



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR



Purificación y antigenicidad de una proteína  
recombinante de *Trypanosoma cruzi* obtenida  
mediante sustracción con *Trypanosoma rangeli*.

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

Presentado ante la ilustre universidad  
central de Venezuela, por el **Br Ali Agudelo**,  
como requisito parcial para optar al título de  
Licenciado en Biología.

Tutora: Dra. Teresa Abate.

SECCIÓN DE BIOLOGÍA MOLECULAR

IMT-UCV

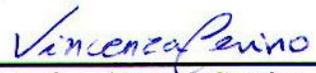
Caracas, abril 2017

**DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL  
DE GRADO DEL (A) Br. Ali Agudelo Agudelo**

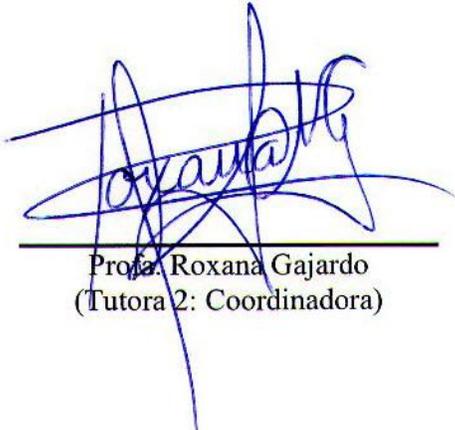
Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado del Br. Ali Agudelo Agudelo, C.I: 20155914, titulado “**Purificación y antigenicidad de una proteína recombinante de *Trypanosoma cruzi* obtenida mediante sustracción con *Trypanosoma rangeli*”**, para optar al título de Licenciado (a) en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los 21 días del mes de junio del año 2017, dejando constar que la Profa. Roxana Gajardo actuó como coordinadora del jurado examinador.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Guillermina Alonso

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Vincenza Cervino

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Teresa Abate  
(Tutor 1)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Roxana Gajardo  
(Tutora 2: Coordinadora)

<b>1.INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>8</b>
1.1. Tripanosomiasis americana. ....	8
1.2. Patología de la enfermedad de Chagas.....	9
1.3. Trypanosoma rangeli.....	10
1.4 Ciclo de vida. ....	10
1.6. Diagnóstico de la infección por <i>T. cruzi</i> y <i>T. rangeli</i> . ....	19
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>22</b>
<b>3.OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
4.1. Cepas.....	27
4.3. Transformación de células competentes.....	28
4.4. Aislamiento y purificación del ADN plasmídico.....	30
4.5. Electroforesis en geles de agarosa.....	31
4.6. Identificación molecular .....	32
4.7. Inducción de la expresión y purificación de la proteína. ....	32
4.8. Cuantificación por el método de Bradford. ....	34
4.9. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS .....	34
4.10 Dot-Blot.....	35
4.11. Western blot. ....	36
<b>5.RESULTADOS. ....</b>	<b>37</b>
5.1 Purificación de la proteína .....	37
5.2 Determinación de la antigenicidad específica de la proteína .....	40
<b>6.DISCUSIÓN .....</b>	<b>42</b>
<b>6.CONCLUSIONES.....</b>	<b>51</b>
<b>7.REFERENCIAS.....</b>	<b>52</b>

## INDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	11
Figura 2 .Esquema del ciclo biológico de <i>T. rangeli</i> .....	13
Figura 3. Infecciones simples y mixtas de <i>Rhodnius pallescens</i> con <i>T. cruzi</i> y <i>T rangeli</i> en distintos hábitats. ...	14
Figura 4. Mecanismo de trans-splicing para el procesamiento de ARN monocistrónico en tripanosomátidos. 16	
Figura 5. Microarreglo de ARNm transcritos de genes de la transialidasa. ....	17
Figura 6. Expresión diferencial de proteínas entre la fase inicial de la metaciclogenesis de <i>T. cruzi</i> y los tripomastigotes metaciclicos .....	18
Figura 7. Historia evolutiva de la familia trypanosomatidae .....	19
Figura 8. Comparación de los títulos de anticuerpos obtenidos con suero de pacientes en ensayos de inmunofluorescencia indirecta .....	21
Figura 9. Plásmido pT7-MAT-Tag-1. ....	29
Figura 10. Diagrama de la purificación mediante columna de afinidad metálica de las proteínas marcadas con histidina. ....	33
Figura 11. Esquema del <i>dot blot</i> . ....	35
Figura 12. Esquema de configuración del equipo para western blot. ....	36
Figura 13. Análisis mediante PCR del ADN del inserto Cm81. ....	38
Figura 14. Análisis de las fracciones obtenidas de la purificación de proteínas de los cultivos post-induccion Cm81 y pT7. ....	39
Figura 15. Inmunodetección de la proteína Cm81 recombinante purificada, usando mezcla de sueros chagásicos y normales. ....	40
Figura 16. Inmunodetección de la proteína recombinante purificada Cm81., ....	41
Figura 17. Comparación de la cepa modificada LOBSTR con <i>E. coli B121</i> . ....	42
Figura 18. Inmunodetección mediante <i>dot-blot</i> de Cm81 .....	¡Error! Marcador no definido.

---

## **TABLAS**

<b>Tabla 1. Análisis serológico, parasitológico y molecular de 206 niños de entre 3-14 años de edad en el municipio la chorrera Panamá.....</b>	<b>11</b>
---	-----------

## INDICE DE ABREVIATURAS

TBS	Tris Buffered saline
SDS	Dodecyl sulfato de sodio
pH	Potencial de hidrogeno
nm	nanometro
ng	nanogramo
Mpb	Mega pares de bases
mm	milimetros
mM	milimolar.
mL	Mililitro
m	Metro
kDa	Kilo Dalton
IPTG	Isopropiltiogalatosido
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
g	Gramo
col	Colaboradores
BSA	Albumina de suero bovino
ARNm	Ácido ribonuclecomensajero
ARN	Ácido ribonucleico
ADN	Ácido deoxyribonucleico
μm	Micrometro
μL	Microlitro

*Trypanosoma cruzi* es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, una patología difundida desde México hasta el cono sur. Debido a los problemas de sensibilidad y sobretodo de especificidad en el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas, particularmente con relación a la infección con *Trypanosoma rangeli*, surge la necesidad de desarrollar herramientas que permitan la detección inequívoca del parásito especialmente en la fase crónica de la enfermedad, en la cual los parásitos son prácticamente indetectables de manera directa. Por ello, esta tesis estuvo orientada a la purificación de una proteína antigénica y específica de *T. cruzi* llamada Cm81. Esta proteína es codificada por un gen obtenido previamente mediante sustracción con *T. rangeli*, pertenece a la familia MASP y se expresa mayormente en la fase de tripomastigote. Para su purificación se procedió a la transformación de una cepa bacteriana con un vector de expresión con etiqueta de histidina ligado a un inserto obtenido por PCR con cebadores específicos de la familia MASP, se indujo su expresión con IPTG y se purificó la proteína recombinante por cromatografía de afinidad por metales. La electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS, reveló una proteína purificada de aproximadamente 28 kDa. El ensayo de *dot blot*, usando una mezcla de suero de pacientes chagásicos como anticuerpo primario, permitió detectar una interacción antígeno-anticuerpo, aunque con una débil señal. De esta manera se logró expresar una proteína MASP recombinante de *T. cruzi* y confirmar su antigenicidad con sueros de pacientes chagásicos. El hecho de que esta proteína no se expresa en *T. rangeli*, la convierte en un candidato ideal para el desarrollo de inmunoensayos específicos para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

Palabras clave: *T. cruzi*, MASP, inmunoensayo, expresión, purificación, proteína.

## 1. INTRODUCCIÓN

---

*Trypanosoma cruzi* es un parásito hemoflagelado causante de la enfermedad de Chagas, una de las enfermedades tropicales llamadas desatendidas. Dichas enfermedades han ganado la atención de los países potencias económicas en los últimos años. Son originadas por parásitos, bacterias o virus, considerados hasta hace poco como aquellas para las cuales el financiamiento a la investigación escasea en relación al impacto de las patologías producidas (World-Health-Organization, 2015). La tripanosomiasis humana, animal y la leishmaniasis, causadas por protozoarios parásitos de la familia *Trypanosomatidae*, son algunas de estas enfermedades tropicales desatendidas, todas con un impacto socioeconómico alto.

### 1.1. Tripanosomiasis americana.

La tripanosomiasis causada por el protozoario hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* infecta entre 6 y 7 millones de personas a nivel global (WHO, 2015). Presenta una distribución amplia, en el continente americano se extiende por 21 países, ubicados desde el norte de México hasta el sur de Argentina y Chile. No obstante, en las últimas décadas se ha observado con mayor frecuencia en los Estados Unidos de América, Canadá, muchos países europeos y algunos del Pacífico Occidental. Esto obedece sobre todo a la movilidad de la población entre América Latina y el resto del mundo (Pérez, 2009). En Venezuela, la tripanosomiasis está ampliamente distribuida en todo el territorio nacional exceptuando los lugares con altitudes mayores 2500m y las regiones selváticas húmedas; siendo los estados más afectados Anzoátegui, Barinas, Monagas y Portuguesa (Arrechedera y Marques, 2010).

## **1.2. Patología de la enfermedad de Chagas.**

El desarrollo y curso de la enfermedad depende de varios factores tales como: el inoculo inicial, posibles reinfecciones, las características de la cepa, la respuesta humoral y celular del hospedador (Coura, 2006)

Se pueden presentar dos fases:

La fase aguda se manifiesta poco después de ocurrir la infección. Los síntomas son diversos e incluyen trastornos cardiacos, fiebre, convulsiones, vómitos, diarreas, dolores musculares y somnolencia. En algunos casos (del 1 al 2%) se presenta inflamación de la piel (Chagoma) o de la mucosa ocular (Romaña) (Arrechedera y Marques, 2010).

La fase crónica está caracterizada por granulomas localizados en tejido muscular, principalmente el cardíaco, hiperplasia en ganglios linfáticos y fibrosis miocárdica. También es frecuente la hipertrofia de las fibras miocárdicas y dilatación de las cavidades cardiacas.

La forma digestiva de la enfermedad da lugar a la destrucción de las neuronas de los plexos mientéricos (principalmente esófago y colon) lo cual conlleva a una dilatación de dichos órganos, apareciendo síndromes como megacolon o megaesófago (Coura, 2006). Sin embargo de un 50 a un 70% de los individuos infectados crónicamente, no muestran ningún síntoma ni manifestación clínica en el transcurso de sus vidas, por lo que se dice que la enfermedad se encuentra en forma indeterminada. Estos individuos actúan como reservorios del parásito y contribuyen a mantener su ciclo de vida (Arrechedera y Marques, 2010).

### **1.3. *Trypanosoma rangeli***

Es la segunda especie de tripanosoma encontrada en humanos en el continente americano (Tejera, 1920, citado en Hoare, 1972). A pesar de que comparte con *T. cruzi* características biológicas y epidemiológicas, no han sido identificadas patologías asociadas a la infección natural del hospedero vertebrado (D' Alessandro-Bacigalupo y Saravia, 1992), aun cuando la parasitemia (cantidad de parásitos presentes en sangre) puede persistir por meses incluso años (Herbig-Sandreutter, 1957).

Desde su descubrimiento, el parásito *T. rangeli* ha sido estudiado bajo el contexto de la biología de *T. cruzi*. En la actualidad, representa un papel fundamental en la epidemiología de la enfermedad de Chagas, específicamente en las regiones donde coexisten ambas especies, en las cuales es frecuente la presencia de infecciones mixtas, tanto en el insecto vector como en el hospedador. Esto genera complicaciones durante el diagnóstico serológico, debido a que ambos parásitos comparten por lo menos un 60% de los determinantes antigénicos de superficie (Vásquez *et al.*, 1997).

### **1.4 Ciclo de vida.**

El ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* (Figura 1) es dígenético, es decir que comprende dos hospedadores, uno vertebrado y otro invertebrado, siendo los últimos, insectos hematófagos de la familia *Reduviidae*. El ciclo involucra la aparición de formas morfológicamente diferentes. La forma infectiva del parásito (tripomastigote) es móvil y posee flagelo. El parásito se encuentra en las heces de los triatominos y penetra al torrente sanguíneo del individuo hospedador a través de microabrasiones autoinflingidas en la piel al rascarse o a través de la conjuntiva. Una vez en el organismo, el parásito penetra en células

fagocíticas y no fagocíticas adquiriendo una forma redonda y sésil (amastigote) que se multiplica intracelularmente de manera asexual. Posteriormente, el amastigote se transforma en tripomastigote y se libera al medio extracelular previa lisis celular. Los tripomastigotes así liberados pueden a su vez infectar nuevas células y pueden ser adquiridos por triatominos que se alimentan de la sangre de los individuos infectados (Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 2015). En algunos animales silvestres como *Didelphis marsupialis* y otros mamíferos de hábitos peridomésticos no se evidencian signos clínicos de la enfermedad, por lo que pueden ser considerados como reservorios del parásito. El parásito también se puede adquirir oralmente a través de alimentos contaminados, transfusión de sangre, transmisión congénita y órganos donados, aunque estos modos de transmisión son menos frecuentes.

