destiñó con agua y se bloqueó 1 hora en agitación con solución de bloqueo (Leche en polvo Svelty-Nestlé® sin grasa al 6% en PBS 1X-Tween 20 al 0.05%). A continuación, la membrana fue lavada por 10 minutos con agua

bidestilada e incubada ON a 4°C con el anticuerpo primario comercial Anti-histidinas producido en ratón (Monoclonal Anti-Hystidine clone His&, Sigma-Aldrich® H1029) en dilución 1: 1,500. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS 1X-Tween 20 al 0.05%, PBS 1X y PBS 1X-Tween 20 al 0.05%, respectivamente. Posteriormente se incubó la membrana por 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario Anti-antihistidinas conjugado a peroxidasa producido en cabra en dilución 1:5,000 (6x-His Tag Polyclonal Antibody HRP, Invitrogen™ PA1-23024). Por último, se realizaron nuevamente tres lavados con PBS 1X-Tween 20 al 0.05%, PBS 1X y PBS 1X-Tween 20 al 0.05%. La membrana fue revelada por quimioluminiscencia en el equipo ChemiDoc™ XRS+ System (Bio-Rad©) usando el kit SuperSignal™ West Femto, Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific™ 34095) siguiendo las especificaciones del proveedor (Sambrook y Rusell, 2001).

9.15. EXTRACCIÓN DE PROTEINAS TOTALES

La lisis celular realizada con detergentes, como SDS y Nonidet P-40, se basa en la solubilización de lípidos y proteínas membranales mediante la producción de poros que eventualmente causarán ruptura celular. Además, ambos detergentes generan desnaturalización y ruptura de complejos proteícos (Brown y Audet, 2008 y Lever y colaboradores, 2015).

Cultivos de 1×10^8 parásitos (epimastigotes) fueron centrifugados a 3,000rpm por 15 minutos. La pastilla obtenida fue lavada por triplicado con 1mL de PBS 1X y tratada por 20 minutos con 500µL de buffer de lisis A (Tris-HCl 50mM pH 7.8, Nonidet P-40 1%, SDS 1%) a 4°C. Posteriormente, la muestra fue sometida a 5 ciclos de congelación-descongelación en nitrógeno líquido y baño a 37°C.

9.16. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

El método utilizado por el kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific™ 23225) combina la reacción de Biuret, que consta de la reducción del ion Cu^{2+} a Cu^+ al formar un complejo con los enlaces peptídicos en medio alcalino, con la detección colorimétrica del ion Cu^+ utilizando ácido bicinconínico (BCA, por sus siglas en inglés) (McClatchey, 2002).

A través del kit anteriormente mencionado se realizó la cuantificación de proteínas totales de los extractos totales de epimastigotes, tripomastigotes, amastigotes y bacterias *E. coli* BL21(DE3)pLysS (utilizado como control), siguiendo las indicaciones del proveedor. La proteína recombinante His-Q4DYC3 se cuantificó mediante una curva patrón de albúmina de suero bovino (BSA, de acuerdo con sus siglas en inglés, *Bovine serum albumin*) analizada por SDS-PAGE, abarcando de 0.1µg/µL a 500µg/µL.

9.17. ELISA

El ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) detecta y cuantifica antígenos específicos presentes en una muestra mediante su inmovilización en una fase sólida para su posterior reconocimiento por un anticuerpo primario específico, el cual a su vez es reconocido por un anticuerpo secundario conjugado a una enzima capaz de producir una señal colorimétrica por la adición de su sustrato. Siendo dicha señal proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra (Shah y Maghsoudlou, 2016 y Konstantinou, 2017).

Las pruebas de ELISA se realizaron en placas de 96 pozos de alta adherencia, inmovilizados *ON* a 4°C con 25µg de la proteína recombinante obtenida o extracto total de proteínas en 50µL de buffer de carbonatos (Na₂CO₃ 16mM, NaHCO₃ 34mM, pH 9.6). Posteriormente, se realizaron tres lavados con 200µL de PBS 1X - Tween 20 al 0.1% antes de bloquear los pozos durante 1 hora a 37°C en cámara húmeda con PBS 1X - Tween 20 al 0.1% - BSA 3% y realizar, nuevamente, tres lavados con PBS 1X – Tween 20 0.1%. A continuación, se añadieron sueros humanos reactivos y no reactivos a *T. cruzi* en dilución 1:25 y 1:50 en PBS 1X – Tween 20 al 0.1% - BSA 3% incubándose 2 horas a 37°C en cámara húmeda y realizando 5 lavados posteriores con PBS 1X – Tween 20 0.1%. Se añadió posteriormente el anticuerpo secundario conjugado de cabra anti-IgG de humano en dilución 1:1,000 con PBS 1X – Tween 20 al 0.1% - BSA 3%, incubando las muestras 1 hora a 37°C. Las placas fueron lavadas 5 veces con PBS 1X – Tween 20 al 0.1%, antes de adicionar 50µL de solución reveladora (C₆H₈O₇ 9.49%, H₂O₂ 30%, Na₃C₆H₅O₇ 2.99%, OPD 10mg) a cada pozo y ser incubadas por 15 minutos a 37°C en oscuridad y cámara húmeda. La reacción fue detenida con solución de ácido sulfúrico 2N y leída a 490nm un equipo Max® Jinetico ELISA Micro late Reader a 490nm.

Mediante el Kit diagnóstico Test ELISA Chagas III (GrupoBios S.A. 1300442), se corroboró la reactividad o no reactividad de los sueros humanos utilizados, ante *T. cruzi*, siguiendo las instrucciones del proveedor.

10. RESULTADOS

10.1. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Con la finalidad de clonar las secuencias codificantes completas de las proteínas en estudio: Q4D2C9, Q4CY87, Q4DYC3, Q4CQ28 y Q4DC56, llevamos a cabo el análisis bioinformático para el diseño de los oligonucleótidos correspondientes. Se analizaron *in silico* tanto las secuencias codificantes de las proteínas en estudio, como los oligonucleótidos diseñados para amplificar dichas secuencias desde un codón después del ATG de inicio, el cual fue eliminado considerando que se utilizará el codón de inicio de la bandera de Histidinas colocada río arriba, hasta el codón de paro de la secuencia en estudio. En ambos extremos se agregaron las secuencias para las enzimas de restricción que fueron utilizadas para su clonación dirigida en los vectores pGEM®-T Easy y pRSET®-A (**Tabla 7**) (Lodge, Lund y Minchin, 2007). Además, se agregaron nucleótidos extras en la posición necesaria de acuerdo con el manual de usuario 2002-03 New England BioLabs® Inc., para mantener en fase las secuencias en estudio con la bandera de histidinas del vector y poseer el número de nucleótidos necesarios en los extremos de los amplicones para un adecuado acoplamiento de las enzimas de restricción (Caldwell, Williams y Caldwell, 2006). Finalmente, nos aseguramos que el porcentaje de nucleótidos G y C fuera similar entre ambos oligonucleótidos, a fin de obtener una T_m compatible entre los mismos. El análisis de las secuencias de las proteínas Q4D2C9, Q4CY87, Q4DYC3, Q4CQ28 y Q4DC56, y sus secuencias codificantes, se realizó utilizando como referencia las secuencias pertenecientes a la cepa CL Brener Tc00.1047053505163.80, Tc00.1047053510001.20, TcCLB.511817.40, TcCLB.510681.30 y Tc00.1047053508317.80 (de acuerdo con su número de identificación en la base TriTrypDB), respectivamente, ya que es la cepa de referencia del proyecto genoma de *T. cruzi*, la cual cuenta con su genoma totalmente secuenciado, además de presentar la mayoría de características relevantes de este parásito y estar ampliamente caracterizada de forma experimental (Zingales y colaboradores, 1997 y Lacerda y colaboradores, 2008).

Las secuencias nucleotídicas codificantes a las proteínas en estudio fueron extraídas en formato FASTA para el diseño de oligonucleótidos (**Anexo 15.1**), observando que dichas secuencias varían entre 867 y 2,466pb. Como se muestra en la **Tabla 7**, se diseñó un juego de oligonucleótidos sentido y antisentido para cada secuencia en estudio. En el caso de las secuencias codificantes de Q4D2C9, Q4CY87 y Q4DYC3, el contenido de GC de ambos oligonucleótidos es similar, obteniendo una T_m cercana. Por el contrario, en el caso de las secuencias codificantes de Q4CQ28 y Q4DC56, el contenido de GC y por consiguiente sus T_m son diferentes. Sin embargo, no fue necesario añadir nucleótidos adicionales ni de la secuencia codificante ni de la no codificante (extremo 5' o 3'), debido a que afectaría el tamaño, costo y funcionalidad de los oligonucleótidos ya que de cualquier modo cumplen con la regla

experimental que refiere usar como temperatura de alineamiento 60°C al tener un contenido de GC es mayor o igual al 50% y 55°C si es menor al 50%.

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados en la amplificación por PCR de las secuencias codificantes a las proteínas Q4D2C9, Q4CY87, Q4DYC3, Q4CQ28 y Q4DC56.

| Proteína | On | Secuencia | L | Nt | %GC | ER |
|---------------------|-----------------|---|----|----|------|---------|
| Q4D2C9 | S | 5'-GCGGTACCGGGACACAGCACAATTAACAC-3' NF SR NF | 29 | 19 | 55.2 | KpnI |
| | AS | 5'-CGCAAGCTTCTAGCCACGCCCTTCATTGCG-3' NF SR CP | 30 | 21 | 60 | HindIII |
| Q4CY87 | S | 5'-CCGGGTACCGCGGGGATTTACCTTCCAATGAG-3' NF SR NF | 32 | 21 | 59.4 | KpnI |
| | AS | 5'-CCGGAATTCGCGCTATCGCTTTTCCTCTTC-3' NF SR NF CP | 30 | 18 | 53.3 | EcoRI |
| Q4DYC3 | S | 5'-CGCGGATCCAAAGCTTTATTTGCGGCG-3' NF SR | 27 | 18 | 55.6 | BamHI |
| | AS | 5'-GCGCGGTACCTCAGAACTTGAAAACCATC-3' NF SR CP | 29 | 19 | 51.7 | KpnI |
| Q4CQ28 | S | 5'-CCGGGATCCCGCCCGCCGCGCACCATG-3' NF SR | 27 | 18 | 81.5 | BamHI |
| | AS | 5'-CCCAAGCTTTCATTTTCTTCTGCGGGC-3' NF SR CP | 27 | 18 | 51.9 | HindIII |
| Q4DC56 ¹ | S | 5'-CCGGGTACCGGCGTTCTGGGGGAGACGG-3' NF SR NF | 28 | 17 | 75 | KpnI |
| | AS ¹ | 5'-CCGGAATTCTCAGCGGAATATGGACTTCG-3' NF SR CP | 31 | 19 | 51.6 | EcoRI |

* On (Oligonucleótido), S (Oligonucleótido sentido), AS (Oligonucleótido antisentido), Nt (Nucleótidos que abarcan los oligonucleótidos en la secuencia de ADN codificante a la proteína correspondiente), L (Longitud total de nucleótidos del oligonucleótido), %GC (Porcentaje Guanina-Citosina), ER (Enzima de restricción),

NF (Nucleótidos flanqueantes), SR (Sitio de restricción), CP (Codón de paro), ¹(el oligonucleótido antisentido de Q4DC56 no fue diseñado en el presente trabajo, pero fue utilizado durante el mismo).

La especificidad de los oligonucleótidos diseñados para las secuencias codificantes a amplificar se comprobó alineando la secuencia de cada oligonucleótido contra el genoma de *T. cruzi* CL Brener mediante la herramienta BLAST de la base de datos TriTrypDB. Para ello se analizaron las secuencias que presentaron los menores valores de *Expect value* (*E value*) para cada oligonucleótido, ya que entre menor sea dicho valor mayor es la similitud entre ambas secuencias. Conforme a la **Figura 8**, los oligonucleótidos Q4D2C9-S y Q4D2C9-AS se alinearon con mayor especificidad a la secuencia TcCLB.505163.80:mRNA, la cual codifica para la proteína esperada Q4D2C9 de 2,397pb, por lo que no se esperaría obtener amplificaciones inespecíficas al utilizar dicho par de oligonucleótidos en la presente experimentación.

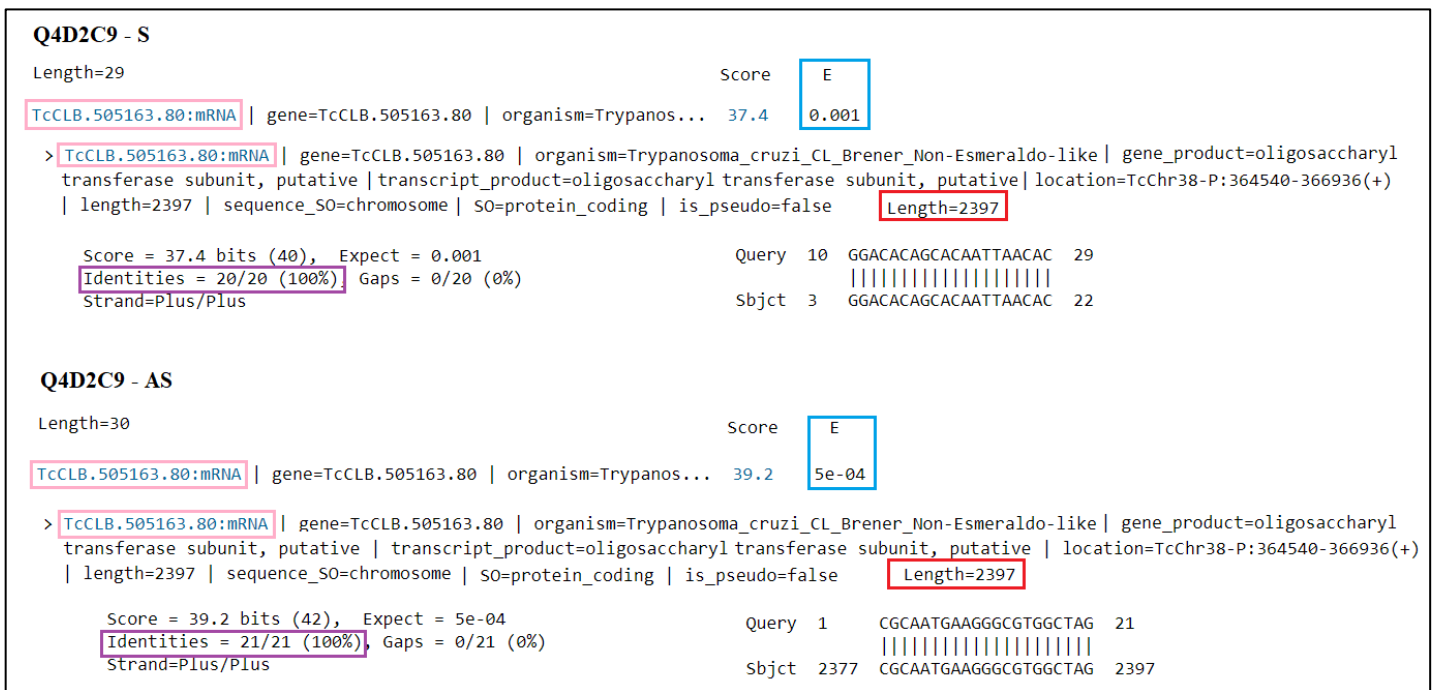


Figura 8. Alineación de los oligonucleótidos diseñados para la secuencia codificante a la proteína Q4D2C9 ante el genoma de *T. cruzi* CL Brener. Tanto el oligonucleótido sentido (Q4D2C9-S) como antisentido (Q4D2C9-AS) se alinearon a la secuencia TcCLB.505163.80:mRNA (recuadros rosas) de 2,397pb (recuadros rojos) con un porcentaje de identidad del 100% (recuadros morados), presentando los menores valores de *E value* (recuadros azules), respecto a otras secuencias.

Como se muestra en la **Figura 9**, tanto el oligonucleótido sentido como el antisentido de Q4CY87 se alinean con mayor especificidad a la secuencia codificante de dicha proteína

(TcCLB.510001.20:mRNA), respecto al resto de las proteínas presentes en *T. cruzi*. Por esta razón, se predice no obtener productos inespecíficos durante la amplificación por PCR de la secuencia codificante de Q4CY87.

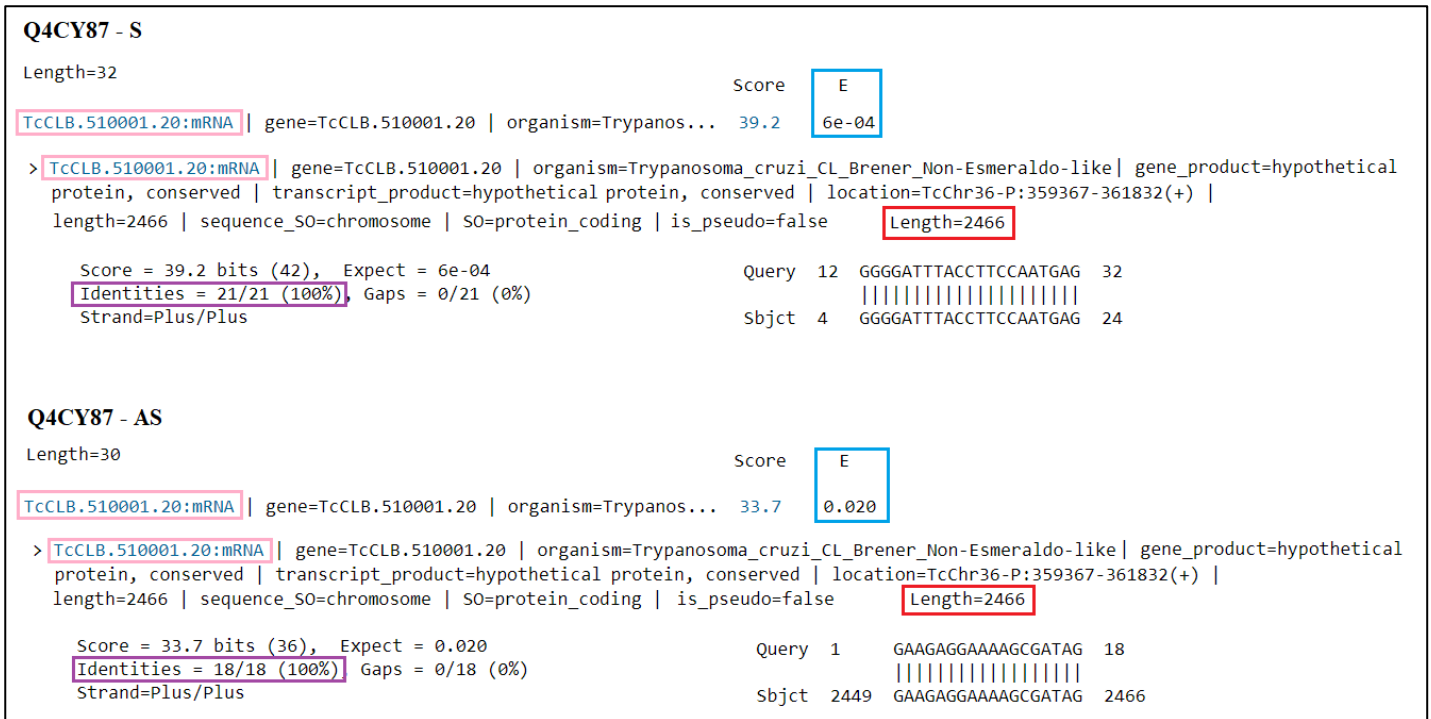


Figura 9. Alineación de los oligonucleótidos diseñados para la secuencia codificante a la proteína Q4CY87 ante el genoma de *T. cruzi* CL Brener. Los oligonucleótidos sentido (Q4CY87-S) y antisentido (Q4CY87-AS) se alinearon a la secuencia TcCLB.510001.20:mRNA (recuadros rosas) de 2,466pb (recuadros rojos) con un porcentaje de identidad del 100% (recuadros morados), presentando los valores mínimos de *E value* (recuadros azules), respecto a otras secuencias.

La **Figura 10** muestra que la secuencia del oligonucleótido sentido de *Q4DYC3* solamente se alineó a la secuencia TcCLB.511817.40:mRNA, con una identidad del 100% y el menor valor de *E value*. Esta secuencia corresponde a la proteína en estudio *Q4DYC3* de 867pb. En la alineación del oligonucleótido antisentido se encontraron dos secuencias con el menor valor de *E value* (0.005) y el mismo porcentaje de identidad (100%), las cuales corresponden a la secuencia codificante de la proteína esperada (*Q4DYC3*) y a su secuencia ortóloga en CL Brener Esmeraldo (TcCLB.510521.10) de 540pb. Al utilizar en conjunto ambos oligonucleótidos, se esperaría que amplificara logarítmicamente y por lo tanto en mayor proporción la secuencia codificante de *Q4DYC3*, debido a que la secuencia TcCLB.510521.10 amplificaría aritméticamente durante los primeros ciclos de PCR y al no será delimitada por otro oligonucleótido, su cantidad final será despreciable.

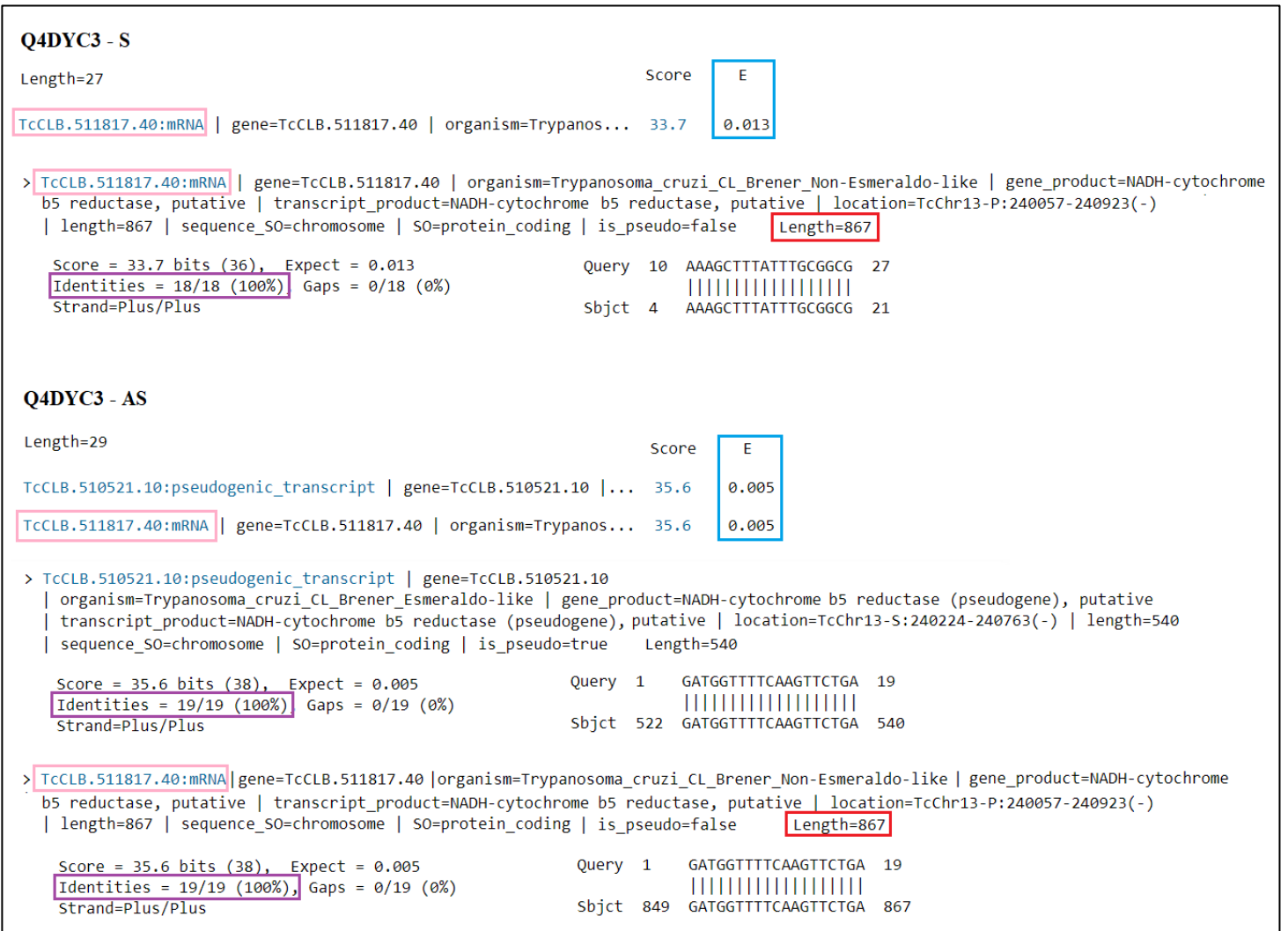


Figura 10. Alineación de los oligonucleótidos diseñados para la secuencia codificante a la proteína Q4DYC3 ante el genoma de *T. cruzi* CL Brener. Ambos oligonucleótidos (Q4DYC3-S y Q4DYC3-AS) se alinearon a la secuencia TcCLB.51181740:mRNA (recuadros rosas) de 2397pb (recuadros rojos) con un porcentaje de identidad del 100% (recuadros morados), presentando los menores valores de *E value* (recuadros azules), en comparación a otras secuencias del genoma de *T. cruzi*.

De acuerdo con la **Figura 11**, los oligonucleótidos sentido Q4CQ28-S y antisentido Q4CQ28-AS son capaces de alinearse con más de una secuencia del genoma de *T. cruzi* de forma específica al poseer un porcentaje de identidad del 100%. Entre estas secuencias se encuentra la de nuestro interés (TcCLB.510681.30:mRNA), que al ser la única a la que se unen ambos oligonucleótidos se predice que su amplificación por PCR no generará productos inespecíficos.



Figura 11. Alineación de los oligonucleótidos diseñados para la secuencia codificante a la proteína Q4CQ28 ante el genoma de *T. cruzi* CL Brener. Tanto el oligonucleótido sentido (Q4CQ28-S) como antisentido (Q4CQ28-AS) pueden alinearse con más de una secuencia del genoma de *T. cruzi* con un 100% de identidad (recuadros morados). Entre las secuencias con el valor más bajo de *E value* (recuadro azul) se encuentra la de nuestro interés, TcCLB.510681.30:mRNA (recuadros rosas) formada por 1,047pb (recuadros rojos).

En las **Figuras 12.1 y 12.2** se muestra que los oligonucleótidos Q4DC56-S y Q4DC56-AS se pueden alinear a diferentes secuencias genómicas presentes en *T. cruzi* de forma específica, de acuerdo con su porcentaje de identidad y valores de *E value*. Tres de las secuencias obtenidas, incluyendo la secuencia codificante de Q4DC56 (TcCLB.518317.80:mRNA), se alinean a ambos oligonucleótidos implicando que cualesquiera de ellas o todas pueden ser amplificadas durante la PCR a realizar, sin poder ser diferenciadas, debido a que presentan tamaños similares, de 1,800pb aproximadamente. Para corroborar que el producto amplificado y ligado a pGEM®-T Easy corresponda a la secuencia de nuestro interés (*Q4DC56*), será necesario realizar una reacción de PCR anidada utilizando oligonucleótidos específicos a dicha secuencia.

