



UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**Clonación y expresión de la proteína quimera
Tv70CatL en un sistema bacteriano**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO
Presentado ante la Ilustre
Universidad Central de Venezuela
por la Bachiller Maryori Carolina
Correia Correia como requisito
parcial para optar al título de
Licenciado en Biología.

Tutores: Dr. Bernardo Gonzalez
Dra. Vincenza Cervino

CARACAS, VENEZUELA.

MARZO 2013

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la UCV, orgullosa de formar parte de una gran casa de estudio y sobre todas las cosas formar parte de Ciencias-Biología. Lourdes Suárez, gracias por hacerme entender que hasta lo más difícil se vuelve sencillo cuando te centras en eso. Wilmer Tezara, gracias por tu apoyo y por brindarme confianza y amistad en todo momento.

Gracias MAMI por luchar tanto en la vida y sacarme adelante, brindarme educación y enseñarme los valores de la vida. Este TEG, este título, toda mi carrera es para usted. La amo infinitamente y espero poder ser esa mujer luchadora y constante que es usted.

Gracias PAPA, que a pesar que no eres de sangre, eres esa persona que estuvo en momentos importantes de mi vida, gracias por apoyarme, escucharme y quererme como una hija.

Mis hermanas Eliseth, Eli Y Yuri. Gracias por todo lo que me han aguantado, mis amarguras, mi distancia, mis peleas. Este TEG es una muestra de que con perseverancia todo se puede. Las amo y son muy importantes en mi vida aunque a veces no se los demuestre.

Gracias Mimi por demostrándome siempre tu sinceridad y estar allí en todo. Ya no soy tu sanguijuela, pero espero seguir siendo tu amiga y disfrutar más momentos juntas con mi bella sobrina Mariugenia. Te quiero.

Gracias a mi Novio, Alejandro Ángel por compartir conmigo más que una vida universitaria. Por ayudarme, aguantar mis amarguras, ser mi pilar y enseñarme que con esfuerzo todo se puede. Orgullosa de tener a alguien como tú y poder disfrutar cada momento junto a ti. No tengo palabras para decirte lo que siento y aquí todo se queda corto, pero sí puedo decirte que eres más que importante para mí y que simplemente Te Quiero con todo mi corazón Mi Licenciado.

Gracias a mi "Tuti" Bernardo González, por enseñarme miles de cosas, ser mi profesor, guía y amigo, por aguantarse todas mis quejas, regaños y travesuras, incluyendo un lavado de campana con ADN o algo con la manilla de un carro. Gracias por enseñarme que las cosas llegan a su tiempo y que en la biología la paciencia es lo primero. Mis respetos y cariños para usted.

Agradezco a mi asesora Vincenza Cervino y al Profesor Tomas Hermoso, por sus consejos y colaboración durante la elaboración de mi TEG. A mi jurado, Elizabeth Valdívieso y Palmira Guevara por sus consejos y enseñanzas. Por enseñarme que el TEG es un proceso de maduración que nos permite crecer y ser mejores profesionales.

Gracias a todo el grupo del laboratorio de Inmunobiología y del IDECYT: Lucy, Armando, Mari, José, Marta, Aní, Yare, Ignacio, María, Alpi, David; por ser mis guías durante este proceso, ser mis consejeros, regañarme cuando las cosas las hacia mal (Armando) y hacerme reír en esos momentos donde quería quemar el laboratorio porque las bacterias no me querían.

Gracias chicos: Ele, Kim, Ray, Vicky, Ali, Erick, Robert, Roberto, Jennifer, Jenny, "Gato", Mimi, Cerraf, Sergio, Vale, Elan, Cory, Lupe, por ser mis compañeros de clases, de trabajo, amigos de rumbas y tragos, personas que siempre han estado allí para cualquier situación demostrando que la amistad existe y que a pesar de las distancias siempre están en las buenas y malas.

Agradezco a mi Madrina y a la Familia Alejos por apoyarme en todo y estar siempre presentes. A Mery, Gracias por estar allí, ayudándome y abrigándome en su casa cuando lo necesite.

La adoro y la respeto, gracias por abrirme las puertas de su casa y de su familia junto con Candy y Nathaly que han sido mi ejemplo de esfuerzo y perseverancia, personas a quienes admiro y quiero de corazón.

Gracias a aquellas personas que no menciono pero que están presentes en mis pensamientos y corazón.

RESUMEN

La tripanosomosis animal es una enfermedad parasitaria hemotrópica causada principalmente por *Trypanosoma vivax*, un hemoflagelado unicelular eucariota que afecta a bovinos, ovinos, caprinos y bufalinos; ocasionando pérdidas económicas importantes en la ganadería venezolana. Hasta la fecha, el serodiagnóstico está limitado debido a la ausencia de antígenos específicos para la identificación de *T. vivax*. Por otra parte, el uso de vacunas convencionales y de drogas tripanocidas no han proporcionado resultados efectivos ante la enfermedad. La clonación y expresión de proteínas quimeras constituyen la clave en el desarrollo de estrategias que puedan ser empleadas para el control y serodiagnóstico de la enfermedad. El principal objetivo de este estudio fue la clonación y expresión del gen quimera *Tv70CatL* en un sistema bacteriano. Este gen está formado por una región de 251 aminoácidos de la proteína de choque térmico de 70 Kda (Hsp70₃₅₉₋₆₁₀) unida a la región catalítica de la cisteín proteasa, ambas de *T. vivax*. Se subclonó en el vector pET28a y se expresó en *E. coli* B121 (DE3) Rosetta transformado con el vector de expresión pET28a/*Tv70CatL*. Los clones fueron analizados por PCR de las colonias, obteniendo la amplificación de un producto de 1469 pb en 3/7 de las colonias y fueron comprobadas por digestión con enzimas de restricción. La expresión de la proteína *Tv70CatL* se obtuvo a 30°C con IPTG 1mM y por inducción con lactosa a los 28 °C, confirmándose su presencia por western blot con el anticuerpo policlonal anti-Hsp70, el cual mostró una banda de 55 kDa. El análisis por zimografía no mostró actividad gelatinasa de la proteína bajo diferentes pH (3; 4,2; 7,2 y 9,6) a 37°C en ausencia y presencia de los activadores L-Cys y CaCl₂.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Lista de abreviaturas.....	viii
Índice de tablas.....	ix
Índice de figuras.....	x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Tripanosomosis animal.....	1
1.2 <i>Trypanosoma vivax</i>	2
1.2.1 Transmisión de <i>T. vivax</i>	4
1.3 Proteínas de choque térmico de 70 kDa (Hsp70).....	6
1.3.1 Función de la Hsp70 en tripanosomátidos.....	7
1.4 Cistein proteasas (Cps).....	7
1.4.1 Función de las cisteín proteasa en tripanosomátidos.....	8
1.5 Sistema de expresión bacteriano.....	9
1.6 ANTECEDENTES.....	12
1.6.1 Proteínas de choque térmico 70 kDa (Hsp70).....	12
1.6.2 Cistein proteasas (Cps).....	14
2. OBJETIVOS.....	18
3. METODOLOGÍA.....	19
3.1 Esquema general de la metodología.....	19
3.2 Material biológico.....	20
3.3 Vector de expresión pET28a.....	19
3.4 Gen <i>Tv70CatL</i>	19
3.5 Anticuerpos.....	21
3.6 Extracción del plásmido pPICZ α A/ <i>Tv70CatL</i>	21
3.6.1 Corte con enzimas de restricción al plásmido pPICZ α A/ <i>Tv70CatL</i>	22

3.7 Obtención de los clones pET28a/ <i>Tv70CatL</i>	23
3.7.1 Purificación del gen <i>Tv70CatL</i>	23
3.7.2 Reacción de ligación para la formación del vector recombinante pET28a/ <i>Tv70CatL</i>	24
3.7.3 Preparación de las células electrocompetentes de <i>E. coli</i>	25
3.7.4 Transformación del vector recombinante pET28a/ <i>Tv70CatL</i> en una cepa de <i>E. coli</i>	25
3.7.5 Ensayo de la reacción en cadena de la polimerasa de la colonia recombinante (PCR).....	26
3.7.6 Extracción de plásmido pET28a/ <i>Tv70CatL</i>	27
3.7.7 Confirmación de la presencia del vector recombinante pET28a/ <i>Tv70CatL</i> por corte con enzimas de restricción.....	27
3.8 Expresión de la proteína quimera <i>Tv70CatL</i> con IPTG y medio autoinducción.....	29
3.8.1 Electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida.....	30
3.9 Detección de la proteína <i>Tv70CatL</i> por Western blot.....	31
3.9.1 Análisis de las secuencias de la proteína <i>Tv70CatL</i> y del anticuerpo 678.....	32
3.10 Actividad enzimática por zimografía.....	32
4. RESULTADOS	34
4.1 Extracción del plásmido pPICZ α A/ <i>Tv70CatL</i>	34
4.2 Obtención del gen <i>Tv70CatL</i> por corte con enzimas de restricción al plásmido pPICZ α A/ <i>Tv70CatL</i>	34
4.2 Obtención de colonias recombinantes.....	35
4.2.1 Determinación de la presencia del gen <i>Tv70CatL</i> por PCR de las colonias.....	36

4.3	Extracción del plásmido pET28a/ <i>Tv70CatL</i>	36
4.3.1	Corte con enzimas de restricción al vector pET28a/ <i>Tv70CatL</i>	37
4.4	Expresión de la proteína <i>Tv70CatL</i>	40
4.5	Detección de la expresión de la proteína quimera <i>Tv70CatL</i> por western blot.....	42
4.5.1.	Análisis de la proteína <i>Tv70CatL</i> y del anticuerpo 678 por bioinformática.....	42
4.6	Actividad enzimática por zimografía.....	44
5.	DISCUSIÓN	49
6.	CONCLUSIONES	59
7.	PERSPECTIVAS	60
8.	BIBLIOGRAFÍA	61
9.	APÉNDICE	74
10.	ANEXOS	81

LISTA DE ABREVIATURAS

aa: aminoácidos.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNr: ácido ribonucleico ribosomal.

ARNt: ácido ribonucleico de transferencia.

Bip: proteína de unión a inmunoglobulinas.

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool.

Cps: cisteín proteasas.

E. coli: Escherichia coli.

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

ExPaSy: Sistema experto de análisis de proteínas.

Hsp70: proteínas de choque térmico 70kDa.

HSP70359-610: región terminal de la HSP70 que incluye al dominio de unión al péptido.

IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido.

ITS: espaciador de transcrito interno.

kADN: ADN mitocondrial.

L. braziliensis: Leishmania braziliensis.

LAMP: amplificación isotérmica mediada por asas.

LB: Luria-Bertani.

L-Cys: L-Cisteína.

pb: pares de bases.

PBS: buffer fosfato salino.

PBS-T: buffer fosfato salino tween.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PFR2: proteína paraflagelar tipo 2.

SDS: dodecil sulfato sódico.

T. brucei: *Trypanosoma brucei*.

T. congolense: *Trypanosoma congolense*.

T. cruzi: *Trypanosoma cruzi*.

T. evansi: *Trypanosoma evansi*.

T. rangeli: *Trypanosoma rangeli*.

T. vivax: *Trypanosoma vivax*.

Taq: *Thermus aquaticus*.

TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina.

Tv70CatL: Proteína quimérica (vivaxpaina/Hsp70).

TvCatLRc: región catalítica de la vivaxpaina.

Twj1/2: cebadores que amplifican regiones minisatelites de *T. vivax*.

VSG: Glicoproteínas variables de superficie.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes de la mezcla de reacción para la digestión con las enzimas de restricción <i>EcoRI</i> y <i>NotI</i> al vector pPICZαA/ <i>Tv70CatL</i>	22
Tabla 2. Componentes de la mezcla de reacción para la ligación entre el vector pET28a y el gen <i>Tv70CatL</i>	23
Tabla 3. Secuencia de cebadores empleados en la PCR de las colonias.....	25
Tabla 4. Componentes de la mezcla de reacción para la amplificación del gen <i>Tv70CatL</i> con los cebadores <i>Hsp70</i> ₃₅₉₋₆₁₀ F y <i>TvCatLRcR</i>	25
Tabla 5. Programa de ciclado para la PCR de las colonias con los cebadores <i>Hsp70</i> ₃₅₉₋₆₁₀ F / <i>TvCatLRcR</i>	26
Tabla 6. Componentes de la mezcla de reacción para la digestión con las enzimas de restricción <i>EcoRI</i> y <i>PstI</i> del ADN plasmídico pET28a/ <i>Tv70CatL</i>	27
Tabla 7. Componentes de la mezcla de reacción para la digestión con las enzimas de restricción <i>EcoRV</i> y <i>EcoRV/PstI</i> del ADN plasmídico pET28a/ <i>Tv70CatL</i>	27
Tabla 8. Componentes de la mezcla de reacción para la digestión con las enzimas de restricción <i>EcoRI/NotI</i> del ADN plasmídico pET28a/ <i>Tv70CatL</i>	27
Tabla 9. Secuencia aminoacídica del anticuerpo anti-Hsp70 678.....	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución geográfica y porcentajes de prevalencia de <i>T. vivax</i> en Venezuela.....	3
Figura 2. Morfología de <i>T. vivax</i>	4
Figura 3. Transmisión cíclica y mecánica de <i>T. vivax</i>	6
Figura 4. Estructura del gen <i>Tv70CatL</i>	19
Figura 5. Integridad del ADN plasmídico pPICZ α A/ <i>Tv70CatL</i>	32
Figura 6. Digestión del ADN plasmídico pPICZ α A/ <i>Tv70CatL</i> con las enzimas <i>EcoRI</i> y <i>NoTI</i>	33
Figura 7. Transformación en <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Rosetta con pET28a/ <i>Tv70CatL</i>	33
Figura 8. PCR de las colonias recombinantes pET28a/ <i>Tv70CatL</i>	34
Figura 9. Integridad del ADN plasmídico pET28a/ <i>Tv70CatL</i>	34
Figura 10. Digestión del ADN plasmídico pET28a/ <i>Tv70CatL</i> con la enzima <i>EcoRI</i> ...	35
Figura 11. Mapa de restricción del gen <i>Tv70CatL</i>	36
Figura 12. Mapa de restricción del vector pET28a.....	36
Figura 13. Digestión del ADN plasmídico pET28a/ <i>Tv70CatL</i> con las enzimas <i>PstI</i> y <i>EcoRV</i>	37
Figura 14. Digestión del ADN plasmídico pET28a/ <i>Tv70CatL</i> con las enzimas <i>PstI</i> y <i>EcoRV</i>	37
Figura 15. Digestión del ADN plasmídico pET28a/ <i>Tv70CatL</i> con las enzimas <i>EcoRI</i> y <i>NoTI</i>	38
Figura 16. Expresión de la proteína <i>Tv70CatL</i> a 30 °C.....	39
Figura 17. Expresión de la proteína <i>Tv70CatL</i> a 28 °C con medio autoinducción.....	39
Figura 18. Western blot de la proteína quimera <i>Tv70CatL</i>	40

Figura 19. Alineación entre el anticuerpo 678 y la proteína Tv70CatL.....	40
Figura 20. Zimografía de la proteína Tv70CatL a pH 3 durante 6 horas.....	42
Figura 21. Zimografía de la proteína Tv70CatL a pH 4,2 durante 3 horas.....	43
Figura 22. Zimografía de la proteína Tv70CatL a pH 4,2 durante 6 horas.....	43
Figura 23. Zimografía de la proteína Tv70CatL a pH 7,2 durante 3 horas.....	44
Figura 24. Zimografía de la proteína Tv70CatL a pH 7,2 durante 6 horas.....	45
Figura 25. Zimografía de la proteína Tv70CatL a pH 9,6 durante 6 horas.....	45

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Tripanosomosis animal

La tripanosomosis animal es una enfermedad parasitaria hemotrópica causada principalmente por agentes del género *Trypanosoma*. En América, es ocasionada por *Trypanosoma vivax* que afecta a ovinos, caprinos, bovinos y camélidos (Dávila y Silva, 2000) y *Trypanosoma evansi* el cual afecta principalmente a equinos (García y col., 2002). La enfermedad se caracteriza por la presencia intermitente de parásitos en sangre, fiebre intermedia y un cuadro agudo de anemia; además de presentar pérdida en la condición corporal, emaciación, abortos y esterilidad (Suárez y col., 2009).

La tripanosomosis presenta tres fases: prepatente, aguda y crónica. La fase prepatente inicia con un período de incubación del parásito y en ella no se presentan signos clínicos en el animal (Gómez, 2011) y se caracteriza por la presencia de altos picos de parasitemia, fiebre, anorexia y puede presentar un estado de pancitopenia caracterizado por anemia, leucopenia y trombocipenia (Anosa, 1988; Espinoza, 1988). Cuando el animal supera la fase aguda, llega a una fase crónica, la cual tiene un tiempo de duración de varios meses o años y se caracteriza por no manifestar síntomas de la enfermedad ni cambios en su condición corporal, lo cual los convierte en portadores asintomáticos de la enfermedad (Suárez y col., 2009). De acuerdo con Rivera (1996), bajo la fase crónica disminuye la cantidad de parásitos en sangre, por lo que es difícil su detección por métodos parasitológicos.

En el caso particular de la tripanosomosis bovina, esta enfermedad constituye uno de los principales factores limitantes en el desarrollo de la ganadería, representado con un 40% de la tasa de mortalidad total del ganado en América Latina (Desquesnes, 2004b), lo cual ocasiona una disminución en la producción de carne y leche, afectando directamente a la población consumidora (Rivera, 1996; García y col., 2002).