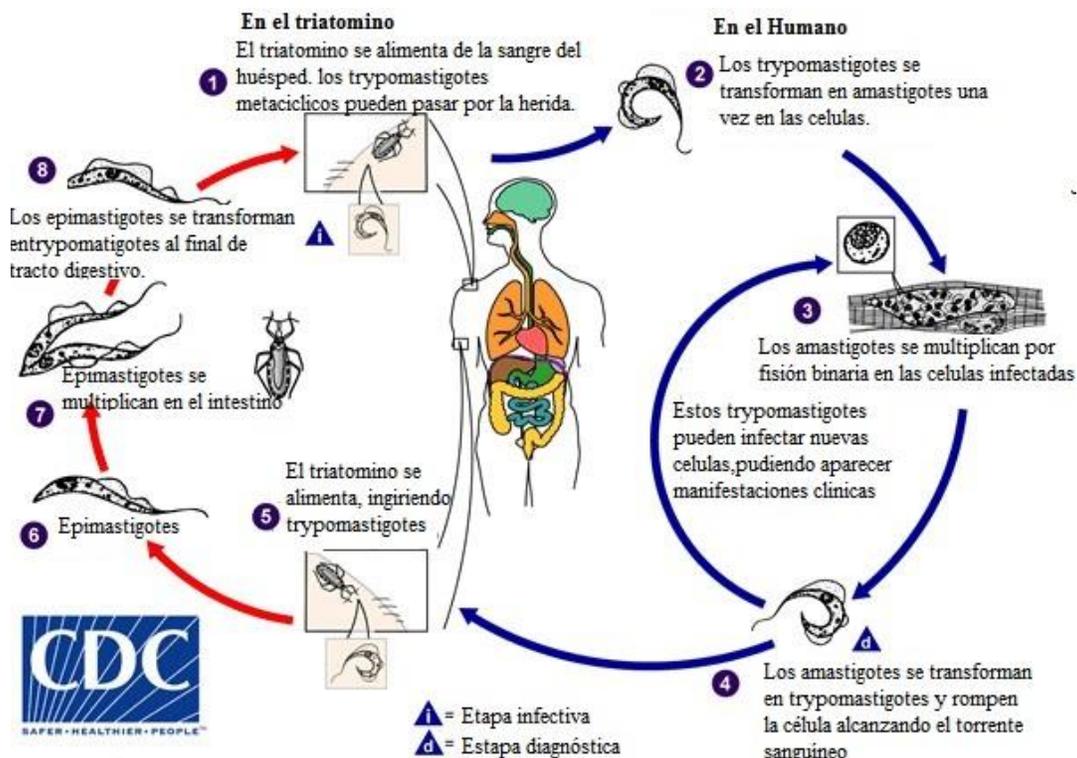


Figura 1. **Ciclo biológico de Trypanosoma cruzi** (Tomado con modificaciones del sitio <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html> de Centers Disease Control and Prevention, 2010).

*Trypanosoma rangeli* alterna entre dos tipos de hospedadores: vertebrados, fase que es poco conocida e invertebrados, la cual ha sido estudiada con más detalle. A diferencia de *T. cruzi*, no es patógeno para el humano. En cambio, afecta a los triatomínicos vectores. *T. rangeli* es capaz de producir problemas en el vector invertebrado, tales como retardo en la ecdisis, interferencia en el proceso de muda, deformaciones y alteraciones en el proceso alimenticio (Vallejo *et al.*, 2015).

El triatomino se infecta al ingerir tripomastigotes sanguíneos de vertebrados infectados; al llegar a la parte media del tracto digestivo del insecto, los parásitos ingeridos comienzan a dividirse transformándose en epimastigotes que se multiplican por fisión binaria. Algunos flagelados alcanzan el recto y son excretados con las heces, sin embargo, no colonizan la pared rectal como lo hace *T. cruzi* (Sousa, 1972). La invasión de la hemolinfa ocurre cuando algunos epimastigotes en el intestino medio penetran el epitelio intestinal y llegan al hemocele recorriendo una ruta intracelular. Una parte de esta población invade hemocitos en los cuales se dividen, mientras otra parte se multiplica en la hemolinfa (Vallejo *et al.*, 2009). Los epimastigotes cortos, invaden las glándulas salivales y llegan a los conductos colectores, en donde se adhieren a una superficie glicosilada, por medio de interacciones específicas receptor-ligando, mediante el reconocimiento de carbohidratos con residuos de N-acetilglucosamina y fucosa (Basseri *et al.*, 2002). Es allí donde ocurre la transición a tripomastigotes metacíclicos, que es la forma infectiva del parásito, por lo que su transmisión al vertebrado es inoculativa durante la penetración de la probóscide del triatomino en la epidermis del vertebrado, en la búsqueda de un capilar sanguíneo a partir del cual alimentarse (D'Alessandro, 1976) (Figura 2)

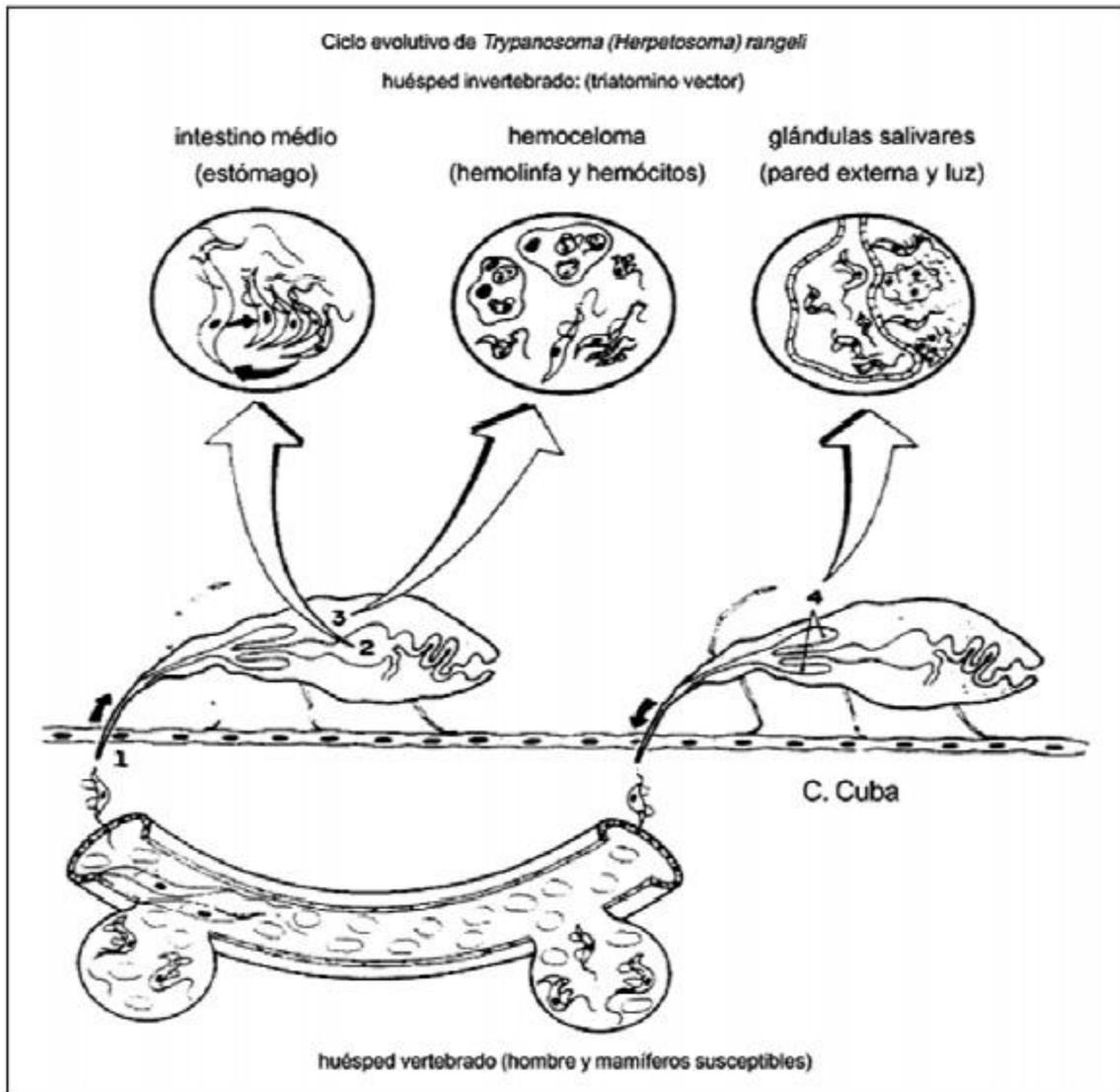


Figura 2. **Esquema del ciclo biológico de *T. rangeli***. 1- Ingesta de tripomastigotes al alimentarse de sangre de vertebrados infectados. 2-Las formas tripomastigotas pasan a epimastigotes y se multiplican por fisión binaria. 3-Algunos epimastigotes atraviesan el epitelio intestinal alcanzando el hemocele. 4-Epimastigotes cortos invaden las glándulas salivares, una vez alcanzan los conductos colectores ocurre la transición a tripomastigotes metacíclicos (Tomado de Cuba, 1998).

Los vectores en su mayoría se encuentran infectados como se puede apreciar en el trabajo de Gottdenker *et al.* (2016), en el cual estudiaron 643 triatominos en 45 sitios en Panamá clasificados en 5 niveles de intervención humana (Figura 3).

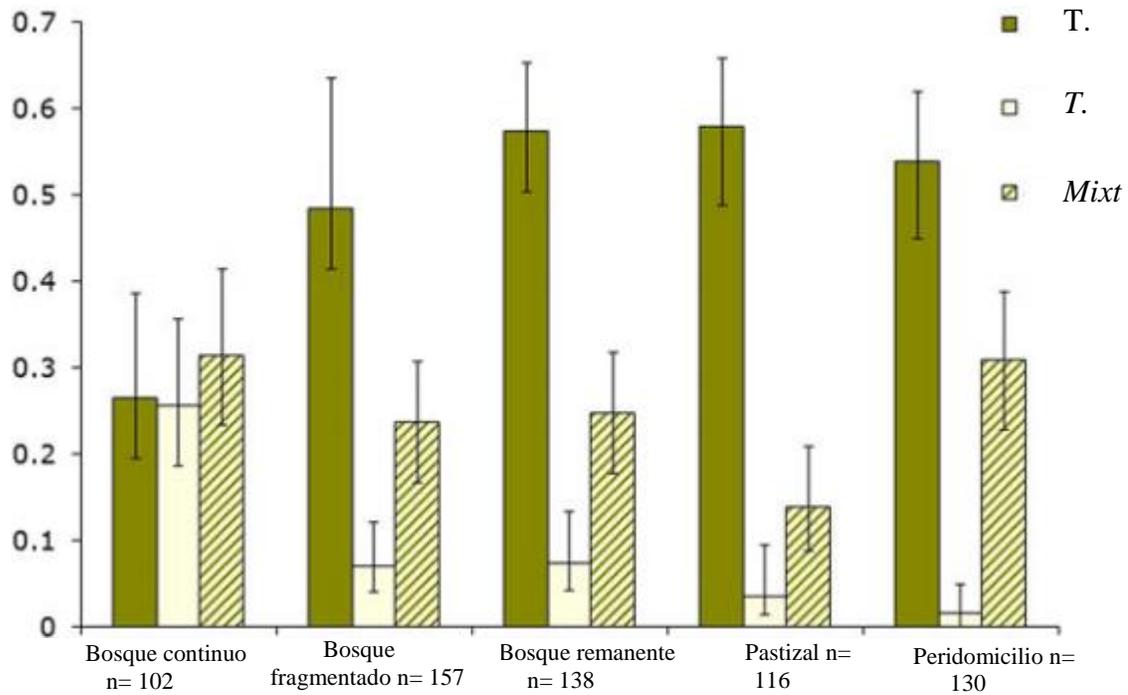


Figura 3. Infecciones simples y mixtas de *Rhodnius pallescens* con *T. cruzi* y *T. rangeli* en distintos hábitats. Tomado con modificaciones de Gottdenker *et al.*, 2016

Encontrándose los vectores coinfectados con ambos parásitos, se intuye que es posible el contagio del huésped vertebrado con *T. cruzi* y *T. rangeli*. Hay casos reportados de humanos contagiados con los dos tripanosomátidos (Chiurillo *et al.*, 2003). Sin embargo, este tipo de contagio parece ser inusual según los resultados del trabajo de Saldaña *et al.* (2005)(Tabla 1).

Tabla 1. Análisis serológico, parasitológico y molecular de 206 niños de entre 3-14 años de edad del distrito La Chorrera en Panamá. (Tomado de Saldaña *et al.*, 2005)

Muestras	Infectados	Mixta	<i>T. cruzi</i>	<i>T. rangeli</i>
206	20 (9,7%)	0	6 (2,9%)	14 (6,8%)

### **1.5 Genoma y expresión genética en tripanosomátidos, el caso de *T.cruzi*.**

El parásito *T. cruzi*, al igual que otros tripanosomátidos contiene información genética en el núcleo y también en una compleja red de moléculas circulares denominada kinetoplasto, albergada en el mitocondrion y contentiva de hasta un 30% de ADN total del parásito (Brenner *et al.*, 2000).

El genoma de *T.cruzi* tiene un tamaño de 60Mpb, del cual 58,9% es codificante, para un total de 22.570 genes que codifican para proteínas. El 50% del código está compuesto por secuencias repetitivas, las cuales consisten principalmente en grandes familias de genes de proteínas de superficie, retrotransposones y repetidos subteloméricos. El ADN satélite y los elementos transponibles (L1Tc) están representados para la cepa CL Brener, en un 5% y 3% respectivamente (El-Sayed *et al.*, 2005).