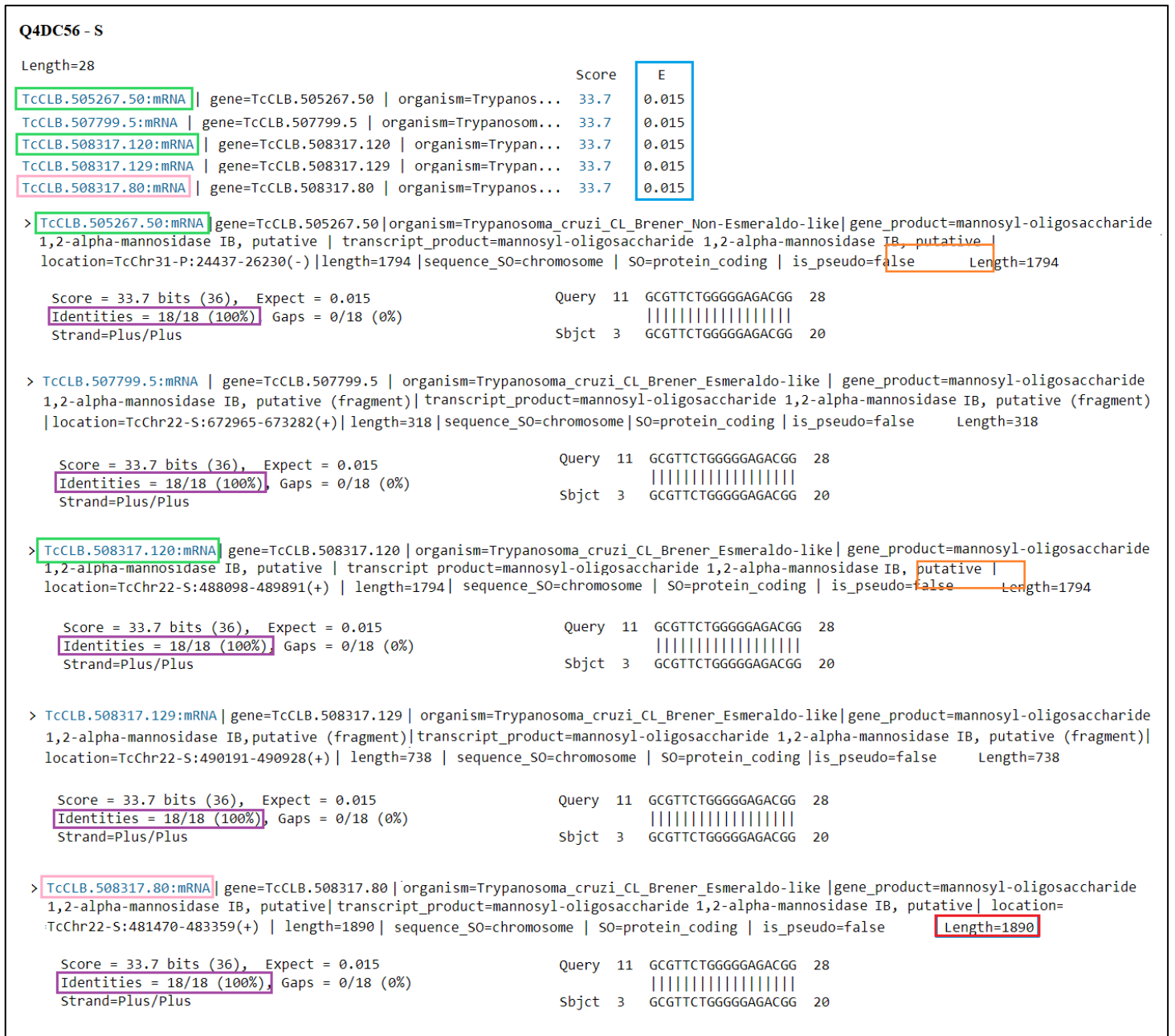


Figura 12.1. Alineación de los oligonucleótidos diseñados para la secuencia codificante a la proteína Q4DC56 ante el genoma de *T. cruzi* CL Brener. Los oligonucleótidos sentido y antisentido de *Q4DC56* son capaces de alinearse a tres secuencias de *T. cruzi* (recuadros rosas y verdes) presentando un porcentaje de identidad del 100% (recuadros morados), valores de *E value* (recuadro azul) iguales y tamaños similares (recuadros rojos y anaranjados), incluyendo la secuencia de interés *Q4DC56* (recuadros rosas).

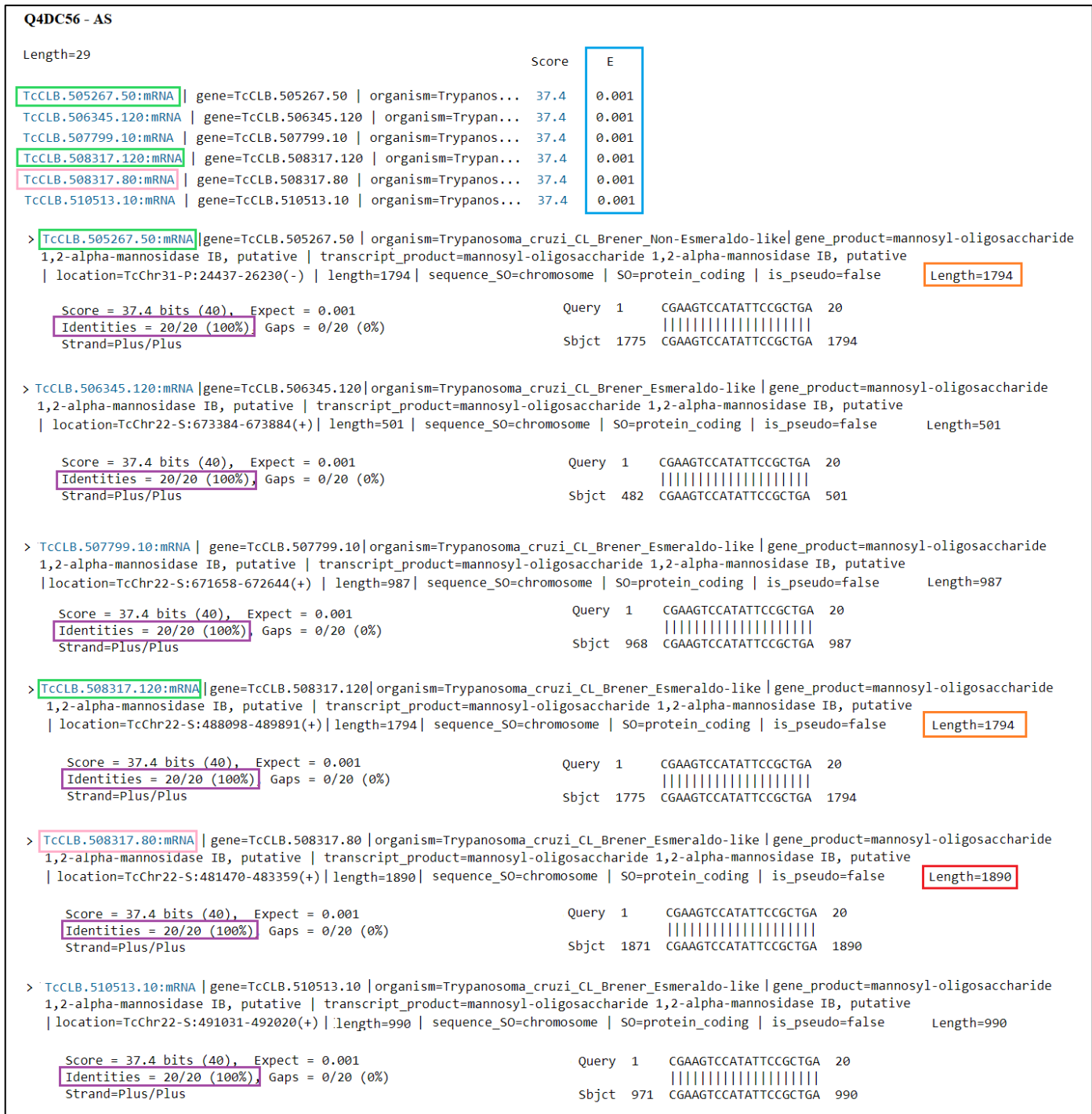


Figura 12.2. Continuación: Alineación de los oligonucleótidos diseñados para la secuencia codificante a la proteína Q4DC56 ante el genoma de *T. cruzi* CL Brener. Los oligonucleótidos sentido y antisentido de *Q4DC56* son capaces de alinearse a tres secuencias de *T. cruzi* (recuadros rosas y verdes) presentando un porcentaje de identidad del 100% (recuadros morados), valores de *E value* (recuadro azul) iguales y tamaños similares (recuadros rojos y anaranjados), incluyendo la secuencia de interés *Q4DC56* (recuadros rosas).

Para garantizar la adecuada traducción de las secuencias codificantes unidas a una bandera de histidinas, se realizó la fusión entre ambas secuencias en el programa SnapGene®. En las **Figura 13 – 17** se muestra el codón de inicio proporcionado por el vector pRSET®-A, seguido por una bandera de seis histidinas, el promotor T7 y la secuencia codificante correspondiente a cada una de las proteínas en estudio, fusionada mediante sitios de restricción proporcionados por los oligonucleótidos utilizados para su amplificación. Al observar la correcta fusión y formación del codón de paro de cada una de estas secuencias codificantes, se deduce que las cinco fusiones se encuentran en fase respecto al marco de lectura establecido por el vector utilizado.

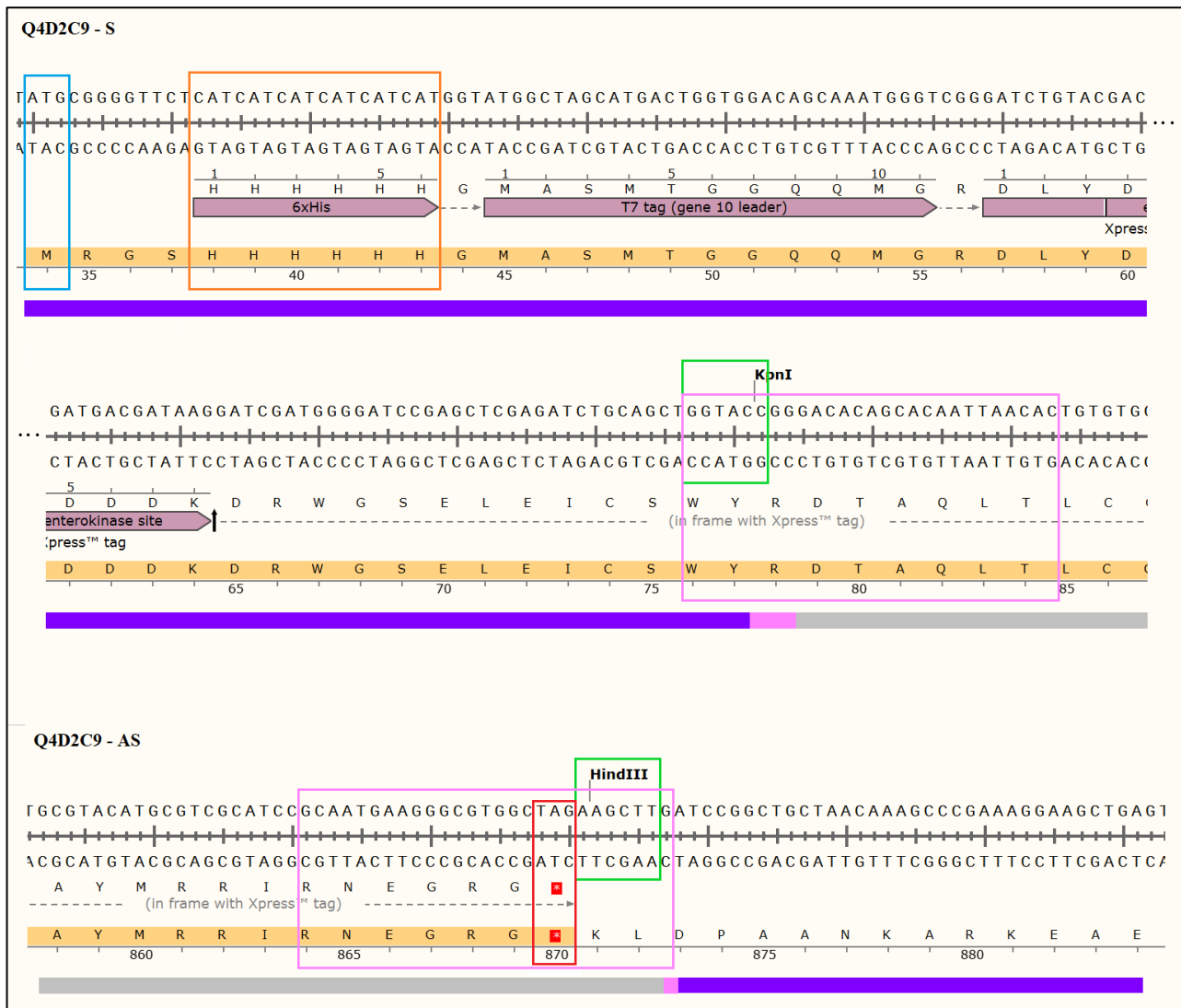


Figura 13. Fusión de la secuencia codificante a la proteína Q4D2C9 con la bandera de histidinas presente en el vector pRSET®-A. A partir del codón de inicio (recuadro azul) presente en el vector pRSET® A (barra morada) se traduce la construcción pRSET-A-2C9, incluyendo una bandera de histidinas (recuadro anaranjado) fusionada a la proteína Q4D2C9 (barra gris) mediante los sitios de restricción

(recuadros verdes) de las enzimas KpnI y HindIII proporcionados tanto por el vector como por los oligonucleótidos diseñados (recuadros rosas). Dicha traducción finalizará con el codón de paro TAG (recuadro rojo).

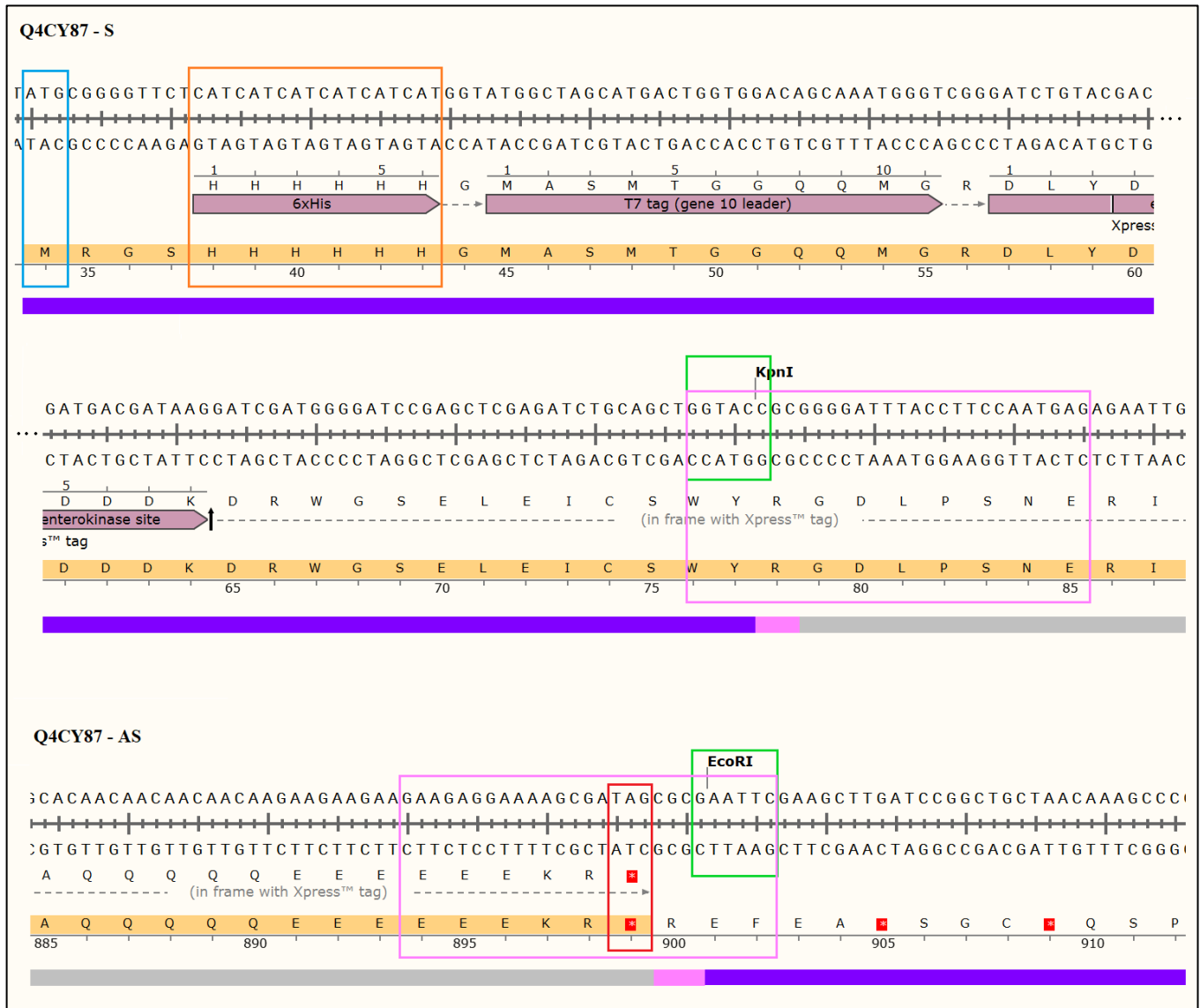


Figura 14. Fusión de la secuencia codificante a la proteína Q4CY87 con la bandera de histidinas presente en el vector pRSET®-A. A partir del codón de inicio (recuadro azul) presente en el vector pRSET®-A (barra morada) se traduce la construcción pRSET-A-Y87, incluyendo una bandera de histidinas (recuadro anaranjado) fusionada a la proteína Q4CY87 (barra gris) mediante los sitios de restricción (recuadros verdes) de las enzimas KpnI y EcoRI proporcionados tanto por el vector como por los oligonucleótidos diseñados (recuadros rosas). Dicha traducción finalizará con el codón de paro TAG (recuadro rojo).

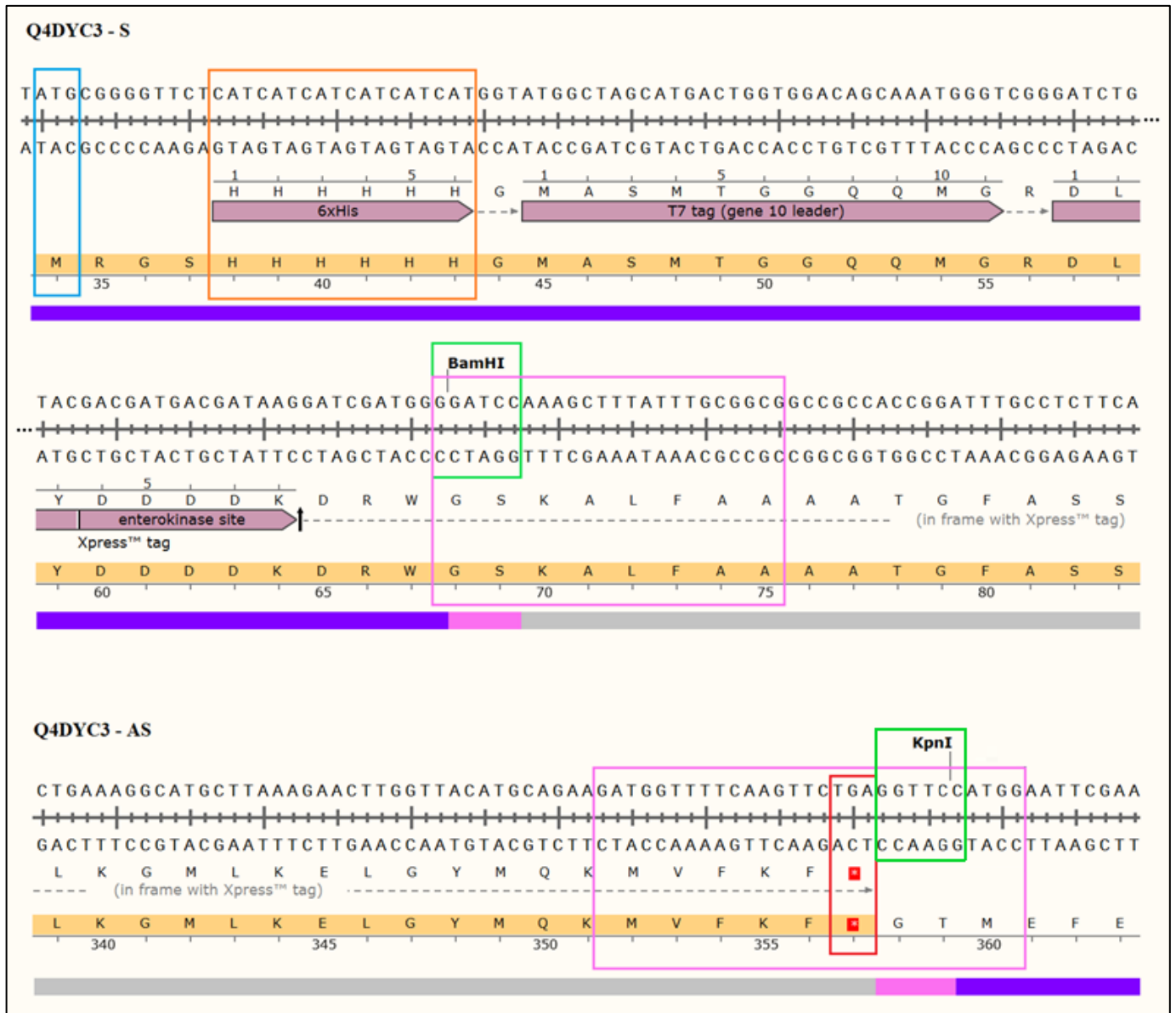


Figura 15. Fusión de la secuencia codificante a la proteína Q4DYC3 con la bandera de histidinas presente en el vector pRSET®-A. A partir del codón de inicio (recuadro azul) presente en el vector pRSET®-A (barra morada) se traduce la construcción pRSET-A-YC3, incluyendo una bandera de histidinas (recuadro anaranjado) fusionada a la proteína Q4DYC3 (barra gris) mediante los sitios de restricción (recuadros verdes) de las enzimas BamHI y KpnI proporcionados tanto por el vector como por los oligonucleótidos diseñados (recuadros rosas). Dicha traducción finalizará con el codón de paro TGA (recuadro rojo).

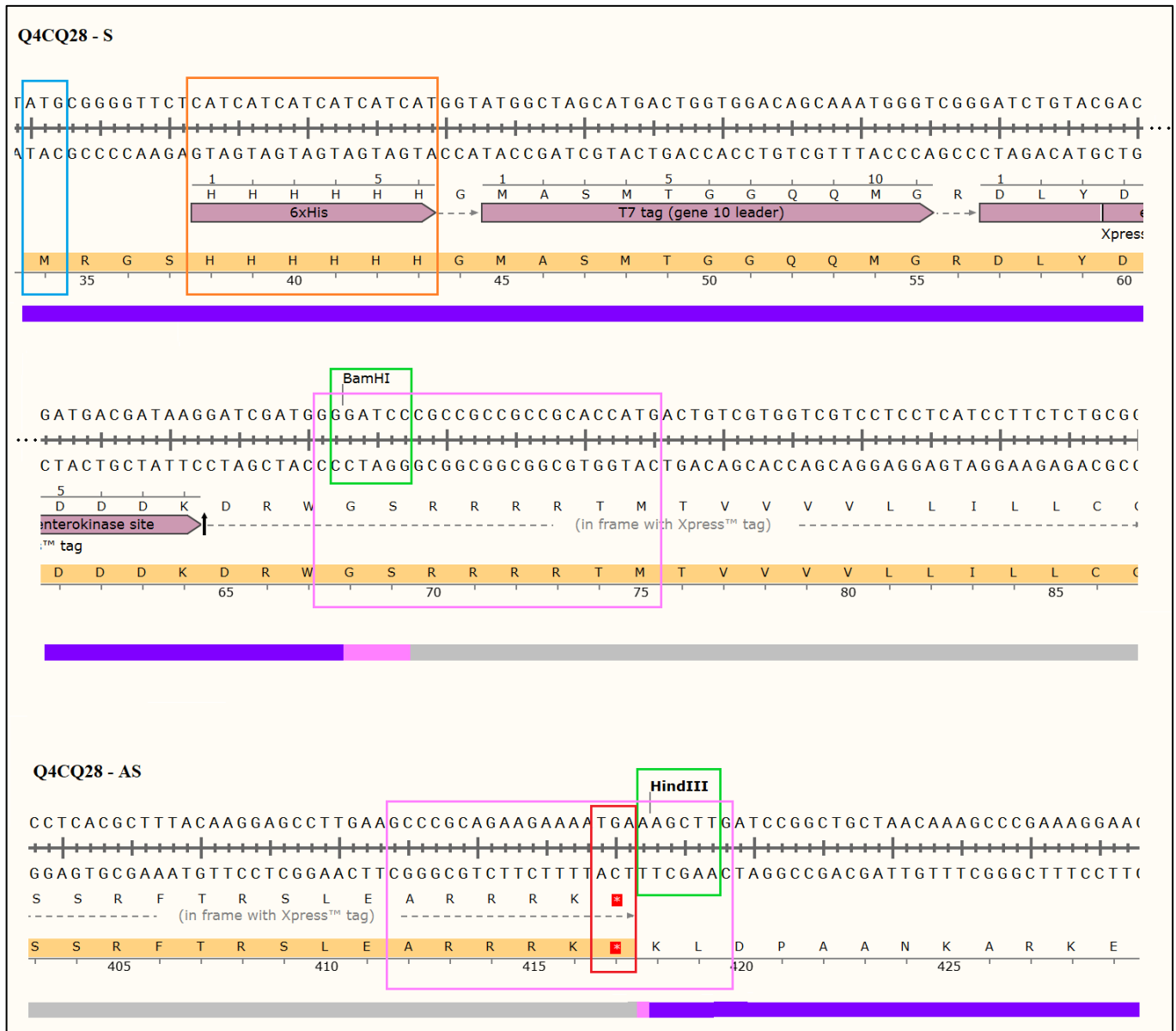


Figura 16. Fusión de la secuencia codificante a la proteína Q4CQ28 con la bandera de histidinas presente en el vector pRSET®-A. A partir del codón de inicio (recuadro azul) presente en el vector pRSET®-A (barra morada) se traduce la construcción pRSET-A-Q28, incluyendo una bandera de histidinas (recuadro anaranjado) fusionada a la proteína Q4CQ28 (barra gris) mediante los sitios de restricción (recuadros verdes) de las enzimas BamHI y HindIII proporcionados tanto por el vector como por los oligonucleótidos diseñados (recuadros rosas). Dicha traducción finalizará con el codón de paro TGA (recuadro rojo).