Con relación al tratamiento de la enfermedad, el uso de vacunas convencionales implementadas en tratamientos contra la enfermedad no ha proporcionado resultados efectivos debido a la capacidad que posee *T. vivax* de evadir la respuesta inmune del hospedador consecuencia de las variaciones antigénicas de sus glicoproteínas de superficie variables (VSG) usadas como un sistema de defensa contra el sistema inmune del huésped (Uzcanga y col., 2009; Jackson y col., 2011). Por otra parte, el uso de drogas tripanocidas crea efectos tóxicos en el animal, además existen cepas de *T. vivax* que pueden generar resistencia a algunas de esas drogas (Geerts y col., 2001; Delespaux y col., 2007). Por ello, la utilización de quimeras que posean una propiedad adyuvante e inmunogénica podría ser una alternativa viable para el control de la enfermedad. En cuanto a su diagnóstico, no se han empleado antígenos específicos contra *T. vivax*, por lo que generalmente se utiliza *T. evansi* debido a la similitud antigénica compartida para realizar diagnóstico en infecciones con *T. vivax* (Uzcanga y col., 2002). Sin embargo, esto podría arrojar falsos positivos en zonas ganaderas donde ambos tripanosomas existen (Toro y col., 1980). Por ello, el empleo de proteínas que presenten una propiedad antigénica e inmunogénica podría ser empleado para el serodiagnóstico específico de la tripanosomosis bovina en presencia de *T. vivax* (Boulangé y col., 2002; Zurita y col., 2003; Bannai y col., 2003; Bolívar y col., 2007).

1.2 *Trypanosoma vivax*

T. vivax es un hemoflagelado unicelular eucariota, que se encuentra ampliamente distribuido en las zonas tropicales de África y América del Sur (Hoare, 1972). En Latinoamérica se han reportado casos de tripanosomosis causados por *T. vivax* en Costa Rica, El Salvador, Brasil, Paraguay, Panamá, Martinica, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, Guyana Francesa y Venezuela (Rivera, 1996; Desquesnes, 2004b).

En Venezuela fue reportado por primera vez por Enrique Tejera en 1920, al observarlo en bovinos, describiéndolo morfológica y biológicamente (Kubes, 1944; Shaw y Lainson, 1972). Este patógeno está distribuido por todo el país, observándose una mayor prevalencia en zonas ganaderas bovinas, como en la región de los llanos venezolanos (39%) (Toro y col., 1980; Toro, 1990). Perrone y col. (1991) muestran una alta seroprevalencia en el Estado Guárico y un 78% en el Estado Táchira (Rivera, 1996) Reyna (2007) demuestra una prevalencia de *T. vivax* en el centro y occidente del país (43%), específicamente en los estados Miranda, sur del estado Guárico, Anzoátegui y Monagas (Figura 1), mientras que Simoes y col. (2009) reportan un 77% de seroprevalencia de *T. vivax* en municipios del Estado Zulia.

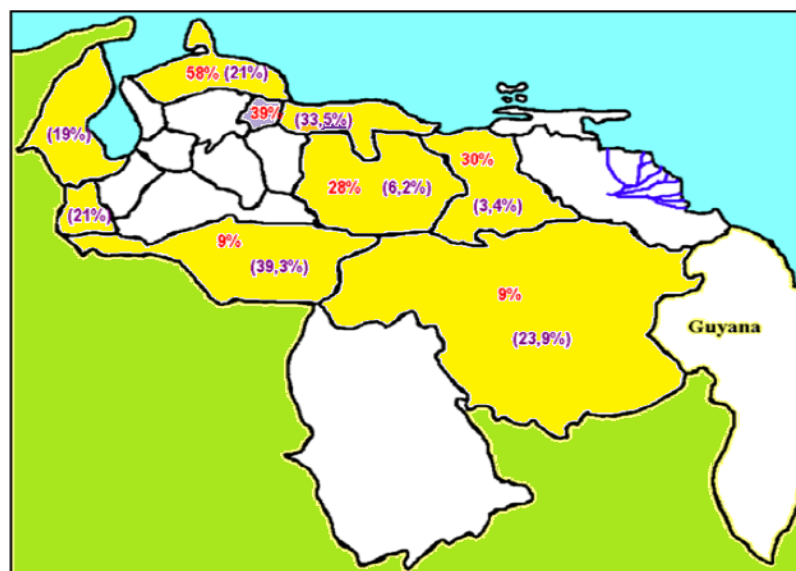


Figura 1: Distribución geográfica y porcentajes de prevalencia de *T. vivax* en Venezuela. (Tomado y modificado de Desquesnes, 2004a; de acuerdo a lo descrito por Toro y Espinoza).

Este parásito presenta una longitud entre 20-27 μm y 3 μm de ancho, aunque estos valores oscilan dependiendo de la localidad (Desquesnes, 2004a). De acuerdo con Leger y Vienne (1919), en las cepas suramericanas existen variaciones de tamaño de 16-26.5 μm de longitud y un ancho de 1-3 μm . Gómez (2011) indica que el tamaño de *T. vivax* en Venezuela varía en distintas regiones entre 18-24 μm de largo (en promedio $21,00 \pm 2,00 \mu\text{m}$).

Morfológicamente, *T. vivax* presenta un núcleo central, una membrana ondulante bien desarrollada, un flagelo libre y un cinetoplasto redondeado y pequeño cercano al extremo posterior del parásito ubicado en posición central donde está presente el ADNk (Hoare, 1972) (Figura 2). El ADN mitocondrial está organizado en dos tipos de moléculas circulares de ADN interconectados denominadas minicírculos y maxicírculos (Borst y col., 1985), los cuales constituyen entre el 10 y 20% del contenido total de ADN del organismo (Simpson, 1987).

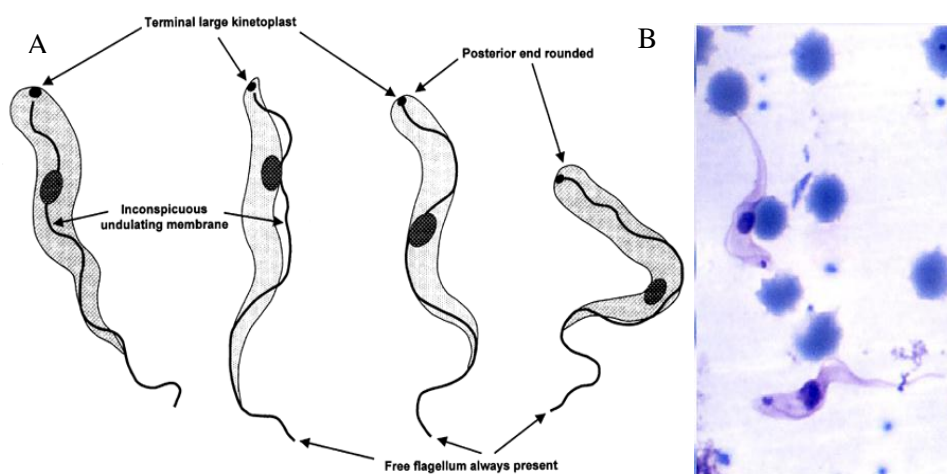


Figura 2: A) Morfología de *T. vivax*. (Tomado de Silva y col., 2002). B) *T. vivax* en sangre (100x). (Tomado y modificado de Oliveira y col., 2009).

De acuerdo con Levine y col. (1980), taxonómicamente *T. vivax* se encuentra en:

- Reino** Animalia
- SubReino** Protozoa
- Phylum** Sarcomastigophora
- Subphylum** Mastigophora
- Clase** Zoomastigophora
- Orden** Kinetoplastida
- Suborden** Trypanosomatina
- Familia** Trypanosomatidae
- Género** *Trypanosoma*
- Subgénero** *Duttonella*
- Especie** *T. Vivax*

Hoare (1972), divide el género *Trypanosoma* en dos secciones: Stercoraria y Salivaria. La sección Stercoraria contiene flagelados metacíclicos que se desarrollan en el tubo digestivo del vector y son transmitidos por las heces, mientras que los pertenecientes a la sección Salivaria son flagelados metacíclicos que se transmiten a

través de glándulas salivares del vector (Hoare, 1972). De acuerdo con esta clasificación *T. vivax* pertenece a la Sección Salivaria.

1.2.1 Transmisión de *T. vivax*

Existen dos tipos de transmisión por parte de *T. vivax*: cíclica y mecánica. En América Latina *T. vivax* es transmitido por vectores como *Tabanus sp.*, *Stomoxys calcitrans* y *Haematobia irritans* y su transmisión es solo mecánica (Desquesnes, 2004b; Osorio y col., 2008). Además, otros vectores como jejenes y Simulidae pueden ser vectores de *T. vivax* (Rivera, 1996). En África es transmitido cíclicamente por la mosca tsetse (*Glossina sp.*) y mecánicamente por moscas hematófagas (Osório y col., 2008).

La transmisión cíclica requiere la presencia de un hospedador vertebrado (mamíferos) y un vector invertebrado (dípteros hematófagos). Dentro del díptero hematófago, el parásito es capaz de multiplicarse y permanecer en la fase infectiva durante toda la vida del insecto, desarrollándose en la probóscide del organismo donde pasa de tripomastigote a epimastigote. En esta fase se conduce el desarrollo de tripomastigotes metacíclicos, la cual es la única forma en la que el hospedador se ve afectado por la picadura de la mosca tsetse infectado por el parásito (Osório y col., 2008). La transmisión mecánica se da sin la multiplicación ni crecimiento del parásito en el hospedador invertebrado (Hoare, 1972; Osório y col., 2008). Al estar el parásito en el hospedador vertebrado, éste es capaz de dividirse por fisión binaria, iniciada por la bipartición del cinetoplasto, ocasionando así la completa infección (Hoare, 1972) (Figura 3). Una forma frecuente de transmisión y propagación de la enfermedad es el uso de jeringas contaminadas con el parásito en procesos de vacunación o inyección de vitaminas u otros tipos de fármacos, así como el traslado del ganado a otras regiones (Van Den Bossche y col., 2000).

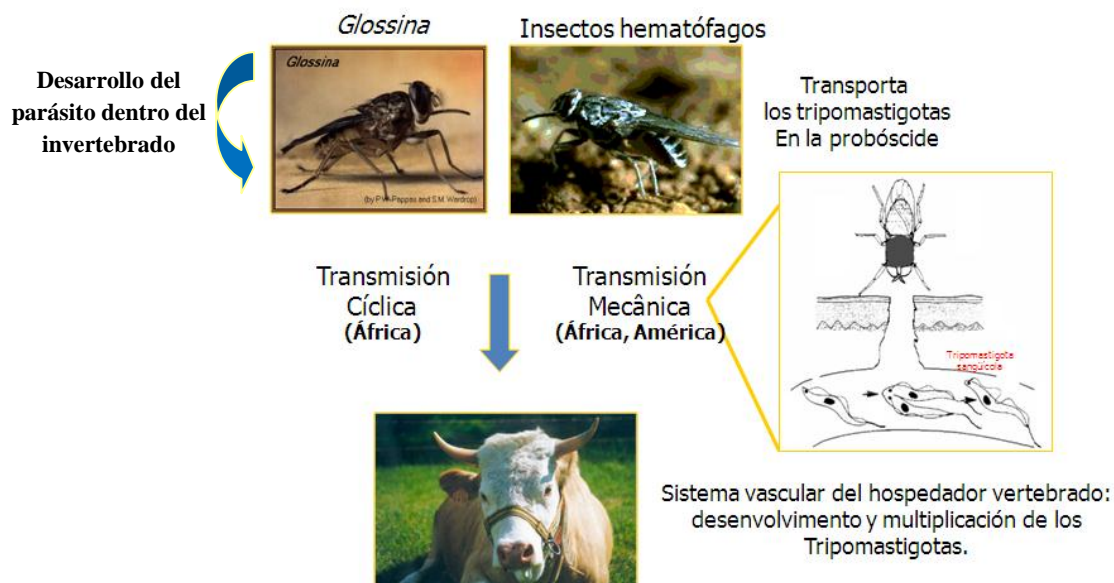


Figura 3: Transmisión de *T. vivax*. Transmisión cíclica (África) y mecánica (África, América) (Tomado y modificado de Silva y col., 2002).

1.3 Proteínas de choque térmico de 70 kDa (Hsp70)

Las Hsp70 forman parte de un grupo de chaperonas altamente conservadas entre numerosas especies y juegan un papel fundamental en diversos procesos celulares (Kiang y col., 1998; Carmelo y col., 2006). Estructuralmente, estas proteínas presentan un dominio N-terminal de la ATPasa de 45kDa, un dominio de unión al péptido de 15-18 kDa y un dominio C-terminal de 10 kDa (Morshauser y col., 1995). Se distribuyen por todo el citoplasma, la mitocondria y el retículo endoplasmático, participando en la translocación de proteínas, así como promoviendo la generación de la estructura terciaria (Becker y Craig, 1994; Hartl, 1996; Meimaridou y col., 2009). Además, cooperan en el plegamiento de las proteínas recién sintetizadas actuando como “chaperonas moleculares” (Maresca y col., 1992; Ellis y Hartl, 1999; Mayer y col., 2005). Diversos estudios muestran que esta proteína podría ser utilizada como adyuvante de vacunas, para potenciar la respuesta inmune del hospedador (Planelles y col., 2001; Robert, 2003).

1.3.1 Función de la Hsp70 en tripanosomátidos

La respuesta de choque térmico juega un papel funcional en los parásitos durante la invasión al hospedador, donde la concentración de la Hsp70 se correlaciona con un aumento en la patogenicidad e infectividad (Carmelo y col., 2006). Se ha encontrado Hsp70 en varias infecciones del parásito en el hospedador, causadas por especies del género *Trypanosoma* (Shapira y col., 1988). Durante la invasión al hospedador los parásitos experimentan un cambio de temperatura desde los 22-28°C de los vectores hasta los 37°C del hospedador mamífero, lo que puede causar un efecto letal de desnaturalización o agregación de ciertas proteínas; sin embargo, se ha encontrado que la presencia de las Hsp70 en estos organismos parasitarios inhibe la desnaturalización de las proteínas, por lo que se cree que están implicadas en el proceso de invasión al hospedador (Carmelo y col., 2006). Por otra parte, en tripanosomátidos la Hsp70 está implicada en la diferenciación de promastigotes a amastigotes durante su ciclo de vida (Van der Ploeg y col., 1985).

1.4 Cistein Proteasas (CPs)

Las peptidasas son un grupo de proteínas que tienen como función principal clivar enlaces peptídicos (Buttle, 2004). Se clasifican de diversas maneras, dependiendo del sitio de clivaje (exopeptidasas y endopeptidasas), de la naturaleza química del sitio catalítico y de su mecanismo de acción (serin-peptidasa, aspartil-peptidasa, metalopeptidasa, Cp, glutamil-peptidasa y treonin-peptidasa) (Buttle, 2004).

Las Cp están presentes en todos los organismos vivos y su estructura consta de una región inicial o pre-región, que contiene un péptido señal tipo hidrofóbico de aproximadamente 20 aminoácidos (aa); una región central o dominio catalítico de una longitud que oscila entre 212 -252 aa y una pro-región que presenta una región hidrofílica con una longitud entre 62-123 aa asociada al correcto plegamiento de la enzima (North y

col., 1990). Las Cp catalizan la hidrólisis de péptidos con enlaces amino, éster y tiol (North y col., 1990) y requieren de un grupo sulfhidrilo y un residuo de cisteína (-SH) en el sitio activo para la hidrólisis (Barret, 1998). Se pueden subdividir en exopeptidasas, las cuales escinden el enlace peptídico proximal a los extremos amino o carboxi del sustrato y endopeptidasas que cortan los enlaces peptídicos distantes de la región N o C-terminal (Barret, 1998).

En tripanosomátidos, las Cps presentan una región C terminal diferente a la observada en otros organismos (Sajid y Mckerrow, 2002). En organismos parasitarios estas enzimas se dividen en dos grupos denominados clanes A (CA) y D (CD) (Barret, 1998). Las más estudiadas dentro de los kinetoplástidos son las pertenecientes al CA, el cual contiene a las catepsinas B, C, K, L y S (Caffrey y col., 2009).

1.4.1 Función de las cisteín proteasas en tripanosomátidos

Las peptidasas en tripanosomátidos patógenos juegan un papel importante en varias etapas de la infección, como: absorción, penetración, supervivencia intracelular, diferenciación, infectividad, evasión inmune y nutrición (Vermelho y col., 2007). Intervienen en diversos procesos biológicos como la digestión lisosomal de proteínas exógenas o del propio parásito; en la penetración del tripomastigote a la célula del mamífero; en las etapas de diferenciación en diferentes puntos del ciclo de vida de *T. cruzi* (Cazzulo y col., 1999); y en el procesamiento de proteínas, adhesión y patogénesis (Alane y col., 2007).

Las Cps tienen un efecto sobre la supervivencia del parásito ya que intervienen en la digestión lisosomal (O'Brien y col., 2008) y participan en la diferenciación de tripomastigote a amastigote después de la invasión, y de amastigote a tripomastigote antes del egreso del parásito *T. cruzi* (Harth y col., 1993). Estas proteínas han sido estudiadas como marcadores de serodiagnóstico y blancos de drogas terapéuticas debido

a su propiedad inmunogénica (Sajid y Mckerrow, 2002). Authie y col. (2001) demostró que la utilización de esta proteína en *T. congolense* permitió atenuar los síntomas de la enfermedad; como disminución en el nivel de parasitemia y aumento en los niveles de hematocrito, sugiriendo que las Cps podrían estar implicadas en la anemia y la inmunosupresión.