En cuanto a la expresión, en los tripanosomátidos el genoma, generalmente diploide, está organizado en agrupaciones de genes en tanda (policistrónicos), con decenas a cientos de secuencias libres de intrones codificadoras de proteínas, no relacionadas en función, organizadas secuencialmente en la misma hebra y mantenidas separadas entre sí por secuencias intergénicas cortas (El-Sayed *et al.*, 2005). Estos arreglos son transcritos por la ARN polimerasa a partir de un promotor único. Tomando en cuenta que estos organismos se multiplican rápidamente y que deben adaptarse a cambios en el ambiente, la organización policistrónica les permitiría evadir la reiniciación continua de la transcripción y responder rápido a sus necesidades. Además, pueden mostrar diferentes patrones de expresión a pesar de estar todos codificados en un mismo policistrón (Palenchar y Bellofatto, 2006).



Las secuencias intergénicas son la fuente de las regiones no transcritas o “untranslated regions” (UTR) las cuales determinan la estabilidad del ARNm, así como la eficiencia de traducción. La expresión de genes, ya sea en etapas específicas del desarrollo o de forma constitutiva, está en su mayoría definida por las secuencias intergénicas de manera post-transcripcional (Clayton, 2002). Sin embargo, también existe una regulación en la abundancia de ARNm (Figura 5) en una proporción significativa de los genes, observada mediante el empleo de micro arreglos de oligonucleótidos de *T. cruzi* (Minning *et al.*, 2009).

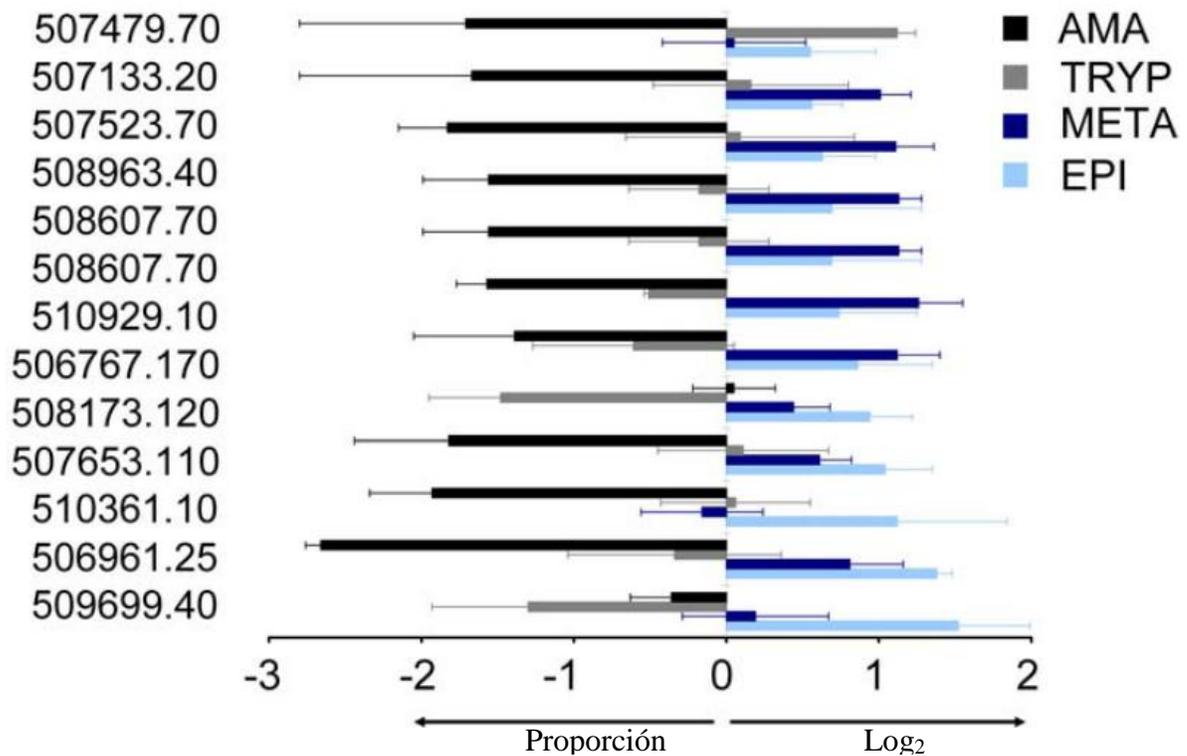


Figura 5. **Microarreglo de ARNm transcritos de genes de la transalidasa.** Se muestra un promedio de las proporciones  $\text{Log}_2$  (estado/referencia) entre los 4 morfotipos de *T. cruzi*. En el eje Y se identifican los genes según lo asignado en la referencia para el genoma de la cepa de *T. cruzi* CL Brener (el prefijo Tc00.1047053 esta truncado). (Tomado con modificaciones de Manning *et al.*, 2009)

Los mecanismos de regulación de la transcripción tienen como resultado una expresión diferencial de distintas proteínas en los 4 estadios del parásito, como se evidencia en el trabajo de Atwood *et al.* (2005) en el cual analizaron proteínas de los 4 morfotipos mediante cromatografía líquida (LC) multidimensional y espectrometría de masa (MS). De 2748 proteínas 838 fueron detectadas en los 4 estadios y 30 miembros de las mucinas y transialidasas, fueron expresadas exclusivamente en los tripomastigotes. Dichas familias génicas que responden por la patogenia de *T. cruzi* para el vertebrado, se expresan en poca cantidad o nula en los tripomastigotes de *T. rangeli*, de forma que, este parásito carece de las proteínas como las MASP y las transialidasas, necesarias para invadir las células del mamífero (Vallejo *et al.*, 2015). 1114 proteínas se expresan diferencialmente (Figura 6) entre la transición de metaciclologénesis a tripomastigotes metacíclicos (de Godoy *et al.*, 2012)

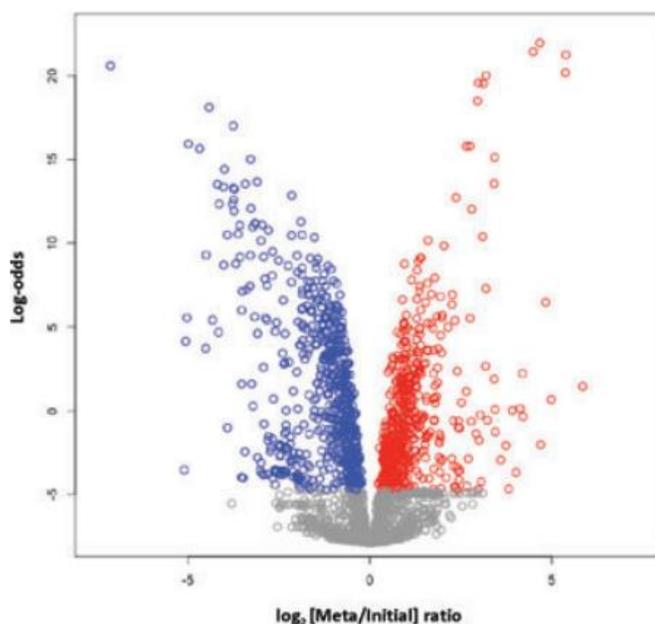


Figura 6. **Expresión diferencial de proteínas entre la fase inicial de la metaciclologénesis de *T. cruzi* y los tripomastigotes metacíclicos.** Representada mediante un diagrama volcán. Los puntos azules representan descenso, los rojos ascenso en la expresión proteica, los puntos grises son aquellos en los que no hubo un cambio estadísticamente significativo ( $p=0,05$ ) (Tomado con modificaciones de Godoy *et al.*, 2012).



(Castro *et al.*, 2006). Entonces es necesario desarrollar nuevas técnicas de mayor sensibilidad y especificidad para evitar el diagnóstico erróneo de la enfermedad de Chagas.

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas puede ser directo, detectando al parásito en el huésped o indirecto, estudiando la respuesta inmune del hospedador infectado (Brenner *et al.*, 2000).

Los métodos parasitológicos directos más importantes son: al fresco, micro-hematocrito, PCR y la técnica de concentración de Strout.

Entre los procesos indirectos se encuentran los inmunoensayos y el xenodiagnóstico. Este consiste en la alimentación de ninfas de triatomíneos no infectadas, con sangre del paciente. El parásito, si está presente, se multiplica en el tubo digestivo del triatómíneo, luego las heces de las ninfas son examinadas a los 30 y 60 días después de ser alimentadas (Brenner *et al.*, 2000). El hemocultivo es otro método indirecto en el que la sangre del paciente previamente tratada con anticoagulante y sin plasma, es incubada en un medio y a una temperatura que favorece la multiplicación de los parásitos.

En la fase crónica de la enfermedad, la parasitemia cae drásticamente y se requieren otros métodos de diagnóstico, como por ejemplo los ensayos inmunoenzimáticos. El problema recae en que estas pruebas necesitan continuar desarrollándose: con respecto a los inmunoensayos, se encuentra hasta un 60% de reactividad antigénica cruzada (Vásquez *et al.*, 1997). Como solución a este problema se han producido nuevos exámenes como el TESA (*trypomastigote extracted-secreted antigen*), también denominado TESA-blot. Esta prueba usa los antígenos de tripomastigotes. Posee una alta sensibilidad y especificidad sin reactividad en enfermos con leishmaniosis o infectados con *T. rangeli*. (Da Silveira *et al.*, 2001), Pero dichos antígenos no han sido incluidos en *kits* por razones técnicas. La

producción y purificación en masa de antígenos por métodos de bioquímica clásica es una tarea muy difícil y con un bajo rendimiento. Algunos de estos problemas han sido resueltos con el uso de tecnología de ADN recombinante, con la cual se han construido varios sistemas de expresión de genes que permiten una producción de antígenos mucho mayor, con alta pureza y estándares de calidad.

A pesar de que existen técnicas confiables de alta sensibilidad y especificidad, en Latinoamérica los ensayos de inmunofluorescencia (IFA) (Figura 8) siguen siendo los más empleados para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Dichos ensayos pueden alcanzar hasta un 80% de reactividad cruzada (RC) con infecciones de *T. rangeli*, entendiéndose por RC al reconocimiento de antígenos de distinto origen pero con alguna similaridad, por un mismo anticuerpo.

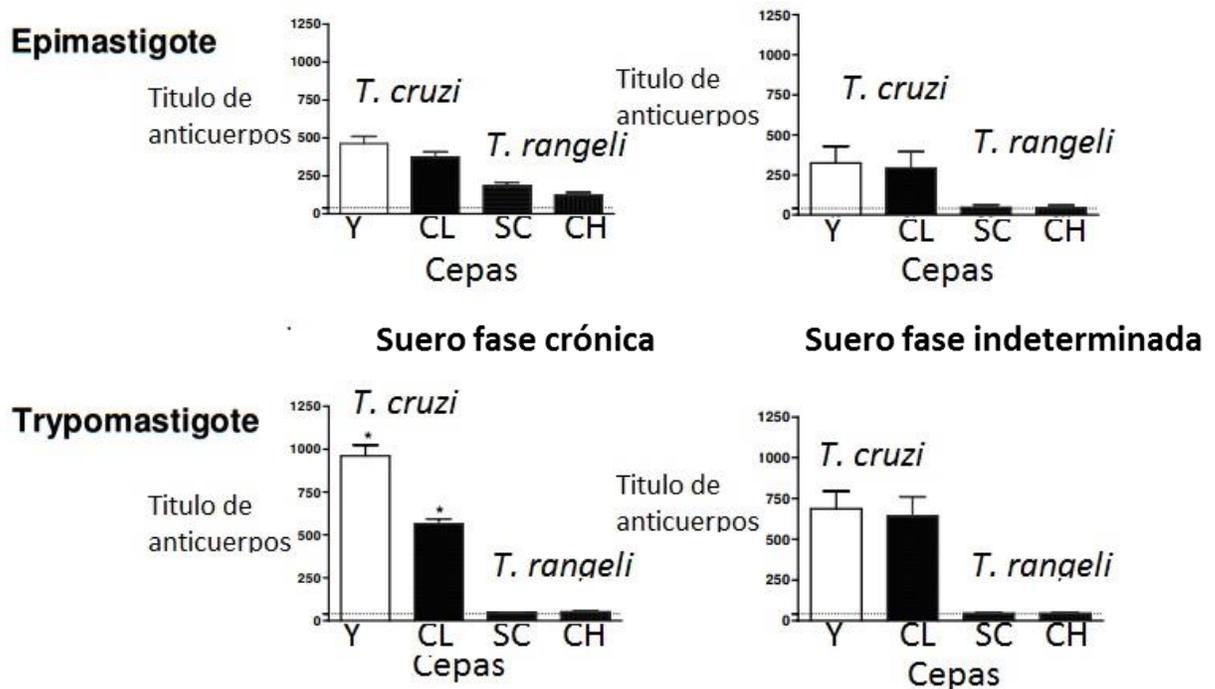


Figura 8. Comparación de los títulos de anticuerpos obtenidos con suero de pacientes en ensayos de inmunofluorescencia indirecta. Teniendo como punto de corte para la detección, un título de 1:40 y usando epimastigotes de *T. rangeli* para la producción de los antígenos. (Tomado con modificaciones de Moraes *et al.*, 2008)

## **2.ANTECEDENTES**

### **Las proteínas de superficie asociadas a mucinas (MASP por sus siglas en inglés).**

Esta gran familia de proteínas específicas de *T. cruzi* (de Pablos *et al.*, 2016) fueron descritas por primera vez a raíz de la secuenciación del genoma de *T. cruzi* en 2005, siendo por primera vez demostrada su transcripción en tripomastigotes por Abate *et al.* Ese mismo año. Dicha familia está caracterizada por unos dominios altamente conservados en los extremos N- y C- terminal, una región central variable y compone al menos el 6% del genoma diploide de *T. cruzi*. Debe su nombre al hecho de estar ubicada entre los genes que codifican para las transialidasas y mucinas. En concreto, aguas abajo de los miembros de TcMUC II con los cuales se asemejan en estructura no así en secuencia (El Sayed *et al.*, 2005).