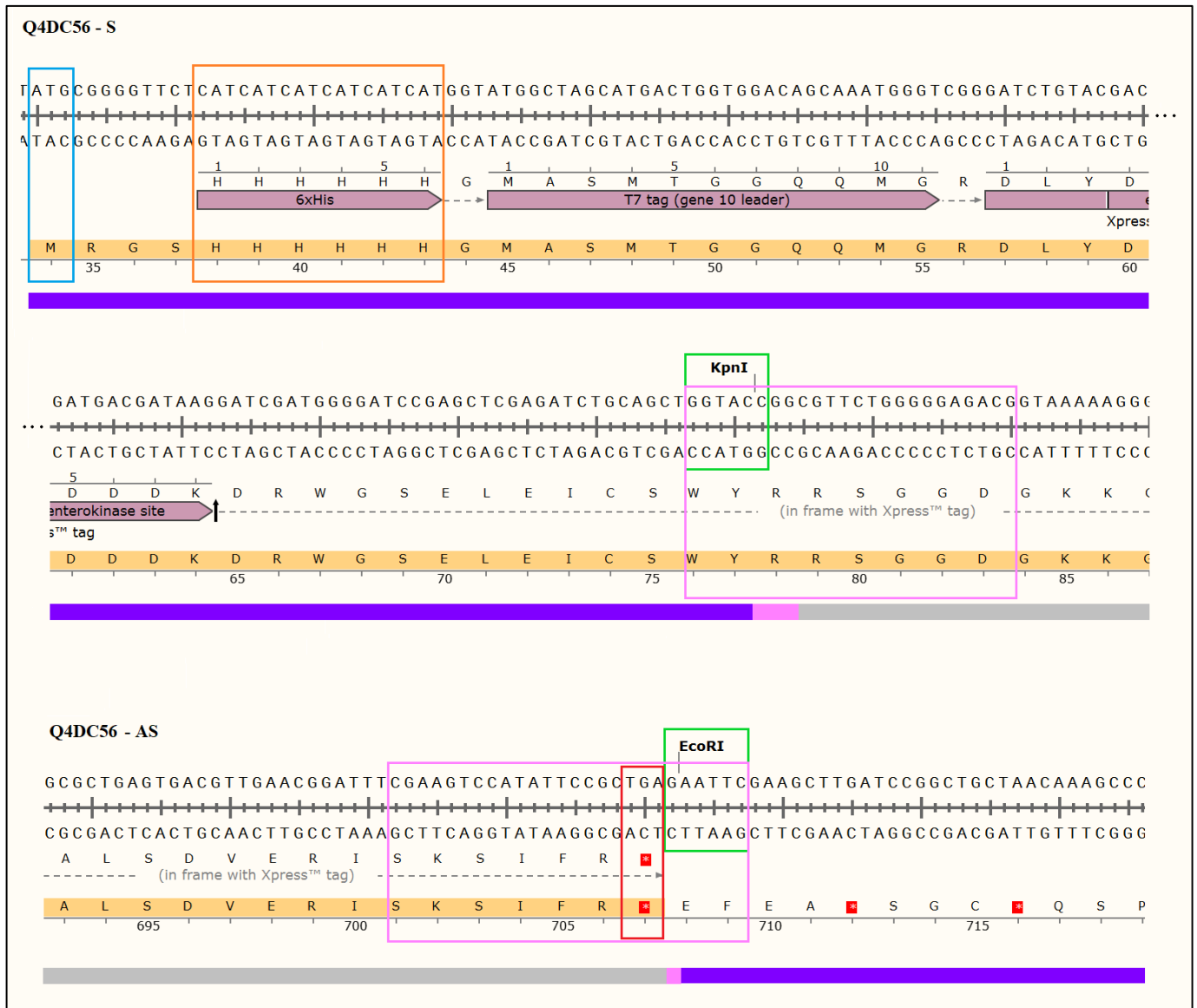
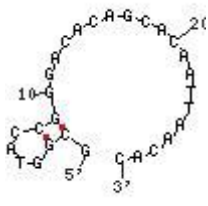
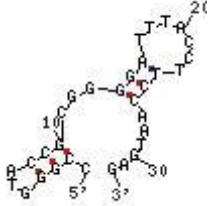
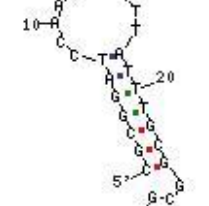
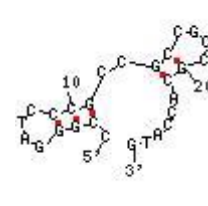
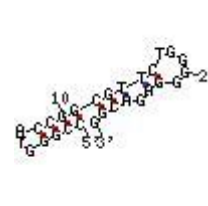
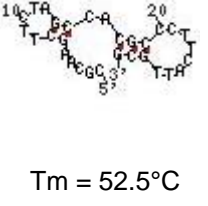
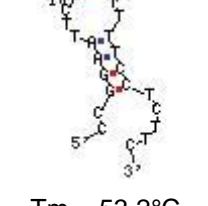
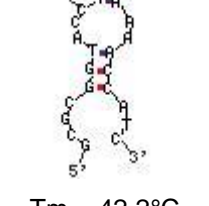
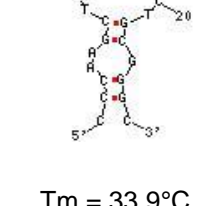
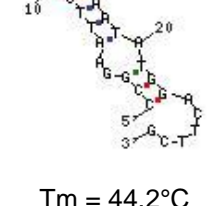


Figura 17. Fusión de la secuencia codificante a la proteína Q4DC56 con la bandera de histidinas presente en el vector pRSET®-A. A partir del codón de inicio (recuadro azul) presente en el vector pRSET®-A (barra morada) se traduce la construcción pRSET-A-C56, incluyendo una bandera de histidinas (recuadro anaranjado) fusionada a la proteína Q4DC56 (barra gris) mediante los sitios de restricción (recuadros verdes) de las enzimas KpnI y EcoRI proporcionados tanto por el vector como por los oligonucleótidos diseñados (recuadros rosas). Dicha traducción finalizará con el codón de paro TGA (recuadro rojo).

Con el fin de evitar la formación de estructuras secundarias en los oligonucleótidos diseñados durante la amplificación por PCR de las secuencias codificantes en estudio, se determinaron las estructuras secundarias de probable formación a través del programa bioinformático OligoAnalyzer, considerando las condiciones de reacción especificadas en el punto 9.7. Acorde con los resultados de la **Tabla 8**, las estructuras tipo horquillas de los oligonucleótidos diseñados presentan valores de Tm menores a

la temperatura de alineamiento a utilizar (60°C), indicando que durante la amplificación por PCR dichas estructuras serán linealizadas y/o permanecerán en bajas cantidades. También se obtuvo el cambio en la energía libre de Gibbs (ΔG) de estas estructuras, variando entre -6.69 y -1.03Kcal/mol, valores que indican su baja probabilidad de formación durante la experimentación, al ser cercanos y/o mayores a -5Kcal/mol (Barh, Khan y Davies, 2015 y Popp y Bauer, 2015),

Tabla 8. Estructuras tipo horquilla de posible formación en los oligonucleótidos de las secuencias codificantes a las proteínas Q4D2C9, Q4CY87, Q4DYC3, Q4CQ28 y Q4DC56, obtenidas mediante el programa OligoAnalyzer.

| On | Q4D2C9 | Q4CY87 | Q4DYC3 | Q4CQ28 | Q4DC56 |
|-----------|---|---|---|---|---|
| S |  <p>Tm = 46.1°C $\Delta G = -1.7$Kcal/mol</p> |  <p>Tm = 59.8°C $\Delta G = -5.6$Kcal/mol</p> |  <p>Tm = 47.4°C $\Delta G = -2.3$Kcal/mol</p> |  <p>Tm = 52.8°C $\Delta G = -4.3$Kcal/mol</p> |  <p>Tm = 54.9°C $\Delta G = -6.6$Kcal/mol</p> |
| AS |  <p>Tm = 52.5°C $\Delta G = -4.3$Kcal/mol</p> |  <p>Tm = 53.2°C $\Delta G = -5.4$Kcal/mol</p> |  <p>Tm = 42.2°C $\Delta G = -2.7$Kcal/mol</p> |  <p>Tm = 33.9°C $\Delta G = -1.0$Kcal/mol</p> |  <p>Tm = 44.2°C $\Delta G = -2.7$Kcal/mol</p> |

* AS (Antisentido), On (oligonucleótido), S (Sentido), Tm (Temperatura de fusión), ΔG (Cambio de la energía libre de Gibbs).

El valor límite de ΔG aceptable para homo y heterodímeros es -11Kcal/mol (Mukhopadhyay, Choudhary e Iquebal, 2018). Al analizar la **Tabla 9**, existen pocas estructuras secundarias que sobrepasan dicho valor límite, representando una baja probabilidad de generar una amplificación inadecuada y/o inespecífica de las secuencias codificantes a las proteínas en estudio.

Tabla 9. Valores de ΔG de homodímeros y heterodímeros de posible formación entre los oligonucleótidos de las secuencias codificantes a las proteínas Q4DYC3, Q4CQ28, Q4DC56, Q4D2C9 y Q4CY87, obtenidas mediante el programa OligoAnalyzer.

| E | On | Q4DYC3 | Q4CQ28 | Q4DC56 | Q4D2C9 | Q4CY87 |
|----|----|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|
| Ho | S | -14.11 kcal/mol | -24.12 kcal/mol | -9.78 kcal/mol | -17.01 kcal/mol | -16.5 kcal/mol |
| | AS | -10.36 kcal/mol | -10.23 kcal/mol | -9.75 kcal/mol | -10.65 kcal/mol | -10.36 kcal/mol |
| He | | -10.36 kcal/mol | -12.89 kcal/mol | -9.75 kcal/mol | -6.75 kcal/mol | -10.36 kcal/mol |

*AS (Antisentido), E (Estructura), He (Heterodímeros), Ho (Homodímeros), On (oligonucleótido), S (Sentido).

10.2. ANÁLISIS *IN SÍLICO* DE LAS SECUENCIAS NUCLEÓTIDICAS Y DE AMINOÁCIDOS DE Q4D2C9, Q4CY87, Q4DYC3, Q4CQ28 Y Q4DC56.

Se realizó el análisis *in silico* de las secuencias nucleótidas y de aminoácidos de las proteínas en estudio, con el objetivo de determinar sus propiedades moleculares y posible función; además de corroborar los análisis realizados en un trabajo previo del laboratorio. Para ello se utilizaron las herramientas bioinformáticas descritas en materiales y métodos. Los resultados de la **Tabla 10**, muestran que las proteínas en estudio varían en la cantidad de aminoácidos en un rango desde 288 hasta 821, en consecuencia, presentan diversos pesos moleculares que van de 32 a 93KDa. La fusión de dichas proteínas a una bandera de histidinas aumenta su peso molecular aproximadamente 4KDa, proporcionándole estabilidad únicamente a la proteína Q4DYC3 de acuerdo con el análisis *in silico*. Los niveles de expresión de cada proteína varían dependiendo del estadio del parásito, pudiendo ser específicas de un estadio en particular como en el caso de Q4CQ28 que solo se expresa en amastigotes; mientras el resto de las proteínas en estudio se expresan también en epimastigotes y tripomastigotes. Todas las secuencias (Q4D2C9, Q4CY87, Q4DYC3, Q4CQ28 y Q4DC56) presentan diversos ortólogos en otras cepas de *T. cruzi* como Dm28c, Marinkellei B7, Sylvio X10 y TCC. En cuanto al tipo de proteína y su función biológica, se recabó que las proteínas Q4DYC3 y Q4DC56 ya cuentan con una función establecida, mientras Q4D2C9, Q4CY87 y Q4CQ28 poseen una función putativa como se describe a detalle a continuación.

Tabla 10. Información general de las proteínas Q4D2C9, Q4CY87, Q4DYC3, Q4CQ28 y Q4DC56 de *T. cruzi*.

| No. acceso UniProt | Q4D2C9 | Q4CY87 | Q4DYC3 | Q4CQ28 | Q4DC56 |
|---|--|--|--|--|--|
| Gen codificante | Tc00.1047053 505163.80 | Tc00.1047053 510001.20 | Tc00.1047053 511817.40 | Tc00.1047053 510681.30 | Tc00.1047053 508317.80 |
| No. de nt | 2,397 | 2,466 | 867 | 1,047 | 1,890 |
| No. de aa | 798 | 821 | 288 | 348 | 629 |
| Peso molecular (KDa) | 90.585 | 93.072 | 32.096 | 38.999 | 68.854 |
| Peso molecular con bandera de His (KDa) | 95.705 | 98.191 | 36.097 | 43.000 | 73.973 |
| Tipo de proteína | Subunidad de oligosacaril transferasa, putativa | Proteína sin caracterizar | NADH citocromo B5 reductasa | Lipasa, putativa | α -1,2-manosidasa |
| Función biológica | Glicosilación proteica | Trasporte transmembranal | Cataliza la reducción de Fe(III) | Metabolismo de triacilglicéridos | Unión a calcio, hidrólisis de enlaces glucosídicos |
| Presenta ortólogos en | CL Brener Esmeraldo y No Esmeraldo, Dm28C, TCC, Sylvio X10, Marinkellei B7 | CL Brener Esmeraldo y No Esmeraldo, Dm28C, TCC, Sylvio X10, Marinkellei B7 | CL Brener Esmeraldo y No Esmeraldo, Dm28C, TCC, Sylvio X10, Marinkellei B7 | CL Brener Esmeraldo y No Esmeraldo, Dm28C, TCC, Sylvio X10, Marinkellei B7 | CL Brener Esmeraldo y No Esmeraldo, Dm28C, TCC, Sylvio X10, Marinkellei B7 |
| Estadios de <i>T. cruzi</i> donde es expresada | Amastigote (+) Tripomastigote Epimastigote | Amastigote Tripomastigote Epimastigote(+) | Amastigote Tripomastigote Epimastigote(+) | Amastigotes | Tripomastigote |
| Estabilidad sin bandera de His | Estable | Inestable | Inestable | Inestable | Estable |
| Estabilidad con bandera de His | Estable | Inestable | Estable | Inestable | Estable |

* aa (aminoácidos), His (histidina), KDa (Kilo Daltons), nt (nucleótidos), (+) estadio de *T. cruzi* donde se expresa en mayor proporción la proteína en estudio.

A fin de corroborar por homología el tipo de proteína y función biológica de las proteínas en estudio y mencionadas en la tabla anterior, se determinaron los dominios conservados que presentan cada una de ellas (**Figura 18**). La proteína Q4D2C9 posee el dominio STT3 característico de la familia de subunidades oligosacaril transferasa STT3, corroborando así que efectivamente pertenece a esta familia y su principal función es glicosilación de proteínas. Q4CY87 al ser miembro de la superfamilia de facilitadores principales, conforme su dominio MFS_1 presentado, actúa como transportador secundario. Por otra parte, la proteína Q4DYC3 contiene dos dominios conservados de unión a NAD (Nicotinamida adenina dinucleótido) y FAD (Flavín adenín dinucleótido), los cuales corresponden a su función reportada en la literatura como NADH citocromo b5 reductasa. Q4CQ28 al contener un dominio lipasa clase 3 confirma su función en el metabolismo de triacilglicéridos. Por último, Q4DC56 presenta un dominio glicol hidrolasa 47 lo que le permite hidrolizar enlaces glucosídicos y corresponde al tipo de proteína determinada como α -1,2-manosidasa (Reddy y colaboradores, 2012).

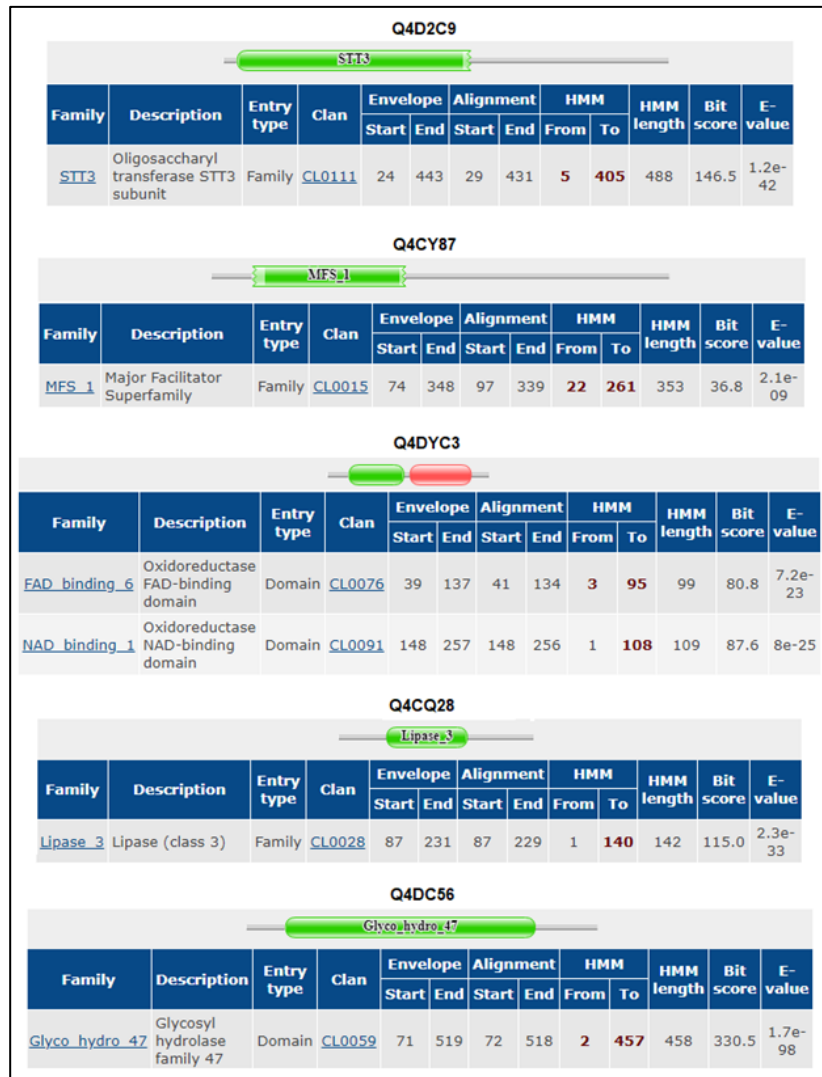


Figura 18. Dominios conservados de las proteínas en estudio. Se muestran los dominios presentes en cada proteína, indicando el clan y familia al que pertenecen.

Las proteínas en estudio al ser producidas por un organismo eucarionte como *T. cruzi*, pueden sufrir diversas modificaciones postraduccionales para ser funcionales, por lo cual se determinaron también estas posibles modificaciones con la herramienta ScanProsite de ExPASy (**Tabla 11**). Obteniendo como principales modificaciones postraduccionales: amidación, N-glicosilación, N-miristoilación y fosforilación para las cinco proteínas analizadas. Además, se puede observar que las proteínas con mayor número de probables modificaciones son Q4DC56 y Q4CY87, en tanto la de menor número de modificaciones es Q4DYC3. No obstante, aún se desconoce si estas modificaciones se llevan o no a cabo y en qué condiciones, estadios de desarrollo o cepas del parásito, y de ser así, el cómo repercuten en la funcionalidad de las proteínas o en su antigenicidad.

Tabla 11. Probables modificaciones postraduccionales de las proteínas Q4D2C9, Q4CY87, Q4DYC3, Q4CQ28 y Q4DC56 de *T. cruzi*, indicando aminoácidos involucrados y su posición.

| Modificación | Q4D2C9 | Q4CY87 | Q4DYC3 | Q4CQ28 | Q4DC56 |
|--|---------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Amidación | RGKR 777 - 780 | IGKR 625 - 628 | | TNAE 3 - 6 | DGKK 6 - 9 |
| Fosforilación por caseína cinasa II | TMND 119 - 122 | SVLE 24 - 27 | STTE 33 - 36 | TTKE 265 - 268 | SGGD 3 - 3 |
| | SVAE 365 - 368 | TMVD 108 - 111 | TRKE 182 - 185 | TKED 266 - 269 | TLID 106 - 109 |
| | TNVE 457 - 460 | TRWE 258 - 261 | SAAD 237 - 240 | SDEE 303 - 306 | SVFE 143 - 146 |
| | SYNE 524 - 527 | SLKE 266 - 269 | SQGE 267 - 270 | | TGDD 239 - 242 |
| | SMTE 545 - 548 | TPQD 351 - 354 | | | SAIE 290 - 293 |
| | TPAD 569 - 572 | TVLE 356 - 359 | | | TVDR 314 - 317 |
| | SLAD 593 - 596 | SLFE 462 - 465 | | | TTVD 329 - 332 |
| | SRAE 636 - 639 | STYD 523 - 526 | | | SLID 585 - 588 |
| | | TYVD 554 - 557 | | | SDVE 618 - 621 |
| Fosforilación por proteína cinasa C | TAR 18 - 20 | SLK 266 - 268 | TAK 75 - 77 | SFR 89 - 91 | TIR 148 - 150 |
| | SIR 40 - 42 45 - 47 | | TGK 79 - 81 | SYR 213 - 215 | TGR 274 - 276 |
| | SLR 195 - 197 | | SLK 120 - 122 | THK 217 - 219 | TVR 314 - 316 |
| | STK 345 - 347 | | TRK 182 - 184 | TTK 265 - 267 | SGR 335 - 337 |
| | SSR 439 - 441 | | | SSR 335 - 337 | TLR 440 - 442 |
| | SGR 461 - 463 | | | | TLK 465 - 467 |
| | SMK 469 - 471 | | | | |
| | SKK 472 - 474 | | | | |

| | | | | | |
|---|-----------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|
| | SIK 529 - 531 | | | | |
| Fosforilación por proteína cinasa dependiente de cAMP y cGMP | | KKIS 64 - 67 | | RRRT 3 - 6 | RRAS 249 – 252 |
| Fosforilación por tirosina cinasa | RGKRDDAY 777 - 784 | KGLDYQTY 590 - 597 | | KVEDHLKY 280 - 287 | RATHDPAY 410 – 417 |
| | | KEMTEGQY 316 - 323 | | | |
| N-glicosilación | NRTS 590 - 593 | NASN 54 - 57 | NKSD 94 - 97 | NESM 82 - 85 | NVSF 133 – 136 |
| | NVSA 724 - 727 | NTSI 489 - 492 | NTTA 171 - 174 | NCSG 271 - 274 | NYTG 175 – 178 |
| | | NVSL 500 - 503 | | | NTST 196 – 199 |
| | | NYSL 659 - 662 | | | |
| N-miristoilación | GLQITS 99 - 104 | GSGHNA 50 - 55 | GMIAGG 147 - 152 | GVNESM 80 - 85 | GGPGGG 33 – 38 |
| | GMSMTM 115 - 120 | GTAFGL 116 - 121 | GNELNE 190 - 195 | GCVGCL 114 - 119 | GGPGGG 34 – 39 |
| | GSVATV 132 - 137 | GIATAI 140 - 145 | | GILITG 150 - 155 | GGGVGE 37 – 42 |
| | GSFSGA 148 - 153 | GLTFAG 154 - 159 | | GGAMAT 159 - 164 | GAWRST 49 – 54 |
| | GAAMTA 152 - 157 | GVMKTF 203 - 208 | | GAMATL 160 - 165 | GAGKNT 94 - 99 |
| | GVLTLG 205 - 210 | GMGASL 210 - 215 | | GGHESY 209 - 214 | GGLLAA 153 – 158 |
| | GLAYGY 209 - 214 | GLIGTF 243 - 248 | | GTPCSA 258 - 263 | GLLAAH 154 – 159 |
| | GTAIAT 261 - 266 | GQYRGI 321 - 326 | | | GIPYGA 200 – 205 |
| | GCRMSR 421 - 426 | GIAIGA 325 - 330 | | | GLDPTE 211 – 216 |
| | GIRVTI 503 - 508 | GVGITL 570 - 575 | | | GLMGNH 264 – 269 |
| GNRTSL 589 - 594 | GITLTA 572 - 577 | | | GSMDSA 286 – 291 | |

| | | | | | |
|--|---------------------|---------------------|--|--|---------------------|
| | GNTWNH 597 - 602 | GISTAF 605 - 610 | | | GMLTTV 326 – 331 |
| | GSWLCT 745 - 750 | GMHYGF 693 - 698 | | | GGHLAE 357 – 362 |
| | | GAALGI 702 - 707 | | | GGPHGG 389 – 394 |
| | | GLTPSL 725 - 730 | | | GSIPSY 487 – 492 |
| | | GICMGK 736 - 741 | | | GSSVGS 499 – 504 |
| | | | | | GSHVGW 503 – 508 |
| | | | | | GGIAAG 567 – 572 |
| | | | | | GIAAGV 568 – 573 |
| | | | | | GGGNTA 601 – 606 |

El reconocimiento de un antígeno, en este caso las proteínas recombinantes en estudio, depende tanto de su composición y modificaciones postraduccionales, como de su conformación tridimensional. Para determinar si la bandera de histidinas fusionada a las proteínas en estudio modifica su conformación secundaria y terciaria, se predijeron dichas estructuras mediante homología con estructuras ya establecidas de otras proteínas.

Acorde las **Figuras 19, 21, 22 y 23**, las conformaciones secundarias de His-Q4D2C9, His-Q4DYC3, His-Q4CQ28 y His-Q4DC56 están formadas por múltiples estructuras α -hélice y lámina- β , en las cuales no se encuentra involucrada la secuencia de aminoácidos de la bandera de histidinas fusionada. También se puntualizan los aminoácidos de estas secuencias que pueden ejercer como sitios activos, residuos catalíticos y/o sitios de unión a ligandos o metales. En el caso de la construcción His-Q4CY87, **Figura 20**, no se encontraron por homología estructuras α -hélice y lámina- β presentes.

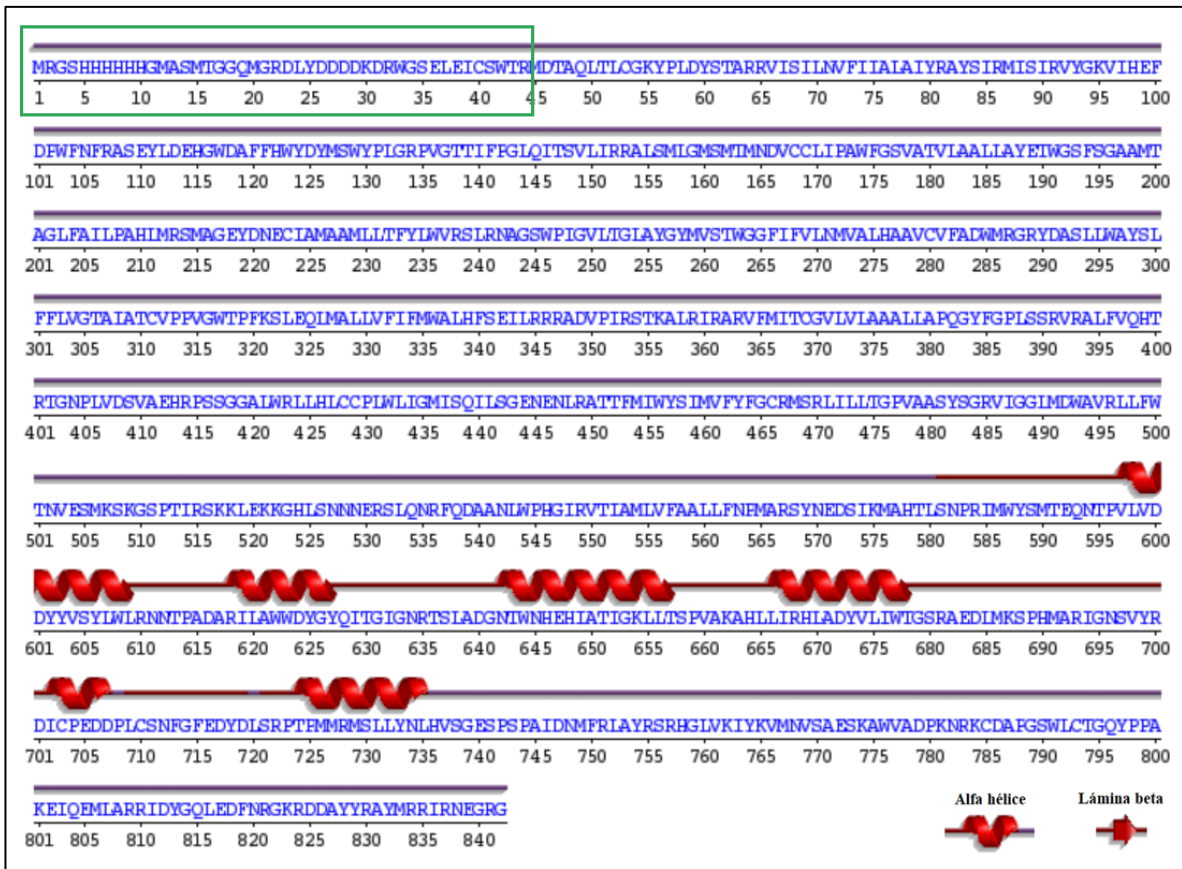


Figura 19. Estructura secundaria probable de la proteína His-Q4D2C9 de *T. cruzi* NM1-cl1. Estructuras α -hélice (bucles) de la proteína Q4D2C9 fusionada a una bandera de histidinas (recuadro verde), determinadas por homología con proteínas de diversos organismos.