1.5 Sistema de expresión bacteriano

La aplicación de técnicas de ADN recombinante ha permitido obtener proteínas recombinantes mediante su expresión en diferentes organismos hospedadores (Choi y col., 2004). La elección de estos organismos depende de la finalidad y las propiedades que se deseen obtener de la proteína expresada (Jonasson, 2002). Entre los sistemas de expresión utilizados se encuentran: sistemas bacterianos utilizando como célula huésped *Escherichia coli* (*E. coli*), sistemas eucariotas, utilizando como huésped organismos como *Pichia pastori* o *Saccharomyces cerevisiae* (Eckart y col., 1996) y células de insectos, larvas y células de mamífero mediante baculovirus (Demain y col., 2009).

Los sistemas de expresión utilizando como célula huésped un organismo procarionta son los más utilizados debido a su bajo costo, alta productividad, rápida utilización y han sido ampliamente caracterizados (Choi y col., 2004; Jonasson, 2002; Makrides, 1996). Como célula huésped es utilizada comúnmente *E. coli*, una bacteria Gram negativa que puede crecer rápidamente en medio mínimo que contenga una fuente de carbono y sales que proporcionen nitrógeno, fósforo y algunas trazas de metales (Terpe, 2006).

La expresión de proteínas recombinantes mediante este sistema requiere de vectores específicos conocidos como plásmidos, de los cuales existe una gran variedad y diversidad genética que facilitan la localización y purificación de la proteína expresada (Jonasson y col., 2002). Estos vectores presentan un origen de replicación, un

gen que le confiere resistencia a un antibiótico (o un marcador selectivo), un sitio múltiple de clonación, un promotor que regula la transcripción del gen insertado y un gen terminador de la transcripción (Terpe, 2006). El origen de replicación determina el número de copias del vector, el cual oscila entre 25-50 copias/célula si la expresión es derivada de un plásmido con bajo número de copias o entre 150-200 copias/célula si proviene de un plásmido con alto número de copias (Balbas y col., 1990). Este número de copias influye en la estabilidad del plásmido, manteniéndolo dentro de la célula durante la división celular (Jonasson y col., 2002).

El gen que codifica la resistencia a un antibiótico es necesario para identificar las células transformantes y para asegurar la presión selectiva por el antibiótico, permitiendo así que solo las células que contienen el vector de expresión se dividan evitando la pérdida del plásmido (Jonasson y col., 2002). La presencia de un sitio múltiple de clonación permite tener un amplio repertorio de enzimas de restricción que permitan la digestión del vector y a su vez la inserción del gen de interés que se desea clonar o expresar por medio de la formación de extremos romo o cohesivos (Luque, 2008).

Por otra parte, es necesario un promotor con ciertas características que permitan una alta síntesis de la proteína. Primero, un promotor fuerte que permita un alto nivel de expresión en *E. coli*, resultando en la acumulación de la proteína de un 10 a 30% o más del total de la proteína celular (Makrides, 1996). Segundo, un promotor que tenga un nivel mínimo de actividad basal transcripcional, para evitar toxicidad en las células y por tanto una disminución en la expresión de la proteína recombinante y un tercer criterio importante es que el promotor sea fácilmente inducible y con bajo costo (Makrides, 1996). Generalmente, para una alta producción de proteínas se emplean promotores inducibles con IPTG (Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) (*Ver anexo 6*),

el cual es regulado por el gen *lacI* (Jonasson y col., 2002). Existen además, sistemas inducibles con lactosa que permiten la obtención de proteínas con una alta densidad celular y por tanto mayor cantidad de proteína expresada siendo de menor costo su producción (Studier, 2005).

A una corta distancia del promotor debe situarse el codón ATG que señala el comienzo de la traducción del ARN mensajero. Finalmente, y situado al extremo 3' es necesaria una secuencia que funcione como terminador de la transcripción o codón de parada, que constituya una horquilla, donde la ARN polimerasa se desliga del ARN recién formado (Baneyx, 1999).

1.6 ANTECEDENTES

1.6.1 Proteínas de choque térmico de 70 kDa (Hsp70)

Las Hsp70 en especies del género *Trypanosoma* han sido ampliamente estudiadas; Zurita y col. (2003) expresaron y purificaron una secuencia de 150 aa de la Hsp70 de *Leishmania braziliensis*. Estos investigadores demostraron que la proteína presentaba una gran especificidad en el diagnóstico serológico de la leishmaniasis cutánea y mucocutánea, no presentando reacciones cruzadas con enfermos chagásicos o sueros de individuos no infectados por el parásito.

Por otra parte, Bannai y col. (2003) clonaron y expresaron la proteína de choque térmico mitocondrial de 70 kDa (MTP) de *Trypanosoma congolense* como antígeno para el desarrollo de un ELISA indirecto. El ensayo demostró la presencia de anticuerpos anti-MTP en sueros de ratones infectados experimentalmente con *T. congolense*, mostrando que la proteína presenta una alta inmunogenicidad, permitiéndole servir como blanco para serodiagnóstico.

La alta homología de la secuencia de ADN que codifica para la Hsp70 entre especies del género *Trypanosoma* condujo al aislamiento, clonación y expresión en un sistema bacteriano de la región N-terminal de la proteína en *T. rangeli*, encontrándose que ésta presenta una elevada identidad con su homóloga en *T. cruzi*, hecho que permitió su utilización en inmunoterapias para pacientes con Chagas (Cuervo y col., 2005).

Trabajos recientes han mostrado que las Hsp de tripanosomátidos poseen propiedades moduladoras cuando son utilizados como adyuvantes en las inmunizaciones; Krautz y col. (1998) fusionaron la Hsp70 del retículo endoplasmático (grp58) de *T. cruzi* con la proteína flagelar de unión al calcio, siendo utilizada como un potente antígeno, incrementando la sensibilidad y especificidad en serodiagnóstico.

Planelles y col. (2001) desarrollaron una vacuna genética en la cual fusionaron el gen *Hsp70* de *T. cruzi* a la proteína del bolsillo flagelar, KMP11, demostrándose que cuando los ratones eran inmunizados con el plásmido de fusión, ocurría un descenso en la parasitemia, confiriendo así protección frente a la infección experimental con *T. cruzi*.

Wang y col. (2004) reportan que el fragmento de la Hsp70, que corresponde a la región Hsp70₃₅₉₋₆₁₉ la cual contiene el dominio de unión al péptido estimula la producción de quimocinas IL12, TNF α , y óxido nítrico. Esta estimulación no se observó en la región N terminal de la proteína.

González y col. (2004) caracterizaron la proteína ribosomal L14 de *L. braziliensis* y la fusionaron covalentemente con la Hsp70 de *T. cruzi* (Hsp70-L14), donde demostraron que la proteína ribosomal L14 de *L. braziliensis* no es inmunogénica en enfermos de leishmaniasis cutánea o en ratones inoculados con la misma. Sin embargo, la inoculación de ratones con la fusión Hsp70-L14 indujo una fuerte respuesta inmunológica específica protectora contra la L14 en ratones, caracterizada por un elevado título de anticuerpos.

Morell y col. (2006) construyeron y expresaron en un sistema bacteriano un gen quimera formado a partir de la proteína del eje paraflagelar (PFR2) unida a la Hsp70 de *T. cruzi* (PFR2-Hsp70). Esta proteína fue utilizada para inmunizar ratones infectados experimentalmente con *T. cruzi* confiriéndoles una inmunidad protectora contra este parásito.

Así mismo, Li y col. (2006) encontraron que vacunas de ADN formadas entre el fragmento Hsp70₃₅₉₋₆₁₀ y el virus de la hepatitis B produjo un incremento significativo de la respuesta humoral contra un antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg), mientras que la Hsp70₁₋₃₆₀ o la Hsp70 completa fusionadas a la vacuna no produjeron

dicha respuesta. Además, observaron que la vacuna de fusión con el fragmento Hsp70₅₃₉₋₆₁₀ mediaba una respuesta de linfocitos T. Estos resultados sugieren que la forma truncada de la Hsp70 de mycobacterium puede ser un candidato como adyuvante en el diseño de vacunas en lugar de la Hsp70 completa.

1.6.2 Cistein proteasas (Cps)

Mottram y col. (1989) mostraron la clonación en sistemas bacterianos del gen “brucipaina”, encontrando que el gen presentó una alta homología con las catepsinas de clase L de otros organismos. Por su parte, Eakin y col. (1992) expresaron en sistemas bacterianos el gen completo que codifica para la Cp de *T. cruzi*, demostrando que presentó una secuencia de aa con alta homología a los miembros de la familia de las Cps de la papaína, y con la Cp de *T. brucei*.

Authie y col. (2001) expresaron e inmunizaron bovinos con dos cisteín proteasas de *T. congolense* (Cp1 y Cp2). A pesar de que estas no causaban ningún efecto sobre la infección, observaron que en comparación con los bovinos controles, los bovinos infectados mantenían su peso corporal, disminuía el nivel de parasitemia y el nivel de hematocrito aumentaba luego de 2 a 3 meses de infección, por lo que las Cps pueden jugar un papel importante en la anemia y la inmunosupresión.

Boulangé y col. (2002) expresaron el gen *Hsp70* de *T. congolense* que codifica para la proteína Bip en un sistema bacteriano, encontrando que la región C terminal de la molécula presenta una alta antigenicidad. Un fragmento de esta proteína fue evaluado en un ensayo de ELISA, demostrando una alta sensibilidad en infecciones con el parásito en bovinos, por lo que se propone que puede ser utilizada como antígeno en serodiagnóstico de la tripanosomosis bovina.

Hasta la fecha no se conocen proteínas quimeras formadas por las Cps de tripanosomátidos. Sin embargo, Huson y col. (2009) muestran la expresión de una

proteína formada por una asociación entre el dominio catalítico de la Cp de *T. congolense* (C2) con la macroglobulina- α 2 de conejo (α 2M) (C2- α 2M). Con este complejo se inmunizaron conejos obteniendo que la misma producía altos niveles de anticuerpos anti C2 lo que generaba una respuesta protectora ante la infección de *T. congolense* en los mismos.

En diagnóstico molecular se han reportado estudios de las Cps en diversos tripanosomátidos. Cortéz y col. (2009) caracterizaron secuencias de genes que codifican las Cps tipo catepsinas L de aislados de África y Sur América de *T. vivax* y evaluaron su sensibilidad como marcadores para diagnóstico. Estos investigadores demostraron que parte de la secuencia era específica para *T. vivax* y no para otros tripanosomátidos, obteniendo así una alta especificidad y sensibilidad de diagnóstico por PCR para esta enfermedad.

Por otra parte, González (2011) en un ensayo de PCR, utilizando un fragmento de la Cp de un aislado venezolano de *T. vivax* encontró una sensibilidad comparable a la obtenida en ensayos donde se utilizaban otros cebadores como Twj1/2 y una mayor sensibilidad a la obtenida con cebadores ITS-1CS/BR utilizados comúnmente en el diagnóstico de este parásito (Datos no publicados).

Alejos (2011), a través de la técnica de amplificación isotérmica mediada por asas (LAMP) encontró que, utilizando una secuencia de la región catalítica de la catepsina L del mismo aislado de *T. vivax*, existía una mayor sensibilidad de detección a la obtenida por PCR. Dicha secuencia de la Cp podría ser utilizada como blanco para diagnóstico molecular de *T. vivax*.

Recientemente, González (2012) construyó, clonó y expresó en un sistema eucariota, la proteína quimera Tv70CatL, obteniendo la secuencia y actividad

enzimática de la misma. Esta proteína quimera Tv70CatL esta formada por la región de unión al péptido de la Hsp70 y la región catalítica de la Cistein Proteasa.

Para la construcción del gen quimera *Tv70CatL* se amplificaron las regiones *Hsp70*₃₅₉₋₆₁₀ y la región catalítica de la *CP* y se ligaron cada uno de los genes en el vector de clonación pGem-T easy vector® (Promega), siendo clonados en la bacteria *E. coli*, cepa DH5α. Aquellas colonias recombinantes se les extrajo los plásmidos y se les realizó las PCRs con los cebadores EHsp70₃₅₉₋₆₁₀F/R (amplificación de *Hsp70*₃₅₉₋₆₁₀) y ETvCatLrcF/R (amplificación de la región catalítica de la *Cp*) los cuales contenían la secuencia para el sitio de restricción de la enzima *SpeI*, creando extremos cohesivos entre el extremo 3` de *Hsp70*₃₅₉₋₆₁₀ y el 5` de la *Cp*. Los amplicones obtenidos fueron digeridos con dicha enzima y ligados entre sí con una ADN T4 ligasa, formando así el gen *Tv70CatL*.

Este gen fue ligado al vector de expresión para levadura pPICZαA. Para ello, el gen se amplificó con los cebadores *Hsp70*₃₅₉₋₆₁₀F y *TvCatLRcR*, los cuales contenían la secuencia para el sitio de restricción de las enzimas *EcoRI* y *NotI*. Tanto el vector como el gen fueron digeridos con estas enzimas, generando extremos cohesivos permitiendo así la ligación entre ellos; utilizando una ADN T4 ligasa. Una vez ligado el vector este fue clonado en células de *Pichia pastori* donde se produjo la expresión de la proteína con metanol como inductor a las 72 horas de inducción. Por otra parte, se estudió su actividad enzimática, obteniéndose actividad proteasa en presencia de buffer Fosfato pH 7.2, siendo característico en las proteasas tipo Serín Proteasas.

La expresión de la proteína Tv70CatL en el sistema eucariota presentó un bajo rendimiento. Por ello, se buscó optimizar su expresión en un organismo procariota para aumentar los niveles de expresión de la misma. Además, se quiso estudiar si la proteína

quimera cuyo gen presenta una región que codifica para la región catalítica de la Cp conservaba su actividad enzimática dentro del sistema bacteriano.

2. OBJETIVOS

Objetivo general

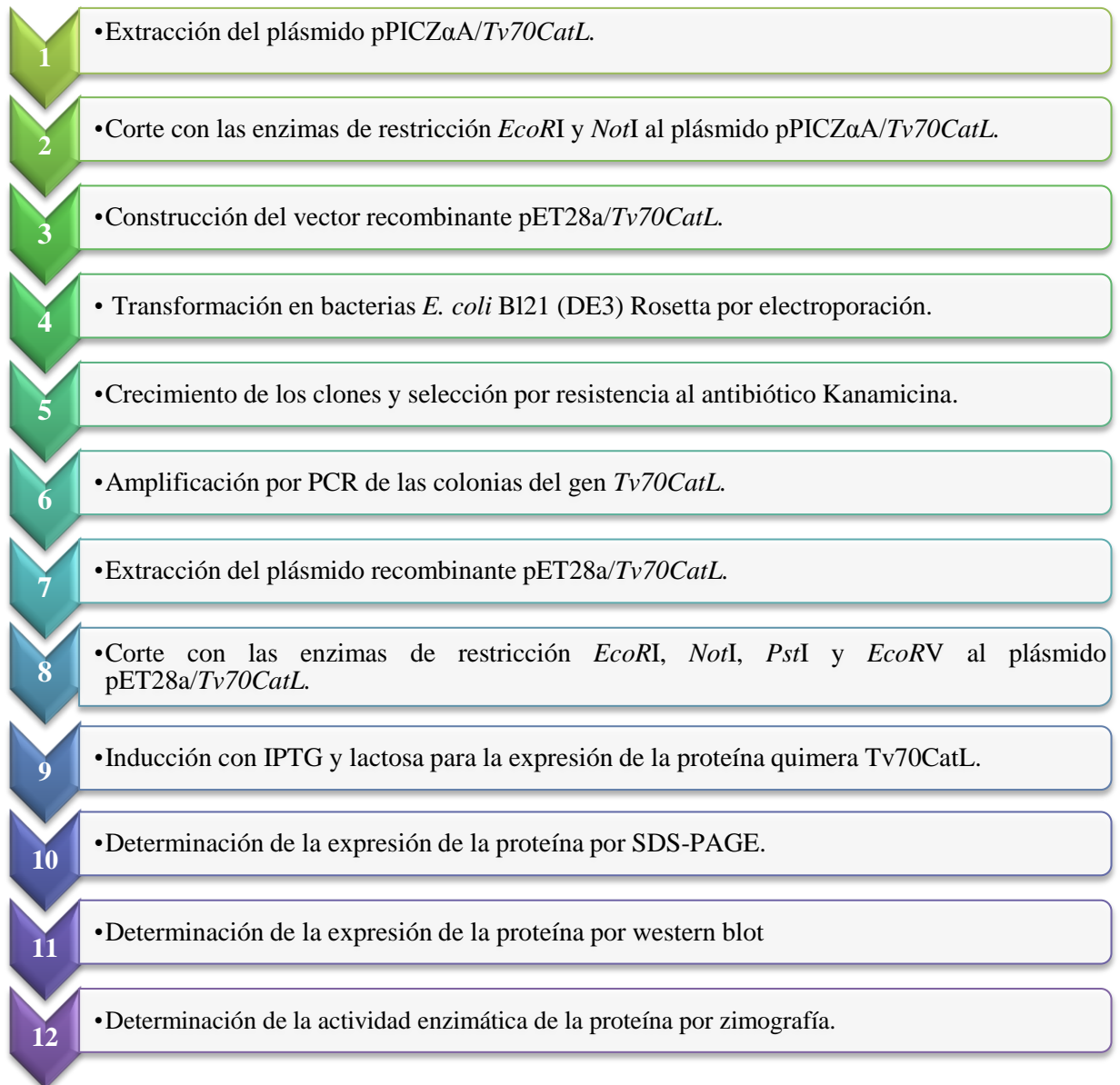
- Clonar y expresar la proteína quimera *Tv70CatL* en un sistema bacteriano.