El clon recombinante de ADNc específico de *T. cruzi* (C8) se obtuvo inicialmente en el laboratorio de la sección de biología molecular del Instituto de Medicina Tropical, mediante el método de sustracción de representación de la expresión diferencial (RDE) reportado por Krieger y *col.*, (1999), que consiste en una amplificación diferencial de fragmentos de ADNc específicos de tripanosomátidos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La hibridación sustractiva se logra efectuar mediante el siguiente proceso. Los fragmentos de ADN de *tester* (*T. cruzi* trypomastigotes.) que en presencia de un exceso de moléculas de ADN de *driver* (*T. rangeli* epimastigotes) que se logren acoplar a otra molécula de ADN de *tester* son los únicos en los que se podrá sintetizar el ADN complementario en los extremos 3' de ambas cadenas del dúplex mediante la PCR, ya que sólo estas moléculas podrán ser amplificadas exponencialmente al tener adaptadores para los iniciadores. Los

fragmentos de *driver* actúan como un inhibidor competitivo para la hibridación entre las cadenas del *tester* que sean comunes con ellas. Debido a esto los fragmentos con secuencias específicas del *tester* podrán acoplarse entre sí, y su población estará enriquecida luego de la amplificación (Krieger y *col.*, 1999).

Las proteínas MASP se encuentran tanto en tripomastigotes como en amastigotes y epimastigotes. Poseen lugares para la N- y O- glicosilación, sufriendo extensas modificaciones postraduccionales (Atwood *et al.*, 2005).

Aunque no se conoce el papel exacto de esta familia en la biología de *T. cruzi*, la hipervariabilidad en sus secuencias puede ser importante para proporcionar versatilidad antigénica al estar situadas en la membrana del parásito. No obstante se han hecho avances en la investigación relacionada con las MASPs. Por ejemplo, en 2009 se hizo un análisis de la organización genética y los perfiles de expresión de los genes MASPs, encontrando que no están distribuidos aleatoriamente en el genoma sino, en cambio agrupados con genes que codifican mucina y otras proteínas de superficie. También lograron mediante el empleo de inmunofluorescencia determinar que la expresión de una determinada MASP está limitada a un grupo de la población total de parásitos (Bartholomeu *et al.*, 2009).

Las funciones de estas proteínas se han asociado a la virulencia del parásito, participando en procesos de evasión del sistema inmune e invasión celular (de Pablos *et al.*, 2016). También, se ha desarrollado un marcador inmunológico que permite discriminar entre linajes (Di Noia *et al.*, 2002). Este marcador es una proteína perteneciente al grupo de las mucinas (TcMUCIII), llamada TSSA (*Trypomastigote small surface antigen*). Esta correlaciona la enfermedad con el linaje II.

En un trabajo de De Pablos *et al.* (2011) lograron determinar que la MASP52 es capaz de inducir endocitosis en las células vero, lo cual sugiere que esta proteína juega un rol en el proceso de invasión celular. Para alcanzar eso, tuvieron que expresar, purificar y caracterizar la proteína MASP52 de 52 kDa; la cual es secretada durante la interacción entre la forma metacíclica de *T. cruzi* y su célula huésped blanco. Algunas proteínas MASPs se secretan, ya sea individualmente o mediante exovesículas, en cambio, otras permanecen unidas a la membrana del parásito (Díaz *et al.*, 2017)

Luego del análisis de las regiones conservadas de la familia de proteínas MASP en otros tripanosomátidos como *Trypanosoma rangeli*, *Leishmania major* y *Blastocrithidia sp.* De Pablos *et al.* (2010) Determinaron que las proteínas MASPs son específicas de *T. cruzi*, ya que no se encontraron genes ortólogos a los de otros kinetoplastidos relacionados filogenéticamente. No menos importante es que estos autores confirmaron la existencia de una respuesta inmune humoral en el suero de pacientes chagásicos hacia el segmento conservado C-terminal de los miembros de la familia MASP. Luego de un mapeo de epítopes, se concluyó que la secuencia DGSTAV es el epítipo más inmunogénico de la región C-terminal. Dicho péptido constituye un posible marcador de la enfermedad (De Pablos, 2010).

La similitud antigénica y morfológica entre los parásitos hemoflagelados *T. cruzi* y *T. rangeli*, dificulta el diagnóstico específico ya sea por métodos directos o indirectos. Este hecho ha conducido a la búsqueda de métodos diagnósticos de implementación simple pero de alta sensibilidad y especificidad. Es por ello que este trabajo se propuso el estudio de la antigenicidad de la proteína específica de *T. cruzi* llamada Cm81, como un aporte que podría permitir la identificación inequívoca del parásito tanto en la fase aguda como en la crónica.

En la sección de Biología Molecular se han obtenido genes de expresión específica de *T. cruzi* mediante hibridación sustractiva con *T. rangeli* (Abate *et al.* 2005, Krieger y Goldenberg, 1998). El propósito del mencionado trabajo a largo plazo, es lograr la caracterización de dichos insertos y los polipéptidos que se sintetizan a partir de esas secuencias. En este trabajo se empleó el clonCm81, cuya secuencia corresponde a un gen MASP, para expresar una proteína recombinante que pudiera usarse como herramienta potencial en la epidemiología y el desarrollo de un posible método de diagnóstico conveniente y específico para la fase crónica de la enfermedad de Chagas.

### **3.OBJETIVOS**

---

#### **Objetivo general:**

- Caracterizar inmunológicamente una proteína recombinante específica de *T. cruzi* obtenida mediante hibridación sustractiva con *T. rangeli*.

#### **Objetivos específicos:**

- Purificar la proteína mediante el uso de columna de afinidad usando etiqueta de histidina.
- Determinar la posible antigenicidad específica de la proteína usando sueros de pacientes chagásicos y controles con suero de personas no infectadas.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

---

### **4.1. Cepas**

La cepa de *E. coli* empleada para el clonamiento y la expresión fue BL21 (DE3), cuyo genotipo es [ *F<sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS<sub>b</sub>(r<sub>b</sub><sup>-</sup>m<sub>b</sub><sup>-</sup>) λ(DE3)*] (Studier y Moffat, 1986)

- *F<sup>-</sup>* = Ausencia del plásmido F.
- *ompT* = mutación en la proteasa de membrana VII
- *lon* = mutación en la proteasa lon
- *gal* = sin la capacidad demetabolizar la galactosa
- *dcm* = metilación de la segunda citosina en los sitios ccwgg.
- *hsdS<sub>b</sub>(r<sub>b</sub><sup>-</sup>m<sub>b</sub><sup>-</sup>)* = sin las enzimas requeridas para la metilación y restricción
- *λ(DE3)* = es un profago lambda que tiene el gen de la T7 ARN polimerasa y *lacI<sup>q</sup>*, gen que promueve la sobreproducción de una proteína represora del operon lactosa

Los sueros utilizados fueron otorgados por la Sección de Inmunología del Instituto de Medicina Tropical. Constaron de una mezcla de 16 sueros de pacientes chagásicos crónicos y una mezcla de 20 sueros controles. Ambas con una dilución final de 1:250

### **4.2 Preparación de células competentes por CaCl<sub>2</sub>**

El protocolo seguido en la preparación de células competentes por CaCl<sub>2</sub> fue tomado de Sambrook *et al.* (1989), con algunas modificaciones. Fueron utilizadas células de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3). Partiendo de una colonia aislada, se inocularon 2 mL de caldo LB (10g bacto-triptona, 10g NaCl, 5g de extracto de levadura para un litro de solución ajustada a pH 7,5), el cultivo se dejó crecer con agitación durante toda la noche a una temperatura de 37

°C, pasado el tiempo de incubación, se agregaron 8 mL de caldo LB fresco al pre-cultivo y se sometió a incubación por una hora adicional (a 37 °C con agitación); seguidamente, las células fueron recuperadas por centrifugación a 4000g, a 4 °C por 10 minutos. El sedimento celular fue lavado con solución salina (NaCl 0,85%) estéril, y luego recuperado nuevamente por centrifugación, manteniendo las mismas condiciones del paso anterior. Este sedimento se resuspendió en una solución de CaCl<sub>2</sub> 50mM estéril a 4 °C, e incubado en hielo durante 1 hora. Posteriormente, las células fueron recuperadas por centrifugación a 4000g por 10 minutos, y se resuspendieron en 500µL de CaCl<sub>2</sub> 50mM estéril a una temperatura de 4 °C. Esta suspensión celular se usó inmediatamente para llevar a cabo la transformación.

#### **4.3. Transformación de células competentes.**

El protocolo de transformación bacteriana fue tomado de Sambrook *et al.*, (1989) con ciertas modificaciones. Se mezclaron 100µL de la suspensión de células competentes con aproximadamente 10ng de ADN del plásmido (pT7-MAT-Tag-1) (Figura 9) ligado con el inserto Cm81, en un volumen final de 10µL. Esta mezcla se incubó en hielo por 1 hora. Transcurrido este tiempo se aplicó un choque térmico a 45°C por 90 segundos. Inmediatamente las células fueron resuspendidas en 1mL de LB e incubadas por 1 hora a 37 °C con agitación. El cultivo se centrifugó por 2 minutos a 3000 x g y el sedimento celular fue resuspendido en 200 µL de LB para luego haber sido sembrados en dos placas de Agar LB, 100µL de cultivo en cada placa, suplementadas con ampicilina (100µg/mL). Las placas se incubaron durante toda la noche a una temperatura de 37 °C.

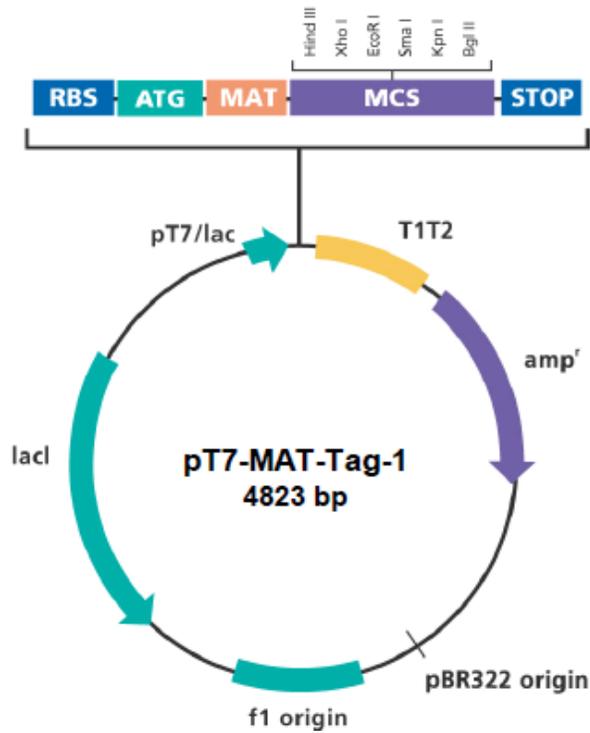


Figura 9. Plásmido pT7-MAT-Tag-1. Tomado con modificaciones del sitio <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/e5780?lang=en&region=VE>.

El plásmido pT7 es un vector de expresión para procariontes. Como tal, posee el sitio de unión ribosomal RBS (Shine-Dalgarno), seguido del codón de inicio de la transcripción ATG, luego, el marcador de afinidad metálica (MAT) cuyos codones codificantes para histidinas colaboran en la purificación de la proteína expresada. Contiguamente se ubica el sitio de clonamiento múltiple (MCS), el cual contiene secuencias blanco de varias enzimas de restricción lo que permite insertar el fragmento de ADN de interés. Finalmente está el codón de terminación. Además, están las secuencias inhibidoras T1T2, el gen *amp<sup>r</sup>* el cual codifica para una beta-lactamasa, enzima que confiere resistencia a la ampicilina. También, el gen represor del operon lac (*lacI*) posee dos orígenes de replicación: F1 y pBR322 y adicionalmente el promotor híbrido pT7/lac.

Los clones recombinantes provenientes de la transformación de la cepa de *E.coli*BL21 [ $\lambda$ (DE3)] conCm81, se almacenaron en alícuotas de glicerol al 15% a -70 °C.

En condiciones de esterilidad, se inocularon tubos con 5 mL de medio LB suplementado con el antibiótico ampicilina (100ug/mL) y se incubaron con agitación a 37 °C durante toda la noche (O.N). Posteriormente, fueron sembrados en placas de agar LB por agotamiento y así obtener colonias aisladas.

#### **4.4. Aislamiento y purificación del DNAplasmídico.**

El aislamiento del ADN plasmídico se realizó empleando el estuche *The CONCERT Rapid plasmid purification systems (GIBCO-BRL)*, el cual es una modificación del procedimiento con sales y SDS que es usado para crear un lisado y que finalmente permite obtener el ADN plasmídico con mínimas cantidades de ADN genómico.