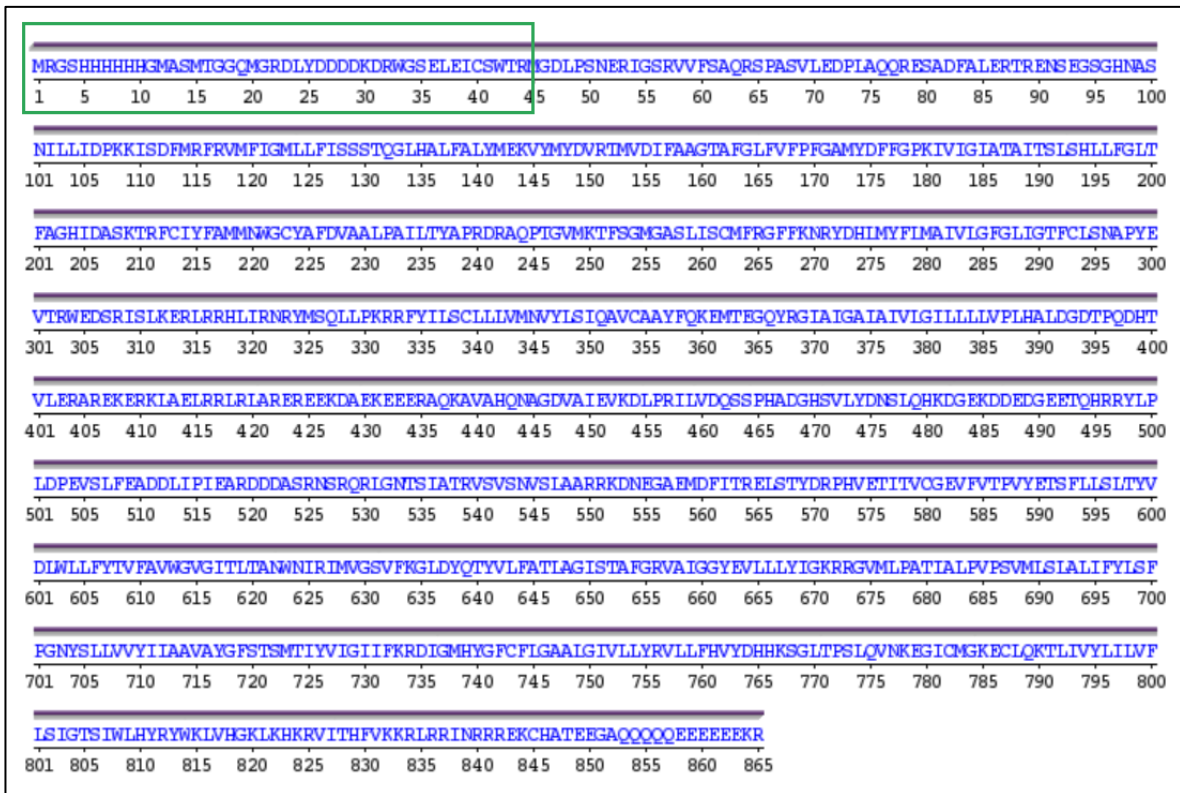


Figura 20. Estructura secundaria probable de la proteína His-Q4CY87 de *T. cruzi* NM1-c11. Proteína Q4CY87 fusionada a una bandera de histidinas (recuadro verde).

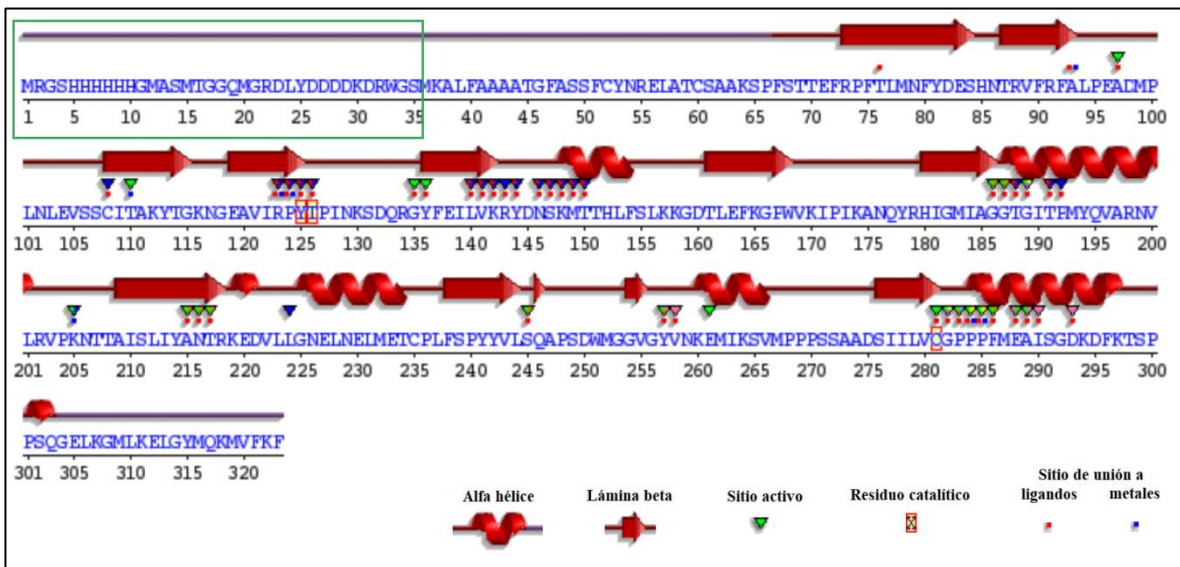


Figura 21. Estructura secundaria probable de la proteína His-Q4DYC3 de *T. cruzi* NM1-c11. Estructuras α -hélice (bucles) y lámina- β (Flechas rectas) de la proteína Q4DYC3 fusionada a una bandera de histidinas (recuadro verde), determinadas por homología con proteínas de diversos organismos.

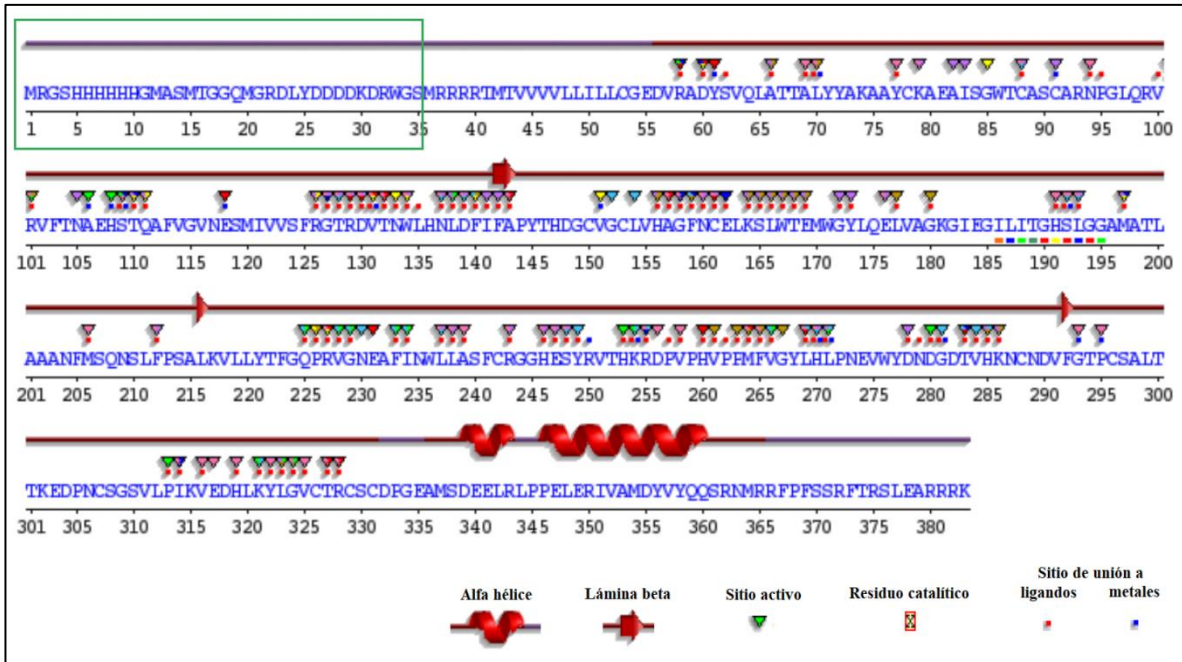


Figura 22. Estructura secundaria probable de la proteína His-Q4CQ28 de *T. cruzi* NM1-cl1. Estructuras α -hélice (bucles) y lámina- β (Flechas rectas) de la proteína Q4CQ28 fusionada a una bandera de histidinas (recuadro verde), determinadas por homología con proteínas de diversos organismos.

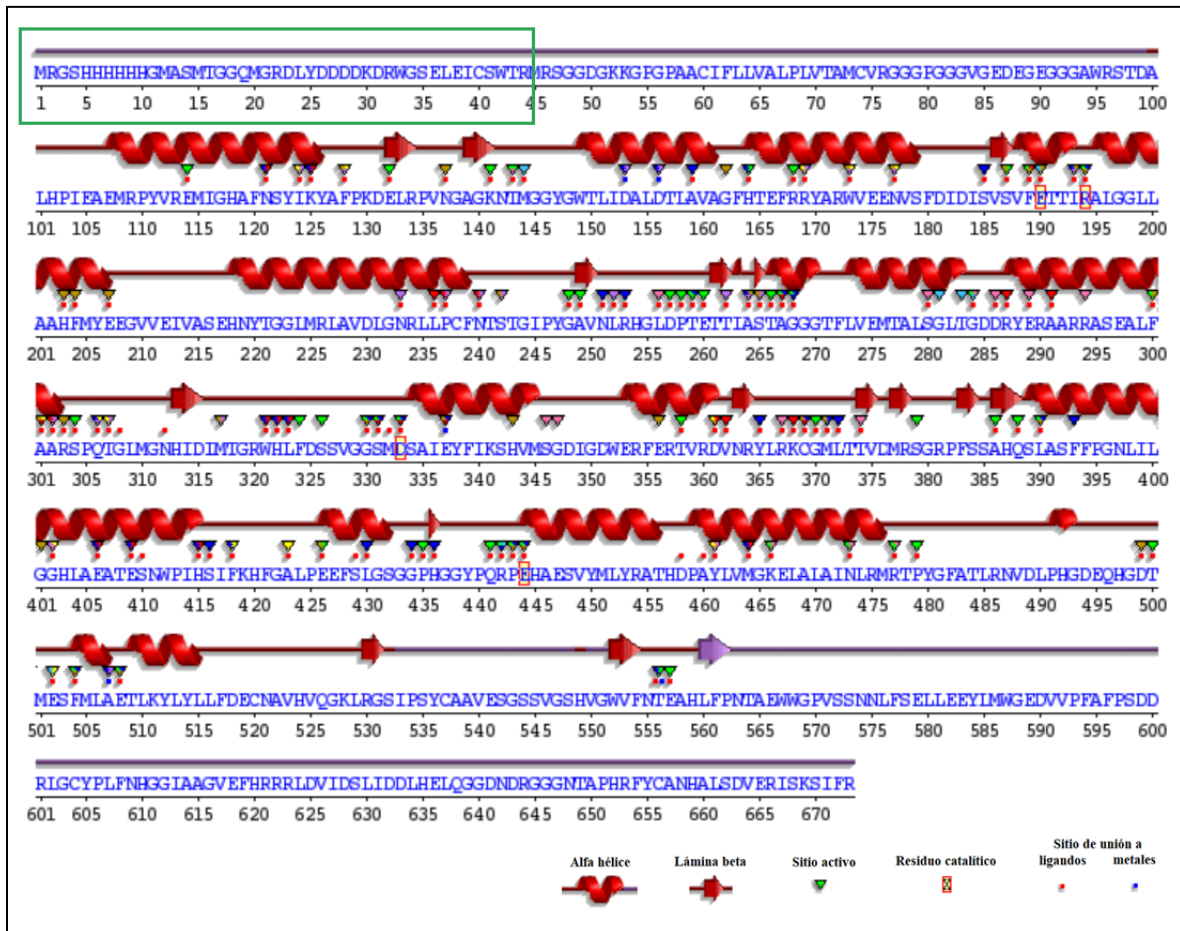


Figura 23. Estructura secundaria probable de la proteína His-Q4DC56 de *T. cruzi* NM1-cl1. Estructuras α -hélice (bucles) y lámina- β (Flechas rectas) de la proteína Q4DC56 fusionada a una bandera de histidinas (recuadro verde), determinadas por homología con proteínas de diversos organismos.

La estructura terciaria determinada para la proteína His-Q4D2C9 presentó un 31.49% de identidad con la estructura terciaria de la subunidad STT3A de la dolícil-difosfooligosacárido-proteín-glicosiltransferasa. El alineamiento entre ambas secuencias (**Figura 24**) muestra que la bandera de histidina incorporada a la proteína Q4D2C9 (recuadro verde) no modifica su conformación.



Figura 24. Estructura terciaria probable de la proteína His-Q4D2C9 de *T. cruzi* NM1-cl1. Alineamiento entre la subunidad STT3A de la dolencil-difosfooligosacarido-protein-glicosiltransferasa (6ftj.l.s) y la proteína His-Q4D2C9 (Model1_01), señalando que la bandera de histidina incorporada a la proteína en estudio (recuadro verde) no modifica su estructura terciaria.

Conforme a la **Figura 25**, la estructura terciaria establecida de His-Q4CY87 fue obtenida por un 14.59% de homología con la estructura terciaria de la proteína lactosa permeasa, determinada por difracción

de rayos-X. La bandera de histidinas fusionada a la proteína Q4CY87 no modifica su estructura terciaria.



Figura 25. Estructura terciaria probable de la proteína His-Q4CY87 de *T. cruzi* NM1-cl1. Conforme al alineamiento entre la proteína His-Q4CY87 (Model1_01) y la lactosa permeasa (5gxb.1.A), la bandera de histidina incorporada a la proteína en estudio (recuadro verde) no afecta su estructura terciaria.

Como se muestra en la **Figura 26**, la estructura terciaria establecida de His- Q4DYC3 se obtuvo mediante homología con la estructura terciaria de la proteína citocromo b5 reductasa de *Physarum polycephalum* determinada por difracción de rayos-X, encontrando una identidad del 39.67% entre

ambas secuencias. De acuerdo con el alineamiento de dichas secuencias, la bandera de histidina incorporada a la proteína en estudio (recuadro verde) no modifica su conformación.

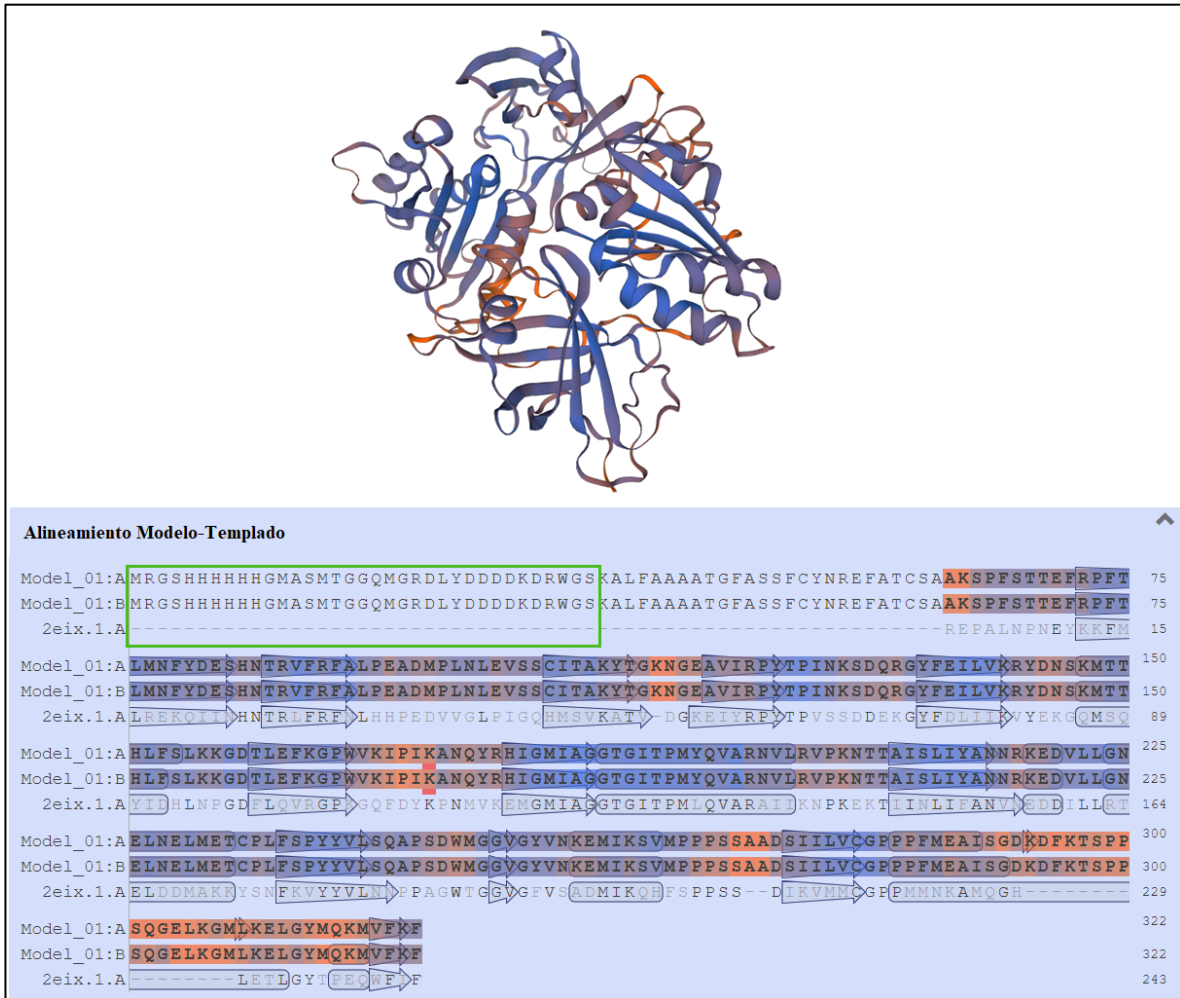


Figura 26. Estructura terciaria probable de la proteína His-Q4DYC3 de *T. cruzi* NM1-cl1. Conforme al alineamiento entre la proteína His-Q4DYC3 (Model1_01 A y B) y la citocromo b5 reductasa de *P. polycephalum* (2eix.1.A), la bandera de histidina incorporada a la proteína en estudio (recuadro verde) no afecta su estructura terciaria.

La estructura terciaria obtenida para His-Q4CQ28 (Figura 27) fue obtenida por homología con la estructura terciaria de una lipasa de *Gibberella zeae* determinada por difracción de rayos-X. El alineamiento entre ambas secuencias presentó una identidad del 33%, mostrando que la bandera de histidina incorporada a la proteína Q4CQ28 no interfiere en su conformación terciaria.

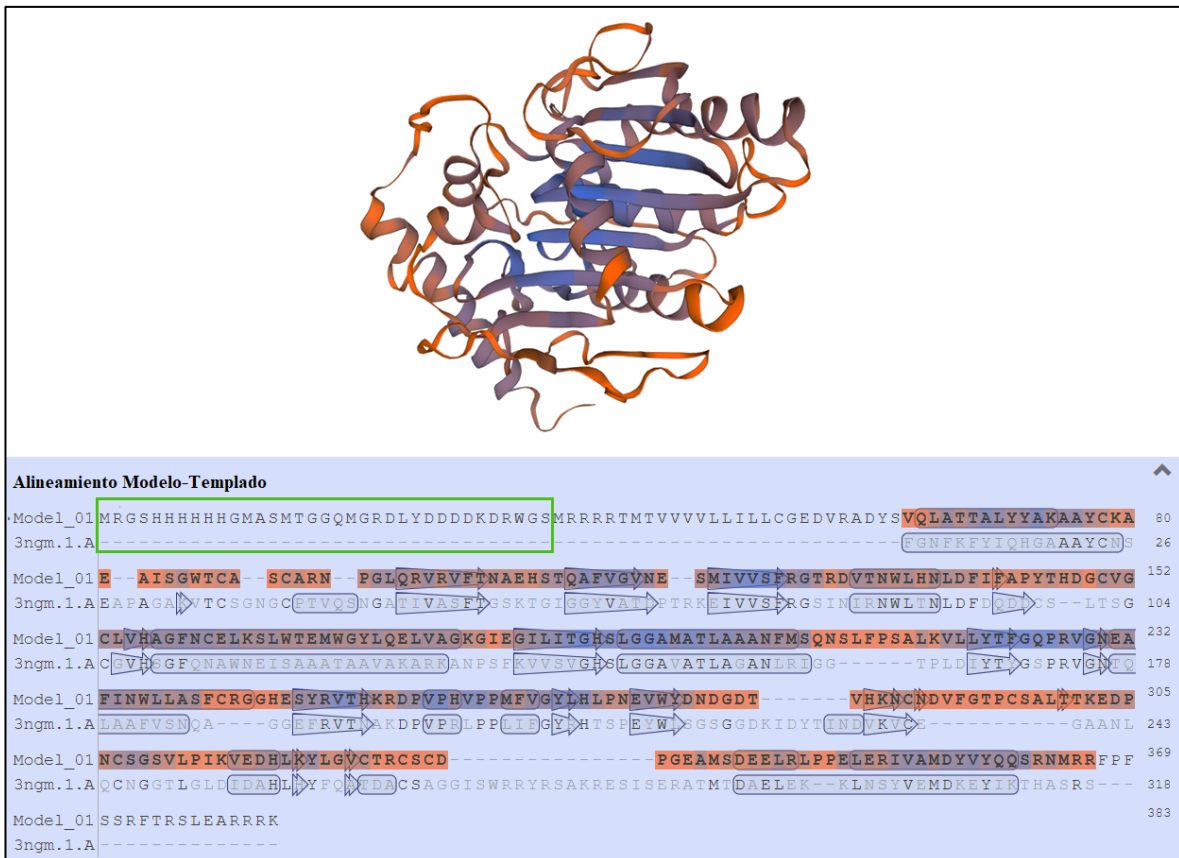


Figura 27. Estructura terciaria probable de la proteína His-Q4CQ28 de *T. cruzi* NM1-cl1. De acuerdo con el alineamiento entre la proteína His-Q4CQ28 (Model1_01) y la lipasa de *G. zeae* (3ngm.1.A), la bandera de histidina incorporada a la proteína en estudio (recuadro verde) no afecta su estructura terciaria.

La **Figura 28** muestra la estructura terciaria probable de His-Q4DC56, establecida por homología con la estructura terciaria de la proteína manosil-oligosacárido α -1,2-manosidasa, presentando un porcentaje de identidad del 30.14%. Acorde co el alineamiento entre dichas secuencias, la bandera de histidina incorporada a la proteína en estudio (recuadro verde) no modifica su conformación terciaria.

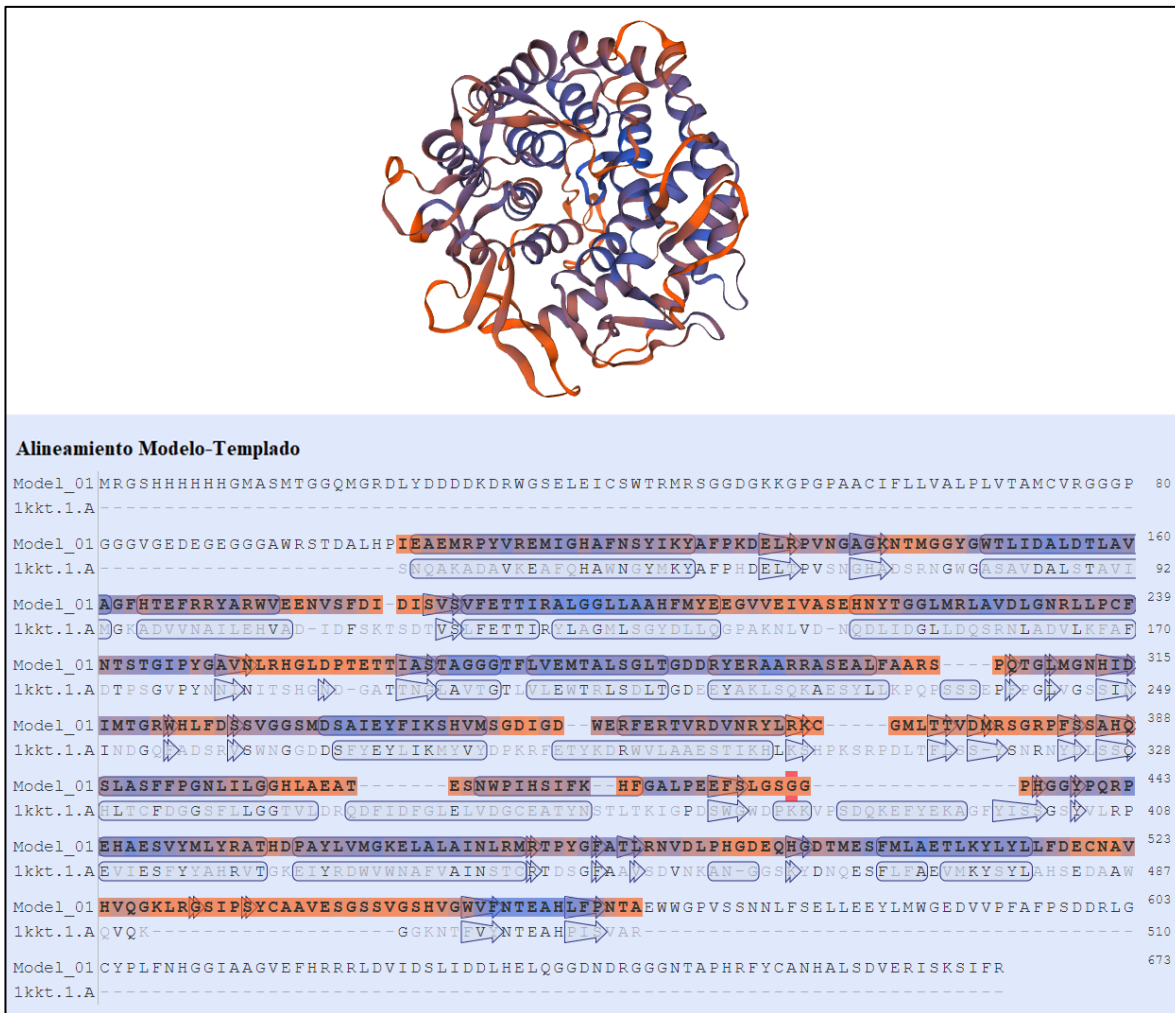


Figura 28. Estructura terciaria probable de la proteína His-Q4DC56 de *T. cruzi* NM1-cl1. La bandera de histidina incorporada a la proteína Q4DC56 (recuadro verde) no afecta su estructura terciaria, de acuerdo con el alineamiento entre la proteína His-Q4DC56 (Model1_01) y proteína manosil-oligosacrido α -1,2-manosidasa (1kkt.1.A).

De acuerdo con lo obtenido, la bandera de histidinas a fusionar a las proteínas Q4D2C9, Q4CY87, Q4DYC3, Q4CQ28 y Q4DC56 no modifica sus estructuras secundarias ni terciarias, por lo tanto, se espera que no afecte su capacidad antigénica.

10.3. CLONACIÓN DE LAS SECUENCIAS CODIFICANTES DE Q4D2C9, Q4CY87, Q4DYC3, Q4CQ28 Y Q4DC56 EN EL VECTOR pGEM®-T EASY.

Para obtener y clonar las secuencias en estudio, primero se procedió a su amplificación por la técnica de PCR utilizando como templado ADN genómico de *T. cruzi* NM1-cl, debido a que las secuencias codificantes de *T. cruzi* no contienen intrones. Se amplificaron las secuencias codificantes de Q4D2C9

(Tc00.1047053505163.80), Q4CY87 (Tc00.1047053510001.20), Q4DYC3 (TcCLB.511817.40), Q4CQ28 (TcCLB.510681.30) y Q4DC56 (Tc00.1047053508317.80), utilizando una enzima ADN Taq polimerasa de alta fidelidad, con el objetivo de obtener una replicación fidedigna de dichas secuencias. Como se puede observar en la **Figura 29**, los productos amplificados de 2397, 2466, 867, 1047 y 1890pb corresponden a los amplicones esperados de Q4D2C9, Q4CY87, Q4DYC3, Q4CQ28 y Q4DC56, respectivamente. En el caso del inserto Q4CQ28, se observa un barrido sobre el producto amplificado generado, posiblemente por un exceso de muestra corrida.

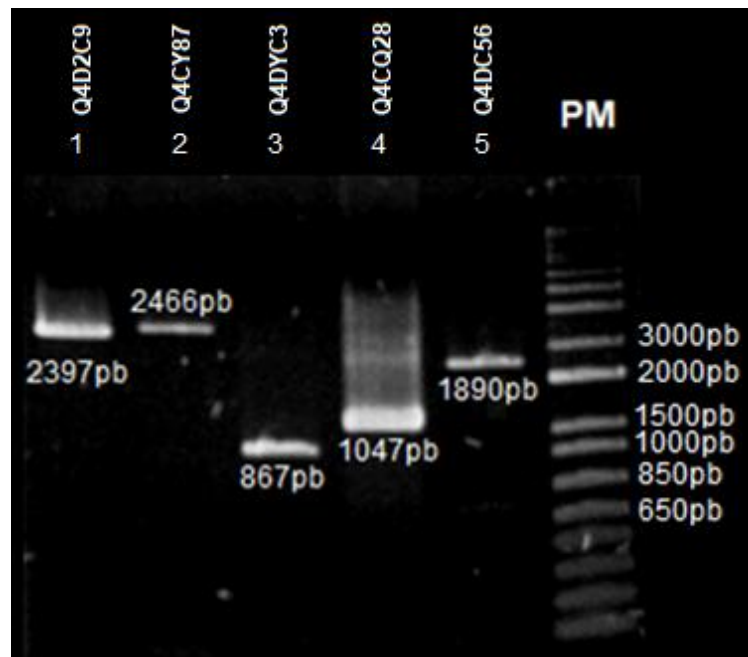


Figura 29. Amplificación por PCR de las secuencias codificantes a Q4D2C9, Q4CY87, Q4DYC3, Q4CQ28 y Q4DC56. Carril 1: Inserto Q4D2C9 de 2397pb; Carril 2: Inserto Q4CY87 de 2466pb; Carril 3: Inserto Q4DYC3 de 867pb; Carril 4: Inserto Q4CQ28 de 1047pb; Carril 5: Inserto Q4DC56 de 1890pb; Carril PM: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder.