Objetivos Específicos

1. Obtener y clonar el gen quimera *Tv70CatL* en el vector de expresión pET28a.
2. Verificar la presencia del gen *Tv70CatL* por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y por corte con enzimas de restricción.
3. Expresar el gen *Tv70CatL* para la obtención de la proteína quimera en un sistema bacteriano.
4. Realizar SDS-PAGE para detectar la expresión de la proteína *Tv70CatL*.
5. Evaluar la posible actividad enzimática por medio de Zimografía.

3. METODOLOGÍA

3.1 Esquema de la metodología general empleada para la clonación y expresión de la proteína:



3.2 Material Biológico

➤ **Cepa *Escherichia coli* Top10:** Genotipo F⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu) 7697 galE15 galK16 rpsL (Str^R) endA1 nupG (Invitrogen).

➤ **Cepa *Escherichia coli* BL21 (DE3) Rosetta:** F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm lacY1(DE3) pRARE (Cm^R) (Novagen).

3.3 Vector de expresión pET28a

Contiene una secuencia que codifica para seis histidinas que quedan unidas mediante un enlace peptídico a la región amino terminal de la proteína celular después de la traducción. Además, contiene un gen que le confiere resistencia al antibiótico kanamicina. Este vector se encuentra regulado por el promotor para la ARN polimerasa del Bacteriófago T7.

3.4 Gen *Tv70CatL*

El clon del gen quimera *Tv70CatL*, está constituido por una región de 756 pb *Hsp70*₃₅₉₋₆₁₀, la cual incluye al dominio de unión al péptido de la *Hsp70* y por la región catalítica de la *Cistein proteasa* de *T.vivax* (681 pb) (Figura 4), transformado en células de *E. coli* TOP10 con el vector de expresión para levaduras pPICZαA (colonia C₃V₁) (pPICZαA (C₃V₁)/ *Tv70CatL*) mantenidas en el Laboratorio de Biología Molecular de Parásitos ubicado en el Instituto de Estudios Científicos y Tecnológicos (González, 2012).



Figura 4. Esquema del gen *Tv70CatL*. Se muestra la construcción del gen quimera *Tv70CatL*. En verde se observa la región de la *Hsp70* y en azul la región de la región catalítica de la *cistein proteasa*, ambas de *T. vivax*. A los extremos se observan las enzimas de restricción empleadas para la ligación con el vector pPICZαA.

3.5 Anticuerpos

➤ Anticuerpo primario

Para la realización del western blot, se utilizó un anticuerpo policlonal mono-específico anti-Hsp70 de *Leishmania braziliensis*, el cual fue obtenido a partir de inmunizaciones en conejos empleando el péptido sintético denominado 678 de 19 aminoácidos, donado gentilmente por el Profesor Tomas Hermoso del Laboratorio de Bioquímica de Parásitos del Instituto de Medicina Tropical ubicado en la Universidad Central de Venezuela.

➤ Anticuerpo Secundario

El anticuerpo secundario utilizado fue un anti-conejo conjugado a peroxidasa de Laboratorios Jackson ImmunoResearch.

3.6 Extracción del plásmido pPICZαA/Tv70CatL

Para la extracción del plásmido se empleó el método de lisis alcalina propuesto por Birnboim y col. (1979) modificado. Inicialmente, partiendo de una colonia aislada (colonia 6); se dejó crecer un cultivo de bacterias *E.coli* Top10 en medio Luria Bertani (*Ver apéndices*) a 37°C en un agitador Max^QTm Mini 4450. Al día siguiente, se evaluó la $DO_{600nm} = 1,5$ medida en un espectrofotómetro Milton Roy Spectronic 1201. Paralelamente, se colocó la solución C (*Ver apéndices*) en hielo y se precalentó 30 µL de H₂O (d) a 65°C por cada muestra a hidratar. Se colocó 1,5 mL de cultivo en un tubo eppendorf y se centrifugó por 1 min a 13.200 *xg* en una centrífuga Thermo Electrón-Corporation GP 5521. Seguidamente, se descartó el sobrenadante y se agregaron 100 µL de solución A (*Ver apéndices*) al precipitado, resuspendiendo las células hasta que la mezcla quedó homogénea y se dejó 5 min a temperatura ambiente.

Posteriormente, se añadieron 200 μL de la solución B (*Ver apéndices*) al tubo con la solución, se mezcló por inversión varias veces y se incubó la mezcla en hielo por 5 min. Seguidamente, se añadieron 150 μL de la solución C (a 4°C) y se incubó la muestra en hielo por 5 min invirtiendo la mezcla unas 8 veces. Se centrifugó la mezcla por 7 min a 13.200 xg y se preparó un tubo con 500 μL de isopropanol por cada muestra realizada. Se transfirió el sobrenadante al tubo eppendorf que contenía los 500 μL de isopropanol y se mezcló por inversión varias veces. Se centrifugó la mezcla por 10 min a 13.200 xg , se descartó el sobrenadante dejando el precipitado lo más seco posible y se añadieron 200 μL de etanol al 95%, realizando una agitación con un vortex ICB VM-2000 para mezclar. Posteriormente, se centrifugó por 5 min a 13.200 xg . Se descartó el sobrenadante y se secó la muestra en un concentrador (LABCONCO) por 5 min.

Una vez seca la muestra se colocó un volumen de 30 μL de agua previamente calentada a 65 °C y se resuspendió suavemente con la pipeta. Seguidamente, se dejó a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente, se colocó 1 μL de ARNasa. Se incubó la muestra por 10 minutos a 37 °C y se almacenó a -20 °C hasta su uso. Las muestras se analizaron en geles de agarosa al 0.8% (Invitrogen, Ultra Pure TM Agarose) el cual contenía 1 μL de SYBR[®] Safe TM DNA gel stain (Invitrogen) por cada 10mL de TAE 1X. La corrida electroforética se realizó a 100 V durante 1 hora. Una vez transcurrido el tiempo de corrida, se observó el gel en un equipo de fotodocumentación (Uviti).

3.6.1 Corte con enzimas de restricción al plásmido pPICZ α A/Tv70CatL

Para extraer el inserto del vector pPICZ α A/Tv70CatL se realizó una digestión con las enzimas *EcoRI* y *NotI*. Para ello, se realizó la mezcla de reacción descrita en la Tabla 1.

Tabla 1. Componentes de la mezcla de reacción para la digestión con enzimas de restricción *EcoRI* y *NotI* del vector pPICZ α A/*Tv70CatL*.

Reactivos	Volumen (μL)
Buffer H	5
BSA	0,5
<i>EcoRI</i>	0,5
<i>NotI</i>	0,5
ADN	20
H ₂ O	23,5
Volumen final	50

La mezcla de reacción se colocó en incubación a 37 °C en un agitador durante 3 horas. Finalmente, se analizaron las muestras en geles de agarosa al 0,8% y se revelaron en un transluminador UV.

3.7 Obtención de los clones pET28a/*Tv70CatL*

La clonación se realizó con el objetivo de producir un gran número de copias del gen que codifica la proteína *Tv70CatL*. Para ello, el gen se insertó en el vector de expresión pET28a formando una molécula recombinante y se incorporó a una célula anfitriona de *E. coli*, donde tuvo lugar la amplificación por replicación del vector recombinante.

3.7.1 Purificación del vector pET28a y del gen *Tv70CatL*

Se purificó el gen y el vector proveniente de la digestión con sus respectivas enzimas de restricción para su posterior ligación, empleando el estuche comercial Wizard^R SV Gel and PCR clean-Up System Promega, cuyos pasos se explican a continuación:

Luego de la electroforesis en geles de agarosa, se escindieron las bandas de ADN (del gen *Tv70CatL* y del vector) del gel y se colocaron en un tubo Eppendorf de 1,5 mL. Se añadió un volumen de 10 μ L de solución de unión de membrana por cada 10 mg del gel. Cada gel fue mezclado e incubado a una temperatura 65 °C hasta que el gel quedó totalmente disuelto. Posteriormente, se insertó una mini columna SV en un tubo

de recolección, transfiriendo la mezcla de gel disuelta, se incubó a temperatura ambiente por 1 min y se centrifugó a 16.000 xg por 1 min. Se descartó el sobrenadante y se reinsertó la columna en el tubo de recolección. Seguidamente, se añadió un volumen de 700 μL de solución de lavado de membrana y se centrifugó a 16.000 xg por 1 min. Se descartó el sobrenadante y se reinsertó la mini columna en el tubo de recolección, luego se añadió 500 μL de solución de lavado de membrana y se centrifugó a 16.000 xg por 5 min.

Posteriormente, se secó la muestra en un concentrador (LABCONCO) por 5 min para evaporar cualquier residuo de etanol y la columna se transfirió a un tubo eppendorf de 1,5 mL y se añadió 50 μL de agua destilada. Se incubó por 1 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 16.000 xg por 1 min. Por último, se descartó la minicolumna y se guardó la muestra a 4 °C.

3.7.2 Reacción de ligación para la formación del vector Recombinante pET28a/*Tv70CatL*

La ligación se realizó entre el inserto *Tv70CatL* y el vector pET28a para formar el vector recombinante pET28a/*Tv70CatL*. El protocolo utilizado para la ligación fue el descrito por la casa comercial Novagen. Para ello, se realizó una mezcla de ligación como se observa en la Tabla 2.

Tabla 2. Componentes de la mezcla de reacción para la ligación entre el vector pET28a y el gen *Tv70CatL*.

Reactivos	Volumen (μL)
Buffer 2X rapid ligation Buffer T4 ADN ligasa	2
Vector pET28a	1
Inserto <i>Tv70CatL</i>	3
T4 ADN ligasa (3U/ μL)	1
H ₂ O estéril	3
Volumen Final	10

La mezcla se incubó a 4 °C durante toda la noche. Finalmente, se analizaron las muestras en geles de agarosa al 0,8% y se observó en un equipo de fotodocumentación (Uviti).

3.7.3 Preparación de las células electrocompetentes de *E. coli* BL21 (DE3)

Para realizar el proceso de transformación en una cepa de *E. coli* BL21 (DE3), se empleó el método de electroporación. Para ello, se hicieron las células electrocompetentes dejando crecer un cultivo de bacterias en 3mL de medio LB en agitación durante toda la noche a 37 °C. Se transfirió un volumen de 3 mL del cultivo en una fiola que contenía 200 mL de medio LB (*Ver apéndices*) y se incubó a 37 °C, hasta alcanzar una $DO_{600nm} = 0,6$.

Posteriormente, se tomaron 4 tubos falcon de 50 mL y se volcó 50 mL del cultivo de la fiola. Se centrifugó a 4.000 xg a 4 °C en una centrifuga Jouan CR312 Systeme Qualite durante 15 min. Seguidamente, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento celular en 45 mL de agua estéril y fría. Se centrifugó a 4.000 xg a 4 °C durante 15 minutos y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió en dos tubos falcon añadiéndole 20 mL de agua y se centrifugó a 4.000 xg a 4 °C durante 15 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 300 μ L de glicerol al 10 %. Finalmente, se guardó en alícuotas de 40 μ L en -80 °C.

3.7.4 Transformación del vector recombinante pET28a/*Tv70CatL* en una cepa de *E. coli*

Una vez obtenidas las células electrocompetentes se procedió a la electroporación colocándose las cubetas y las muestras para electroporar en hielo. Se tomó el ADN proveniente de la mezcla de ligación que se deseaba electroporar, donde la concentración osciló entre 10-30 ng/ μ L. Posteriormente, se prepararon los Eppendorfs con un volumen de 1 mL de medio LB (*Ver apéndices*) para colocarlos en

la cubeta luego de realizar la electroporación. Se mezcló la ligación con un volumen de 40 µL de las células electrocompetentes y se transfirió a la cubeta de electroporación. Seguidamente, se dio un pulso de 1500 V por un tiempo de aproximadamente 2 mseg en el electroporador Eppendorf y al escuchar la alarma del equipo se colocó rápidamente un volumen de 1 mL de LB en la cubeta. Por último, se dejó a 37°C por 1 hora y se sembraron 100 µL del volumen total del electroporado por rastrilleo en placas LB (*Ver apéndices*) con kanamicina y se dejó a 37°C durante toda la noche.

3.7.5 Ensayo de la reacción en cadena de la polimerasa de la colonia recombinante (PCR) de las colonias

Se realizó la reacción en cadena de la polimerasa de las colonias recombinantes con los cebadores *Hsp70*₃₅₉₋₆₁₀F y *TvCatLRcR* construidos por González (2012) (Tabla 3) los cuales se anclan a la región inicial del extremo 5' de la *Hsp70* y una región terminal de la *Cp* dentro de la proteína químera; en un termociclador eppendorf, con el fin de seleccionar las colonias transformadas con el vector y el gen de interés.

Tabla 3. Secuencia de cebadores empleados en la PCR colony.

Cebador	Secuencia
<i>Hsp70</i> ₃₅₉₋₆₁₀ F	5'ATGATGAATCCGGCAAGGAACTGAACAAGAGC 3'
<i>TvCatLRcR</i>	5'AGGAAGCGGCCGCGCCACCAACAACAGCAC 3'

Inicialmente, se seleccionó una colonia recombinante (color blanco) la cual se tomó con la ayuda de un asa de platino y se colocó en la mezcla de reacción preparada como se indica en la Tabla 4 para la PCR de las colonias con los cebadores mencionados anteriormente.

Tabla 4. Componentes de la mezcla de reacción para la amplificación del gen *Tv70CatL* con los cebadores *Hsp70*₃₅₉₋₆₁₀F y *TvCatLRcR*.

Componentes	Concentración Stock	Concentración final	Volumen (μL)
Buffer 1X	5X	1X	5
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	0,75
dNTPs	40 mM	0,2 mM	0,5
Cebador <i>Hsp70</i> ₃₅₉₋₆₁₀ F	10 μM	0,2 μM	0,5
Cebador <i>TvCatLRcR</i>	10 μM	0,2 μM	0,5
H ₂ O	-	-	16,5
ADN	-	-	1
Taq polimerasa	5 U/ μL	1 U/ μL	0,25
Volumen final	-	-	25

Posteriormente, se siguieron las condiciones establecidas en la Tabla 5.

Tabla 5. Programa de ciclado para la PCR de las colonias con los cebadores *Hsp70*₃₅₉₋₆₁₀F/*TvCatLRcR*.

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización	95	5	1
		1	33
Hibridación	64	1	33
Extensión	72°C	2	33
		10	1

Una vez culminada la PCR de las colonias, se realizó una corrida electroforética del producto obtenido en geles de agarosa al 1%, a 100 V durante 30 min y se observó en un equipo de fotodocumentación (Uviti).

3.7.6 Extracción del plásmido pET28a/*Tv70CatL* (Miniprep)

Se realizó la extracción del ADN plasmídico de las 3 colonias que resultaron positivas por PCR de las colonias. La extracción se realizó siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4.6.

3.7.7 Confirmación de la presencia del vector recombinante pET28a/*Tv70CatL* por corte con enzimas de restricción

Por medio del programa NEBcutter (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>) se obtuvieron los mapas de restricción del gen que codifica la proteína *Tv70CatL* y del

vector pET28a. Estos mapas permitieron seleccionar diversas enzimas de restricción como: *EcoRI*, *NotI*, *PstI* y *EcoRV*, para su posterior digestión. Para ello, una alícuota del ADN plasmídico obtenido en la extracción fue añadido con el buffer específico para cada enzima, la enzima de restricción y el agua deionizada. Seguidamente, se incubó la muestra a 37°C durante 3-4 horas.

Por último, se realizó una corrida electroforética del producto obtenido en geles de agarosa al 0,8%, a 100 V durante 1h y se observó en un equipo de fotodocumentación (Uviti). En las Tablas 6, 7 y 8 se observan los componentes de la mezcla de reacción para la digestión del ADN plasmídico con las diferentes enzimas que cortan al vector pET28a y al gen *Tv70CatL*.

Tabla 6. Componentes de la mezcla de reacción para la digestión con las enzimas de restricción *EcoRI* y *PstI* del ADN plasmídico pET28a/*Tv70CatL*.

Reactivos	Volumen (µL)	Reactivos	Volumen (µL)
Buffer H	5	Buffer H	3
BSA	0,5	BSA	0,3
<i>EcoRI</i>	0,5	<i>PstI</i>	0,5
ADN	25	ADN	10
H ₂ O	19	H ₂ O	16,2
Volumen final	50	Volumen final	30

Tabla 7. Componentes de la mezcla de reacción para la digestión con las enzimas de restricción *EcoRV* y *EcoRV/PstI* del ADN plasmídico pET28a/*Tv70CatL*.

Reactivos	Volumen (µL)	Reactivos	Volumen (µL)
Buffer D	3	Buffer E	3
BSA	0,3	BSA	0,3
<i>EcoRV</i>	0,5	<i>EcoRV/ PstI</i>	0,5 c/u
ADN	10	ADN	15
H ₂ O	16,2	H ₂ O	10,7
Volumen final	30	Volumen final	30

Tabla 8. Componentes de la mezcla de reacción para la digestión con la enzima de restricción *EcoRI/NotI* del ADN plasmídico pET28a/*Tv70CatL*.