Procedimiento (Invitrogen, 2011):

1. Se centrifugaron los 5mL del cultivo bacteriano ( $>1 \times 10^8$  cel/mL) y se lavaron con solución salina 0,85% para remover el medio de cultivo.
2. Se resuspendieron hasta homogeneizar las bacterias en buffer (R3) con RNasa.
3. Se añadió buffer de lisis, se mezcló por inversión cuidadosamente y luego se dejó incubando por 5 minutos.
4. Se añadió buffer de precipitación luego se mezcló por inversión y posteriormente se centrifugó  $g > 12000$  por 10 minutos.
5. Se cargó el sobrenadante a la columna de purificación y se centrifugó por 1 minuto a  $g > 12000$ .

6. Se agregó buffer de lavado con etanol y se centrifugó a  $g > 12000$  por 1 min
7. Se eluyó aplicando buffer TE a la columna y centrifugando.

La cuantificación del ADN obtenido se realizó utilizando un espectrofotómetro modelo *SmartSpect 3000* de BIORAD. Se midió la absorbancia a 260 y se estimó la concentración con la relación 50 ug/mL por unidad de densidad óptica (Husset *al.*, 1983).

#### **4.5. Electroforesis en geles de agarosa.**

Los fragmentos de ADN digeridos se visualizaron y analizaron mediante una corrida electroforética en un gel de agarosa al 1.5% (Sambrook *et al.*, 1989). A las muestras se les agregó una solución de carga (azul de bromofenol 0.5%, cianol xileno 0.5% y glicerol 30%), utilizando 1/10 del volumen total de la muestra.

La solución tampón de corrida fue TAE 1X (Tris-HCl 40mM pH 7.6, ácido acético 20mM, y EDTA 1mM). Para las corridas electroforéticas se aplicó un voltaje de 60V (~4V/cm). Posteriormente el gel se tiñó en una solución de bromuro de etidio (0.5ug/mL) durante 5 minutos, y luego desteñidos en suficiente agua destilada durante 15 minutos. Finalmente, el ADN separado en el gel se vio en un minitrans-iluminador U.V. (BIO-RAD).

#### **4.6. Identificación molecular**

Las reacciones de PCR para amplificar el inserto (Cm81) fueron ejecutadas en un termociclador (MJ *Research*, modelo PTC-200) con un volumen final de 50µL por cada 40ng de ADN genómico. Como control se usó PT7 sin inserto. El cebador usado fue el FXhoI 5'-CGCGGCCTCGAGATGGCGATGATGATGACTG-3' y RBgIII como antisentido 5'-GATCTAGAAGATCTTTCGCGGCCACCACCGC-3'. Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTP's 200 µM, *Taq* Polimerasa (hotstart) 0,5U/ensayo, oligo XhoI 0,2 µM, oligo BgIII 0,2 µM, tampón taq 10% V/V. El programa a usar para ejecutar las reacciones fue un primer ciclo de desnaturalización a 95 °C durante 1 minuto, luego 30 ciclos que comprenden: 95°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, con una extensión final a 72°C por 5 minutos.

#### **4.7. Inducción de la expresión y purificación de la proteína.**

Se incubaron cultivos de *E. coli* BL21 con el inserto Cm81 y un control solo con el plásmido, durante la noche en 10mL de medio LB suplementado con ampicilina 100ug/mL. Al día siguiente se aumentó el volumen a 250 mL y se incubó con agitación y a 37 °C hasta que alcanzó una densidad óptica de 0.6 (aproximadamente 90min). Alcanzado dicho punto se procedió a inducir la producción del péptido agregando IPTG para alcanzar una concentración final de 1mM (aproximadamente 4 horas, tiempo determinado experimentalmente en un trabajo previo). Finalmente se centrifugó el cultivo a 3000 x g y 4 °C por 20 min posteriormente se descartó el sobrenadante y se almacenó a -20°C.

Este sedimento fue resuspendido en solución tampón de lisis desnaturalizante (Urea 8M, tris 10mM y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>100mM pH 8.0) (kit Quiagen express Ni-NTA) (ver Figura 10) e incubado por 1 hora a temperatura ambiente, luego centrifugado a 12000 x g por 35 minutos.

La resina (agarosa-Níquel-Ácidonitriloacético) de la columna *Fast Start* fue resuspendida por inversión y se le aplicó el sobrenadante, se recogió esta fracción y luego se agregaron dos alícuotas sucesivas con 4 mL de solución tampón de lavado (misma solución de lisis con pH de 6.3), las cuales se almacenaron por separado. Después, se obtuvo la proteína etiquetada con histidina usando la solución tampón de elución (misma solución de lisis pH 4.5) en dos alícuotas de 1mL cada una almacenada por separado.

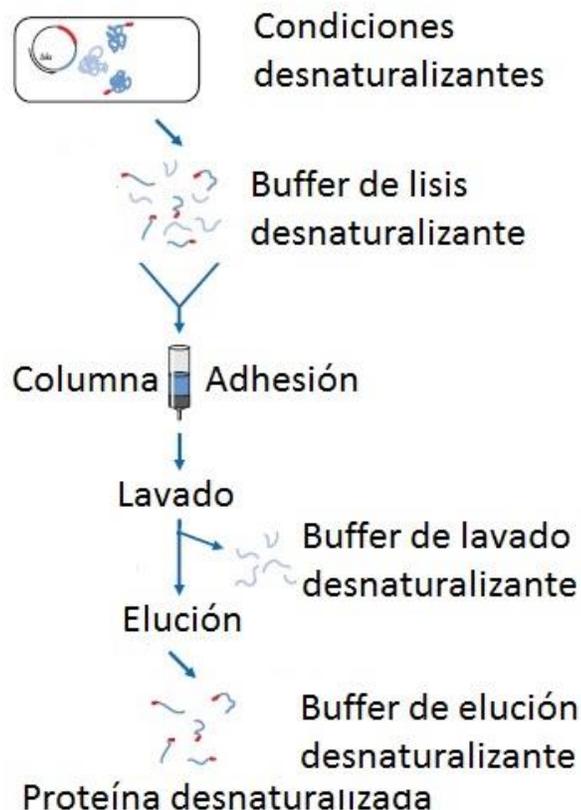


Figura 10. **Diagrama de la purificación mediante columna de afinidad metálica de las proteínas marcadas con histidina.** Tomado con modificaciones de <https://www.qiagen.com/us/shop/sample-technologies/protein/protein-preparation/ni-nta-fast-start-kit/#productdetails>

#### **4.8. Cuantificación por el método de Bradford.**

Se realizó una curva de calibración con varias concentraciones de albúmina sérica bovina, a saber: 125ug/mL, 250ug/mL, 500ug/mL, 750ug/mL, 1000ug/mL, 1500ug/mL, 2000ug/mL. Posteriormente 20uL de las muestras se mezclaron con 1mL de reactivo de Bradford, se incubaron 10 min y se midió la absorbancia a 595nm (Bradford, 1976).

#### **4.9. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS**

Se utilizó el módulo de electroforesis *Mini Protean* de BIO-RAD con capacidad para geles de 0,75mm de grosor. Para el gel de resolución al 15% se mezclaron en un *beaker* 2,5mL de solución 30% acrilamida 0,8% bis-acrilamida con 1,25mL de la solución amortiguadora de Tris-HCl a pH 8,8, 1.2mL de agua destilada, 50uL de SDS al 10% y de último 25uL de persulfato de amonio (APS) al 10% y 2,5uL de TEMED. El gel de apilamiento se hizo al 5%, para lo cual se mezclará en un beaker 0,86mL de la solución de 30% acrilamida 0,8% bis-acrilamida, 1,25mL de la solución amortiguadora de Tris-HCl a pH 6,8, 2,85mL de agua destilada, 50uL de SDS al 10% y de último 25uL de persulfato de amonio (APS) al 10% y 5uL de TEMED. Previamente a colocar las muestras, estas se calentaron a 95°C por un minuto, luego se corrieron a 200V en el gel, el cual posteriormente fue teñido con una solución colorante (0,25g azul de comassie, 45mL de metanol, 10mL de ácido acético glacial y 45mL de agua destilada) por un período de 15 minutos y luego sumergido en una solución decolorante (20mL metanol, 15mL ácido acético y 65mL de agua destilada) hasta lograr distinguir las bandas. El marcador de peso molecular de proteína usado fue *Pierce Blue Prestained Protein de Thermo Scientific* y el tamaño esperado para la proteína es de alrededor de 12 kDa (Shapiro *et al.*, 1967).

#### 4.10 Dot-Blot

Con una micropipeta se colocaron 1,5 y 10uL de la proteína purificada en una membrana de nitrocelulosa, la cual fue bloqueada con leche descremada al 5% en TBST (0,5% *tween*) durante 1 hora. Luego, se sumergió la membrana en una dilución 1:250 de una mezcla de 16 sueros de pacientes chagásicos con 100 uL de lisado de *E. coli* B121 durante 1 hora, como control se usó una mezcla de 20 sueros de humano no chagásico. Posteriormente, se realizaron 4 lavados de 15 minutos cada uno, con una solución de TBST (0,05% *tween*). Después, la membrana se transfirió a una dilución en TBST 1:20000 anti-IgG humano conjugado a peroxidasa, se incubó media hora y luego se lavó con 3 rondas de 15 minutos con TBST y la última con TBS por 5 minutos. Finalmente, se incubó la membrana por 5 minutos con 5 mL de la solución sustrato peróxido-luminol 1:1 (Promega, 1996). (Figura 11)

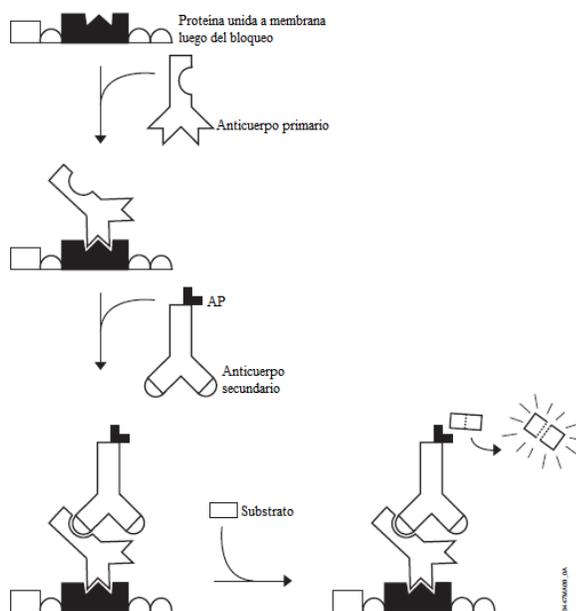


Figura 11. **Esquema del dot blot.** Tomado de <https://worldwide.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20manuals/0/protoblot%20ii%20ap%20systems%20with%20stabilized%20substrate.pdf>

#### 4.11. Western blot.

Se usó el equipo mini *trans-blot* (*bio-rad*). Se preparó una solución tampón de transferencia compuesta por: 25mM tris pH 8.3, 192mM glicina y 0.1% SDS.

Se equilibró el gel de acrilamida y se remojaron las almohadillas, el papel de filtro y la membrana de nitrocelulosa en solución amortiguadora de transferencia durante 15 minutos. Luego se preparó el casete y se corrió a 100V por 1 hora. (Towbin *et al.*, 1979). Finalmente se realizó la detección con el mismo procedimiento que para el dot blot explicado anteriormente. Usando de igual manera suero humano normal como control (ver Figura 12).

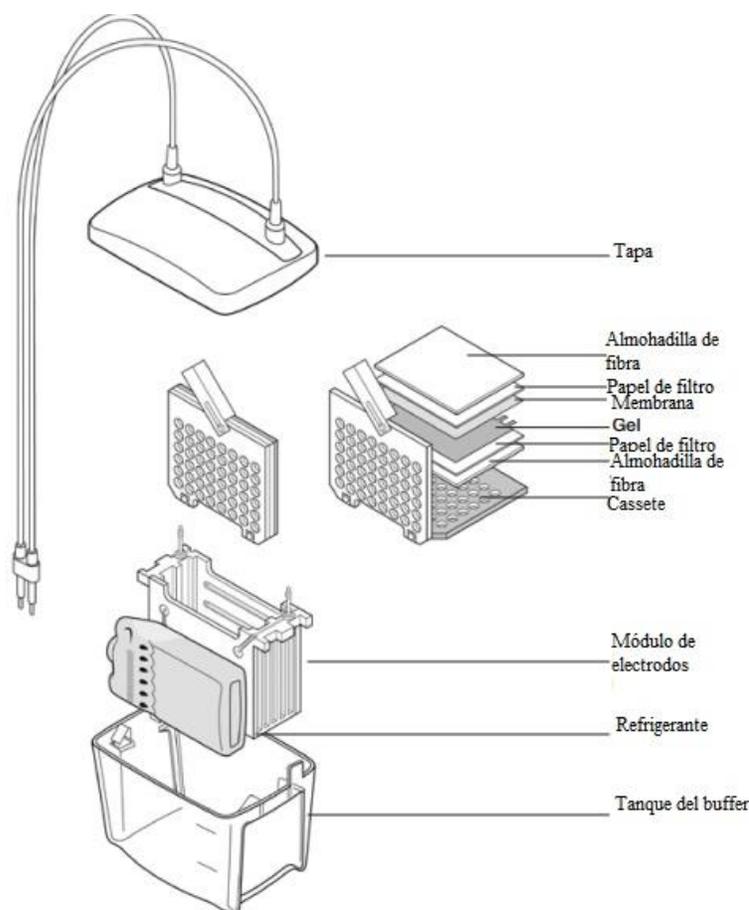


Figura 12. Esquema de configuración del equipo para western blot. Tomado de [http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin\\_5535.pdf](http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5535.pdf)

## **5.RESULTADOS.**

### **5.1 Purificación de la proteína sintetizada a partir del clon Cm81 mediante el uso de columnas de afinidad usando etiquetas de histidina.**

Como se comentó en los antecedentes, las proteínas pertenecientes a la familia de las MASPs son específicas de *T. cruzi*, lo que les aporta un interés desde el punto de vista diagnóstico.