Los productos de PCR obtenidos se ligaron al vector de clonación pGEM®-T Easy como se describe en materiales y métodos, dando como resultado las construcciones pGEM-TE-2C9, pGEM-TE-Y87, pGEM-TE-YC3, pGEM-TE-Q28 y pGEM-TE-C56. La identificación de UFC (Unidades Formadoras de Colonias) positivas a dichas construcciones se realizó mediante la extracción de ADN de plásmido de diversas UFC blancas transformadas, seguido de su digestión enzimática para liberar el inserto presente y su análisis en un gel de agarosa. Acorde a la **Figura 30**, se obtuvo ADN de plásmido de las cinco construcciones en estudio, cuyos productos digeridos concuerdan a los tamaños esperados de 2397, 2466, 867, 1047 y 1890pb para los insertos Q4D2C9, Q4CY87, Q4DYC3, Q4CQ28 y Q4DC56,

respectivamente, y 3015pb para el vector pGEM®-T Easy. De acuerdo con lo anteriormente mencionado, la clonación de los insertos amplificados en el vector pGEM®-T Easy se realizó correctamente.

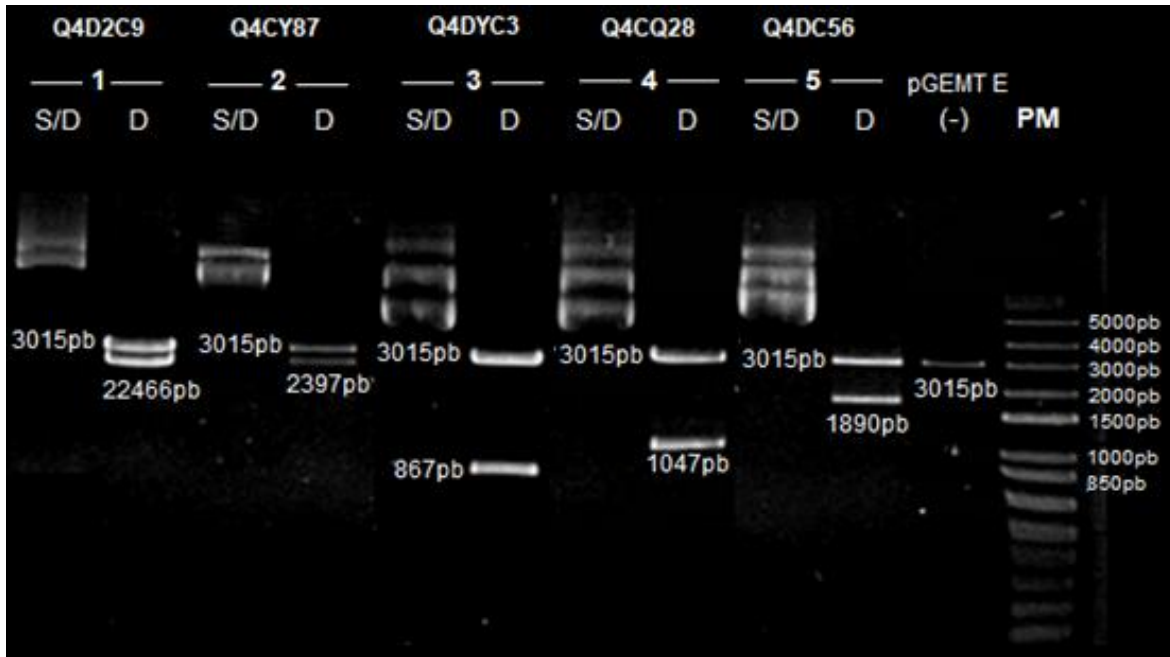


Figura 30. Extracción de ADN de plásmido de las construcciones pGEM-TE-2C9, pGEM-TE-Y87, pGEM-TE-YC3, pGEM-TE-Q28 y pGEM-TE-C56 por el método modificado de Hirt. Carriles 1-5 S/D: ADN de plásmido de las construcciones en estudio; Carriles 1-5 D: ADN de plásmido de las construcciones en estudio digeridas por EcoRI; Carril (-): Control negativo, vector pGEM®-T Easy; Carril PM: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder.

A partir de las UFC transformadas y positivas determinadas anteriormente, se extrajo ADN de plásmido mediante lisis alcalina de cada construcción en estudio, realizando digestiones enzimáticas con EcoRI para comprobar una vez más que las construcciones obtenidas contienen los insertos determinados unidos al vector pGEM®-T Easy. En la **Figura 31**, las construcciones digeridas presentan los tamaños esperados a cada inserto analizado.

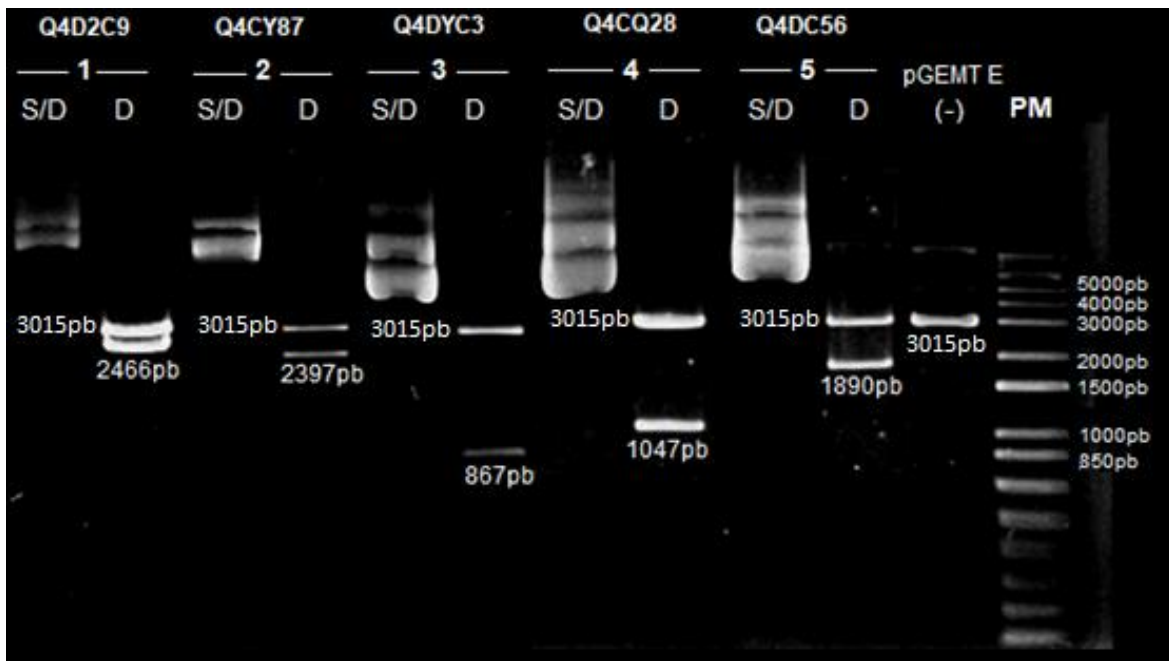


Figura 31. Extracción de ADN de plásmido de las construcciones pGEM-TE-2C9, pGEM-TE-Y87, pGEM-TE-YC3, pGEM-TE-Q28 y pGEM-TE-C56 mediante lisis alcalina.

Carriles 1-5 S/D: ADN de plásmido de las construcciones en estudio sin digerir; Carriles 1-5 D: ADN de plásmido de las construcciones en estudio digeridas por EcoRI; Carril (-): Control negativo, vector pGEM®-T Easy; Carril PM: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder.

Como se mencionó anteriormente en el punto 10.1, durante la amplificación por PCR de la secuencia codificante de Q4DC56 pueden amplificarse otras dos secuencias, TcCLB.505267.50 y/o TcCLB.508317.120 de 1,794pb. Por lo cual se amplificó un fragmento de dicha secuencia a partir de la construcción pGEM-TE-C56 obtenida, utilizando el oligonucleótido antisentido 5'-CCGGAATTCTCA GTCTGCGATGAAACTCCAC-3' específico a Q4DC56. Conforme los resultados de la **Figura 32**, la construcción pGEM-TE-C56 evaluada no contiene al inserto Q4DC56, infiriendo que la secuencia amplificada y ligada al vector pGEM®-T Easy corresponde a alguna de las otras dos secuencias. Por esta razón, no se continuó con la subclonación de éste inserto.

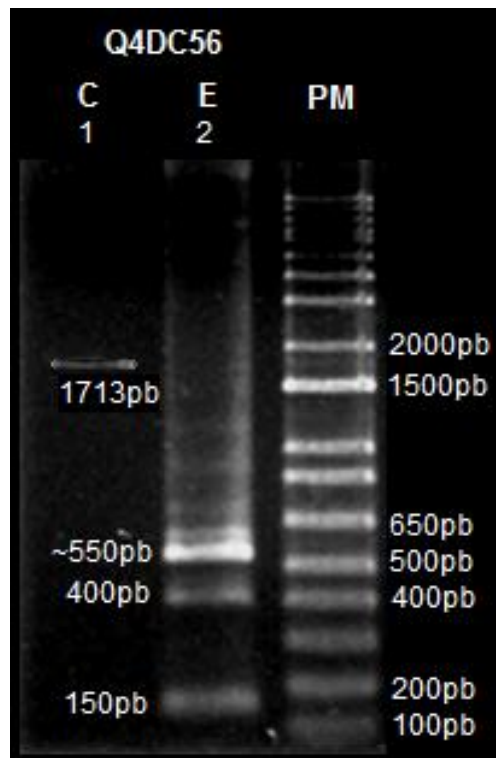


Figura 32. Amplificación de *Q4DC56* utilizando oligonucleótidos específicos. Carril 1 (C): producto de 1713pb correspondiente al fragmento esperado de *Q4DC56*; Carril 2 (E): productos inespecíficos de 550, 400 y 150pb; Carril PM: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder.

Para identificar UFC positivas a la construcción pGEM-TE-C56, se tendrá que evaluar en trabajos futuros, mediante PCR anidada de colonia, a partir de diversas colonias blancas transformadas, utilizando el oligonucleótido sentido diseñado en la presente experimentación y el oligonucleótido antisentido específico a *Q4DC56*.

10.4. SUBCLONACIÓN DE INSERTOS EN pRSET®-A

A partir de las construcciones obtenidas pGEM-TE-2C9, pGEM-TE-Y87, pGEM-TE-YC3 y pGEM-TE-Q28, se llevó a cabo la liberación de los insertos a subclonar (*Q4D2C9*, *Q4CY87*, *Q4DYC3* y *Q4CQ28*) por digestión enzimática con las enzimas de restricción específicas para cada uno de ellos (**Tabla 4**). De igual forma se digirió enzimáticamente el vector pRSET®-A con las mismas enzimas. Los insertos de *Q4DYC3* y *Q4CQ28*, y el vector pRSET®-A digeridos y purificados se analizaron en un gel de agarosa, mostrando únicamente los productos deseados de 867, 1047 y 2897pb, respectivamente (**Figura 33**). En el caso de *Q4CY87*, se purificó tanto el inserto como el vector pGEM®-T Easy debido a que los productos son de tamaño similar y no fue posible realizar un corte del inserto sin

contaminación del vector, situación que también presento el inserto *Q4D2C9*. Motivo por el cual no se continuó en este trabajo con la subclonación de estos insertos y se pretende en un trabajo futuro concluir estas construcciones, digiriendo el vector con otras enzimas que permitan separarlo de los insertos.

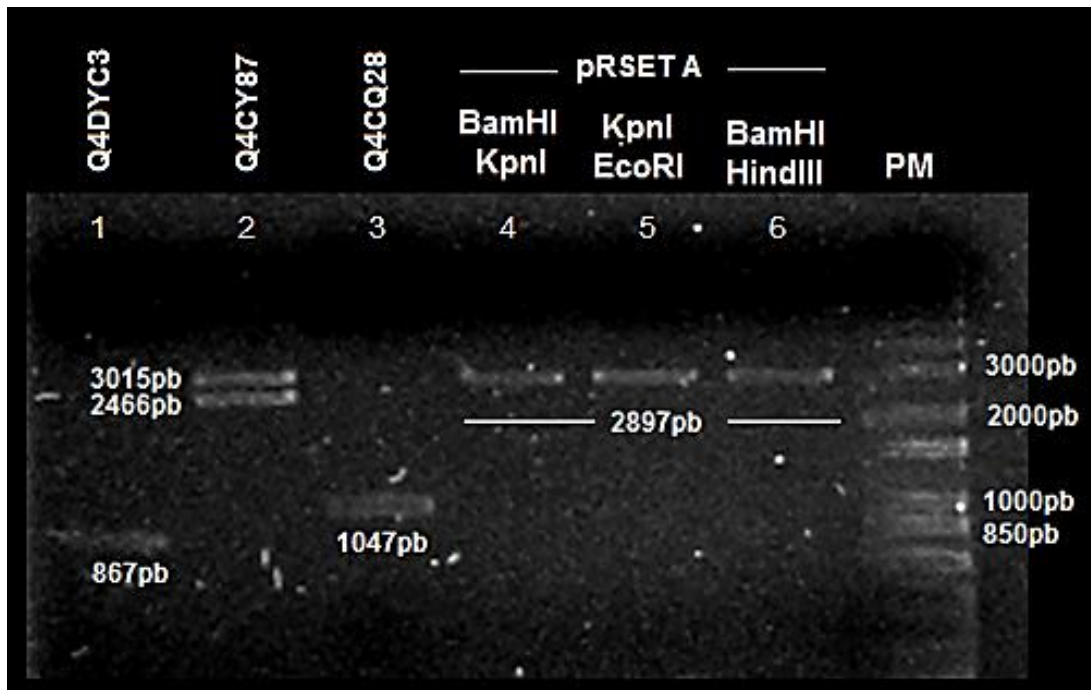


Figura 33. Purificación del vector pRSET®-A y los insertos *Q4DYC3*, *Q4CY87* y *Q4CQ28*. Carril 1: inserto *Q4DCY3* de 867pb; Carril 2: productos de 3015pb y 2466pb correspondientes al vector pGEM®-T Easy y al inserto *Q4CY87*; Carril 3: inserto *Q4CQ28* de 1047pb; Carriles 4-6: producto de 2897pb correspondiente al vector pRSET®-A digerido; Carril PM: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder.

Con las ligaciones resultantes de los insertos *Q4DYC3* y *Q4CQ28* en pRSET®-A, se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α . La identificación de UFC transformadas positivas se realizó mediante extracción de ADN de plásmido por el método modificado de Hirt para la construcción pRSET-A-YC3, y por PCR de colonia para la construcción pRSET-A-Q28. En la **Figura 34** se puede observar que el ADN de plásmido evaluado corresponde a la construcción pRSET-A-YC3, ya que su digestión con las enzimas BamHI y KpnI comprobó la presencia del inserto *Q4DYC3* del tamaño esperado de 867pb y la banda correspondiente al vector pRSET®-A de 2897pb.

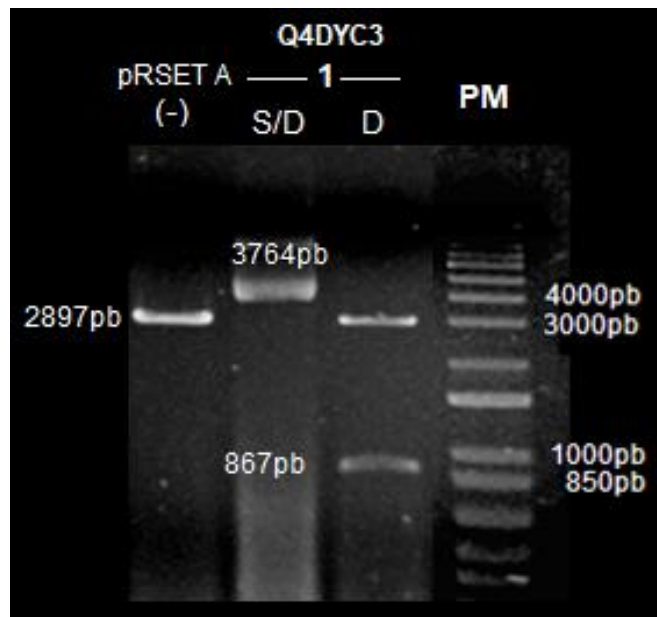


Figura 34. Extracción de ADN de plásmido de la construcción pRSET-A-YC3 por el método modificado de Hirt. Carril (-): control negativo, vector pRSET®-A de 2897pb; Carril 1 S/D: construcción pRSET-A-YC3 sin digerir de 3764pb; Carril 1 D: productos de 2897pb y 867pb correspondientes al vector pRSET®-A y el inserto *Q4DYC3*; Carril PM: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder.

Las siete UFC analizadas por PCR de colonia de la transformación con la construcción pRSET-A-Q28 resultaron positivas, mostrando la amplificación de un producto de 1047pb correspondiente al inserto *Q4DYC3* (Figura 35).

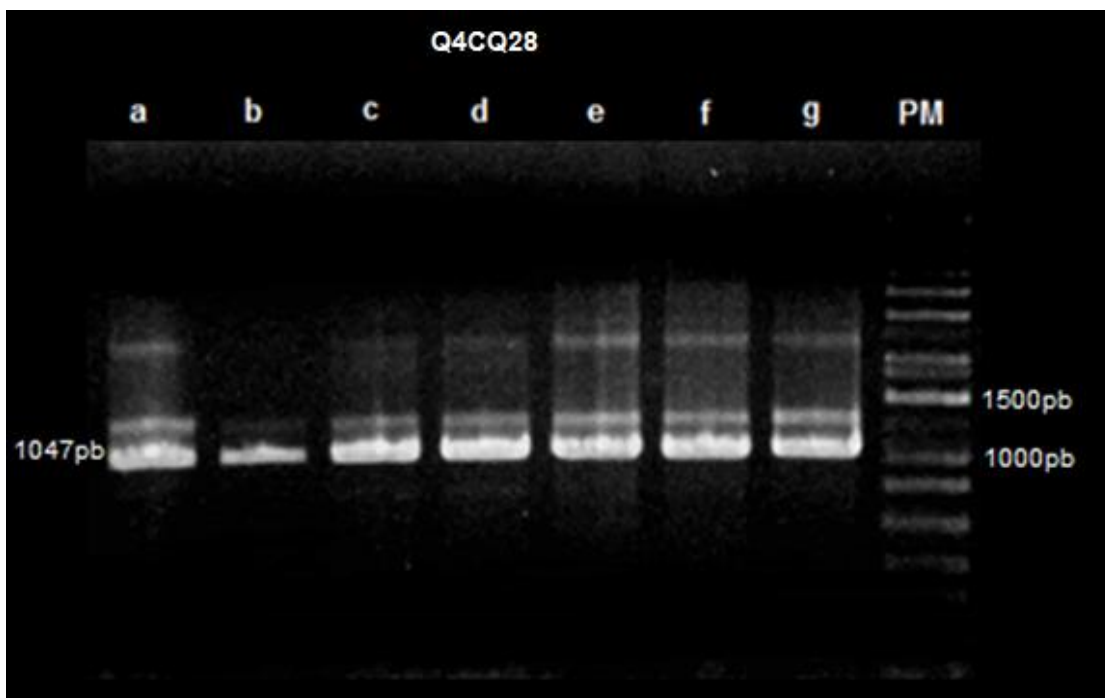


Figura 35. Identificación de construcciones pRSET-A-Q28 a través de PCR de colonia. Carril PM: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder; Carriles a – g: producto de 1047pb correspondiente al inserto *Q4CQ28*.

Las bacterias identificadas como positivas fueron extraídas mediante lisis alcalina y digeridas enzimáticamente, comprobando que la subclonación de los insertos *Q4DYC3* y *Q4CQ28* en pRSET®-A fue exitosa (**Figura 36**), resultando en las construcciones pRSET-A-YC3 y pRSET-A-Q28 de 3764 y 3944pb, respectivamente, así como sus productos digeridos de 867, 1047 y 2897pb que corresponden a los insertos *Q4DYC3*, *Q4CQ28* y al vector pRSET®-A.

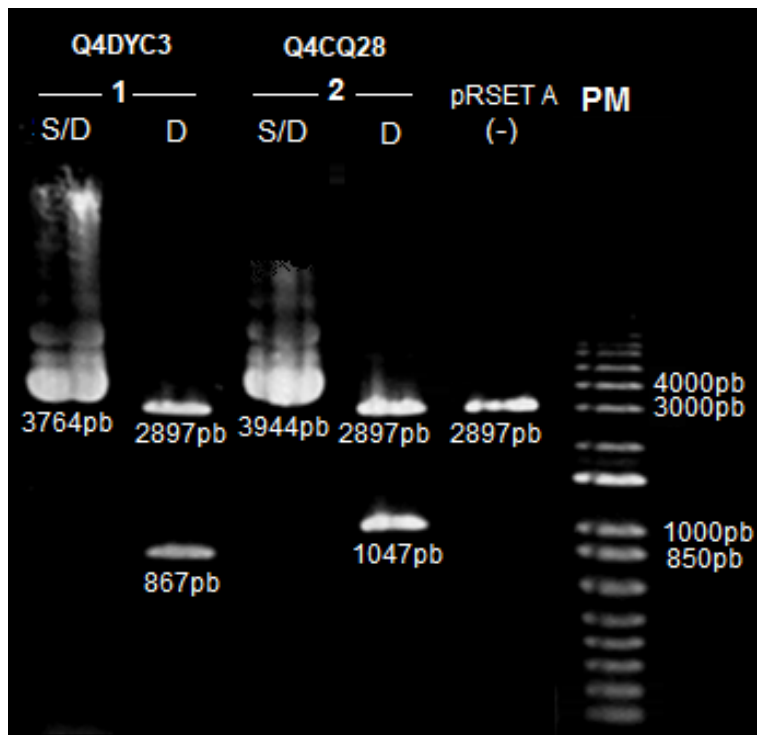


Figura 36. Extracción de las construcciones pRSET-A-YC3 y pRSET-A-Q28 mediante lisis alcalina. Carril (-): control negativo, vector pRSET®-A; Carriles 1 y 2 S/D: construcciones pRSET-A-YC3 y pRSET-A-Q28 sin digerir; Carriles 1 y 2 D: productos digeridos de las construcciones pRSET-A-YC3 y pRSET-A-Q28 digeridas; Carril PM: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder.

Antes de realizar la secuenciación de las construcciones obtenidas pRSET-A-YC3 y pRSET-A-Q28, se verificó que en efecto estos ADNs estuvieran conformadas por los insertos Q4DYC3 y Q4CQ28 unidos al vector pRSET®-A. Para ello, se utilizaron las enzimas XbaI y HindIII, cuyos sitios de restricción se encuentran en el vector pRSET®-A flanqueando los insertos clonados y se encuentran ausentes en el vector pGEM®-T Easy. Como se muestra en la **Figura 37**, ambos insertos se encuentran clonados en pRSET®-A, ya que las digestiones se llevaron a cabo correctamente, linealizando el vector de 2897pb y liberando los insertos Q4DYC3 y Q4CQ28 que se visualizaron en una banda de 867 y 1047pb, respectivamente.

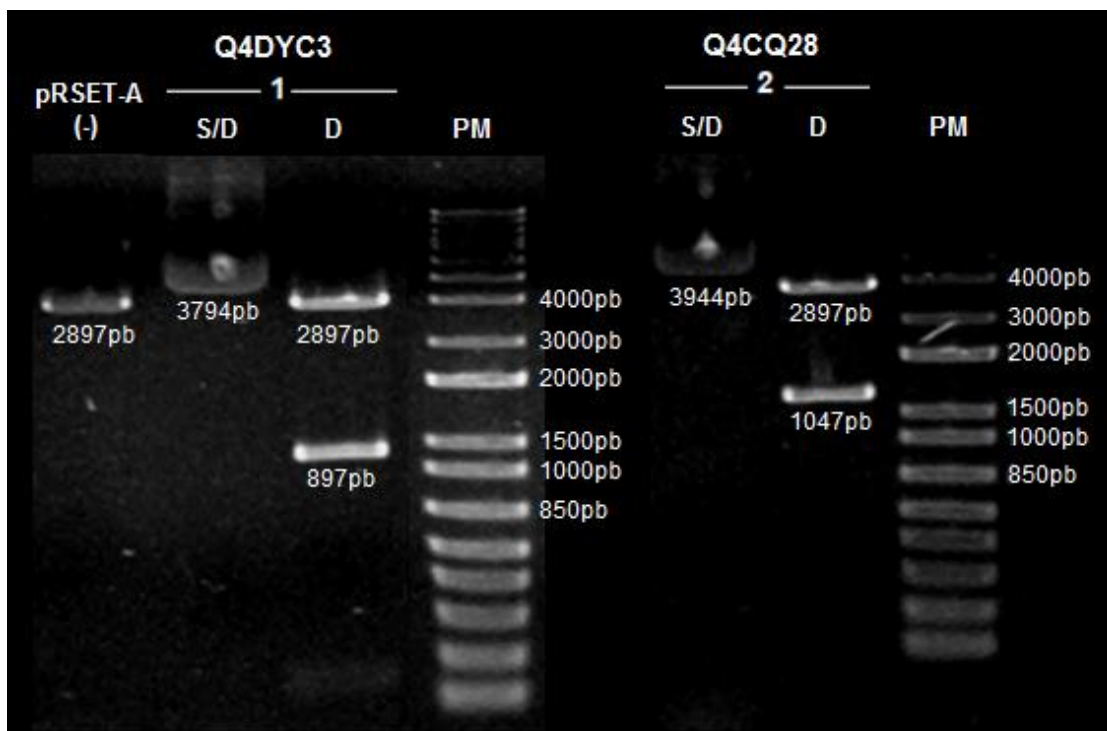


Figura 37. Extracción de las construcciones a secuenciar pRSET-A-YC3 y pRSET-A-Q28 a través de QIAprep® Spin Miniprep Kit. Carril (-): control negativo, vector pRSET®-A; Carriles 1 y 2 S/D: construcciones pRSET-A-YC3 y pRSET-A-Q28 sin digerir; Carriles 1 y 2 D: productos digeridos de las construcciones pRSET-A-YC3 y pRSET-A-Q28 digeridas; Carril PM: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder.

10.5. SECUENCIACIÓN DE CONSTRUCCIONES pRSET-A-YC3 Y pRSET-A-Q28

La secuenciación de las construcciones pRSET-A-YC3 y pRSET-A-Q28 se llevó a cabo con el fin de comprobar la veracidad de las construcciones pRSET-A-YC3 y pRSET-A-Q28. Los resultados obtenidos constan de dos secuencias nucleotídicas, la primera generada a partir del oligonucleótido sentido ubicado río arriba del inserto y la segunda a partir del oligonucleótido antisentido ubicado río abajo del mismo y ambas secuencias fueron alineadas con la herramienta bioinformática BLASTn. En el caso de la construcción pRSET-A-YC3, el alineamiento de las secuencias recibidas presentó un porcentaje de identidad del 100%, señalando que no existen diferencias entre ellas e indicando que la secuenciación realizada de esta construcción es fidedigna (**Anexo 15.2**). En cambio, los resultados de la construcción pRSET-A-Q28 muestran algunas diferencias, que se encuentran en los primeros 60 nucleótidos y posteriores a los 800 nucleótidos, quedando fuera de los límites de confiabilidad de la secuenciación y sugiriendo que los cambios no son reales (**Anexo 15.3**). Además, las secuencias analizadas fueron obtenidas a partir de ADN genómico de *T. cruzi* NM1-cl1, cepa que, al no contar actualmente con su genoma secuenciado, dificulta comprobar si los cambios observados son reales

resultado de polimorfismo entre cepas o consecuencia de estar fuera del rango confiable de secuenciación. No obstante, a través de la herramienta BLAST de la base TriTrypDB se recabaron las principales secuencias ortólogas de los insertos Q4DYC3 y Q4CQ28 en las cepas CL Brener No-Esmeraldo, Dm28c, Marinkellei B7, Sylvio X10 y TCC de *T. cruzi* (**Tabla 12**), con la finalidad de poder realizar un alineamiento múltiple y determinar si existen polimorfismos entre ellas.