Reactivos	Volumen (μL)
Buffer H	5
BSA	0,5
<i>EcoRI</i>	0,5
<i>NotI</i>	0,5
ADN	20
H ₂ O	23,5
Volumen final	50

3.8 Expresión de la proteína quimera Tv70CatL con IPTG y Medio de autoinducción

Para realizar la inducción de la expresión de la proteína Tv70CatL se partió de una colonia aislada inoculando 10 mL de medio LB, conteniendo 25 μg/mL del antibiótico kanamicina y cloranfenicol (debido a la presencia del vector pRARE en la bacteria) y se dejó en un agitador durante toda la noche a una temperatura de 37 °C. Al día siguiente se tomó un volumen de 20 mL de medio LB precalentado con 1 mL del cultivo crecido durante toda la noche y se dejó crecer bajo diversas temperaturas de inducción (28, 30 y 37 °C) con agitación constante hasta alcanzar una DO_{600nm} igual a 0,6 medida en un espectrofotómetro Milton Roy Spectronic 1201.

Posteriormente, se tomó una muestra antes de la inducción (control no inducido), se centrifugó y el sedimento se resuspendió en 50 μL de buffer de muestra 1X SDS-PAGE (*Ver apéndices*). Seguidamente, se indujo la expresión mediante la adición de IPTG a una concentración final de 1 mM. Se dejó crecer el cultivo a diferentes tiempos de inducción y se tomó 1 mL de la muestra inducida (control inducido), se centrifugó y se resuspendió en 100 μL de buffer de muestra SDS-PAGE 1X. Posteriormente, se congeló la muestra hasta su uso para el SDS-PAGE.

Por otra parte, se realizó la expresión de la proteína con medio de autoinducción. Para ello, se dejó crecer un cultivo bacteriano que presenta el vector con el gen de resistencia a kanamicina, partiendo de una colonia aislada inoculando 10 mL de medio LB conteniendo 25 µg/mL del antibiótico kanamicina y cloranfenicol y se dejó en un agitador durante toda la noche a una temperatura de 37 °C.

Al día siguiente, se tomó un volumen de 50 mL del medio de autoinducción (*Ver apéndices*) precalentado con 5 mL del cultivo crecido durante toda la noche y se dejó crecer a 28 °C con agitación constante y se dejó crecer el cultivo durante 24, 48 y 72 horas de inducción y se tomó 1 mL de la muestra inducida (control inducido) para cada tiempo, se centrifugó y se resuspendió en 100 µL de buffer de muestra SDS-PAGE 1X. Por último, se congeló la muestra hasta su uso para el SDS-PAGE.

3.8.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La separación de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS se realizó de la siguiente manera: Se ensambló un equipo Mini-Protean que consta de soportes, vidrios y separadores proveniente de la casa comercial Bio-Rad®. Posteriormente, se preparó el gel de corrida al 10% agregando a la mezcla de reacción acrilamida 30%, Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; SDS 10%, persulfato de amonio 10% y TEMED (*Ver apéndices*). El gel de apilamiento se preparó con acrilamida 30%, Tris-HCl 1M pH 6,8; SDS al 10%, persulfato de amonio al 10% y TEMED (*Ver apéndices*). Como solución tampón de corrida se utilizó una solución Buffer 1X con un pH 8,3 aproximadamente (*Ver apéndices*).

La electroforesis se llevó a cabo bajo un voltaje constante de 25 mA durante 1 h. Después de la separación de las proteínas, el gel se sumergió en una solución de azul de Coomassie R-250 (Bio-Rad/EUA) (*Ver apéndices*) en agitación durante 3 h a

temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de coloración, el gel se sumergió en una solución decolorante (*Ver apéndices*) hasta que las bandas de proteínas aparecieron azules en un fondo transparente.

3.9 Detección de la proteína Tv70CatL por Western blot

Para realizar el western blot se siguió el siguiente protocolo: Inicialmente, se cortó papel de nitrocelulosa con las medidas del gel de electroforesis. Se humedecieron los filtros y el papel de nitrocelulosa con el buffer de transferencia (*Ver apéndices*). Una vez realizada la corrida electroforética SDS-PAGE, se realizó el apilamiento o sándwich en el siguiente orden, partiendo desde el electrodo negativo hacia el positivo: Esponja, filtro, gel, papel de nitrocelulosa, filtro y esponja.

El sistema de transferencia se corrió a 75 mAmp en una unidad de transferencia semi-seca Amersham BIOSCIENCES modelo TE 70 durante 30 min. Transcurrido el tiempo, se recortó en tiras o cintas verticales el papel de nitrocelulosa para mantener el patrón de las bandas proteicas y se colocó en pocillos separados.

Posteriormente, se bloquearon las transferencias añadiendo un volumen de solución de saturación al 5% (*Ver apéndices*), suficiente para cubrir la muestra y se incubó por 1 h a temperatura ambiente en agitación suave y constante. Transcurrido el tiempo, se descartó la solución de saturación y se realizaron 3 lavados con agitación suave y constante de 5 min c/u con solución PBS-T (*Ver apéndices*). Seguidamente, se incubó la muestra por 1 h en agitación suave y constante con el anticuerpo primario (Anti-Hsp70) diluido 1/200 con solución de saturación al 1% (*Ver apéndices*).

Posteriormente, se realizaron 5 lavados sucesivos con agitación suave y constante de 5 min c/u con solución PBS-T. Se incubó la muestra por 1 h en agitación suave y constante con el anticuerpo secundario (Anti-conejo) diluido 1/5000 con solución de saturación al 1%. Se descartó la solución anterior y se realizaron 3 lavados

sucesivos con agitación suave y constante de 5 min c/u con solución PBS-T, descartando el último lavado. Se añadió suficiente solución reveladora TMB 10X (Calbiochem) a cada transferencia y se incubó en agitación constante hasta que se observaron las bandas de interés. Finalmente, se descartó la solución anterior y se realizó un lavado con agua bidestilada y se secó la transferencia en estufa a 37 °C colocadas en papel de filtro.

3.9.1 Análisis de las secuencias Tv70CatL y el anticuerpo 678

Para determinar la homología entre la secuencia de la proteína quimera Tv70CatL y la secuencia del péptido sintético 678 anti-Hsp70 se realizó un análisis *in silico* colocando las secuencias en la base de datos del servidor National of Biotechnology Information, por medio del uso del programa BLAST.

Tabla 9. Secuencia aminoacídica del péptido sintético 678 anti-Hsp70.

Péptido	Secuencia
678	NHITITNDKGRLSKDEIER

3.10 Actividad enzimática por Zimografía

Se evaluó la actividad gelatinasa de la proteína Tv70CatL por medio de zimografía a partir de sobrenadantes provenientes de cultivos de *E. coli* transformados con el vector pET28a. Inicialmente se lisaron las células de *E. coli* para la liberación de todo el material intracelular, incluyendo la proteína de interés, utilizando un método de lisis por congelamiento y descongelamiento de las células. Para ello se tomó 1,5 mL del cultivo y se centrifugó por 5 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 200 µL de Buffer Tris-HCl pH 7,5 (*Ver apéndices*). Se incubó la muestra durante 30 segundos a -70 °C y se descongeló a aproximadamente 37 °C por 30 segundos. Esto se realizó 10 veces sucesivamente. Posteriormente, se centrifugó la muestra y el sobrenadante se resuspendió en 200 µL de buffer de carga sin β-

mercaptoetanol y sin calentamiento. Se sembró 20 μ L de las muestras en un gel de poliacrilamida al 10% que contenía gelatina al 0,1%. La electroforesis se llevó a cabo a 100 V por 60 min a 4°C.

Posteriormente, los geles fueron lavados 3 veces con agua destilada e incubados por 30 min con buffer Tris HCL 0,1M pH 8,8; en presencia de Triton X-100 al 1% (*Ver apéndices*), con agitación y a temperatura ambiente. Luego, se realizaron tres lavados con agua destilada y se incubó el gel en buffer Tris HCL 0,1M pH 8,8 (*Ver apéndices*) durante 30 min en agitación a temperatura ambiente. Seguidamente, se realizó 3 lavados con agua destilada y se incubó el gel con buffer de activación buffer fosfato pH 7, buffer citrato pH 3, buffer citrato pH 4,2; buffer carbonato-bicarbonato pH 9,6 (*Ver apéndices*) en presencia y ausencia de de L-cisteína 25 mM y CaCl₂ 2,5 mM (*Ver apéndices*) durante 3 y 6 horas a 37 °C. Los geles fueron teñidos con azul de coomassie R-250 durante toda la noche y posteriormente fueron desteñidos con una solución decolorante.

4. RESULTADOS

4.1 Extracción del plásmido pPICZ α A/*Tv70CatL*

Para la obtención del gen de interés *Tv70CatL* se aisló a partir de un cultivo de la colonia transformante C₃V₁ en células TOP10 el ADN plasmídico pPICZ α A/*Tv70CatL*. La integridad del ADN plasmídico fue evaluado por medio de una electroforesis en geles de agarosa, observándose en el carril 2 (Figura 5) el patrón del ADN correspondiente a la colonia C₃V₁.

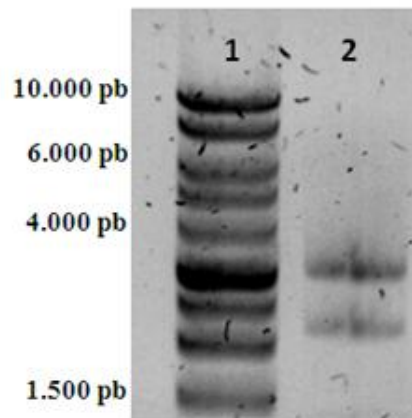


Figura 5. Integridad del ADN plasmídico pPICZ α A/*Tv70CatL*. Corrida electroforética al 0,8% de agarosa en buffer TAE 1X teñido con SYBR safe, mostrando un patrón de ADN plasmídico. Carril 1: MPM: 1 Kb (Promega); carril 2: ADN plasmídico de la colonia C₃V₁.

4.2 Obtención del gen *Tv70CatL* por corte con enzimas de restricción al plásmido pPICZ α A/*Tv70CatL*

La figura 6A (carril 2) muestra la digestión del plásmido pPICZ α A/*Tv70CatL* con las enzimas de restricción *EcoRI* y *NotI* para la liberación del fragmento de interés, observándose una banda de 1.456 pb que corresponde al gen *Tv70CatL* y una banda de 3.600 pb correspondiente al tamaño del vector pPICZ α A, de acuerdo a lo descrito en el mapa del vector (Figura 6B).

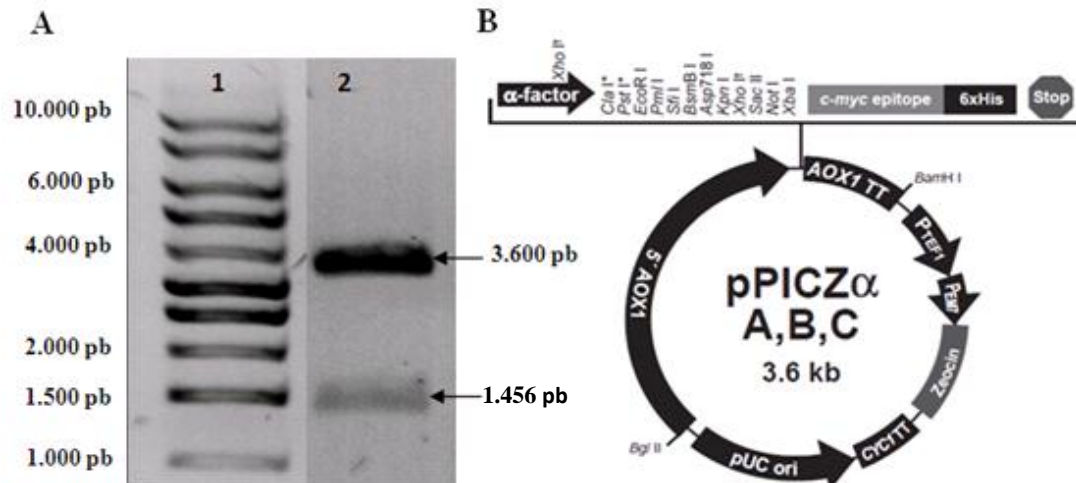


Figura 6. Digestión del ADN plasmídico pPICZ α A/Tv70CatL con *EcoRI* y *NotI*. Corrida electroforética al 0,8% de agarosa en buffer TAE 1X teñido con SYBR safe, mostrando los fragmentos generados por el corte con las enzimas de restricción. Carril 1: MPM: 1 Kb (Axygen); carril 2: producto de la digestión del ADN plasmídico. B) Mapa del vector pPICZ α A (3.6 kb).

4.3 Obtención de colonias recombinantes

El gen *Tv70CatL* fue ligado al vector pET28a por medio de una ADN T4 ligasa a una proporción 1:3 formando el vector pET28a/*Tv70CatL*. Una vez obtenido el producto ligado se realizó la transformación en *E. coli* cepa BL21 (DE3) Rosetta. Se observa la transformación bacteriana en la placa A (Figura 7).

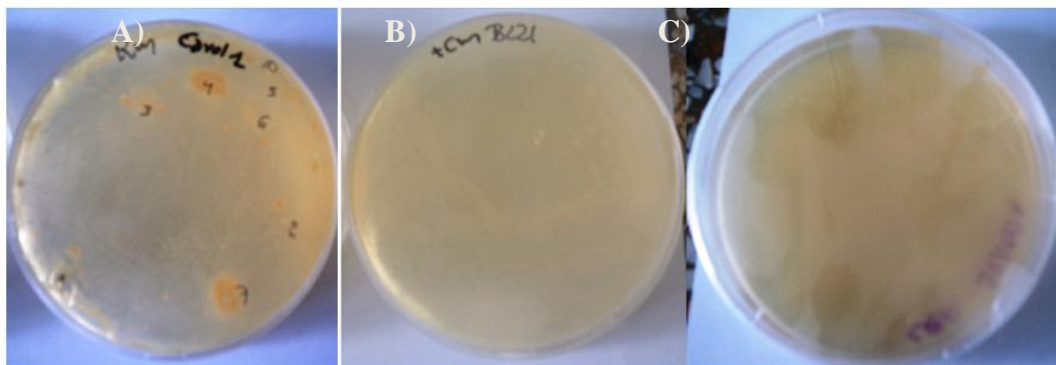


Figura 7. Transformación en *E. coli* BL21 (DE3), pET28a/*Tv70CatL*. Placas de agar LB suplementadas con 50 µg/mL de kanamicina y cloranfenicol. A) Colonias transformantes. B) Control positivo. C) Control negativo.

4.3.1 Determinación de la presencia del gen *Tv70CatL* por PCR de las colonias

Por medio de una PCR se verificó la presencia del gen *Tv70CatL* en 3 de las 8 colonias blancas obtenidas (Figura 8, carriles 3, 6 y 7), observándose una banda de 1469 pb. Las colonias fueron denominadas 5, 8 y 9 respectivamente.

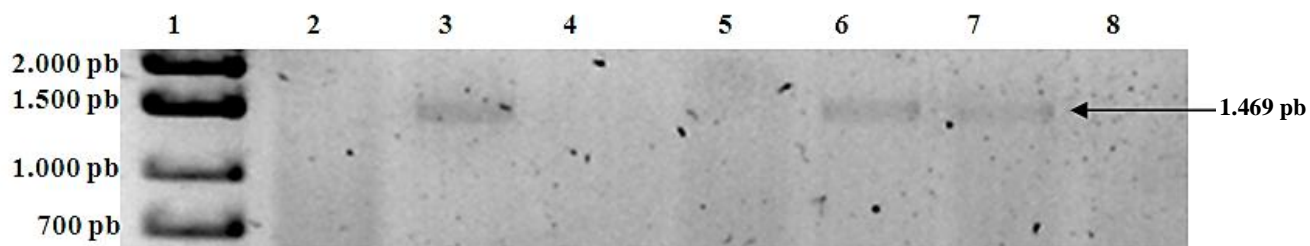


Figura 8. PCR de las colonias del vector recombinante pET28a/*Tv70CatL*. Corrida electroforética en gel de agarosa al 0,8% de agarosa en buffer TAE 1X teñido con SYBR safe, mostrando los productos de amplificación por PCR empleando los cebadores *Hsp70*₃₅₉₋₆₁₀/*TvCatL*ReR. Carril 1: MPM: 1Kb (Axygen); carril 2: ADN de la colonia 4; carril 3: ADN de la colonia 5; carril 4: ADN de la colonia 6; carril 5: ADN de la colonia 7; carril 6: ADN de la colonia 8; carril 7: ADN de la colonia 9; carril 8: H₂O.

4.4 Extracción del plásmido pET28a/*Tv70CatL*

Se realizó la extracción del ADN plasmídico de las colonias 5, 8 y 9. La integridad del ADN plasmídico fue evaluada por medio de una electroforesis en geles de agarosa. En la figura 9 se observa el patrón del ADN plasmídico de las colonias 5, 8 y 9 respectivamente (carriles 1, 2 y 3).