Con el objetivo de confirmar la antigenicidad del clon recombinante Cm81 con relación a sueros de humanos, y de obtener la proteína recombinante para posteriores ensayos de caracterización inmunológica, se procedió a obtener la proteína. Esto contempla la transformación bacteriana con el ADN del vector de expresión con el inserto CM81, inducción de la expresión de la proteína y la purificación de la misma, previo a realizar los ensayos inmunológicos. El clon Cm81 se obtuvo en un trabajo previo, al realizarse un despistaje inmunológico con sueros de pacientes chagásicos de una genoteca de genes MASP en el vector pT7-MAT. Las bacterias CM81 originales fueron almacenadas en glicerol 50% a -80°C, pero no pudieron recuperarse por cultivo, lo que hizo necesario realizar una transformación bacteriana con el ADN que se tenía conservado a -20°C.

Una vez obtenidas las células transformantes y como paso previo a la inducción, se verificó la presencia del inserto Cm81 en el ADN plasmídico, aislado de las bacterias transformadas. Estose realizó mediante PCR, usando como oligos: FXhoI y RBglII, descritos en la metodología, los cuales hibridan con la región altamente conservada 5' y 3' de las secuencias MASPs.

Como se observa en la Figura 13, tras la separación electroforética del ADN se obtuvo una banda de aproximadamente 400pb que corresponde con el tamaño esperado para un segmento de vector más inserto.

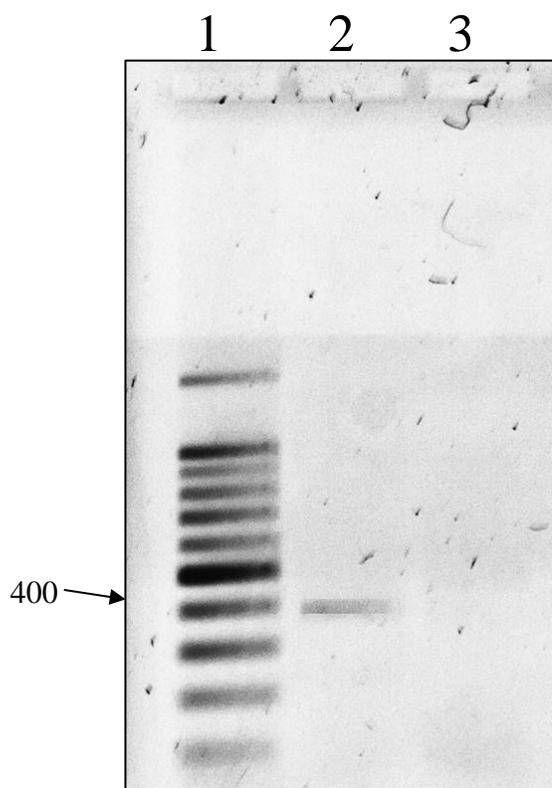


Figura 13. Registro fotográfico de la electroforesis en gel de agarosa del vector recombinante T7-MAT con el inserto Cm81. Carril 1. Marcador de peso molecular, 100pb ladder. Carril 2. Vector recombinante con inserto Cm81. Carril 3. H<sub>2</sub>O. Esta corrida electroforética se realizó en un gel de agarosa al 2% con tampón TAE 1X. El gel fue teñido en una solución de bromuro de etidio a una concentración de 0,5 ug/mL.

Una vez realizada la inducción y purificación de la proteína recombinante CM81 se procedió a realizar una electroforesis en gel de acrilamida-SDS, con la finalidad de verificar la efectividad de dicho procedimiento. En los geles se sembraron las distintas fracciones de la purificación tanto para los cultivos transformados con Cm81, como para aquellos con el vector solamente, como control negativo. En la figura 14 se observa una banda de

aproximadamente 28 kDa en la primera elución de CM81 (carril 7 del gel B), la cual demuestra que se logró aislar proteína con la metodología aplicada. También, se logra ver dicha banda en el sobrenadante de CM81 (carril 5 del gel A) y con menor intensidad en el eluato de CM81 (carril 7 del mismo gel), indicando así su adherencia a la columna, aunque al parecer, de manera incompleta.

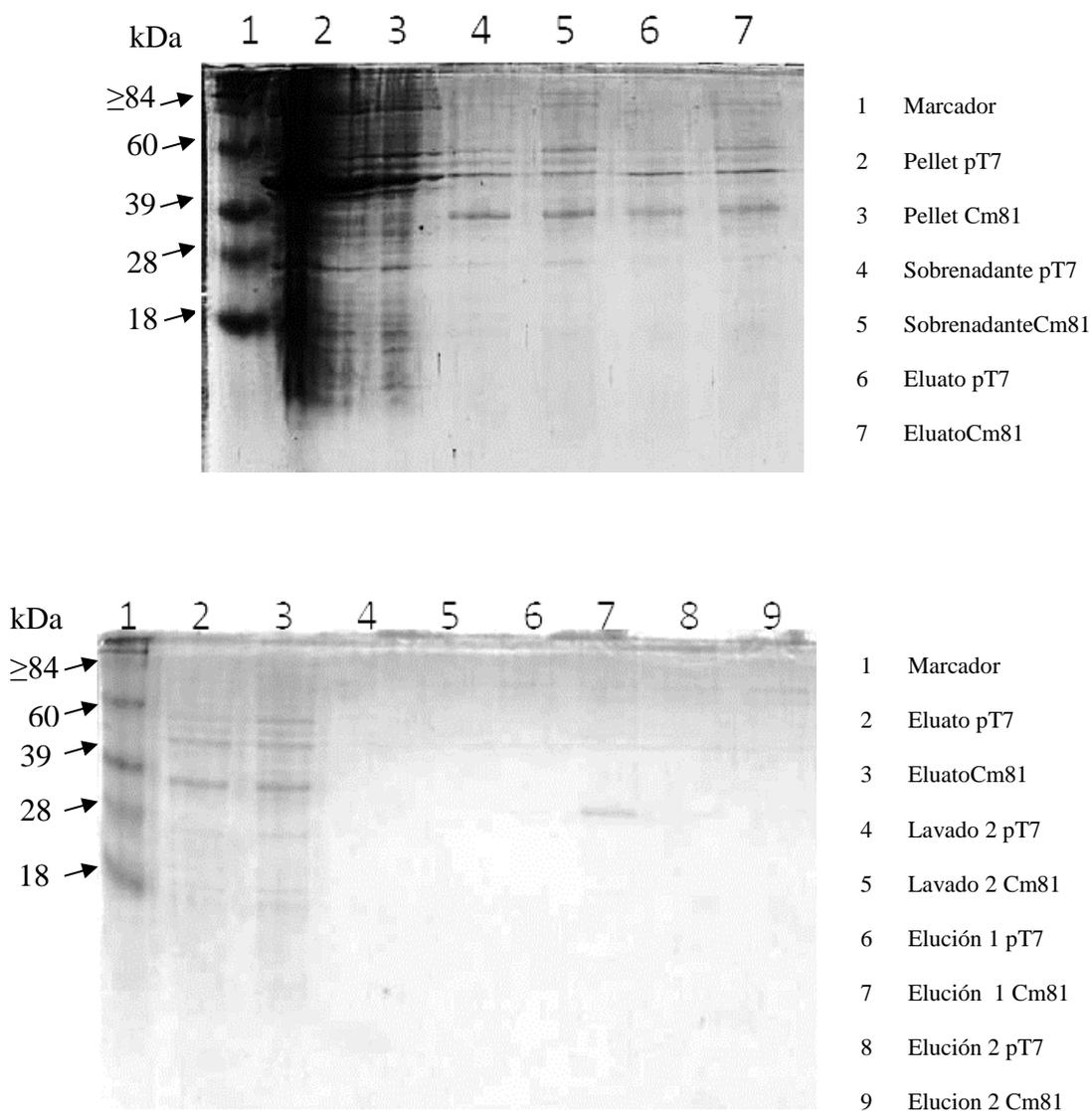


Figura 14. Registro fotográfico de unas corridas electroforéticas en gels de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturalizantes de las fracciones obtenidas de la purificación de proteínas de los cultivos post-inducción Cm81 y pT7.

## 5.2 Determinación de la antigenicidad específica de la proteína usando sueros de pacientes chagásicos y controles con suero de personas no infectadas con *T. cruzi*.

Posterior a la purificación se procedió a analizar inmunológicamente la proteína. Para ello, se utilizó el método dot-blot con la finalidad de constatar que hubiese reactividad de la proteína con el suero proveniente de pacientes chagásicos. En la figura 15 se observa el reconocimiento antígeno-anticuerpo en el punto de 10uL para Cm81, notable sobre todo al compararlo con el control de suero normal para el mismo volumen.

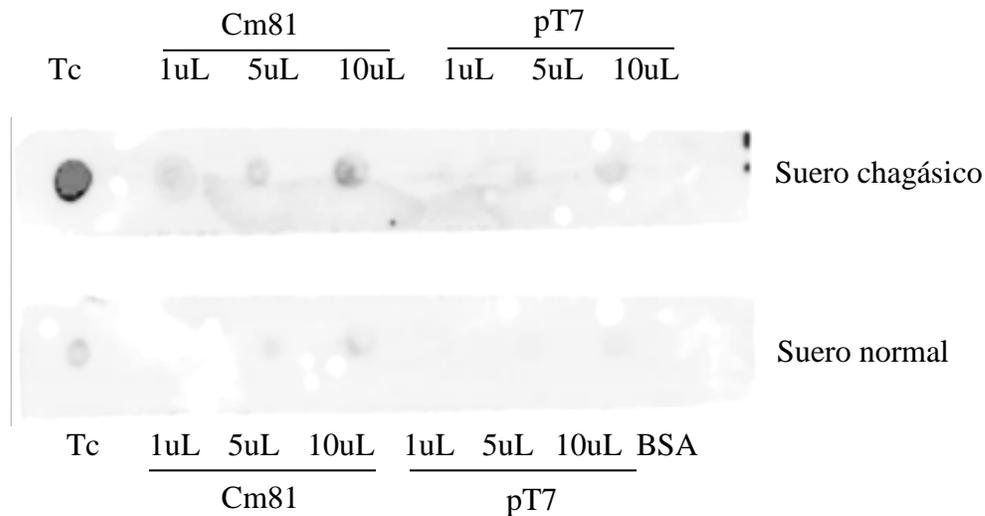


Figura 15. Registro de la Inmunodetección de la proteína Cm81 recombinante purificada, usando mezcla de sueros chagásicos y normales, mediante dot blot. Tc es antígeno purificado de *T. cruzi* y se agregó 1uL en los puntos respectivos. En el otro extremo de la nitrocelulosa se agregaron 100ng de BSA en 1 uL.

El siguiente paso fue realizar un *western-blot*. Para ello primero se realizó una corrida electroforética en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Como control negativo se usó BSA y elución de la purificación de proteínas del vector sin inserto. De control positivo se empleó nuevamente antígeno purificado de *T. cruzi*.

Tal y como se observa en la figura 16, únicamente se logra detectar unas bandas mayores a los 60 kDa en todos los carriles. Este peso molecular no corresponde con el de la proteína

recombinante purificada, observado en la banda del carril 7 de la figura 14 B, correspondiente a la elución 1. Dado que aparecen en todos los carriles, incluido el de BSA, se presume que se trate de una contaminación probablemente del *buffer* de muestra. El hecho es que, mediante la técnica de *western blot* no fue posible detectar reactividad de los sueros chagásicos contra la proteína recombinante purificada.

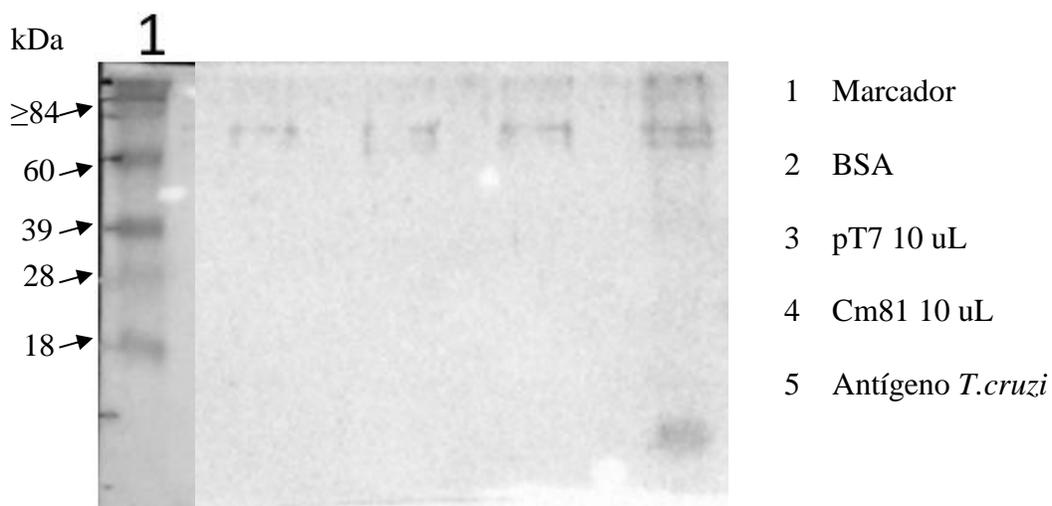


Figura 16. **Inmunodetección de la proteína recombinante purificada.** Usando una mezcla de suero de pacientes chagásicos. Se observan unas bandas mayores a los 60 kDa en todos los carriles excepto el del marcador. Como control positivo se usó 1 uL de antígeno purificado de *T. cruzi* y como control negativo 100ng de BSA y elución de la purificación del vector sin inserto. La nitrocelulosa usada fue de 0,45  $\mu$ m.