Tabla 12. Genes ortólogos de las secuencias codificantes a las proteínas Q4DYC3 y Q4CQ28.

| Cepa | Q4DYC3 | Q4CQ28 |
|------------------------|-----------------------|-----------------------|
| CL Brener Esmeraldo | TcCLB.510521.10 | TcCLB.509011.90 |
| CL Brener No-Esmeraldo | Tc00.1047053511817.40 | Tc00.1047053510681.30 |
| Dm28c | TCDM_02568 | BCY84_00131 |
| Marinkellei B7 | Tc_MARK_93 | - |
| Sylvio X10 | TCSYLVIO_001410 | TCSYLVIO_002870 |
| TCC | C3747_83g22 | C3747_49g251 |

En el alineamiento múltiple de la construcción pRSET-A-YC3 con sus secuencias ortólogas (**Anexo 15.4**), se presenta una mutación en el nucleótido 804, correspondiente a un cambio de adenina por guanina. Sin embargo, ambos codones (CAA y CAG) codifican al mismo aminoácido, Glutamina, resultando en un cambio conservado, que no afecta a la proteína en estudio Q4DCY3.

En cuanto a la alineación de la construcción pRSET-A-Q28 (**Anexo 15.5**), se encontraron nueve cambios de nucleótido, de los cuales uno es conservado y ocho no conservados. Estos últimos cambios de no ser polimorfismos propios de la cepa pueden generar modificaciones en el plegamiento, funcionamiento y antigenicidad de la proteína Q4CQ28. Debido a esto, se realizó la obtención, secuenciación y alineación de otras dos clonas de la construcción pGEM-TE-Q28 (**Anexo 15.6**), que mostraron los mismos cambios mencionados anteriormente, apoyando la posibilidad de que sean posibles polimorfismos propios de la cepa NM1-cl1. Otra posibilidad pudiera ser que son cambios generados durante la experimentación, al exponer el ADN teñido con bromuro de etidio y/o luz UV. Aun cuando esto es posible, consideramos que es poco probable que se den tantos cambios y de manera restringida en partes determinados de la secuencia. Por lo tanto, en trabajos futuros se llevarán a cabo nuevas secuenciaciones con otros oligonucleótidos que se unan a distancias leíbles de las secuencias en duda, para asegurar estar dentro de los límites confiables de secuenciación. En caso de que los cambios en la secuencia se reproduzcan, se realizarán nuevas clonaciones a partir de ADN y ARNm

acoplado a PCR de transcripción inversa, así como la secuenciación de varias clonas para corroborar si el resultado obtenido es producto de polimorfismos propios de la cepa NM1-cl1.

10.6. OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES His-Q4DYC3 e His-Q4CQ28

Para poder inducir la expresión de las proteínas His-Q4DYC3 y His-Q4CQ28, se transformaron células BL21(DE3)pLysS de *E. coli* con las construcciones pRSET-A-YC3 y pRSET-A-Q28, identificando diez UFC positivas a dichas construcciones por medio de PCR de colonia, obteniendo como productos amplificados los insertos *Q4DYC3* y *Q4CQ28* de 867 y 1047pb (**Figuras 38 y 39**). Cinco de dichas UFC fueron elegidas para inducir las proteínas recombinantes en estudio.

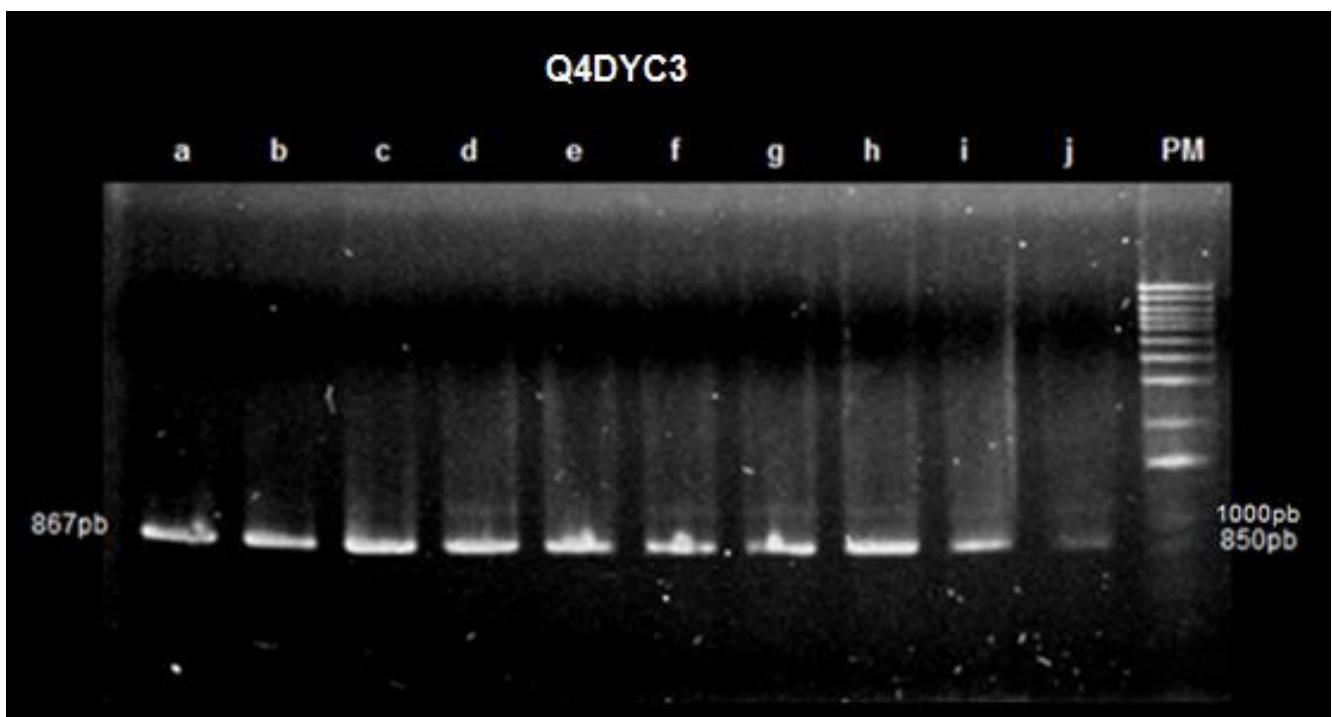


Figura 38. Identificación de construcciones pRSET-A-YC3 a través de PCR de colonia. Carril PM: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder; Carriles a – j: producto de 867pb correspondiente al inserto *Q4DYC3*.

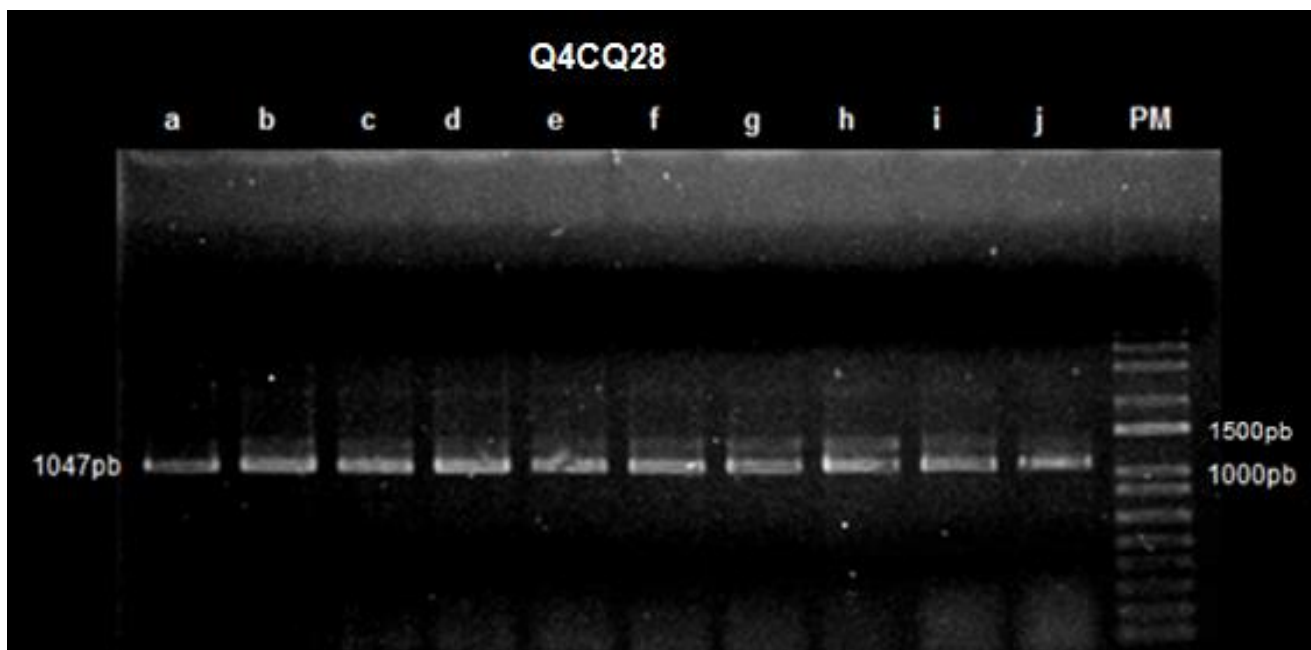


Figura 39. Identificación de construcciones pRSET-A-Q28 a través de PCR de colonia. Carril PM: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder; Carriles a – j: producto de 1047pb correspondiente al inserto Q4CQ28.

Con la finalidad de determinar las condiciones óptimas de inducción de las proteínas recombinantes en estudio, se realizaron curvas de temperatura (30 y 37 °C), tiempo de inducción (1, 2, 3, 5 horas y ON (16 horas aproximadamente)) y concentración de IPTG (0.5, 1 y 2.5 mM), como se describe en materiales y métodos. En la curva de temperatura y tiempo de inducción de la proteína His-Q4DYC3 (**Figura 40**), las muestras evaluadas tanto a 30°C como a 37°C en los diferentes tiempos de inducción mostraron la expresión de una proteína de 36KDa, la cual al ser reconocida por un anticuerpo anti-poli-histidinas por *Western blot* comprueba que corresponde a la proteína Q4DYC3 fusionada a una bandera de histidinas. Con estos resultados, se eligió como mejor condición de inducción 1 hora a 30°C, ya que utilizando estos parámetros además de observar la proteína recombinante, no se observó degradación ni dimerización de la proteína deseada (**Figura 40.B**). También, como se muestra en **Figura 41**, se determinó que la concentración óptima de inducción con IPTG es 1mM, ya que a ésta se produce la mejor cantidad de la proteína recombinante His-Q4DCY3 en la fracción soluble.

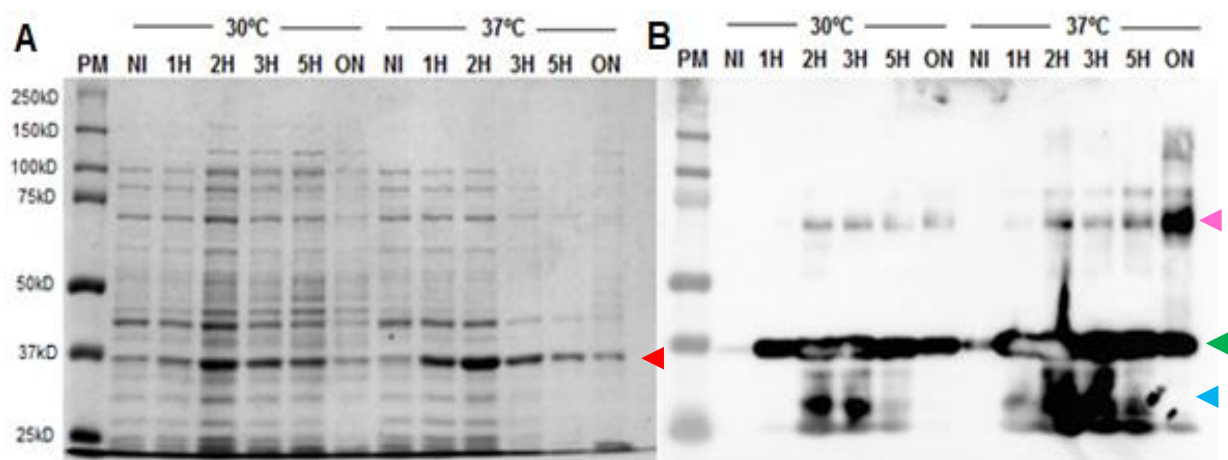


Figura 40. Curva de inducción de la proteína His-Q4DYC3 a diferentes tiempos y temperaturas. PM: Marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Standards; NI: muestra no inducida; 1H – 5H: horas post-inducción; ON: muestra inducida durante una noche. **A)** SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie, se observan múltiples bandas que corresponden a proteínas celulares de *E. coli*, resaltando una banda de aproximadamente 37KDa (◄); **B)** Western Blot, en todas las muestras se observa el reconocimiento de la proteína en estudio His-Q4DYC3 de 36.097KDa con el anticuerpo antihistidinas (◄), posible degradación de la proteína en estudio (◄) y posible dimerización (◄) de dicha proteína. En ambos geles se muestra en la parte superior las temperaturas en que fue realizada la inducción.

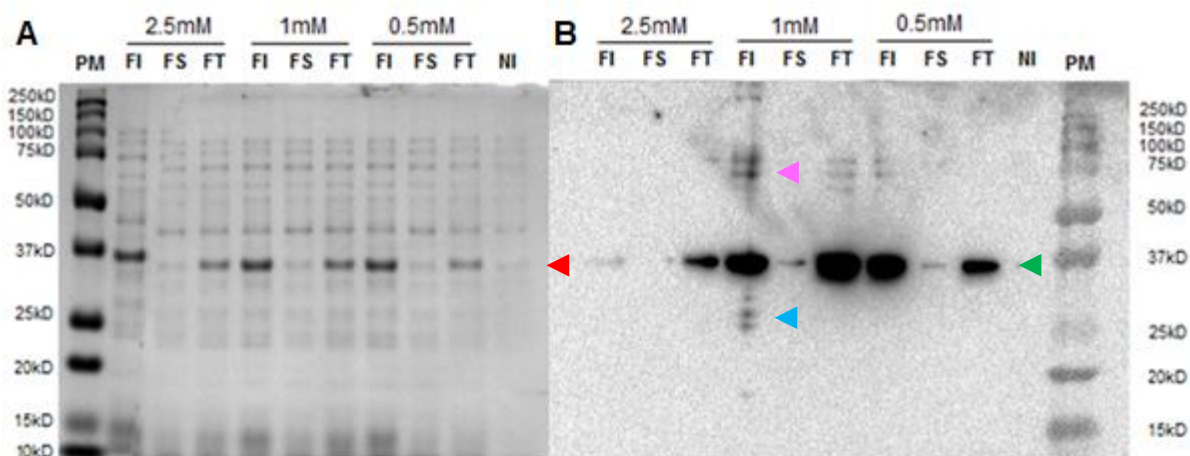


Figura 41. Curva de inducción de la proteína His-Q4DYC3 a 30°C durante 1 hora con diferentes concentraciones de IPTG. PM: Marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Standards; NI: muestra no inducida; FI: fracción insoluble; FS: fracción soluble; FT: fracción total. **A)** SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie, múltiples bandas correspondientes a proteínas celulares de *E. coli*, resaltando una banda de aproximadamente 37KDa (◄); **B)** Western Blot, todas las muestras inducidas presentan reconocimiento de la proteína His-Q4DYC3 de 36.097KDa por un

anticuerpo antihistidinas (◀). Se aprecian bandas de posible degradación (◀) y posible dimerización (◀) en algunas muestras.

La proteína His-Q4CQ28 de 43KDa no logró expresarse bajo las condiciones probadas en la presente experimentación, como se muestra en la **Figura 42. B**, en que el anticuerpo anti Histidinas no reconoció ninguna banda, indicando que no hubo expresión de la proteína recombinante Q4CQ28 fusionada a una bandera de histidina.

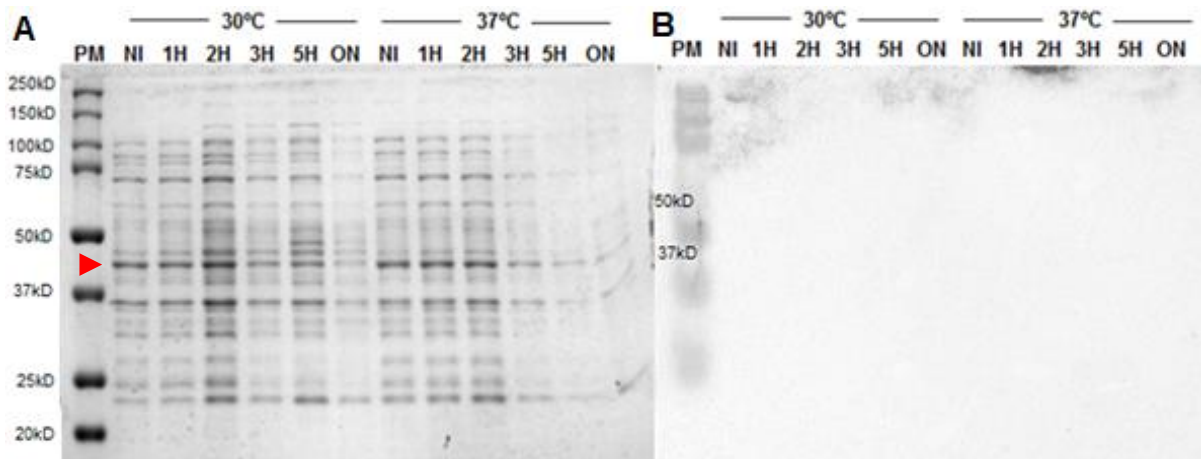


Figura 42. Curva de inducción de la proteína His-Q4CQ28 a diferentes tiempos y temperaturas. PM: Marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Standards; NI: muestra no inducida; 1H – 5H: horas post-inducción; ON: muestra inducida durante una noche. **A)** SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie, muestra múltiples bandas que corresponden a proteínas celulares de *E. coli*, encontrándose en mayor concentración una banda de aproximadamente 45KDa (◀); **B)** *Western blot*, las muestras evaluadas no indican el reconocimiento de alguna proteína con bandera de histidina.

Una vez determinada su correcta inducción, procedimos a la purificación de la proteína recombinante His-Q4DYC3 mediante perlas de níquel-sefarosa *ON* como se describe en materiales y métodos. Como se observa en la **Figura 43**, se obtuvo la proteína de interés, aunque no completamente pura ya que también se purificó con ella una proteína de aproximadamente 45KDa como se observa en los eluidos E1 – E4 de **Figura 43.A**. Por ser en donde se obtuvo la mejor cantidad de nuestra proteína recombinante His-Q4DYC3, se eligió el eluido 1 para continuar con la experimentación (**Figura 43.B**).

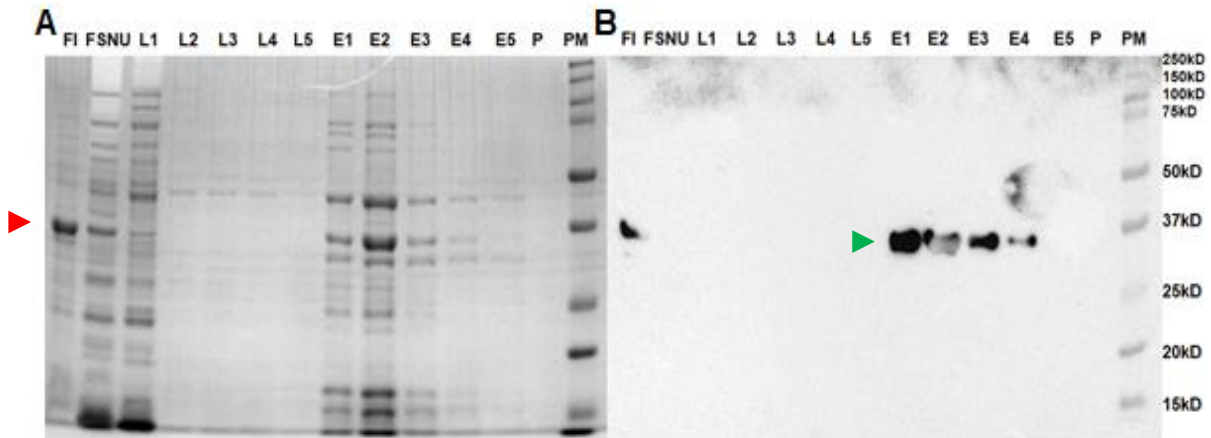


Figura 43. Purificación de His-Q4DYC3 con perlas Ni-sefarosa. PM: Marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Standards; FI: fracción insoluble; FSNU: fracción soluble no unida; L1-L5: Lavados; E1-E5: Eluidos; P: perlas de Ni-sefarosa. **A)** SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie: se observan múltiples bandas que corresponden a proteínas celulares de *E. coli*, resaltando una banda de aproximadamente 37KDa principalmente en FI y E2 (◀); **B)** Western Blot: se observa el reconocimiento de una proteína de aproximadamente 37KDa por un anticuerpo antihistidinas, correspondiendo a la proteína en estudio His-Q4DYC3 de 36.097KDa (▶), en FI y los eluidos 1, 2, 3 y 4.

Para descartar la posible interferencia de las proteínas contaminantes obtenidas durante la purificación de la proteína recombinante His-Q4DYC3, se indujo y purificó bajo las mismas condiciones la bandera de histidinas como control negativo (**Figura 44**), obteniendo la ausencia de la proteína recombinante en estudio y un patrón de proteínas similar al observado en la purificación de esta (**Figura 43**).

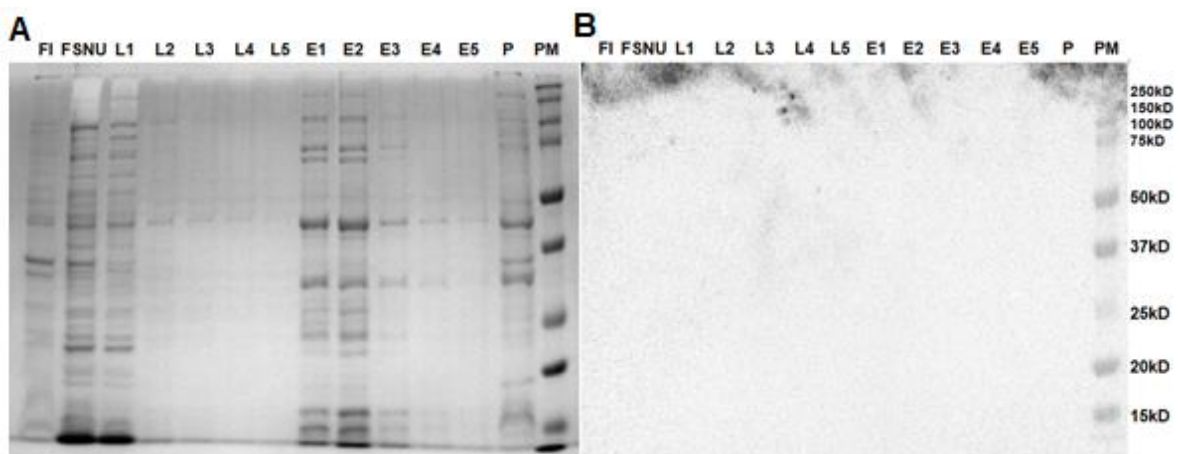


Figura 44. Purificación del control His-pRSET-A con perlas Ni-sefarosa. PM: Marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Standards; FI: fracción insoluble; FSNU: fracción soluble no unida; L1-L5: Lavados; E1-E5: Eluidos; P: perlas de Ni-sefarosa. **A)** SDS-PAGE

teñido con Azul de Coomassie, los eluidos obtenidos muestran un patrón de proteínas celulares de *E. coli* similares a los presentes en la inducción de His-Q4DYC3; **B)** *Western Blot*, no hay reconocimiento de proteínas por el anticuerpo anti-polihistidinas.

De acuerdo con los resultados mencionados, se eligieron los eluidos 1 y 4 de la proteína His-Q4DYC3 purificada para evaluar su antigenicidad. El eluido 4 fue precipitado con acetona en proporción 1:4, con el propósito de aumentar la concentración de la proteína en estudio. El control de histidinas seleccionado fue el eluido 1.

10.7. EVALUACIÓN DE ANTIGENICIDAD DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE His-Q4DYC3 ANTE SUEROS REACTIVOS A *T. cruzi*.

La evaluación de las diversas muestras serológicas disponibles en el laboratorio, se llevó a cabo mediante el kit Test ELISA Chagas III, a fin de corroborar su presunta reactividad y no reactividad ante *T. cruzi*. Los seis sueros no reactivos evaluados, fueron determinados como tal al presentar valores de absorbancia menores al punto de corte. Por otra parte, de los ocho sueros establecidos previamente como reactivos, cinco fueron catalogados como positivos y tres como no reactivos, razón por la cual estos últimos fueron descartados (**Figura 45**). De acuerdo con sus valores de absorbancia, se eligieron a los sueros reactivos con los valores más altos (R1, R5, R7 y R8) y los sueros no reactivos con los valores más bajos (NR1, NR2, NR4 y NR5). Los valores de corte fueron calculados a partir del promedio de los sueros no reactivos más dos desviaciones estándar (Machado y colaboradores, 2012 y Naqvi y colaboradores, 2019).

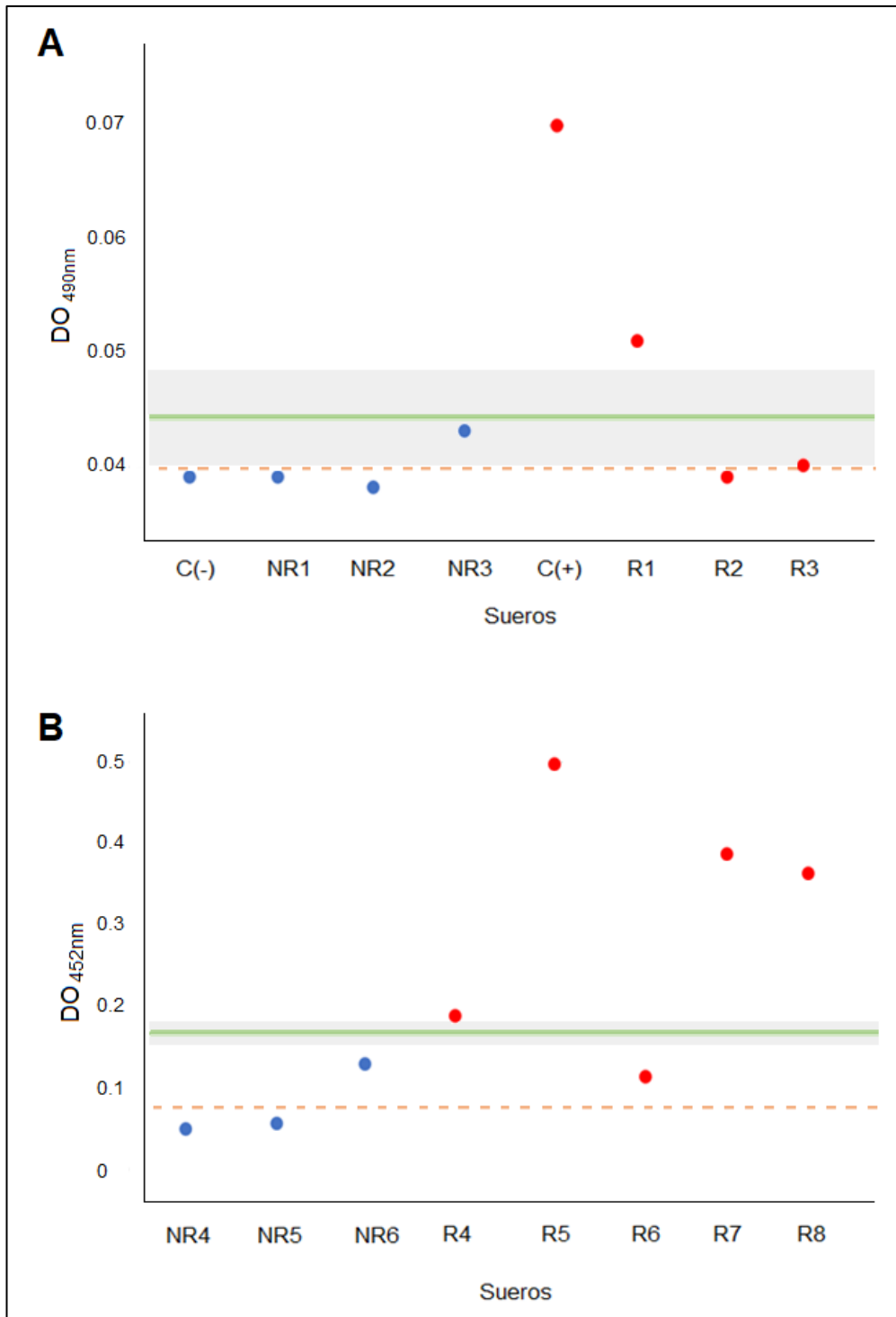


Figura 45. Evaluación de reactividad de muestras serológicas ante *T. cruzi*. Los sueros determinados previamente como no reactivos (puntos azules) se encuentran debajo del valor de corte (línea verde). Cinco de los ocho sueros reactivos (puntos rojos) se encuentran por encima de la línea de corte y tres por debajo de la misma. En A, se observan los resultados del control positivo y negativo del kit diagnóstico utilizado y 3 de los sueros no reactivos (NR) y 3 de los sueros reactivos (R). En B se muestran los resultados de otros 3 sueros NR y 5 R.