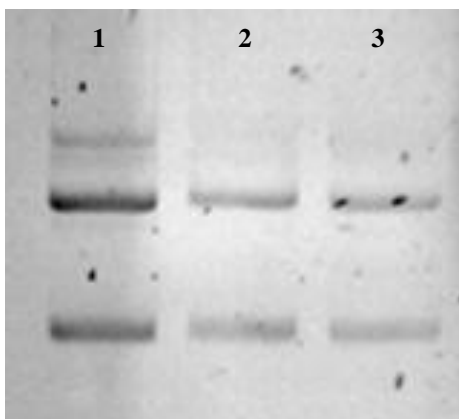


Figura 9. Integridad del ADN plasmídico pET28a/*Tv70CatL* de las colonias 5, 8 y 9. Corrida electroforética en gel de agarosa al 0,8% de agarosa en buffer TAE 1X teñido con SYBR safe. Carril 1: ADN plasmídico de la colonia 5; carril 2: ADN plasmídico de la colonia 8; carril 3: ADN plasmídico de la colonia 9.

4.4.1 Corte con enzimas de restricción al vector pET28a/*Tv70CatL*

Para verificar la presencia del gen y del vector dentro de la célula huésped *E. coli* se realizó la digestión con la enzima *EcoRI* al vector pET28a/*Tv70CatL* de cada una de las 3 colonias, observándose una banda de 6.793 pb producto de la suma del vector pET28a con el inserto *Tv70CatL* (Figura 10; carriles 2, 3 y 4).

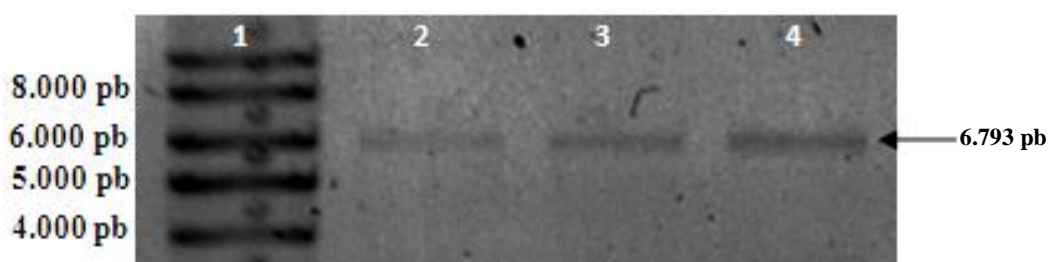


Figura 10. Digestión del ADN plasmídico pET28a/*Tv70CatL* con la enzima *EcoRI*. Corrida electroforética en gel de agarosa al 0,8% de agarosa en buffer TAE 1X teñido con SYBR safe. Carril 1: MPM: 1 Kb (Axygen); carril 2: digestión del ADN plasmídico colonia 5; carril 3: digestión del ADN plasmídico colonia 8; carril 4: digestión del ADN plasmídico colonia 9.

Por medio de un análisis *in silico* con el programa NebCutter se obtuvo que la enzima *PstI* y *EcoRV* presenta un solo sitio de corte en la región interna del gen *Tv70CatL* (Figura 11) y el vector pET28a (Figura 12) respectivamente. El producto de la digestión con ambas enzimas muestra una banda de 6.793 pb correspondiente al tamaño del vector pET28a/*Tv70CatL* de forma lineal (Figura 13A, carril 2; Figura 13B, carril 2).

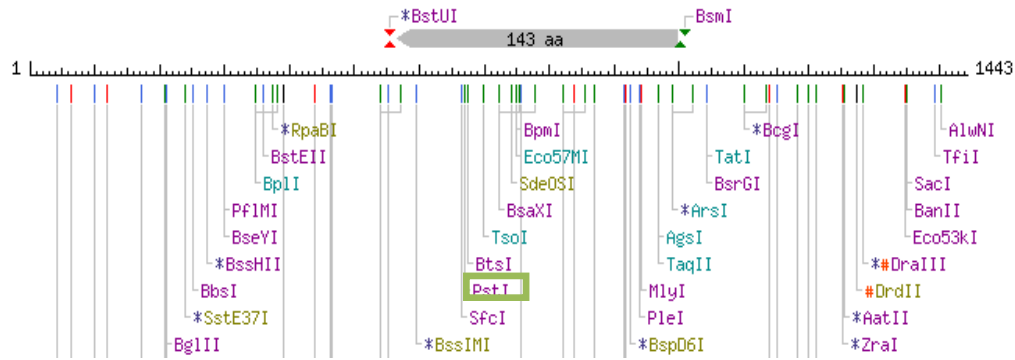


Figura 11. Mapa de restricción del gen *Tv70CatL* utilizando el programa *NebCutter*. Letras moradas: enzimas comerciales para NEB; letras verdes: enzimas no comerciales; letras azules: enzimas de otro fabricante; flechas azules: extensión extremo 5'; flechas rojas: corte extremos romo; flechas verdes: extensión 3'; asteriscos azules: corte afectado por una metionina CpG y numeral rojo: corte afectado por otra metionina. Se señala con un recuadro verde la enzima de restricción seleccionada para la digestión.

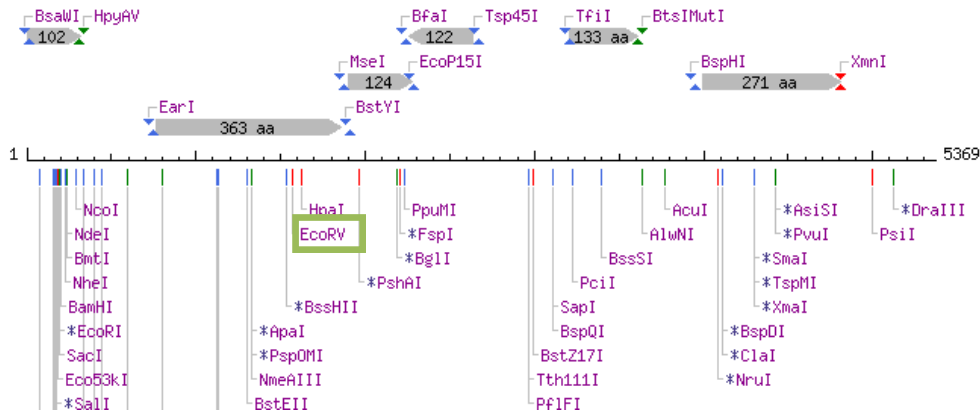


Figura 12. Mapa de restricción del vector *pET28a* utilizando el programa *NebCutter*. Letras moradas: enzimas comerciales para NEB; flechas azules: extensión extremo 5'; flechas rojas: corte extremos romo; flechas verdes: extensión 3'; asteriscos azules: corte afectado por una metionina CpG y numeral rojo: corte afectado por otra metionina. Se señala con un recuadro verde la enzima de restricción seleccionada para la digestión.

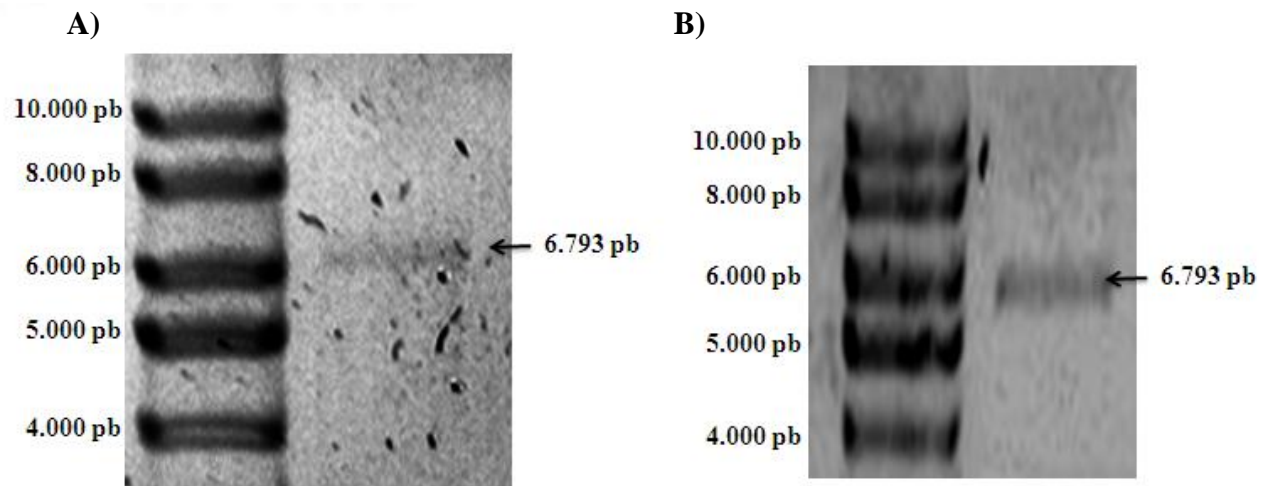


Figura 13. Digestión del ADN plasmídico pET28a/Tv70CatL con las enzimas *EcoRV* y *PstI*. Corrida electroforética en gel de agarosa al 0,8% de agarosa en buffer TAE 1X teñido con SYBR safe, mostrando los fragmentos generados por la digestión con las enzimas de restricción. A) Digestión con *EcoRV*. Carril 1: MPM: 1 Kb (Axygen); carril 2: producto de la digestión con *EcoRV* del ADN plasmídico de la colonia 5. B) Digestión con *PstI*. Carril 1: MPM: 1 Kb (Axygen); carril 2: producto de la digestión con *EcoRV* del ADN plasmídico de la colonia 5.

En la combinación del corte con ambas enzimas *EcoRV* y *PstI* se observó una banda de 4.740 pb y una de 2.053 pb (Figura 14; carril 3). En el carril 2 se observa el ADN plasmídico sin digerir.

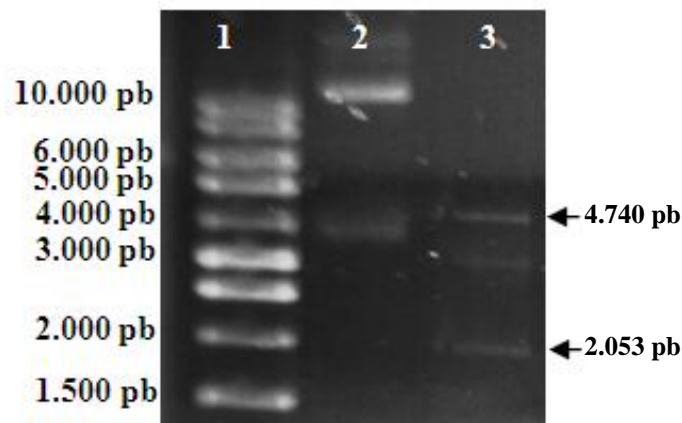


Figura 14. Digestión del ADN plasmídico pET28a/Tv70CatL con las enzimas *PstI* y *EcoRV*. Corrida electroforética en gel de agarosa al 0,8% de agarosa en buffer TAE 1X teñido con SYBR safe. Carril 1: MPM: 1 Kb (Axygen); carril 2: ADN plasmídico recombinante de la colonia 5 sin digerir; carril 3: producto de la digestión del ADN plasmídico de la colonia 5.

La figura 15 muestra la digestión con las enzimas de restricción *EcoRI* y *NotI* para la liberación del inserto *Tv70CatL* de la colonia 5, observándose una banda de

5350 pb y una banda de 1.443 pb (carril 3) correspondiente al vector de expresión pET28a y al gen *Tv70CatL* respectivamente.

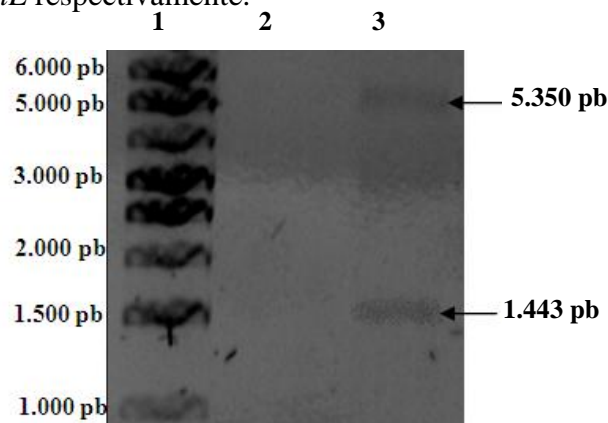


Figura 15. Digestión del ADN plasmídico pET28a/*Tv70CatL*, con las enzimas *EcoRI* y *NotI*. Corrida electroforética en gel de agarosa al 0,8% en buffer TAE 1X teñido con SYBR safe. Carril 1: MPM: 1 Kb (Axygen); carril 2: vacío; carril 3: producto de la digestión del ADN plasmídico de la colonia 5.

4.5 Expresión de la proteína *Tv70CatL*

Una vez verificado el proceso de clonación del gen *Tv70CatL* se procedió a su expresión en un sistema bacteriano. Bajo condiciones de una densidad celular $DO_{600nm}=0,6$; concentración de IPTG 1mM y una temperatura de inducción de 30 °C no se observó diferencia de expresión en la colonia 5 recombinante durante las 0, 1, 3 y 8 horas de inducción (Figura 16; carriles 3, 4, 5 y 6) con respecto a la expresión de la cepa silvestre B121 (carril 2). Se esperaba observar la proteína con un peso aproximado de 55 kDa.

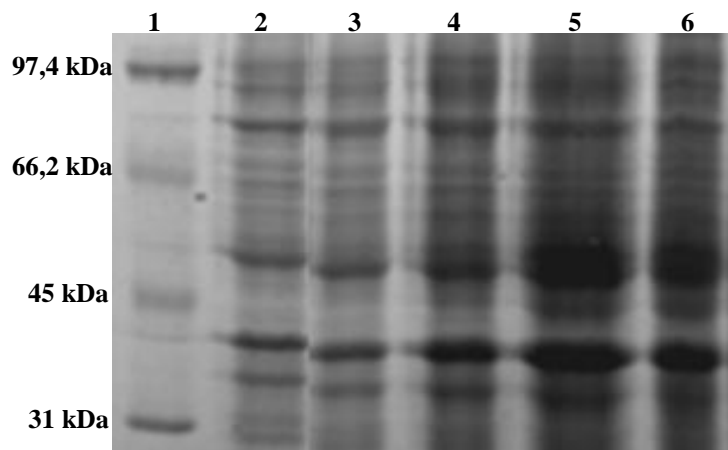


Figura 16. Expresión de la proteína Tv70CatL a 30 °C, 1mM de IPTG. Electroforesis SDS-PAGE (10% de acrilamida) teñido con azul de coomassie R-250. Carril 1: MPM low range 97kDa (Biorad); carril 2: cepa silvestre BI21; carril 3: colonia recombinante 5 no inducida (0 hora); carril 4: colonia recombinante 5 inducida (1 hora); carril 5: colonia recombinante 5 inducida (3 horas); carril 6: colonia recombinante 5 inducida (8 horas).

Al realizar la inducción de la proteína Tv70CatL bajo condiciones de autoinducción a una temperatura de 28 °C no se observó diferencias de expresión entre la cepa silvestre (Figura 17; carril 2) y la colonia 5 recombinante a las 24, 48 y 72 horas de inducción (carriles 3, 4 y 5). Se esperaba observar la proteína con un peso aproximado de 55 kDa.

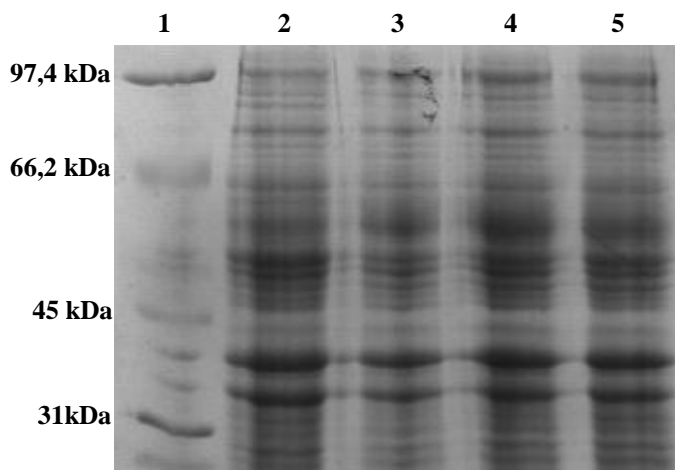


Figura 17. Expresión de la proteína Tv70CatL a 28 °C con medio de auto-inducción. Electroforesis SDS-PAGE (10% de acrilamida) teñido con azul de coomassie R-250. Carril 1: MPM low range 97kDa (Biorad); carril 2: cepa silvestre BI21; carril 3: colonia recombinante 5 inducida (24 horas); carril 4: colonia recombinante 5 inducida (48 hora); carril 5: colonia recombinante 5 inducida (72 horas).

4.6 Detección de la expresión de la proteína quimera Tv70CatL por Western blot

Para detectar la expresión de la proteína Tv70CatL se procedió a realizar un Western blot con un anticuerpo anti-Hsp70, analizando la expresión en diferentes tiempos de inducción con IPTG y lactosa. En la figura 18 se observa una banda de aproximadamente 55 kDa correspondiente a la colonia recombinante 5 inducida a 30 °C bajo 1mM de IPTG (carril 7) y a 28 °C bajo condiciones de autoinducción (carril 9), la cual no se observa en la cepa silvestre B121 (carril 2). Además, se observa una banda de 70 kDa en todas las muestras que posiblemente corresponda al tamaño de la Hsp70 de *E. coli*, ya que esta chaperona es común entre diversos organismos.