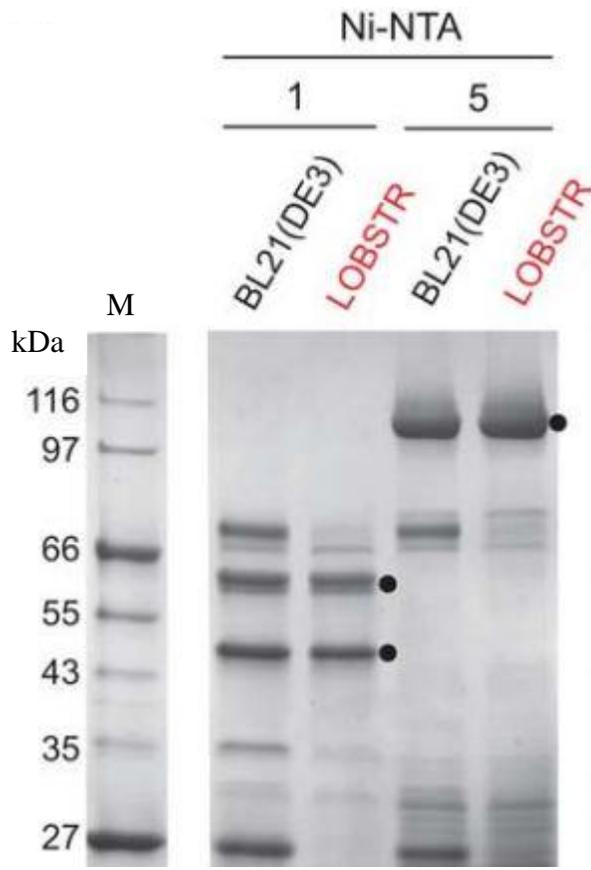


Figura 17. Comparación de la cepa modificada LOBSTR con de *E. coli* BL21 (DE3). Las muestras fueron tomadas de una purificación con Ni-NTA (Quiagen), los puntos en el gel señalan la proteína de interés. El gel de acrilamida es de 12%. Figura tomada con modificaciones de (Andersen *et al.*, 2013).

## 6.DISCUSIÓN

---

El estudio de la genética de *T. cruzi* ha dejado conocer la expansión tanto de su tamaño como del número de genes, en comparación con el resto de los kinetoplastidos secuenciados (El-Sayed *et al.*, 2005; Stoco *et al.*, 2014). Las familias multigénicas de *T. cruzi*, TS, MASP, DGF-1, mucina y gp63, las cuales codifican para proteínas de superficie, se han desarrollado en gran manera, constituyendo aproximadamente 18% del genoma de este parásito (El-Sayed *et al.*, 2005). La familia MASP es la segunda en número de miembros, con una serie de características específicas en su secuencia, tales como la de poseer extremos N-(5') y C-(3') terminales conservados, una zona central hipervariable, sitios de unión a GPI y N-glicosilación (Bartholomeu *et al.*, 2009).

Sólo algunos de los genes que componen esta familia se expresan simultáneamente, representando según estimaciones realizadas un 1,8 hasta 2,8 % del total de los transcritos en la fase tripomastigote de cultivo celular (Bartholomeu *et al.*, 2009). Debido a eso, y con la finalidad de obtener una secuencia útil para el diagnóstico específico, la estrategia planteada en la sección de biología molecular del IMT Dr. Félix Pífano fue clonar el *pool* de genes MASP y seleccionar los que tuviesen reactividad antigénica para el suero humano chagásico.

Para lograrlo se realizó una amplificación por PCR del ADN de epimastigotes usando cebadores diseñados para las regiones altamente conservadas de los extremos N-(5') y C-(3') terminal de las MASPs (Abate *et al.* 2005), obteniendo finalmente 4 clones luego de un cribaje inmunológico primario y secundario con mezcla de sueros de pacientes chagásicos (Rincón, 2004). Siendo Cm81 uno de los cuatro clones y el mismo usado en este trabajo.

Este resultado previo es ya, de por sí, revelador de la antigenicidad de solo algunos miembros de la familia MASPs con sueros de pacientes chagásicos venezolanos. Dado los estudios previos que indican la expresión de subpoblaciones clonales de genes MASP (referencia), era de esperarse tal resultado, que confirma que no todas las proteínas codificadas se expresan, o al menos, se exponen al sistema inmunológico del paciente. La amplitud de la familia MASP en el genoma de *T. cruzi*, sugiere que la familia es imprescindible para la supervivencia del parásito (Bartholomeu *et al.*, 2009).

La alta expresión de dichas proteínas en la fase de tripomastigote en comparación a las otras, puede ser debida, a que dicha fase posee una mayor exposición al sistema inmune y por tanto la expresión de variantes proteicas MASP en la membrana de *T. cruzi* sería un mecanismo necesario para la evasión de dicha respuesta, con un mecanismo similar a como ocurre con las VSG de *T. brucei* (El-Sayed *et al.*, 2005; Bartholomeu *et al.*, 2009).

También se postula que su alta expresión en la fase tripomastigote, su exposición en la superficie e incluso su secreción, sería un mecanismo generador de proteínas que participan en los procesos de interacción y supervivencia durante la invasión y multiplicación en la célula hospedadora facilitando la invasión de numerosos tipos de células, característico de *T. cruzi* (Stoco *et al.*, 2014). Por esta razón se escogió a Cm81, pertenecientes la familia de las MASPs, dada su posible uso terapéutico o de diagnóstico al ser de superficie y/o secretada.

Avances en ese aspecto ha logrado De Pablos (2010), quien en conjunto con su laboratorio purificó y caracterizó una proteína de 52kDa secretada al medio durante la interacción *T. cruzi*-célula huésped, perteneciente a la familia MASP. Esta metodología

permitió clasificar a los pacientes chagásicos en función de la fase de la enfermedad, así como de la severidad de la misma y el pronóstico post-tratamiento (De Pablos, 2011).

En el presente trabajo de tesis se logró la inducción de la expresión, purificación y determinación de antigenicidad de una proteína recombinante MASP de *T. cruzi*. Sin embargo, el rendimiento de la purificación fue bajo, el tamaño de la proteína purificada fue superior al esperado y la reactividad con sueros chagásicos fue débil. A continuación se discutirán las posibles causas de estos resultados.

El análisis inmunológico del inserto Cm81 contempló principalmente tres fases, tal como se describió en los resultados: inducción, purificación e inmunodetección.

La primera fase consistió en la síntesis de la proteína recombinante Partiendo de un cultivo de *E. coli* el cual fue transformado con ADN plasmídico purificado del clon Cm81.

Inicialmente se obtuvieron las bacterias que permitieron luego expresar la proteína. Con esa finalidad se transformó a la bacteria *E. coli*B121 (DE3) con el ADN del clon CM81 (vector pT7-MAT-Tag-1 más inserto). La cepa B121 tiene mutaciones en varias proteasas y enzimas de restricción la convierten en buena candidata para ser transformada y expresar proteínas recombinantes. También tiene el gen de la T7 ARN polimerasa y *lacI<sup>q</sup>*, gen que promueve la sobreproducción de una proteína represora del operón lactosa. Estos genes promueven una numerosa transcripción y control sobre la misma, apropiados para los sistemas de expresión inducibles (Studier y Moffat, 1986).

Una vez transformada se procedió a cultivar la cepa en agar LB con ampicilina, antibiótico que funge como marcador selectivo ya que el vector tiene un gen que sintetiza betalactamasa (Confiere resistencia a la ampicilina). Luego de la selección se realizó el

cultivo para lograr aislar suficiente ADN plasmídico a ser analizado en un gel de agarosa al 0,8% para verificar integridad del plásmido, en la cual se observó el plásmido en las 3 formas: lineal, circular y enrollado. Adicionalmente se efectuó una PCR para constatar la presencia del inserto (Figura 13). En la imagen del gel se pueden observar en el carril 2 una banda que corresponde a un inserto de ~400pb. A partir de esa misma colonia se inició el cultivo para la inducción en aras de evitar inducir subcultivos sin inserto. Es poco probable que se hayan insertado errores dado el pequeño tamaño del inserto. Sin embargo, para evaluar esta posibilidad estaba planteado secuenciar el inserto, pero por cuestiones de logística externas, no se pudo realizar.

La inducción de la expresión fue realizada partiendo de una colonia de cada cepa (pT7 y Cm81), tomada de placas de agar LB complementada con ampicilina 100 ug/mL. El tiempo de inducción y la concentración de IPTG, respectivamente 4 horas y 1mM, se tomaron de un trabajo previo, debido a limitaciones en la disponibilidad de reactivos. Sin embargo, ese no fue el procedimiento apropiado, ya que dicho trabajo previo fue realizado con una proteína distinta. Por lo tanto una estandarización era requerida, ya que hay variables a tomar en cuenta como la estabilidad de la proteína o su toxicidad. Es posible que 4 horas haya sido un periodo de inducción excesivo, y que haya tenido un rendimiento pobre en parte debido a degradación por baja estabilidad, o insuficiente para lograr la máxima expresión de la proteína. Esto podría explicar la poca cantidad de proteína purificada o el bajo rendimiento.

La segunda fase consistió en la purificación de la proteína Cm81 mediante el uso de columnas de afinidad en condiciones desnaturalizantes y su posterior análisis en SDS-PAGE.

Las columnas son parte del estuche Ni-NTA *fast start*, las cuales consisten en una cromatografía de afinidad entre níquel y una etiqueta de histidinas intercaladas incorporada a la proteína cuando se transcribe a partir del vector. Para los lavados y eluciones se usaron soluciones de urea de distintos pH: El *eluato* a pH 8, los lavados a pH 6,5 y las eluciones a pH 4,5. Uno de los problemas con las soluciones de urea es que puede causar carbamilación en el extremo N-terminal de las proteínas y principalmente en los grupos funcionales amino de las cadenas laterales de los residuos de arginina y lisina.

La carbamilación es una modificación post-transduccional causada por el ácido isociánico (CNOH) el cual se produce a partir de la urea, cuando ésta espontáneamente se disocia en solución acuosa para formar cianato y amonio. El problema está en que puede ser artificialmente introducida durante la preparación de muestras con urea. La temperatura, el tiempo de incubación y el pH son factores que afectan la tasa de disociación y la magnitud de la carbamilación de las proteínas. Esto trae como consecuencia tiempos de retención inesperados en la cromatografía, masas no previstas y la degradación de las proteínas (Sun *et al.*, 2014).

Es posible que por carbamilación se haya degradado parte de la muestra o incluso haya afectado por alguna modificación la conformación de la proteína, evitando de esa manera su reconocimiento por los anticuerpos. Ya que las fracciones fueron almacenadas durante un largo periodo, y hubo congelamientos y descongelamientos sucesivos es posible que se haya afectado la eficiencia de la purificación e incluso la integridad de la proteína.

Sin embargo, a pesar de ello se logró observar una banda de aproximadamente 28 kDa en el carril 7 correspondiente a la elución 1 de Cm81 (Figura 14), demostrando con ello se

logró aislar una proteína con masa molecular el doble de la esperada (14kDa). Esto sugiere que es posible que haya ocurrido una dimerización en el gel (Park *et al.*, 2014). Las MAPS son proteínas de membrana y la migración anómala de proteínas de membrana en geles de poliacrilamida- SDS parece ser un hecho común (Rath *et al.*, 2008). Otra explicación, es que sea una proteína de *E. coli* con una región rica en histidina. Sin embargo, no se observa ninguna banda de proteína en el control negativo del vector sin inserto (Figura 14). Las dos más comunes son ArnA, una enzima bifuncional, y SlyD un peptidil-prolylcis/trans-isomerasa (Andersen *et al.*, 2013). Ya que no se pueden eliminar porque la cepa tendría problemas de crecimiento, se ha diseñado una cepa llamada LOBSTR (*low background strain*) que tiene modificaciones para esas regiones ricas en histidina reduciendo su afinidad por el níquel (Andersen *et al.*, 2013). En la figura 17 se puede ver en un SDS-PAGE la efectividad de esta cepa en evitar la contaminación con estas proteínas. También, es notable que SlyD sea de un tamaño similar al del obtenido en la muestra de Cm81 (figura 14).

La tercera y última fase consistió en la inmunodetección de la proteína Cm81 mediante *dot-blot* y *western-blot* usando una mezcla de sueros de pacientes chagásicos.

En el *dot-blot* (Figura 15) se observó reacción de la muestra Cm81 con el suero de pacientes chagásicos. En contraste, ni en el suero normal ni en el control con pT7 se obtuvo emisión. Los parches blancos que se observan en la membrana de nitrocelulosa, se deben a áreas que no se humedecieron con el TBS, esto pudo haber sido solucionado, humedeciendo la membrana con agua destilada y luego equilibrarla con solución tampón antes de sembrar. La baja intensidad de la señal indica una baja concentración de proteínas en las eluciones.