Como control positivo de la presencia o ausencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* en los sueros elegidos, se realizaron ensayos ELISA caseros utilizando un extracto total de proteínas de epimastigotes de *T. cruzi* NM1-cl1, obteniendo que los sueros no reactivos dieron resultados negativos al obtener densidades ópticas por debajo del valor de corte, mientras los sueros reactivos mostraron densidades superiores al dicho valor clasificándose como positivos (**Figura 46**). Estos resultados son de esperarse, debido a la alta sensibilidad que presenta el uso de extractos totales de epimastigotes en métodos serológicos (Umezawa y colaboradores, 1999 y Berrizbietia y colaboradores, 2004).

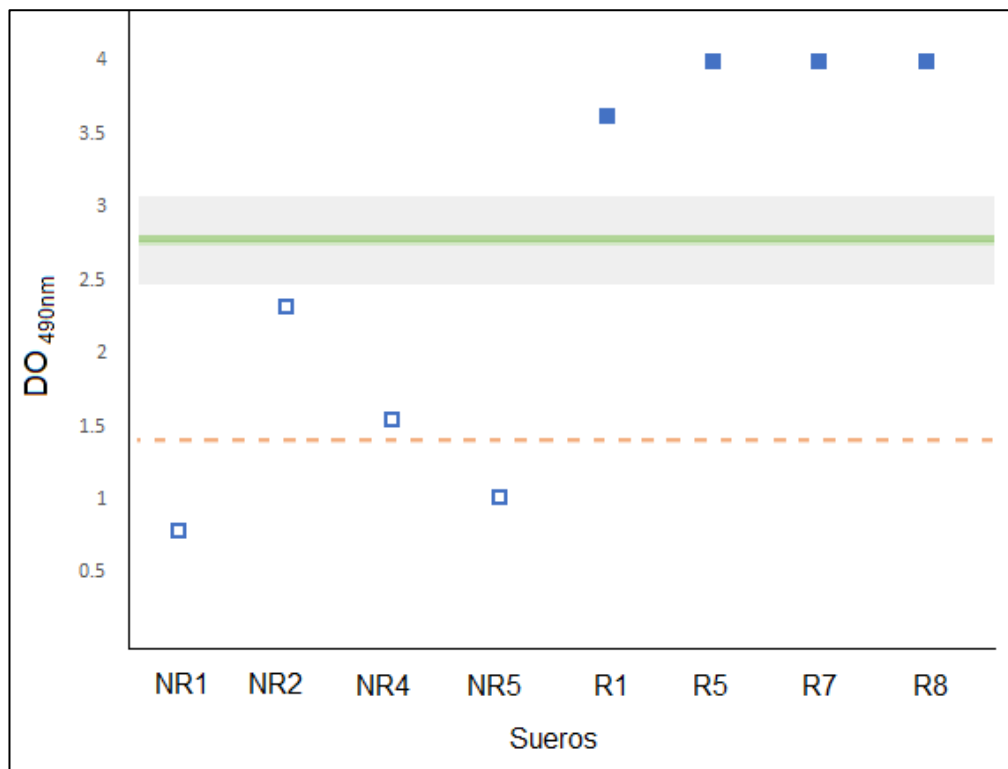


Figura 46. Evaluación del reconocimiento del extracto total de proteínas de epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa NM1-cl1 por sueros reactivos y no reactivos a *T. cruzi*. Los sueros no reactivos (Cuadros azules sin relleno) se encuentran debajo del valor de corte (línea verde). Mientras, los sueros reactivos (Cuadros azules) se encuentran por encima de la misma.

Tres muestras de la proteína recombinante His-Q4DYC3 fueron evaluadas a través de ensayos ELISA con los sueros reactivos y no reactivos seleccionados. Como se muestra en la **Figura 47**, los sueros no reactivos, tanto a dilución 1:25 como 1:50 presentaron valores menores al valor de corte establecido con las tres muestras de la proteína en estudio. De igual forma, los sueros reactivos mostraron valores

negativos a ambas diluciones. Indicando la baja reactividad de la proteína recombinante His-Q4DYC3 con los sueros reactivos a *T. cruzi*. Estos resultados pueden tener varias explicaciones posibles, las cuales serán analizadas a detalle en la discusión: 1) una proteína recombinante por si sola generalmente no es suficiente para detectar muestras serológicas positivas de forma sensible, 2) debido a la falta de modificaciones postraduccionales necesarias para la antigenicidad de la proteína recombinante bacteriana, y 3) la ausencia de anticuerpos específicos contra esta proteína en los sueros evaluados. No obstante, cabe resaltar el hecho de que la muestra concentrada de His-Q4DYC3 presentó una densidad óptica mayor a las muestras sin concentrar, abriendo la posibilidad de obtener mejores resultados, al utilizar una mayor cantidad de proteína recombinante.

El control de histidinas incluido en estos ensayos mostró valores por debajo de la línea de corte al utilizar sueros no reactivos y reactivos, con excepción del suero no reactivo 5 y el suero reactivo 8, los cuales presentaron valores de densidad óptica dentro de la zona gris, determinada de acuerdo con lo reportado por Machado y colaboradores (2012). Estos resultados pueden ser consecuencia de la presencia de anticuerpos contra proteínas de *E. coli* presentes en los sueros, recordando que este microorganismo fue utilizado como sistema de expresión de la bandera de histidinas y de la proteína recombinante.



Figura 47. Evaluación del reconocimiento de la proteína recombinante His-Q4DYC3 por sueros reactivos y no reactivos a *T. cruzi*. Los sueros no reactivos evaluados con las diferentes muestras de His-Q4DYC3 muestran valores de densidad óptica por debajo de la línea de corte (Marcadores sin relleno). El suero no reactivo 5 evaluado con el control de histidinas presenta valores dentro de la zona gris. La mayoría de los sueros reactivos evaluados con sueros reactivos (Marcadores con relleno), también presentaron valores por debajo de la línea de corte. Solamente el control de histidinas evaluado con el suero reactivo 8, mostró valores dentro de la zona gris.

11. DISCUSIÓN

Se estima que en México existen 4.06 millones de individuos infectados por *T. cruzi*, situándolo como el país endémico con el mayor número de infectados con el parásito en América Latina (Arnal y colaboradores, 2019). En la actualidad, el control del vector y un diagnóstico confiable de la infección con *T. cruzi* son los métodos más efectivos para controlar y prevenir la enfermedad, permitiendo la aplicación de un tratamiento oportuno y la disminución de su transmisión. Esto representa un considerable beneficio económico tanto para el sector salud como para los individuos infectados (Carabarin y colaboradores, 2013; Ramsey y colaboradores, 2014; Salazar y colaboradores, 2016; Bartsch y colaboradores, 2018; Arnal y colaboradores, 2019 y Dopico y colaboradores, 2019). El diagnóstico de la ECH en su fase crónica es complicado debido a la amplia heterogeneidad genética que presenta *T. cruzi* aún en una misma región endémica, resultando en la ausencia de una prueba serológica con alta sensibilidad y especificidad capaz de discriminar cualquier muestra serológica positiva y negativa, independientemente del origen geográfico y variabilidad genética y antigénica de la cepa del parásito. Resaltando así, la importancia de identificar nuevas biomoléculas antigénicas e inmunodominantes de *T. cruzi*, para desarrollar nuevas herramientas diagnósticas (De Marchi y colaboradores, 2011; Marcipar y colaboradores, 2012; Carabarin y colaboradores, 2013; De Oliveira y colaboradores, 2013; Rocha y colaboradores, 2017; Rojo y colaboradores, 2018 y Dopico y colaboradores, 2019).

En un trabajo previo del laboratorio se aislaron 15 cepas de *T. cruzi* autóctonas del Estado de Oaxaca, las cuales fueron caracterizadas genética, molecular, biológica y antigénicamente. Se determinó un repertorio antigénico diferencial de las cepas aisladas, cuando se evaluaron por *Western blot* sueros reactivos a *T. cruzi* provenientes de individuos infectados de las mismas zonas geográficas. También, por ensayos de inmunoprecipitación con los sueros reactivos a *T. cruzi* ligados a espectrometría de masas y secuenciación masiva, se identificaron un total de 64 proteínas y 721 epítomos en epimastigotes, y 432 proteínas y 8170 epítomos en tripomastigotes, generando una plataforma de posibles antígenos con potencial diagnóstico, conforme sus valores predictivos de epítomos, localización celular, reproducibilidad y homología con proteínas de otros organismos. Entre estas secuencias se encuentran las proteínas en estudio Q4D2C9, Q4CY87, Q4DYC3, Q4CQ28 y Q4DC56, de este trabajo de investigación.

Se clonaron las secuencias codificantes anteriores para obtener las proteínas recombinantes para su posterior evaluación de antigenicidad. La decisión de evaluar los epítomos como parte de las proteínas recombinantes se debe, a que se sabe que éstas son útiles para el diagnóstico de la ECH en fase crónica a través de ensayos serológicos, ya que a diferencia de los extractos totales de *T. cruzi*, tienen una alta

especificidad y proporcionan un amplio repertorio de epítomos sin interferencia de proteínas que puedan causar falsos positivos (Umezawa y colaboradores, 1996; Umezawa y colaboradores, 1999; Gómez y colaboradores, 2011 y De Marchi y colaboradores, 2011), entendiendo por especificidad a la proporción de individuos sanos o que no presentan una condición determinada, clasificados como negativos por una prueba diagnóstica (Núñez, 2008). Otro criterio para utilizar las proteínas recombinantes es la posibilidad de producirlas en grandes cantidades de forma pura y en su forma nativa, manteniendo sus propiedades antigénicas (Camussone y colaboradores, 2009; De Marchi y colaboradores, 2011 y Mucci y colaboradores, 2017). Cabe mencionar que recientemente, el uso de péptidos sintéticos en pruebas inmunodiagnósticas ha aumentado, puesto que también pueden producirse en grandes cantidades de forma pura y, además, son moléculas químicamente estables y definidas como epítomos antigénicos (Mucci y colaboradores, 2017). No obstante, estos péptidos solo son eficaces cuando se trata de epítomos lineales y no cuando son conformacionales. Se sabe que el reconocimiento antígeno-anticuerpo es una interacción específica entre dos biomoléculas altamente afines, por lo que cualquier modificación en alguna de ellas puede alterar dicha interacción. Los epítomos de las moléculas antigénicas se pueden clasificar en dos tipos: lineales y conformacionales. Los primeros están formados por aminoácidos consecutivos en la estructura primaria de la biomolécula, mientras los segundos constan de aminoácidos dispersos que se encuentran próximos gracias a su conformación secundaria y/o terciaria. Aproximadamente el 90% de los epítomos reportados en la literatura son conformacionales, por lo que es importante para este trabajo, tomar en cuenta la estructura secundaria y terciaria de las proteínas en estudio. En este sentido, de acuerdo con el análisis *in silico* realizado las proteínas recombinantes en estudio no sufren alteraciones conformacionales al fusionarse a la bandera de histidinas, por lo que esperaríamos que su antigenicidad tampoco se ve afectada (Sela y colaboradores, 1967; Kulkarni, Bhosle y Kolaskar, 2005; Fernández y Vasta, 2010; Bottino y colaboradores, 2013 y Sun y colaboradores, 2016).

Aún cuando en el trabajo previo se identificaron epítomos de epimastigotes y tripomastigotes, nosotros decidimos trabajar únicamente con los de tripomastigotes. La mayoría de los métodos serológicos existentes en la actualidad muestran alta sensibilidad, pero baja especificidad, debido a que utilizan extractos totales o semi-purificados de epimastigotes, estadio del parásito presente únicamente en el vector. Mientras que el sistema inmune del hospedero vertebrado está expuesto solamente a tripomastigotes y amastigotes, por lo que los anticuerpos producidos son contra estos dos estadios. Se sabe que hay proteínas que son estadio específicas pero hay otras que se comparten en las tres formas del parásito e incluso en parásitos cercanos, por lo que no es de extrañar la presencia de anticuerpos contra antígenos de epimastigotes en muestras biológicas de individuos infectados y la obtención de falsos positivos, generados por reacción cruzada con otros agentes infecciosos, principalmente

Leishmania sp y *T. rangeli* (Umezawa y colaboradores, 1996; Cuba, 1998; Umezawa y colaboradores, 1999; Berrizbietia y colaboradores, 2004; De Marchi y colaboradores, 2011; Marcipar y colaboradores, 2012; De Oliveira y colaboradores, 2013; Reis y colaboradores, 2014; Neves y colaboradores, 2016 y Salazar y colaboradores, 2016).

Hasta la fecha, los ensayos serodiagnósticos comerciales en México para la ECH constan de antígenos de cepas de *T. cruzi* aisladas en otros países, mostrando baja sensibilidad y especificidad en la detección de muestras reactivas a *T. cruzi* de pacientes mexicanos (Pérez y colaboradores, 1998; Sánchez y colaboradores, 2001; Sánchez y colaboradores, 2006 y Concha y colaboradores, 2017). Se ha propuesto que la sensibilidad de estos ensayos puede mejorarse con el empleo de antígenos de cepas nativas de la zona geográfica de la misma procedencia de las muestras serológicas a evaluar, debido a la gran variabilidad genética, molecular, biológica y epidemiológica que presentan las cepas en diferentes zonas endémicas. En el territorio mexicano, las cepas de *T. cruzi* reportadas pertenecen a TcI predominantemente, aun cuando en los últimos años se han identificado cepas de los otros genotipos (TcII, TcIII, TcIV, TcV y TcVI) (Kirchhoff y colaboradores, 1984; Bosseno y colaboradores, 2000; Ruiz y colaboradores, 2013; Sánchez y colaboradores, 2006; Gómez y colaboradores, 2011; Ramos y colaboradores, 2013; Zingales y colaboradores, 2012; Ibáñez y colaboradores, 2013; Martínez y colaboradores, 2013 y López y colaboradores, 2015). Las cepas autóctonas de Oaxaca utilizadas en este trabajo, para la identificación de los epítomos son TcI, TcII y TcV (Martínez y colaboradores, 2013), por lo que consideramos que los epítomos identificados al menos representan estos tres DTUs.

La OMS y diversos autores (Organización Panamericana de la Salud, 2018; Gomes, Lorena y Luquetti, 2009; De Marchi y colaboradores, 2011 y Reis y colaboradores, 2014) recomiendan que los antígenos recombinantes a utilizar en el diagnóstico de la ECH en fase crónica deben cumplir con los siguientes puntos:

- i) Ser altamente inmunogénicos en todas las poblaciones genéticamente diferentes.
- ii) Estar presentes en aislados de *T. cruzi* de diferentes regiones endémicas.
- iii) Ser estables y de fácil manejo para garantizar su reproducibilidad.
- iv) No presentar reacción cruzada con otros agentes infecciosos.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el trabajo de Martínez-Cuevas (2018), mencionados con anterioridad, y al análisis *in silico* realizado en el trabajo previo y en este, las proteínas Q4D2C9, Q4CY87, Q4DCY3, Q4CQ28 y Q4DC56 cumplen con la mayoría de las características antes mencionadas. Todas ellas presentaron un alto grado de inmunogenicidad en los distintos aislados de *T. cruzi* utilizando las 15 cepas autóctonas analizadas para su identificación, las cuales como se dijo anteriormente pertenecen a diferentes regiones endémicas de la ECH en Oaxaca y representan a los

DTUs TcI, TcII y TcV. Además, en su mayoría son estables acorde a sus propiedades fisicoquímicas, con excepción de Q4CY87 y Q4CQ28. Con respecto al último punto referente a la ausencia de reacción cruzada con otros agentes infecciosos, se buscaron secuencias ortólogas a las proteínas en estudio en *T. rangeli* y *Leishmania sp.* En el caso de *Leishmania* la búsqueda se limitó a cepas reportadas en México, *L. braziliensis*, *L. infantum* y *L. mexicana* (Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades, 2015), encontrando en *T. rangeli* secuencias ortólogas a las proteínas Q4D2C9, Q4CY87, Q4DCY3, Q4CQ28 y Q4DC56 con un porcentaje de identidad entre el 52% y 90%, mientras las secuencias obtenidas en *Leishmania sp* presentan un porcentaje entre el 2% y 74%, indicando que existe la posibilidad de presentar reacción cruzada al utilizarse como antígenos. No obstante, esto se debe comprobar experimentalmente en trabajos futuros.

Para poder obtener las proteínas en estudio sin modificaciones en su composición se clonaron las secuencias codificantes completas de éstas, por lo que los oligonucleótidos se diseñaron a partir de los primeros y últimos nucleótidos de los marcos de lectura completos de las secuencias, tomando al menos 18 nucleótidos para obtener una alineación oligonucleótido-templado específica. La estabilidad de este alineamiento depende directamente del contenido de guanina y citosina presente, ya que dichas bases nitrogenadas crean uniones más fuertes (3 puentes de hidrógeno), que las formadas por las bases adenina y timina (2 puentes de hidrógeno). Por esta misma razón, seguimos la recomendación de contar con bases como guanina o citosina en los extremos 5' y 3' de cada oligonucleótido, asegurando la unión adecuada entre la cadena doble de ADN y la ADN polimerasa durante el inicio de la replicación (Bing-Yuan y Harry, 2002; Yuryev, 2007; Van Pelt-Verkuil, Van Belkum y Hays, 2008 y Feeney, Murphy y Lopilato, 2014). En los extremos 5' y 3' se añadió un sitio de restricción determinado con la finalidad de poder generar extremos cohesivos mediante digestión enzimática y así favorecer la incorporación de los insertos amplificados al vector de expresión pRSET®-A, que presenta los mismos sitios de restricción (Lodge, Lund y Minchin, 2007; Cao y colaboradores, 2010 y Feeney, Murphy y Lopilato, 2014). Además, se añadieron nucleótidos extra tanto río arriba como río abajo del sitio de restricción porque se ha demostrado que diversas enzimas de restricción mejoran su eficiencia hasta en un 90%, al tener cierta cantidad de nucleótidos flanqueando su sitio de restricción (Caldwell, Williams y Caldwell, 2006 y Feeney, Murphy y Lopilato, 2014). En algunos casos también se añadieron nucleótidos extra para conservar el marco de lectura adecuado de cada secuencia codificante asegurando la correcta formación del codón de paro y su correcta traducción (Cao y colaboradores, 2010 y Feeney, Murphy y Lopilato, 2014). De acuerdo con el análisis bioinformático realizado, existe una baja posibilidad de formación de estructuras secundarias entre los pares de oligonucleótidos diseñados que pudieran afectar la amplificación de las proteínas en estudio. Lo cual se corroboró experimentalmente, obteniendo los

productos de PCR esperados sin la formación de productos inespecíficos, indicando el correcto diseño de oligonucleótidos.

Al alinear las secuencias de cada par de oligonucleótidos ante el genoma de *T. cruzi*, se observó que son específicos a cada secuencia codificante en el caso de las proteínas Q4D2C9, Q4CY87, Q4DCY3 y Q4CQ28. Mientras, para la secuencia codificante a la proteína Q4DC56 el par de oligonucleótidos utilizados puede amplificar otras dos secuencias de *T. cruzi* (TcCLB.505267.50 y TcCLB.508317.120) de tamaño similar (1,794pb) a la secuencia de nuestro interés (1,890pb), lo cual dificultó su identificación mediante métodos electroforéticos. Cabe mencionar, que dichas secuencias son alelos de un gen codificante a una proteína 1,2- α -manosidasa putativa, perteneciente a la familia glicosil hidrolasa 47. Familia y tipo de proteína a la que también pertenece Q4DC56, en donde la diferencia entre ambas proteínas es una región de 42 aminoácidos más en Q4DC56, secuencia que podría ser utilizada para identificar y diferenciar la secuencia codificante a nuestra proteína a través de un oligonucleótido específico. La construcción pGEM-TE-C56 obtenida durante el desarrollo experimental fue analizada por PCR utilizando dicho oligo específico, observándose que no corresponde a la proteína deseada. No obstante, se plantea como posible solución a esta limitante realizar en un trabajo futuro el análisis de diversas UFC transformadas con una nueva construcción pGEM-TE-C56, por PCR de colonia utilizando el oligonucleótido específico a la proteína Q4DC56.

La producción de proteínas recombinantes se llevó a cabo en cinco pasos principales: amplificación de las secuencias codificantes a las proteínas de interés por PCR, clonación en pGEM®-T Easy, subclonación en pRSET®-A, expresión proteica por *E. coli* BL21(DE3)pLysS y purificación de proteínas fusionadas por IMAC. El primer paso se realizó a partir de ADN genómico de *T. cruzi* NM1-cl1, cepa autóctona de Oaxaca altamente infectiva perteneciente al DTU TcI (Bosseno y colaboradores, 2002; Gómez y colaboradores, 2011 y Martínez-Cuevas, 2013). Esta amplificación por PCR se hizo con el fin de aumentar la cantidad de copias presentes de cada inserto e incorporar a estos los sitios de restricción necesarios para su clonación en el vector pRSET®-A, utilizando una enzima ADN Taq polimerasa de alta fidelidad. Esta enzima presenta una baja tasa de mutación al poseer actividad exonucleasa tanto en dirección 5' \rightarrow 3' como 3' \rightarrow 5', asegurando una replicación fidedigna del ADN (Steitz, 1999; Algire, 2013 y Ramos, 2017). La clonación de los insertos obtenidos se llevó a cabo en el vector de clonación TA, pGEM®-T Easy, permitiendo una fácil, rápida y eficiente ligación entre ellos, sin importar el tamaño del inserto (Ramos, 2017). Además, este plásmido al contener el gen de selección *lacZ* permite la identificación de UFC transformadas positivas presentando un color blanco, a diferencia de las UFC negativas que presentan un color azul. Sin embargo, pueden generarse UFC blancas negativas y/o azules positivas, haciendo necesario confirmar la presencia o ausencia de los insertos de interés por

extracción de ADN de plásmido o PCR de colonia (Promega Corporation, 2015; Ramos y colaboradores, 2017 y Ahmad y colaboradores, 2018). La razón principal de utilizar este vector de clonación TA es que tiene en su extremo una A o T que se alinea con la base complementaria (T o A, respectivamente) en el inserto al final de la reacción de PCR facilitando la clonación del amplicón. Al quedar clonado en este vector es benéfico porque flanqueando a los sitios de restricción quedan las bases del vector facilitando el acoplamiento y corte por las enzimas de restricción para una posterior subclonación del inserto (Algire, 2013). Posteriormente, los insertos fueron liberados por digestión enzimática generando extremos cohesivos compatibles con los presentes en el vector de expresión pRSET®-A, pero no compatibles entre sí, lo cual evita su recircularización y por consiguiente permite obtener una mayor cantidad de construcciones (Tan y col, 2018). Entre las principales características de este vector se encuentra su capacidad de generar un gran número de copias gracias a su origen de replicación pUC18 y proporcionar una bandera de histidinas a las proteínas recombinantes para facilitar su detección con anticuerpos anti-histidinas y su purificación por IMAC (Ramos y colaboraciones, 2004 e Invitrogen, 2010). De las construcciones obtenidas se seleccionó a la construcción pRSET-A-YC3 para continuar la experimentación del presente trabajo, debido a que su clonación, subclonación y expresión de la proteína recombinante fue la más rápida de obtener. Para inducir su expresión se transformaron células competentes BL21(DE3)pLysS, caracterizadas por presentar una eficiencia de 1×10^6 UFC/ μ g de pUC 18, y por ser recomendadas para expresar proteínas que pudieran ser tóxicas para *E. coli* (Agilent Technologies, 2010 y Rosano y Ceccarelli, 2014). Por último, la purificación de dicha proteína recombinante no fue totalmente eficiente, ya que se detectaron otras proteínas presentes, aunque en menor proporción a la proteína de nuestro interés, correspondientes posiblemente a proteínas celulares de *E. coli*, razón por la cual se obtuvo el repetido de histidinas como control de dichas proteínas contaminantes.

De acuerdo con los resultados de los ensayos de ELISA realizados, la proteína recombinante His-Q4DYC3 no presentó una adecuada reactividad ante las muestras serológicas utilizadas. Este resultado no es de extrañar, ya que se sabe que una sola proteína recombinante suele no ser suficiente para un buen reconocimiento. Se ha reportado que para asegurar un reconocimiento adecuado de muestras positivas a *T. cruzi*, se recomienda utilizar una mezcla de antígenos recombinantes, minimizando la variación de las muestra y mejorando la sensibilidad y especificidad del ensayo diagnóstico, ya que un solo tipo de antígeno no posee la capacidad de detección necesaria (Umezawa y colaboradores, 1999; Da Silveira, Umezawa y Luquetti, 2001; Berrizbietia y colaboradores, 2004; Camussone y colaboradores, 2009 y Mucci y colaboradores, 2017). Bajo este precepto nosotros planteamos inicialmente el análisis de 5 diferentes proteínas recombinantes, que pretendíamos evaluar por separado y en combinación. Sin embargo, por las dificultades que se tuvieron en la obtención de las otras 4 proteínas recombinantes

solo nos quedamos con His-Q4DYC3, no siendo al parecer suficiente y dejando la evaluación de las otras proteínas recombinantes para trabajos futuros. Además, en el caso de los sueros evaluados que mostraron reactividad ante el control de histidinas, se sugiere retirar los posibles anticuerpos anti-*E.coli* presentes en ellos mediante ensayos de adsorción. Otra posibilidad de los resultados negativos que obtuvimos es la posible falta de modificaciones postraduccionales en la proteína recombinante. Se sabe que un factor involucrado en determinar la capacidad antigénica de una proteína en organismos eucariontes, son las modificaciones postraduccionales que puede sufrir. Se ha reportado que proteínas extracelulares o de membrana, como las de éste trabajo, suelen presentar principalmente glicosilaciones y/o carboxilaciones (Cloos y Christgau, 2004 y Walsh, 2010). Esta posibilidad fue evaluada en el análisis computacional realizado, donde se obtuvieron al menos dos sitios putativos de glicosilación en cada una de las proteínas en estudio. Sin embargo, el utilizar a *E. coli* como sistema de expresión de la proteína recombinante resulta en la obtención de la proteína recombinante no glucosilada, pudiendo alterar la estabilidad, plegamiento, señalización, actividad biológica e inmunogenicidad de estas proteínas (Walsh y Jefferis, 2006 y Chen, 2011). Por lo tanto, si la proteína recombinante His-Q4DYC3 requiere de una modificación postraduccional para ser reconocida por los anticuerpos, podría ser este el problema del resultado negativo. Otra posibilidad es que como se dijo anteriormente, se ha reportado la variación del reconocimiento de un antígeno recombinante debido a la heterogeneidad antigénica de las cepas de *T. cruzi*, aun cuando pertenezcan a la misma región geográfica, o a factores relacionados al hospedero como la genética de éste, su sistema inmune, exposiciones previas al agente infeccioso, entre otras. Lo anterior, resulta en la producción de una extensa variedad de anticuerpos anti-proteínas del parásito, que no necesariamente incluyen a la proteína Q4DYC3 (Kirchhoff y colaboradores, 1984; Oelemann y colaboradores, 1998; Umezawa y colaboradores, 1999; Reis y colaboradores, 2014; De Fuentes y colaboradores, 2019 y Gonçavales y colaboradores, 2019).