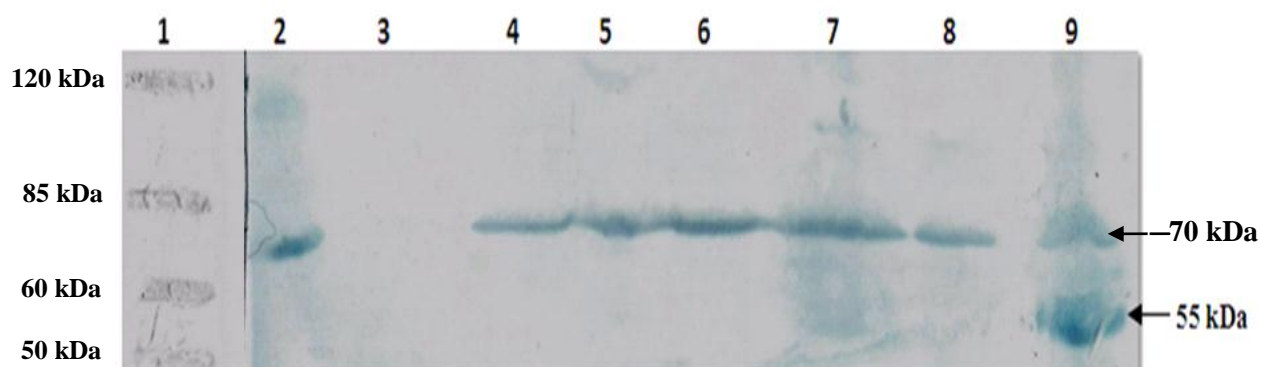


Figura 18. Western blot de la proteína quimera Tv70CatL. Carril 1: MPM Preteñido: 190 kDa (Invitrogen); carril 2: cepa silvestre B121 (DE3) Rosetta; carril 3: vacío; carril 4: colonia recombinante 5 inducida a 20°C; carril 5: colonia recombinante 5 inducida a 27 °C; carril 6: colonia recombinante 5 inducida a 28 °C; carril 7: colonia recombinante 5 inducida a 30 °C; carril 8: colonia recombinante 5 inducida a 37 °C, carril 9: colonia recombinante 5 inducida a 28 °C bajo condiciones de autoinducción.

4.6.1. Análisis de las secuencias por bioinformática

El alineamiento entre la secuencia del péptido sintético 678 (anti-Hsp70) y la secuencia de la proteína Tv70CatL arrojó un porcentaje de identidad del 84% entre ellas. En la figura 19 se muestra el alineamiento entre ellas, observándose reconocimiento de la secuencia que codifica al anticuerpo entre el aa 148 al aa 166 de la secuencia de la proteína Tv70CatL (color azul) correspondiente a la región de la Hsp70

dentro de la químera con el péptido sintético 678 anti-Hsp70 (color rosado). Además, se observan sustituciones de 3 aa del anticuerpo que no coinciden con los aa de la secuencia aminoacídica de la proteína (color amarillo).

GGCAAGGAACTGAACAAGGCATCAAC	
G K E L N K S I N	40
CCCAGCAGGCTGTGGCGTACGGCGCGGGTTCAGGCCCTTCATCTGACCGGCGGCAAG	
P D E A V A Y G A A V Q A F I L T G G K	60
AGCAAGCAGACGGAGGGCCTGCTGCTGCTGGACGTGGCTCCGCTGACGCTTGGCATTGAG	
S K Q T E G L L L L D V A P L T L G I E	80
ACGGCTGGCGGCGTCAAGCGCACTGATCAAGCGCAACACAACGATCCCAACCAAGAAG	
T A G G V M T A L I K R N T T I P T K K	100
AGCCAGATCTTTCCACATACGCGGACAACCAGCCCGGTGTCACATCCAGGTCTTCGAG	
S Q I F S T Y A D N Q P G V H I Q V F E	120
GGTGAGCGGCCATGACGAAGGACTGCCACCTGCTGGGCACGTTTCGACCTCTCCGGCATT	
G E R A M T K D C H L L G T F D L S G I	140
CCCCCGGCGCGCGCGGCTCCCGCAGATCGAGGTGACCTCCGACCTGAACGCGGACGGC	
P P A P R G V P Q I E V T S D L N A D G	160
ATTCTGAGTGTCTCTGCGGAGGAGAAGGGAAGTGGAAAGCGCAACAGATTGTTATCAG	
I L S V S A E E K G T G K R	180
N Q I V I T	
N H I T I T	
AACGACAAGGGACGCCTGAGCAAGGCTGAGATTGAGCGCATGGTGAACGACGCGGCAAG	
N D K G R L S K A E I E R M V N D A A K	200
N D K G R L S K D E I E R	
TACGAGGCGCAGGACAAGGCCAACGTGAGCGCGTAGATGCCAAGAACCGGTTGGAGAAC	
Y E A Q D K A Q R E R V D A K N A L E N	220
TACGCTTCTCGATGAAGAGCACCGCAACTGACCCGAACGTCGGTGGCAAGCTGGACGAG	
Y A F S M K S T A T D P N V G G K L D E	240
GCCGACAAGAACGATCATCGAGGCCGTGGACGGCGCCCTGCAGTGGTTGAGCAATAAC	
A D K N T I I E A V D G A L Q W L S N N	260
CAGGAGGCCAGCAAGGAGGACTACGAGCACCCGAGGAGCTGGAGGGTGTGTGCAGG	
Q E A S K E E Y E H R Q K E L E G V C T	280
CCCATACTAGTGTGAGGACGCTGGTGCAGGTGCCCGCGGGCAAGGCGCCCGCCGCC	
P I M T S V R T L V Q V P P G K A P A A	300
GTGGACTGGCGCCGCAAGGGTGCGGTGCAGCCCGTCAAGGACCAGGGCACCTGCGGCTCC	
V D W R R K G A V T P V K D Q G T C G S	320
TGCTGGTCTTCTCCGCCATTGGGAACATCGAGGGCCAGTGGCGGCTGCCGCAACCCG	
C W S F S A I G N I E G Q W A A A G N P	340
CTGACGAGTCTGTGCGGACAGATGCTTGTGTCGTGCGATTTCAGGACAATGGGTGCGGT	
L T S L S E Q M L V S C D F K D N G C G	360
GGTGGTTTCATGGACAACGCATTTCGAGTGGATCGTGAAGGAGAACAGTGGCAAGGTGTAC	
G G F M D N A F E W I V K E N S G K V Y	380
ACGGAGAAGAGCTATCCCTACGTCTCGGAGGACGGTAGTAAGCCGTTCTGTATTCCTTAC	
T E K S Y P Y V S E D G S K P F C I P Y	400
GGGCACGAGGTCGGTGCACGATCACCGGCCACGTGGACATCCCGCACGACGAGGACGCC	
G H E V G A T I T G H V D I P H D E D A	420
ATCGCCAAGTACCTCGCCGACAACGGCCCGTCCGCTGTGGCGTGGACGCCACCACCTTC	
I A K Y L A D N G P V A V A V D A T T F	440
ATGTCGTACAGTGGCGGTGTGGTGACGTCTGCACCTCCGAGGCGCTGAACCACGGCGTG	
M S Y S G G V V T S C T S E A L N H G V	460
CTCCTCGTCCGCTACAACGACAGCAAGCCCGCTACTGGATCATCAAGAAGTCTGTGG	
L L V G Y N D S S K P P Y W I I K N S W	480
AGCTCGTCTGGGGCAGAAAGGGCTACATCCGCATCGAGAAGGGCACGAATCAGTGTCTG	
S S S W G E K G Y I R I E K G T N Q C L	500

Figura 19. Alineación entre el péptido sintético 678 y la proteína Tv70CatL, utilizando el programa BLAST. Secuencia nucleotídica y aminoacídica de la Tv70CatL. En negrita e itálicas se representa la región de la HSP70₃₅₉₋₆₁₀. En letras negras se representa la región catalítica de la Cisteína proteasa y en azul se encuentra la región de reconocimiento del gen Tv70CatL por el anticuerpo anti-Hsp70 (Rosado).

4.7 Actividad enzimática por zimografía

Una vez obtenida la proteína Tv70CatL se evaluó su actividad gelatinasa por medio de una zimografía, sometiendo las muestras a diferentes pH en presencia y ausencia de los activadores L-Cys y CaCl₂. En la incubación con buffer citrato pH 3 durante 6 horas no se observó actividad gelatinasa en la cepa silvestre B121 (Figura 20; carril 2 y 5), ni en la colonia 5 inducida (carriles 3 y 6); mientras que en el extracto de *T. evansi* en presencia de los activadores se observó actividad gelatinasa (carril 4).

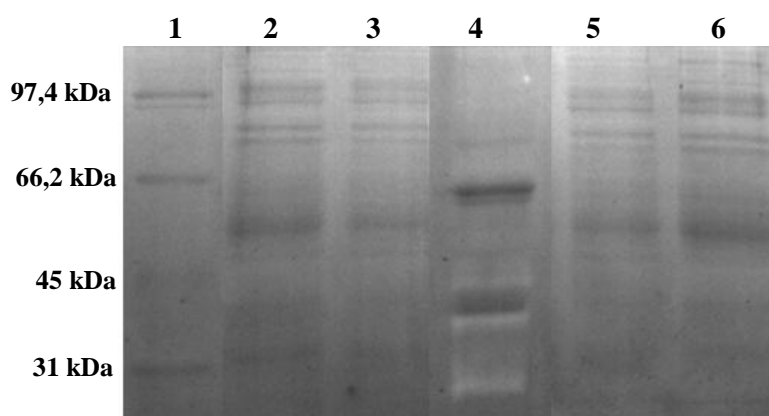


Figura 20. Zimografía de la proteína Tv70CatL a pH 3 durante 6 horas. Electroforesis SDS-PAGE al 12% de acrilamida con gelatina al 0,1% teñido con azul de coomassie R-250 mostrando la actividad gelatinasa de la proteína incubadas en buffer citrato pH 3 en ausencia y presencia de los activadores CaCl₂ y L-Cys a 37 °C durante 6 horas. Carril 1: MPM low range 97kDa (Biorad); carril 2: cepa silvestre B121 sin activadores; carril 3: colonia 5 inducida sin activadores; carril 4: extracto de *T. evansi* con activadores; carril 5: silvestre B121 con activadores; carril 6: colonia 5 inducida con activadores

En la incubación con buffer citrato pH 4,2 en ausencia y presencia de los activadores durante 3 horas no se observó actividad gelatinasa en la cepa silvestre B121 (Figura 21; carril 3 y 6) ni en la colonia 5 inducida (carriles 4 y 7); mientras que en el extracto de *T. evansi* en ausencia de los activadores se observó actividad gelatinasa (carril 2) la cual incrementó en presencia de dichos activadores, observándose una banda de 28 kDa aproximadamente (carril 5; control positivo).

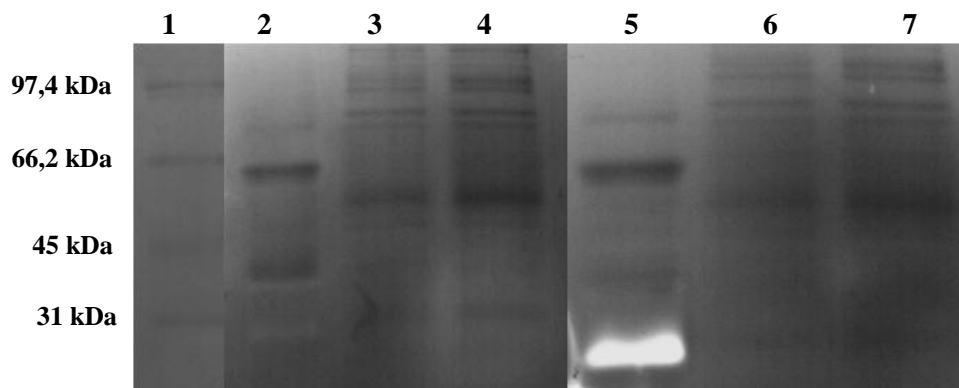


Figura 21. Zimografía de la proteína Tv70CatL a pH 4,2 durante 3 horas. Electroforesis SDS-PAGE al 12% de acrilamida con gelatina al 0,1% teñido con azul de coomassie R-250 mostrando la actividad gelatinasa de la proteína incubadas en buffer citrato pH 4,2 a 37 °C en ausencia y presencia de los activadores CaCl_2 y L-Cys durante 3 horas. Carril 1: MPM low range 97kDa (Biorad); carril 2: extracto de *T. evansi* sin activadores; carril 3: cepa silvestre B121 sin activadores; carril 4: colonia 5 inducida sin activadores; carril 5: extracto de *T. evansi* con activadores; carril 6: silvestre B121 con activadores; carril 7: colonia 5 inducida con activadores.

Al realizar la incubación durante 6 horas a pH 4,2 en ausencia y presencia de los activadores no se observó actividad gelatinasa en la cepa silvestre B121 (Figura 22; carriles 2 y 5) ni en la colonia 5 inducida (carriles 3 y 6). En el extracto de *T. evansi* (carril 4), se observó mayor actividad gelatinasa que a las 3 horas de incubación. Además se observa una segunda banda que podría corresponder a otra proteasa presente en el extracto de *T. evansi*.

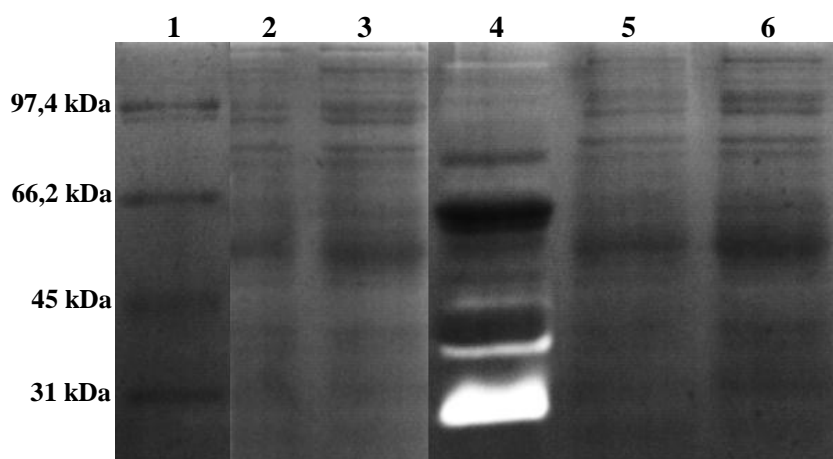


Figura 22. Zimografía de la proteína Tv70CatL a pH 4,2 durante 6 horas. Electroforesis SDS-PAGE al 12% de acrilamida con gelatina al 0,1% teñido con azul de coomassie R-250 mostrando la actividad gelatinasa de la proteína incubadas en buffer citrato pH 4,2 a 37°C en ausencia y presencia de los activadores CaCl₂ y L-Cys durante 6 horas. Carril 1: MPM low range 97kDa (Biorad); carril 2: cepa silvestre B121 sin activadores; carril 3: colonia 5 inducida sin activadores; carril 4: extracto de *T. evansi* con activadores; carril 5: silvestre B121 con activadores; carril 6: colonia 5 inducida con activadores.

Por otra parte, en condiciones de buffer fosfato pH 7,2 durante 3 horas de incubación no se observó actividad gelatinasa de las muestras en ausencia de los activadores (Figura 23; carriles 2, 3 y 4), mientras que en presencia de ellos se observó actividad solo en el extracto de *T. evansi* (carril 5). Cabe destacar que la actividad gelatinasa encontrada en este extracto es menor a la observada en presencia de los activadores a pH 4,2.

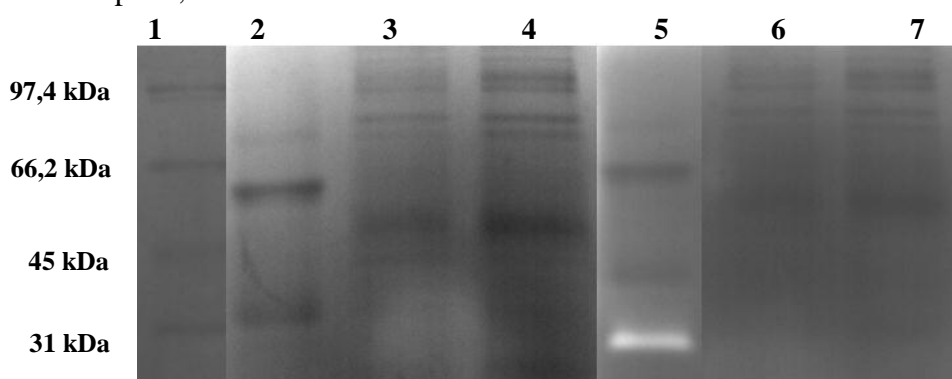


Figura 23. Zimografía de la proteína Tv70CatL a pH 7,2 durante 3 horas. Electroforesis SDS-PAGE al 12% de acrilamida con gelatina al 0,1% teñido con azul de coomassie R-250 mostrando actividad gelatinasa incubadas en buffer fosfato pH 7,2 a 37°C en ausencia y presencia de los activadores CaCl₂ y L-Cys durante 3 horas. Carril 1: MPM low range 97kDa (Biorad); carril 2: extracto de *T. evansi* sin activadores; carril 3: cepa silvestre B121 sin activadores; carril 4: colonia 5 inducida sin activadores; carril 5: extracto de *T. evansi* con activadores; carril 6: silvestre B121 con activadores; carril 7: colonia 5 inducida con activadores.

Al incubar durante 6 horas bajo las mismas condiciones no se observó actividad gelatinasa en la cepa silvestre B121 (Figura 24; carriles 3 y 5) y en la colonia 5 inducida en ausencia y presencia de los activadores (carriles 2 y 4).