Finalmente se procedió a la inmunodetección mediante *western-blot*, no se observó reacción para la banda de 28kDa que se vio en el gel de acrilamida. En cambio, si hubo reacción antígeno-anticuerpo para unas bandas de aproximadamente 84kDa presentes en todos los carriles, menos la del marcador de peso molecular (figura 15), lo que sugiere que pueda ser una contaminación en la aplicación del buffer de carga o el  $\beta$ -mercaptoetanol.

Con respecto a Cm81, quizás varios factores hayan contribuido a que la proteína no fuese detectada. Entre ellos el más importante fue la poca cantidad de proteína sembrada en los pozos en el gel de acrilamida (menos de 0,5 ug por pozo. Resultados no mostrados). Para verificar si las proteínas estaban presentes o ausentes en la membrana se pudo haber usado rojo Ponceau o alguna otra tinción comercial para el mismo fin, detectar las proteínas transferidas a la membrana, no se hizo porque no estaba disponible el reactivo. También es posible teñir el gel luego de la transferencia con azul de comassie para corroborar la transferencia.

También es posible que la conformación adoptada por la proteína recombinante en el gel de poliacrilamida no permitiera la detección de los epítopes reconocidos por los sueros chagásicos en su forma nativa, como sí es posible en el ensayo de *dot-blot*. Como se mencionó más arriba, las proteínas de membrana (y las MAPS los son), presentan con frecuencia migraciones alteradas y formación de oligómeros en presencia de SDS y de altas temperaturas, como las que se usan para preparar las muestras para electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS. Las moléculas de SDS no siempre desnaturalizan las estructuras secundarias por completo. De hecho, las hélices transmembrana están optimizadas para un ambiente hidrofóbico. Sin embargo, la observación de estos oligómeros (un dímero en nuestro caso) no puede tomarse como prueba de su formación en el estado nativo de la

proteína, de modo que pudiera suceder que este estado de agregación en presencia de SDS podría enmascarar los epítopes (lineales y/o conformacionales) que la proteína nativa posea.

El siguiente paso en la investigación es la caracterización del grupo de clones MASP obtenidos luego del cribaje inmunológico, para ello es importante la estandarización de las metodologías a emplear. De esta manera se podrá obtener suficiente muestra para secuenciar y hacer los estudios de inmunodetección para sueros individuales.

## **6.CONCLUSIONES**

6.1. A nuestro conocimiento, es el primer trabajo que ha estudiado proteínas provenientes de esta familia mediante la producción de recombinantes, otros trabajos se han hecho, pero a través de la predicción y síntesis de epítopes probables mediante bioinformática.

6.2. El Inserto Cm81 probablemente fue expresado como mostró la SDS-PAGE de la figura 14. En dicho Gel se observó una proteína de 28 kDa de tamaño, se sospecha de una dimerización.

6.3. La proteína provino de la elución de la purificación, por lo tanto, soluble.

6.4. Se observó que la proteína purificada es reconocida por los anticuerpos presentes en el suero de pacientes chagásicos de acuerdo a los resultados obtenidos en el *dotblot*. Sin embargo, la detección no se logró mediante *western-blot*, por lo tanto, es necesario hacer réplicas de los ensayos, revisar los parámetros y materiales empleados para corroborar resultados.

## 7.REFERENCIAS

1. Abate T., Rincón M., Díaz-Bello Z., Spencer L. y Rodriguez A. (2005). A mucin like gene different from the previously reported members of the mucin like gene families is transcribed in *Trypanosoma cruzi* but not in *Trypanosoma rangeli*. Mem Inst Oswaldo Cruz. **100**: 391-395
2. Arrechedera H., Marques J.(2010). La enfermedad de Chagas en Venezuela(en línea).Intituto de Medicina Tropical. Universidad Central de Venezuela.http://chagas.ucv.ve/libroChagas.html
3. Atwood III J., Weatherly D., Minning T., Bundy B., Cavola C., Opperdoes F. *et al.*(2005) The *Trypanosoma cruzi* proteome. Science. **309**:473–6.
4. Bartholomeu D. 2009. Genomic organization and expression profile of the mucin-associated surface protein (masp) family of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. Nucleic Acids Research, **37**, 3407–3417
5. Basseri H., Tew I., Ratcliffe N. (2002). Identification an distribution of carbohydrates moieties on the salivary glands of *Rhodnius prolixus* and their possible involvement in attachment/invasion by *Trypanosoma rangeli*. *Exp. Parasitol.* **100**: 226-234
6. Bradford M.(1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding,*Anal. Biochem.***72**: 248–254
7. Brenner Z., Andrade Z. y Barral-Netto M.(2000).*Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Editora Guanabara Koogan S.A 2da edición. Rio de Janeiro. Brazil
8. Castro J., de Mecca M. y Bartel L.(2006).Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis).*HumExpToxicol.***25**:471-9
9. Clayton C. 2002. Life without transcriptional control?From fly to man and back again.*EMBO J***21**: 1881-1888
10. Coura J. (2006).Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease. *RevSocBrasMed Trop.* **39**:113-117
11. Cuba C.(1998). Revision de los aspectos biológicos y diagnósticos del *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli*. *RevSocBrasMed Trop.* **31**:207-220
12. D' Alessandro A. (1976). Biology of *Trypanosomarangeli*. Biology of kinetoplastida. London academic press. Pp 327-403.
13. D' Alessandro-BacigalupoA., SaraviaN.(1992). *Trypanosomarangeli*. En ParasiticProtozoa. Second Edition, Academy Press. **2**:1-54.
14. Da Silveira, F., Setsu E. y OstermayerA.(2001). Chagas disease: recombinant*Trypanosoma cruzi*antigens for serologicaldiagnosis. *Trends Parasitol.***17**:286-291
15. De Godoy L.,Marchini F.,Pavoni D., Rampazzo R., Probst C.,Goldenberg S. yKrieger M.(2012).Quantitativeproteomics of *Trypanosomacruziduringmetacyclogenesis*.*Proteomics.***12**:2694-703
16. De Moraes M. (2008). Different serological cross-reactivity of *Trypanosoma rangeli* forms in *Trypanosoma cruzi*-infected patients sera. *Parasit vectors.* **1**:20
17. De Pablos L.2010. Análisis global de la familia miltigénica MASP(*mucinassociated Surface proteins*) de *Trypanosomacruz*i. Tesis doctoral. Universidad de Granada. España.
18. De Pablos L., Gonzalez G., Solano J., Seco V., Díaz I. (2011) Differential expression and characterization of amember of the mucin-associated surface proteins (MASP) family secreted by *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.* **80**:169–174.
19. De Pablos L.,Díaz I., Jercic M.,Quinzada M., Giménez M., Calabuig E., Espino A. *et al.*(2016).The C-terminal region of *Trypanosoma cruzi*MASPs is antigenic and secreted via exovesicles. *Scientific Reports.***6**:27293
20. Di Noia J *et al.*(2002).A *Trypanosoma cruzi* Small Surface Molecule Provides the First Immunological Evidence that Chagas' Disease Is Due to a Single Parasite Lineage. *J. Exp. Med.***195**:401-413

21. Díaz M., De Pablos L., Longhi S., Zago M., Schijman A. y Osuna A. (2017). Immune complexes in chronic Chagas disease patients are formed by exovesicles from *Trypanosoma cruzi* carrying the conserved MASP N-terminal region. *Sci. Rep.* **7**:44451
22. El-Sayed N, Myler P, Bartholomeu D, Nilsson D, Aggarwal G y colaboradores. 2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. **309**: 409-415.
23. Fraga J., Fernandez-Calienes A., Montalvo A., Maes I., Dujardin J. y Van der Auwera G.(2014).Differentiation between *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* using heat-shock protein 70 polymorphisms. *Trop. Med. Int. Health* .**19**:195-206
24. Herbig-Sandreutter A.(1957). Further studies on *Trypanosoma rangelitejera* 1920. *Actatropica*. **14**:193-207
25. Hoare C.(1972). The trypanosomes of mammals. A zoological monograph. Blackwell. Oxford.
26. Huss,V.; Festl H; Heinz K.(1983). Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates. *Systematic and Applied Microbiology*. **4**: 184–192
27. Invitrogen. (2011). Purelink quick plasmid miniprep kits. Quick reference. K2100.**25**:0789
28. Joshi B., Puri R.(2005).Optimization of expression and purification of two biologically active chimeric fusion proteins that consist of human interleukin-13 and *Pseudomonas* exotoxin in *Escherichia coli*.*Protein Expr Purif*.**39**:189-98.
29. Krieger M. y Goldberg S.(1998). Representation of a differential expression: a new approach to study differential gene expression in trypanosomatids. *Parasitology today*. **14**:163-166
30. Liang, X., Haritan, A., Uliel, S., Michaeli, S. 2003. Trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. *Eukaryot Cell*. **2**:830-840.
31. Martinez-Calvillo, S., Yan, S., Nguyen, D., Fox, M., Stuart, K., Myler, P. 2003. Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Mol Cell*.**11**:1291-9.
32. Minning T., Weatherly D., Atwood J., Orlando R. y Tarleton R. (2009). The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics*. **10**:370
33. Moraes M., Guarneri A., Girardi F., Rodrigues J., Eger I., Tyler K., Steindel M. y Grisard E. (2008).Different serological cross-reactivity of *Trypanosoma rangeliforms* in *Trypanosoma cruzi*-infected patients sera. *Parasites & Vectors*.**1**:20
34. Palenchar J., Bellofatto V.(2006). Gene transcription in trypanosomes. *MolBiochem Parasitol*.**146**: 135-141
35. Park h., Sonh y., Yeo j., Park Y., Lee H., Ryu J., Rhee W y Park T.(2014). Dimerization of 30Kc19 protein in the presence of amphiphilic moiety and importance of Cys-57 during cell penetration. *Biotechnol. J.* **9**:1582–1593
36. Pérez A., Pérez J., Navarro M. y López R. (2009). Enfermedad de Chagas en personas procedentes de Latinoamérica residentes en España. Ministerio de sanidad y política social.
37. Promega Corporation. (1996), *Protocols and Applications Guide*, Third Edition 55–72.
38. Rath A., Glibowicka M., Nadeau V., Chen G. y Deber C.(2008). Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *PNAS* vol. 106 no. 6:1760–1765
39. Rincón M. (2004). Caracterización genética de un clon de DNAc específico de *Trypanosomacruzi* obtenido mediante hibridación sustractiva con *Tripanosoma rangeli*. Tesis de licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
40. Sambrook, J., Fritsch, F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*: 2nd ed.. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
41. Shapiro A, Viñuela E, Maizel J. (1967).Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *BiochemBiophys Res Commun*.**28** (5):815–820.
42. Sousa O. (1972).Anotaciones sobre la enfermedad de Chagas en Panamá. Frecuencia y distribución de tripanosoma rangeli

43. Stoco P., Wagner G., Talavera-lopez C., Gerber A., Zaha A., y colaboradores. (2014). Genome of the avirulent human-infective trypanosome *Trypanosoma rangeli*. *PLoS Negl Trop Dis* **8(9)**: e3176
44. Studier F., Moffat B.(1986).Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective High-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.***189**:113-130
45. Sun S., Zhou J., Yang w y Zhang H.(2014).Inhibition of Protein Carbamylation in Urea Solution Using Ammonium Containing Buffers.*Anal Biochem.***446**: 76–81
46. Towbin H., Staehelin T. and Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350–4.
47. Vallejo G., Guhl F. y Shaub G.(2009). Triatominae-*Trypanosoma cruzi*/*T. rangeli*: Vector-parasite interactions. *Acta Tropica*. **110**: 137-147
48. Vallejo G., Suárez Y., Olaya J., Gutiérrez S y Carranza J.(2015). *Trypanosoma rangeli*: un protozoo infeccioso y no patógeno para el humano que contribuye al entendimiento de la transmisión vectorial y la infección por *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas. *Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat.* **39**:111-122
49. Vargas N., Souto R., Carranza J., Vallejo G. y Zingales B.(2000). Amplification of a specific repetitive DNA sequence for *Trypanosoma rangeli* identification and its potential application in epidemiological investigation. *Experimental Parasitology.***96**: 147-159.
50. Vázquez J.,Krusnell J.,Örn A., Sousa O. y Harris R.(1997). Serological diagnosis of *Trypanosoma rangeli* patients. A comparison of different methods and its implications for the diagnosis of Chagas disease. *Scand. J. Immunol.* **45**: 322-330

Consultas en línea:

1. Centers for Disease Control and Prevention. (2015). American Trypanosomiasis. Disponible en <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html> [Consulta: 1 de marzo de 2016].
2. World-Health-Organization. 2015. Third report on neglected tropical diseases. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Chagas disease. Available: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/152781/1/9789241564861\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/152781/1/9789241564861_eng.pdf?ua=1). [Consulta 25 Abril 2016].
3. World-Health-Organization. 2015. Enfermedad de Chagas. Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/> [Consulta: 1 de marzo de 2016].
4. Sigma Aldrich. pT7-MAT-Tag@-1 Expression Vector. Disponible en <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/e5780bul.pdf>. [Consulta: 1 de marzo de 2016].
5. <https://www.qiagen.com/us/shop/sample-technologies/protein/protein-preparation/ni-nta-fast-start-kit/#productdetails> [Consulta: 1 de marzo de 2016].
6. <https://worldwide.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20manuals/0/protoblot%20ii%20ap%20systems%20with%20stabilized%20substrate.pdf> [Consulta: 1 de marzo de 2016].
7. [http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin\\_5535.pdf](http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5535.pdf) [Consulta: 1 de marzo de 2016].