Aun cuando evaluamos únicamente la posible utilidad de la proteína recombinante His-Q4DYC3, se logró la clonación de otras 4 secuencias (Q4D2C9, Q4CY87, Q4CQ28 y Q4DC56) que se encuentran listas para su subclonación en pRSET®-A, establecer las condiciones óptimas de expresión y evaluar su antigenicidad en un trabajo futuro. El presente proyecto de investigación contribuye en uno de los proyectos globales del laboratorio, dirigido a la identificación y caracterización de posibles candidatos potenciales para la detección de Ab anti *T. cruzi*, que podrían aplicarse en un futuro para el diagnóstico crónico de la ECH.

12. CONCLUSIÓN

La proteína recombinante His-Q4DYC3 no es capaz de ser reconocida adecuadamente por muestras serológicas positivas a *T. cruzi*.

13. PERSPECTIVAS

- Evaluar el reconocimiento de muestras reactivas a *T. cruzi* utilizando la proteína His-Q4DYC3 en conjunto con otras proteínas recombinantes.
- Corroborar la correcta clonación de la secuencia codificante a la proteína Q4DC56.
- Subclonar en pRSET®-A las secuencias codificantes a Q4D2C9, Q4CY87, Q4DC56.
- Obtención de las proteínas recombinantes His-Q4D2C9, His-Q4CY87, His-Q4CQ28 y His-Q4DC56, y evaluar su capacidad antigénica por ensayos ELISA.

14. BIBLIOGRAFÍA

- Agilent Technologies. 2010. BL21(DE3) Competent Cells, BL21(DE3)pLysS Competent Cells, and BL21 Competent Cells. Consultado en <https://bit.ly/2nySL7y> el 27 de Abril de 2019.
- Aguirre, O. y Sarría, L. Chagas: una enfermedad emergente. *Gaceta médica de Bilbao*. 2018. 115: 58-66.
- Ahmad, A. y colaboradores. Cloning and expression of MPT83 gene from *Mycobacterium tuberculosis* in *E. coli* BL21 as vaccine candidate of tuberculosis: A preliminary study. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2018. 16: 335-340.
- Algire, M. Restrictionless cloning. *Methods in Enzymology*. 2013. 529: 125-134.
- Andrade, S. y Magalhães, J. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1997. 30: 27-35.
- Arnal, A. y colaboradores. Estimating the current burden of Chagas disease in Mexico: A systematic review and meta-analysis of epidemiological surveys from 2006 to 2017. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2019. 13: e0006859.
- Barh, D., Khan, M. y Davies, E. 2015. PlantOmics: TheOmics of Plant Science. Springer: India.
- Bartsch, S. y colaboradores. The economic value of identifying and treating Chagas disease patients earlier and the impact on *Trypanosoma cruzi* transmission. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2018. 12: e0006809.
- Bass, J. y colaboradores. An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*. 2017. 27: 4-25.
- Berrizbietia, M. y colaboradores. Development and Comparison of Enzyme Immunoassays for Diagnosis of Chagas' Disease Using Fixed Forms of *Trypanosoma cruzi* (Epimastigotes, Amastigotes, and Trypomastigotes) and Assessment of Antigen Stability for the Three Assays. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004. 42: 1766-1769.
- Bhatia, V. y colaboradores. Utility of the *Trypanosoma cruzi* Sequence Database for Identification of Potential Vaccine Candidates by *In Silico* and *In Vitro* Screening. *Infection and Immunity*. 2004. 72: 6245-6254.
- Bing-Yuan, C. y Harry, J. 2002. PCR Cloning Protocols (2). New Jersey: Humana Press.
- Bivona, A. y colaboradores. *Trypanosoma cruzi* 80 kDa prolyl oligopeptidase (Tc80) as a novel immunogen for Chagas disease vaccine. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2018. 30. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006384.
- Bosseno, M. y colaboradores. Mexican *Trypanosoma cruzi* Stocks: Analysis of Minicircle kDNA Homologies by Cross-hybridization. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2000. 95: 473-476.
- Bosseno, M. y colaboradores. Predominance of *Trypanosoma cruzi* Lineage I in Mexico. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002. 1: 627-632
- Bottino, C. y colaboradores. Chagas disease-specific antigens: characterization of epitopes in CRA/FRA by synthetic peptide mapping and evaluation by ELISA-peptide assay. *BMC Infectious Diseases*. 2013. 13: 568.
- Brown, R. y Audet, J. Current techniques for single-cell lysis. *The royal Society Publishing Interface*. 2008. 5: 131-138.
- Brunelle, J. y Green, R. Chapter Twelve - One-dimensional SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (1D SDS-PAGE). *Methods in Enzymology*. 2014. 541: 151-159.
- Caeiro, L. y colaboradores. The protein family TcTASV-C is a novel *Trypanosoma cruzi* virulence factor secreted in extracellular vesicles by trypomastigotes and highly expressed in bloodstream forms. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2018. 4. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006475.
- Caldwell, G., Williams, S. y Caldwell, K. 2006. Integrated Genomics: A Discovery-Base Laboratory Course. Inglaterra: John Wiley & Sons.
- Callejas, F., Gironés, N. y Fresno, M. Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi* Strain Bug2148. *Genome Announcements*. 2018. 6: e01497-17.

- Camussone, C. y colaboradores. Comparison of Recombinant *Trypanosoma cruzi* Peptide Mixtures versus Multiepitope Chimeric Proteins as Sensitizing Antigens for Immunodiagnosis. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2009. 16: 899-905.
- Cao, Y. y colaboradores. PrimerCE: Designing Primers for Cloning and Gene Expression. *Molecular Biotechnology*. 2010. 46: 113-117.
- Carabarin, A. y colaboradores. Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: An update. *Acta Tropica*. 2013. 127: 126-135.
- Carrillo, J. y colaboradores. Evaluación de Procedimientos de Tinción para el Análisis de Proteínas por Electroforesis (SDS-PAGE). *INVURNUS*. 2013. 8:19-26.
- Carson, S., Miller, H. y Witherow, D. 2012. *Molecular Biology Techniques* (3). Consultado en <https://bit.ly/2o7d7oJ> el 3 de Marzo del 2019.
- CDC (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades). 2017. Parásitos: Epidemiología de riesgo. Consultado en <https://bit.ly/2IPpn5J> el 20 de Agosto del 2018.
- CDC^A (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades). 2016. DPDx - Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern: American Trypanosomiasis. Consultado en <https://bit.ly/2BC2aik> el 20 de Agosto del 2018.
- CDC^B (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades). 2016. Parásitos: Epidemiología de riesgo. Consultado en <https://bit.ly/2mrvbwc> el 20 de Agosto del 2018.
- Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades. 2015. Manual para el diagnóstico, tratamiento y control de las leishmaniasis. Consultado en <https://bit.ly/2m1wOhi> el 21 de Agosto del 2019.
- Chen, R. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. *Biothecnology Advances*. 2011. 30:1102-1107.
- Clark, C. y Pung, O. Host specificity of ribosomal DNA variation in sylvatic *Trypanosoma cruzi* from North America. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1994. 66:175-179.
- Cloos, P. y Christgau, S. Post-translational modifications of proteins: implications for aging, antigen recognition, and autoimmunity. *Biogerontology*. 2004. 5: 139-158.
- Concha, F. y colaboradores. Detection of Anti-*Trypanosoma cruzi* Antibodies among Donors at A Blood Bank from Southern Mexico, Using an Iron Superoxide Dismutase Excreted (Fe-Sode) as Antigen. *Journal of Immunology and Infectious Disease*. 2017. 4.
- Coronado, X. y colaboradores. Variation in *Trypanosoma cruzi* clonal composition detected in blood patients and xenodiagnosis triatomines: implications in the molecular epidemiology of Chile. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2006. 74: 1008-1012.
- Corporate Headquarters. 2010. pRSET A, B, and C. For high-level expression of recombinant proteins in *E. coli*. Consultado en <https://bit.ly/2nzZSfW> el 30 de Agosto del 2018.
- Cortázar, A. y Silva, E. 2004. PCR. México: Instituto de Biotecnología, UNAM.
- Cuba, C. Revisión de los aspectos biológicos y diagnósticos del *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1998. 31: 207-220.
- Da Silveira, J., Umezawa, E. y Luquetti, A. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *TRENDS in parasitology*. 2001. 17: 286-291.
- Das, S. y Ranjan, H. 2015. *Microbial Biotechnology: A Laboratory Manual for Bacterial Systems*. India: Springer.
- De Almeida, N. y colaboradores. Heme-Induced ROS in *Trypanosoma Cruzi* Activates CaMKII-Like That Triggers Epimastigote Proliferation. One Helpful Effect of ROS. *PLoS ONE*. 2011. 6. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025935>.

- De Fuentes, J. y colaboradores. *Trypanosoma cruzi*: A review of biological and methodological factors in Mexican strains. *Acta Tropica*. 2019. 195: 51-57.
- De Marchi, C. y colaboradores. Evaluation of a Recombinant *Trypanosoma cruzi* Mucin-Like Antigen for Serodiagnosis of Chagas' Disease. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2011. 18: 1850-1855.
- De Oliveira, T. y colaboradores. Identification of Strain-Specific B-cell Epitopes in *Trypanosoma cruzi* Using Genome-Scale Epitope Prediction and High-Throughput Immunoscreening with Peptide Arrays. *PLoS Neglected Tropical Disease*. 2013. 7: DOI: 10.1371/journal.pntd.0002524.
- De Pablos, L. 2017. Análisis global de la familia multigénica MASP (Mucin Associated Surface Proteins) de *Trypanosoma cruzi*. (Trabajo doctoral, Universidad de Granada). Consultado de <https://bit.ly/2nAEwix> el 20 de Agosto del 2017.
- De Paula, C. y colaboradores. LM14 defined medium enables continuous growth of *Trypanosoma cruzi*. *MBC Microbiology*. 2014. 14: 238.
- De Souza, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current Pharmaceutical Design*. 2002. 8: 269-285.
- De Souza, W. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2009. 104: 89-100.
- Dopico, E. y colaboradores. Immune reactivity to *Trypanosoma cruzi* chimeric proteins for Chagas disease diagnosis in immigrants living in a non-endemic setting. *BMC Infectious Diseases*. 2019. 19: 251-257.
- Duarte, L. y colaboradores. Comparison of seven diagnostic tests to detect *Trypanosoma cruzi* infection in patients in chronic phase of Chagas disease. *Colombia Médica*. 2014. 45: 61-66.
- El-Sayed, N. y colaboradores. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. 2005. 309: 409-415.
- EMBL-EBI. 2019. SAS: Sequence Annotated by Structure. Consultada en <https://bit.ly/2muRdM0>.
- European Molecular Biology Laboratory. 2018. Pfam 32.0. Consultada en <https://bit.ly/2muNbTS>.
- European Molecular Biology Laboratory. 2019. Clustal Omega. Consultada en <https://bit.ly/2Enwpul>.
- Feeney, M., Murphy, K. y Lopilato, J. Designing PCR Primers Painlessly. *Journal of Microbiology & Biology Education*. 2014. 15: 28-29.
- Fernández, J. y Vasta, G. Production of recombinant proteins from protozoan parasites. *Trends in Parasitology*. 2010. 26: 244-254.
- Freitas, J. y colaboradores. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS pathogens*. 2006. 2.
- Fritsch, R. y Krause, I. 2003. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (2)*. USA: Academic Press.
- Gilden, D. y colaboradores. Extraction of cell-associated varicella-zoster virus DNA with Triton X-100-NaCl. *Journal of Virological Methods*. 1982. 4: 263-275.
- Gomes, Y., Lorena, V. y Luquetti, A. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies?. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2009. 104: 115-121.
- Gómez, C. y colaboradores. Molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* Mexican strains and their behavior in the mouse experimental model. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2011. 44: 684-690.
- Gómez, K. y Buscaglia, C. 2019. *T. cruzi* Infection: Methods in Molecular Biology. Humana Press: New York.
- Gonçalves, C. y colaboradores. Cell Culture and Maintenance of the Evolutionary Forms of *Trypanosoma cruzi* for Studies of Parasitic Biology. *IntechOpen*. 2019. DOI: 10.5772/intechopen.84733.
- Green, M., Miller, H. y Hendler, S. Isolation of a Polyoma-Nucleoprotein Complex from Infected Mouse-Cell Cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1971. 68: 1032-1036.

- Griffiths, A. y colaboradores. 1999. *Modern Genetic Analysis*. New York: W. H. Freeman.
- Guhl, F. y Lazdins, J. 2005. Reporte sobre la ECH. Organización Mundial de la Salud: Buenos Aires.
- Hegazy, W. y colaboradores. TcVac1 vaccine delivery by intradermal electroporation enhances vaccine induced immune protection against *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Vaccine*. 2019. 37: 248-257.
- Ibáñez, G. y colaboradores. Identification by Q-PCR of *Trypanosoma cruzi* lineage and determination of blood meal sources in triatomine gut samples in Mexico. *Parasitology International*. 2013. 62: 36-43.
- Ihle, C. y colaboradores. Spatio-temporal characterization of *Trypanosoma cruzi* infection and discrete typing units infecting hosts and vectors from non-domestic foci of Chile. *PLoS Neglected Tropical Disease*. 2019. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007170.
- Integrated DNA Technologies, Inc. 2019. OligoAnalyzer Tool. Consultada en <https://bit.ly/2mG5LYX>.
- Invitrogen Corporation. 2006. Subcloning Efficiency™ DH5α™ Competent Cells. Consultado en <https://bit.ly/2nA2pXu> el 6 de Febrero del 2019.
- Jacobus, A. y Gross, J. Optimal Cloning of PCR Fragments by Homologous Recombination in *Escherichia coli*. *PLoS ONE*. 2015. 10:1-17.
- Kanehisa Laboratories. 2019. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Consultada en <https://bit.ly/2Ynlme7>.
- Kirchhoff, L. y colaboradores. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* differ in their expression of a surface antigen identified by a monoclonal antibody. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1984. 11: 81-89.
- Konstantinou, G. 2017. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). En: Lin, J. y Alcocer, M. *Food Allergens: Methods and Protocols*. Humana Press: New York.
- Kulkarni, U., Bhosle, S. y Kolaskar, A. CEP: a conformational epitope prediction server. *Nucleic acids research*. 2005. 33:168-171.
- Kumar, A. y Garg, N. 2005. *Genetic Engineering*. New York: Nova Science Publishers.
- Lacerda, C. y colaboradores. Proteomic map of *Trypanosoma cruzi* CL Brener: the reference strain of the genome project. *Archives of Microbiology*. 2008. 191:177-184.
- Lever, M. y colaboradores. A modular method for the extraction of DNA and RNA, and the separation of DNA pools from diverse environmental sample types. *Frontiers in Microbiology*. 2015. 6: 1-25.
- Lodge, J., Lund, P. y Minchin, S. 2007. *Gene Cloning*. New York: Taylor & Francis Group.
- López, R. y colaboradores. Synthesis and characterization of α -d-Galp-(1 \rightarrow 3)- β -d-Galp epitope-containing neoglycoconjugates for chagas disease serodiagnosis. *Carbohydrate Research*. 2019. 478: 658-67.
- López, S. y colaboradores. Landscape ecology of *Trypanosoma cruzi* in the southern Yucatan Peninsula. *Acta Tropica*. 2015. 151: 58-72.
- López, V., y colaboradores. Biological characterization and genetic diversity of Mexican isolates of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*. 1997. 69: 239-254.
- Lynn, D. 2009. *Encyclopedia of Insects, Cell Culture*. Elsevier BV. DOI:10.1016/b978-0-12-374144-8.00048-5.
- Machado, G. y colaboradores. Posttherapeutic Cure Criteria in Chagas' Disease: Conventional Serology followed by Supplementary Serological, Parasitological, and Molecular Tests. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2012. 19: 1283-1291.
- Mahmood, T. y Yang, P. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North American Journal of Medical Sciences*. 2012. 4: 429-434.
- Marbach, A. y Bettenbrock, K. lac operon induction in *Escherichia coli*: Systematic comparison of IPTG and TMG induction and influence of the transacetylase LacA. *Journal of Biotechnology*. 2012. 157:82-88.

- Marcili, A. y colaboradores. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Cambridge University Press*. 2009. 136: 641-655.
- Marcipar, I. y Lagier, M. Advances in Serological Diagnosis of Chagas' disease by Using Recombinant Proteins. *Intechopen*. 2012. DOI: 10.5772/28100.
- Martínez, I. y colaboradores. Microsatellite and Mini-Exon Analysis of Mexican Human DTU I *Trypanosoma cruzi* Strains and Their Susceptibility to Nifurtimox and Benznidazole. *Vector-Borne and zoonotic diseases*. 2013. 13.
- Martínez-Cuevas, T. 2013. Caracterización biológica y molecular de aislados de *Trypanosoma cruzi* obtenidos en el Estado de Oaxaca (Trabajo de maestría, CINVESTAV).
- Martínez-Cuevas, T. 2018. Caracterización biológica, genotipificación e identificación de antígenos de aislados de *Trypanosoma cruzi* obtenidos en el Estado de Oaxaca (Trabajo doctoral, CINVESTAV).
- Mas, E. y colaboradores. Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). *Revista AquaTIC*. 2001. 15: 1-10.
- McClatchey, K. 2002. *Clinical Laboratory Medicine (2)*. Lippincott Williams & Wilkins: China.
- Medina, H. y colaboradores. Modelado espacial bayesiano de la ECH en la Huasteca Potosina. *Revista Biomédica*. 2016. 27: 97-109.
- Merck. 2018. BL21 Chemically Competent Cells. Consultado en <https://bit.ly/2od13T7> el 29 de Agosto del 2018.
- Montalvão, F. y colaboradores. Antibody Repertoires Identify β -Tubulin as a Host Protective Parasite Antigen in Mice Infected With *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers in immunology*. 2018. 13: 671.
- Mucci, J. y colaboradores. Next-generation ELISA diagnostic assay for Chagas Disease based on the combination of short peptidic epitopes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2017. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005972.
- Mukhopadhyay, C., Choudhary, R. e Iquebal, M. 2018. *Basic Applied Bioinformatics*. Wiley Blackwell: USA.
- Murillo, G. Enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). *Medicina Interna de México*. 2018. 34: 959-970.
- Naqvi, M. y colaboradores. Combined use of indirect ELISA and Western Blotting with recombinant hepatocellular carcinoma-associated antigen 59 is a potential immunodiagnostic tool for the detection of prepatent *Haemonchus contortus* infection in goat. *Animals*. 2019. 9: 548.
- National Library of Medicine. N.d. BLAST. Consultado en <https://bit.ly/25Tt9Ou>.
- NCBI. 2019. GenBank. Consultado en <https://bit.ly/2wdxi7l>.
- Neves, F. y colaboradores. Chronic Chagas Disease Diagnosis: A Comparative Performance of Commercial Enzyme Immunoassay Tests. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2016. 94: 1034-1039.
- Nowakowski, A., Wobig, W. y Petering, D. Native SDS-PAGE: High Resolution Electrophoretic Separation of Proteins With Retention of Native Properties Including Bound Metal Ions. *Metallomics*. 2014. 6: 1068-1078.
- Núñez, M. 2008. Evaluación de las técnicas diagnósticas: Análisis estadístico. Montevideo: Escuela Universitaria de Tecnología Médica. Consultado en <https://bit.ly/2odKQx7> el 29 de Agosto del 2018.
- Oelemann, W. y colaboradores. Evaluation of Three Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Diagnosis of Chagas' Disease. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998. 36: 2423-2427.
- Organización Mundial de la Salud. 2018. La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). Consultado en <https://bit.ly/2tcEjCn> el 20 de Agosto del 2018.
- Organización Panamericana de la Salud. 2018. Guía para el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad de Chagas. OPS: Washington.

- Palmezano, J. y colaboradores. Chagas disease: reality of a frequent pathology in Santander, Colombia. *Medicas UIS*. 2015. 28: 81-90.
- Pena, S., Renato, C. y Mara, A. *Trypanosoma cruzi*: ancestral genomes and population structure. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2009. 104: 108-114.
- Pereira, D., y colaboradores. Expression and subcellular localization of kinetoplast-associated proteins in the different developmental stages of *Trypanosoma cruzi*. *BioMedCentral Microbiology*. 2009. 9.
- Pérez, R. y colaboradores. Humoral nitric oxide levels and antibody immune response of symptomatic and indeterminate Chagas' disease patients to commercial and autochthonous *Trypanosoma cruzi* antigen. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1998. 58: 715-720.
- Pérez, V. y colaboradores. Caracterización molecular de aislados de *Trypanosoma cruzi* de triatomíneos recolectados en los municipios del Estado de Hidalgo, México. *Nova Scientia: Revista de Investigación de la Universidad De La Salle Bajío*. 2019. 22: 171-185.
- Peverengo, L. y colaboradores. Development and assessment of an improved recombinant multiepitope antigen-based immunoassay to diagnose chronic Chagas disease. *Parasitology*. 2018. 145: 1594-1599.
- Popp, J. y Bauer, M. 2015. *Modern Techniques for Pathogen Detection*. Wiley Blackwell; Alemania.
- Portillo, S. y colaboradores. A prophylactic α -Gal-based glycovaccine effectively protects against murine acute Chagas disease. *NPJ Vaccines*. 2019. 4: 13-27.
- Promega Corporation. 2015. Technical manual: pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems. Consultado en <https://bit.ly/2msLTst> el 29 de Agosto del 2018.
- Protein Information Resource. 2018. PIR: Protein Information Resource. Consultada en <https://bit.ly/2muu9gp>.
- QIAGEN. 2015. QIAprep® Miniprep Handbook. USA: QIAGEN.
- QIAGEN. 2018. QIAquick® Spin Handbook. USA: QIAGEN.
- Ramírez, J. y colaboradores. Evaluation of the analytical and diagnostic performance of a digital droplet polymerase chain reaction (ddPCR) assay to detect *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2018. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007063.
- Ramos, A. y colaboradores. Extensive diversity of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units circulating in *Triatoma dimidiata* from central Veracruz, Mexico. *Infection, Genetics and Evolution*. 2013. 12: 1341-1343.
- Ramos, A. y colaboradores. pELMO, an optimised in-house cloning vector. *AMB Express*. 2017. 7: 26.
- Ramos, C. y colaboradores. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. *Brazilia journal of Medical and biological Research*. 2004. 37: 1103-1109.
- Ramsey, J. y colaboradores. Opportunity Cost for Early Treatment of Chagas Disease in Mexico. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2014. 8: e2776.
- Rassi, A. Jr., Rassi, A. y Marin, J. Chagas disease. *Lancet*. 2010. 17: 1388-1402.
- Reddy, V. y colaboradores. The major facilitator superfamily (MFS) revisited. *The FEBS Journal*. 2012. 286: 2022-2035.
- Reis, J. y colaboradores. Genome-Wide Screening and Identification of New *Trypanosoma cruzi* Antigens with Potential Application for Chronic Chagas Disease Diagnosis. *PLoS One*. 2014. 9.
- Richard, R. y Deutscher, M. 2009. *Methods in Enzymology (2)*. Elsevier Inc.: USA.
- Rocha, M. y colaboradores. Biosensors to Diagnose Chagas Disease: A Brief Review. *Sensors*. 2017. 17: 2629.
- Rojo, J. y colaboradores. Enfermedad de Chagas en México. *Gaceta Médica de México*. 2018. 154: 605-612.

- Rosano, G. y Ceccarelli, E. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*. 2014. 5: 1-17.
- Ruiz, R. y colaboradores. *Trypanosoma cruzi* isolates from Mexican and Guatemalan acute and chronic chagasic cardiopathy patients belong to *Trypanosoma cruzi* I. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2013. 100: 281-283.
- Salazar, P. y colaboradores. Enfermedad de Chagas en México. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*. 2016. 59: 6-16.
- Sales, P. y colaboradores. Experimental and Clinical Treatment of Chagas Disease: A Review. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2017. 97:1289-1303.
- Sambrook, J. y Russell, W. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual* (3). USA: CSHL Press.
- Sánchez, B. y colaboradores. Standardization of micro-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blot for detection of *Trypanosoma cruzi* antibodies using extracts from Mexican strains as antigens. *Archives of medical research*. 2001. 32: 382-388.
- Sánchez, M. y colaboradores. Clinical forms of *Trypanosoma cruzi* infected individuals in the chronic phase of Chagas disease in Puebla, México. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2006. 101: 733-739.
- Sela, M. y colaboradores. Antibodies to Sequential and Conformational Determinants. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. 1967. 32: 537-545.
- Shah, K. y Maghsoudlou, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. *British Journal of Hospital Medicine*. 2016. 77: 98-101.
- Souto, R. y colaboradores. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1996. 83: 141-152.
- Souto, R. y Zingales, B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1993. 62: 45-52.
- Steitz, T. DNA Polymerases: Structural Diversity and Common Mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry*. 1999. 274: 17395-17398.
- Studier, W. y colaboradores. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Gene Expression Technology*. 1990. 185: 60-89.
- Sun, P. y colaboradores. A novel conformational B-cell epitope prediction method based on mimotope and patch analysis. *Journal of theoretical Biology*. 2016. 394: 102-108.
- Swiss Institute of Bioinformatics. N.d. ProtParam tool. Consultada en <https://bit.ly/2NBKbhg>.
- Swiss Institute of Bioinformatics. N.d. ScanProsite tool. Consultada en <https://bit.ly/2o7hm3G>.
- Swiss Institute of Bioinformatics. N.d. SWISS-MODEL. Consultada en <https://bit.ly/2mHXI3t>.
- Sykes, J. y Rankin, S. Isolation in Cell Culture. *Canine and Feline Infectious Diseases*. 2014. DOI: 10.1016/b978-1-4377-0795-3.00001-6.
- Tan, L. y colaboradores. Homologous alignment cloning: a rapid, flexible and highly efficient general molecular cloning method. *PeerJ*. 2018. DOI: 10.7717/peerj.5146.
- Teixeira, D. y colaboradores. Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*, the Causative Agent of Chagas Disease. *PLoS Neglected Tropical Disease*. 2012. 6. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001749.
- The EuPathDB Project Team. 2019. TritrypDB: Kinetoplastid Genomics Resource. Consultada en <https://bit.ly/2nsT3gv>.
- Tibayrenc, M. Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. *Kinetoplastid Biology and Disease*. 2003. 2:1-6.

- Umezawa, E. y colaboradores. Evaluation of Recombinant Antigens for Serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999. 37: 1554-1560.
- Umezawa, E. y colaboradores. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. *Journal of Clinical Microbiology*. 1996. 34: 2143-2147.
- UniProt Consortium. 2019. UniProt. Consultada en <https://bit.ly/2nA91oN>.
- Vago, A. y colaboradores. Genetic Characterization of *Trypanosoma cruzi* Directly from Tissues of Patients with Chronic Chagas Disease: Differential Distribution of Genetic Types into Diverse Organs. *The American Journal of Pathology*. 2000. 156: 1805-1809.
- Van Pelt-Verkuil, E., Van Belkum, A. y Hays, J. 2008. Principles and Technical Aspects of PCR Amplification. Países bajos: Springer
- Walsh, G. Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals. *Drug Discovery Today*. 2010. 15: 773-780.
- Walsh, G. y Jefferis, R. Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nature biotechnology*. 2006. 24: 1241-1252.
- Westenberger, S., Sturm, N. y Campbell, D. *Trypanosoma cruzi* 5S rRNA arrays define five groups and indicate the geographic origins of an ancestor of the heterozygous hybrids. *International Journal of Parasitology*. 2006. 36:337-346.
- Yuryev, A. 2007. PCR Primer Design. New Jersey: Humana Press.
- Zingales, B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Tropica*. 2018. 184: 38-52.
- Zingales, B. y colaboradores. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2009. 104: 1051-1054.
- Zingales, B. y colaboradores. Biological Parameters and Molecular Markers of Clone CL Brener - The Reference Organism of the *Trypanosoma cruzi* Genome Project. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1997. 92: 811-814.
- Zingales, B. y colaboradores. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*. 2012. 12: 240–253.