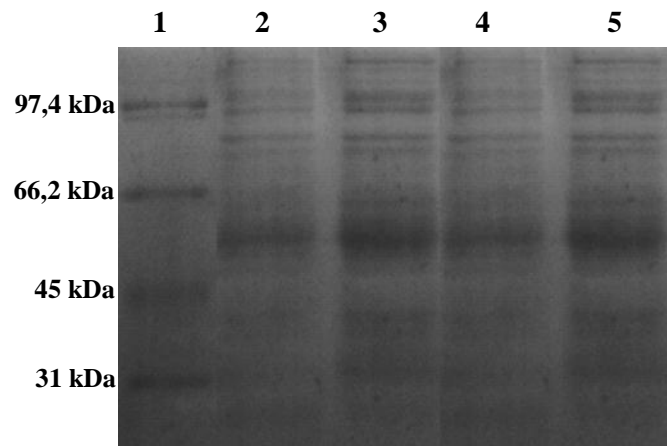


Figura 24. Zimografía de la proteína Tv70CatL a pH 7,2 durante 6 horas. Electroforesis SDS-PAGE al 12% de acrilamida con gelatina al 0,1% teñido con azul de coomassie R-250 mostrando la actividad gelatinasa de la proteína incubadas en buffer fosfato pH 7,2 a 37 °C en ausencia y presencia de los activadores CaCl₂ y L-Cys durante 6 horas. Carril 1: MPM low range 97kDa (Biorad); carril 2: cepa silvestre B121 sin activadores; carril 3: colonia 5 inducida sin activadores; carril 4: silvestre B121 con activadores; carril 5: colonia 5 inducida con activadores.

Por último, bajo condiciones de buffer carbonato-bicarbonato pH 9,6 en presencia y ausencia de los activadores durante 6 horas de incubación, no se observó actividad gelatinasa en la cepa silvestre B121 (Figura 25; carriles 2 y 4) ni en la colonia 5 inducida (carriles 3 y 5).

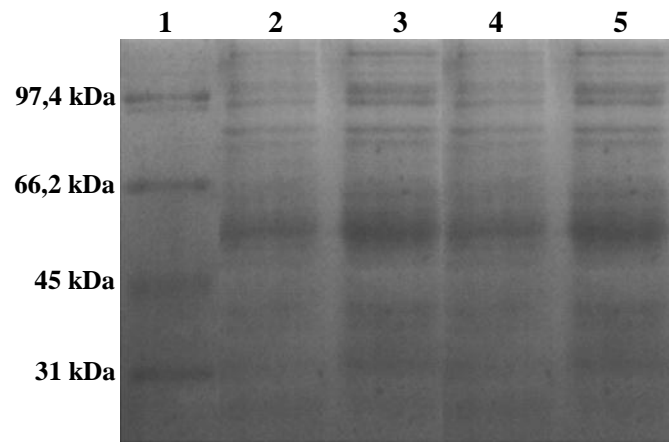


Figura 25. Zimografía de la proteína Tv70CatL a pH 9,6 durante 6 horas. Electroforesis SDS-PAGE al 12% de acrilamida con gelatina al 0,1% teñido con azul de coomassie R-250 mostrando la actividad gelatinasa de la proteína incubadas en buffer carbonato-bicarbonato pH 9,6 a 37 °C en ausencia y presencia de los activadores CaCl₂ y L-Cys durante 6 horas. Carril 1: MPM low range 97kDa (Biorad); carril 2: cepa silvestre B121 sin activadores; carril 3: colonia 5 inducida sin activadores; carril 4: silvestre B121 con activadores; carril 5: colonia 5 inducida con activadores.

5. DISCUSIÓN

La tripanosomosis bovina se ha convertido en uno de los mayores problemas parasitológicos en la producción de la ganadería. Hasta hoy, no se han desarrollado estrategias diagnósticas y terapéuticas eficientes para la detección y control de la enfermedad. Por esta razón, el desarrollo de metodologías alternas basadas en el estudio de genes que codifican proteínas importantes en la fisiología del parásito podría permitir su diagnóstico y tratamiento.

En el presente trabajo se clonó y expresó en un sistema bacteriano un gen quimera denominado *Tv70CatL* (González, 2012), el cual presenta un tamaño de 1478 pb, constituido por la región de unión al péptido de la *Hsp70* y la región catalítica de la *Cp*, ambas proteínas de *T. vivax* (González, 2012). La selección de estos genes se debe a que reportes previos indican que la cisteín proteasa presenta actividad inmunogénica y la *Hsp70* actúa como adyuvante; lo cual podría generar una respuesta protectora en el organismo infectado (Carmelo, 2006). Además, se conoce que ambas podrían ser utilizadas como blanco para el diagnóstico de la tripanosomosis bovina (Krautz y col., 1998; Boulangé y col., 2002; Zurita y col., 2003; Bannai y col., 2003; Cortéz y col., 2009).

El gen *Tv70CatL* se clonó dentro de un vector de expresión denominado pET28a (*Ver anexo 5*), considerado un buen candidato a la hora de expresar proteínas en bacterias debido a que es regulado por un promotor del fago T7 que permite la expresión de una gran cantidad de proteína (Studier, 1986; Jonasson, 2002). Además, la ARN polimerasa T7 transcribe ocho veces más que la ARN polimerasa de *E. coli*, favoreciendo así la expresión de dicha proteína (Lee y col., 2008). Otros reportes muestran un mayor rendimiento de la proteína recombinante P2 del bacteriófago 6

expresada (Makeyev y col., 2000) y la proteína recombinante humana Hsc70 (Espejo y col., 2004) al utilizar el vector pET28a como parte del sistema de expresión.

La construcción del vector recombinante pET28a/*Tv70CatL* fue mediante la ligación de los extremos cohesivos generados por las enzimas de restricción *EcoRI* y *NotI*, por medio de una ADN T4 ligasa que une el extremo N-terminal y C-terminal de ambos fragmentos (Luque, 2008).

Para seleccionar la cepa utilizada en la clonación y expresión de la proteína *Tv70CatL* se realizó un análisis del usaje de codones presente en el gen *Tv70CatL* que no esta presente en la bacteria *E. coli*, observándose 11 codones raros (*Ver anexo 3*) que no son expresados en *E. coli* (*Ver anexo 2*); esto podría ocasionar la terminación prematura de la traducción cuando se agota los ARNt presentes en la bacteria (Kurland y col., 1996; Makrides, 1996). Por ello, se utilizó la cepa BL21 (DE3) Rosetta que contiene el vector pRARE (*Ver anexo 4*), ya que proporciona los ARNt necesarios para la expresión de estos codones dentro de la célula huésped, obteniéndose así la expresión de la proteína dentro del sistema bacteriano (Novy y col., 2001; Novagen, 2003; Terpe, 2006). Por su parte, Castillo (2010) demostró que utilizando el mismo sistema de expresión obtuvo expresión de la proteína recombinante p20 tipo calpaína de *T. cruzi*, en contraste con su expresión en un mismo sistema de expresión pero en ausencia del vector pRARE.

El vector pET28a/*Tv70CatL* fue incorporado dentro de la célula huésped por medio de la electroporación, en la cual, una descarga eléctrica genera la desestabilización de la membrana celular, generando así poros que permiten el paso del ADN plasmídico foráneo a su interior (Luque, 2008).

Las colonias que se obtuvieron en la transformación fueron seleccionadas por el método de selección por resistencia a kanamicina, ya que el vector pET28a contiene dentro de su secuencia nucleotídica el gen de resistencia a dicho antibiótico. Se obtuvo 8 colonias blancas y al ser estudiadas por una PCR de las colonias con los cebadores *Hsp70*₃₅₉₋₆₁₀F/*TvCatLR*cR se verificó la presencia del gen *Tv70CatL* en solo tres de ellas (Figura 8). El resto de las colonias que resultaron negativas y que pudieron crecer en presencia de kanamicina, se debió posiblemente a la falta de ligación del gen con el vector o a la presencia de alguna colonia contaminante que pudiese arrojar falsos positivos, siendo un problema común en las transformaciones bacterianas (McPherson y col., 2006).

El análisis de los ensayos con enzimas de restricción permitió verificar la presencia del gen dentro del vector; el cual se basa en la hidrólisis del enlace fosfodiéster de cada hebra ocasionando la ruptura del vector recombinante, generando diversos fragmentos de tamaños conocidos por medio de un análisis *in silico* del mapa de restricción. El corte con las enzimas *Pst*I y *Eco*RV permitió verificar la presencia del gen *Tv70CatL* y del vector pET28a respectivamente, ya que estos contienen dentro de su secuencia un único sitio de restricción para cada enzima, generando fragmentos de 4.790 y 2.053 pbs (Figura 14) los cuales coinciden con los tamaños esperados de acuerdo al análisis realizado del mapa de restricción (*Ver anexo 1*).

Para la expresión de la proteína se utilizaron diversas condiciones, tales como: densidad celular del cultivo, temperatura de inducción, tipo de inductor y concentración del inductor, las cuales son necesarios a la hora de expresar proteínas en sistemas bacterianos (Jonasson, 2002).

Para observar la expresión de la proteína heteróloga Tv70CatL se utilizó la electroforesis SDS-PAGE teñida con azul de coomassie R-250, observándose el mismo patrón de proteínas que el encontrado en la cepa silvestre utilizada como control (Figura 16 y 17). Sin embargo, al realizar un Western blot se observó una banda de 55 kD (Figura 18) a una temperatura de 28 °C (en condiciones de autoinducción) y 30 °C (a 1mM de IPTG y $DO_{600nm} = 0.6$) que corresponde al peso teórico de la proteína de interés generado por el programa online ExPaSy (<http://www.expasy.org/>).

La detección de la proteína por el Western blot y no por el SDS-PAGE con tinción coomassie podría deberse a la sensibilidad de detección que presentan ambas técnicas. El SDS-PAGE detecta proteínas en el orden de los 100 ng y el western blot en el orden de los 1-10 pg, siendo más sensible la detección de la proteína al utilizar éste método (Invitrogen, 2001). El western blot presenta una mayor especificidad y sensibilidad al estar basado en la utilización de un anticuerpo que reconoce y se une a un epítipo de la proteína de interés (Mahmood, 2012).

En este estudio, el anticuerpo empleado es un anticuerpo policlonal mono-específico anti-Hsp70 de *Leishmania Braziliensi* denominado 678, donde la secuencia de reconocimiento de este anticuerpo se une a una secuencia de 19 aminoácidos de la proteína correspondiente a la región de la Hsp70 presente en la proteína quimera. Los resultados arrojados por el programa BLAST (Figura 19) muestran un 84% de homología entre la secuencia de dicho anticuerpo y la sección proteica mostrada, ya que 16 aa de la sección proteica fueron reconocidos por el anticuerpo, demostrándose una elevada especificidad de reconocimiento entre ellas.

Un anticuerpo que pudo ser utilizado en la detección de esta proteína es el anticuerpo anti-histidina, ya que el mismo reconoce la cola de histidina que está presente en la proteína. Esta cola de histidina es proporcionada por el vector de

expresión pET28a el cual presenta unido a su extremo amino terminal una cola de 6 histidinas. Estas histidinas permiten la purificación una vez expresada la proteína al ser pasadas por una columna de níquel, la cual presenta afinidad por dicha molécula presente en la proteína, permitiendo así su purificación. No se disponía de dicho anticuerpo en el laboratorio; sin embargo, podría ser una alternativa para la detección de la proteína Tv70CatL.

Por otra parte, además de utilizar como control negativo la cepa silvestre no inducida, se pudo utilizar como control positivo la proteína Tv70CatL expresada en el sistema de levaduras por González (2012). De esta manera se podría observar una banda de 55 kDa aproximadamente correspondiente con el tamaño esperado, permitiendo así tener un patrón de la proteína que se debería observar en las muestras inducidas además de que podría servir como un indicativo de que el anticuerpo anti-Hsp70 estaba funcionando correctamente. Sin embargo, no disponíamos de este control, ya que los niveles de expresión de la proteína en levadura fueron muy bajos.

La expresión de la proteína Tv70CatL se logró por medio de las condiciones de expresión utilizadas antes mencionadas. En el caso de la densidad celular, se tomó una DO de 0,6 (DO_{600nm}) debido a que se encuentra dentro de la fase exponencial de la curva de crecimiento bacteriano en células de *E. coli*, cepa BL21 (DE3) Rosetta cuyo rango oscila entre 0,5-0,7 (Datos no mostrados). Bajo esta fase existen las condiciones metabólicas deseables y mayor disponibilidad de nutrientes que permiten obtener una alta productividad de la proteína (Jonasson, 2002). Esto corrobora los resultados obtenidos por Nadkardi y colaboradores (2007) quienes reportaron que para la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) la densidad óptima de crecimiento es de 0,6.

La temperatura de inducción es uno de los factores más críticos dentro de la expresión de proteínas, ya que es importante en los procesos metabólicos afectando la

velocidad de transcripción y la traducción de la proteína (Martinez-Luaces y col., 2006). La temperatura de inducción para los sistemas pET los cuales están regulados por el promotor del fago T7 es de 37°C, ya que la ARN polimerasa T7 se encuentra en su máxima actividad (Shin y col., 2001; Nadkarni y col., 2007).

En estas condiciones de temperatura no se obtuvo un resultado positivo (Figura 18), posiblemente debido a que bajo ésta temperatura la bacteria active diversas proteasas que puedan hidrolizar la proteína Tv70CatL (Jonasson, 2002); por lo que se tomaron temperaturas de 28 y 30 °C, ya que al disminuir la temperatura en el sistema podría disminuir el efecto de hidrólisis de la proteína de interés (Novagen, 2003). Además, se quiso disminuir aún más la temperatura del sistema hasta los 20 °C para disminuir la activación de las proteasas del hospedador; sin embargo, no se mostró expresión de la proteína bajo dicha condición (Figura 18).

El inductor utilizado para el sistema de expresión pET28a fue IPTG y lactosa, ya que los sistema pET son inducidos por la presencia de ambos inductores (Novagen, 2003). Se realizó un ensayo de expresión con diversas concentraciones de IPTG (0,2; 0,5 y 1 mM) donde no se observó diferencias de expresión entre la cepa silvestre utilizada como control y la cepa recombinante (Datos no mostrados); por lo que se utilizó una concentración de 1mM, ya que esta concentración ha sido ampliamente reportada en estudios que utilizan el sistema de expresión pET en cepas de *E. coli* BL21 (Makeyev y col., 2000; Espejo y col., 2004).

Se examinó el nivel de expresión de la proteína a través del inductor “lactosa” en un medio de auto-inducción, observándose un mayor rendimiento de expresión de proteína y una densidad celular mayor ($DO_{600nm} = 0,53$) en comparación a la obtenida con IPTG; esto podría deberse a que tal medio contiene los elementos necesarios para generar una elevada densidad celular y por tanto mayor cantidad de proteína al ofrecer

un pH óptimo y las condiciones metabólicas favorables para el crecimiento celular (Studier, 2005).

Un medio de cultivo que contenga enzimas digestivas de la caseína y extracto de levadura es comúnmente usado, ya que sostiene el crecimiento de una amplia gama de *E. coli* con diferentes requerimientos nutricionales y los cultivos crecen de 2-3 veces más que un simple medio con sales y glucosa como única fuente de carbono (Studier, 2005). Además, se ha demostrado que la utilización de estos medios de cultivo incrementa la producción de las proteínas en los sistemas de expresión pET sin la necesidad de añadir un inductor como el IPTG (Grossman y col., 1998). Por otra parte, la presencia de fosfatos en el medio de autoinducción sostiene elevadas densidades celulares hasta la saturación del cultivo, ya que los iones sodio, potasio y fósforo cambian el pH del medio de cultivo, favoreciendo las condiciones metabólicas de crecimiento (Studier, 2005). La concentración de fosfato presente en el medio permite incrementar la sensibilidad por kanamicina en sistemas pET, favoreciendo la presencia del mismo durante un largo período de crecimiento (Studier, 2005).

En contraste a los resultados obtenidos, Castillo (2010) encontró una mayor expresión de la proteína recombinante p20 tipo calpaína de *T. cruzi* en comparación a la obtenida con IPTG. Por otra parte, Agüero (2011) mostró un mayor rendimiento de la proteína VlhA5.02 de *Mycoplasma gallisepticum* al utilizar el medio auto-inducción (aproximadamente 4 veces), debido al mayor crecimiento de la masa celular que se generó en ese caso.

La autoinducción se basa en regular los elementos del operón *lac* con una mezcla de glucosa, lactosa y glicerol bajo condiciones de un crecimiento diaúxico; donde durante la primera fase de crecimiento la glucosa es usada como principal fuente de carbono, siendo baja la expresión de la proteína, y cuando ésta fuente se agota se

génera un cambio en el metabolismo celular hacia la importación y consumo de lactosa y glicerol (Blommel y col., 2007).

Una explicación fisiológica del proceso es que al utilizar lactosa como inductor, la célula tiene que sintetizar lactosa permeasa para transportar lactosa dentro de las mismas, lo cual prolonga el tiempo de regulación del proceso actuando como un inductor moderado perpetuando la expresión de la proteína heteróloga (Kilikian y col., 2000). En comparación, el IPTG entra a la célula por difusión actuando como un inductor fuerte (Studier y Moffatt, 1986) y la alta carga metabólica podría generar un efecto tóxico en la célula, disminuyendo la expresión de la proteína (Woyski y Cupp-Vickery, 2001).

Studier (2005) reporta que la utilización del medio de auto-inducción para la expresión de las proteínas es más conveniente que la inducción con IPTG, puesto que el primero se da simplemente inoculando el medio con el cultivo celular hasta su saturación, sin la necesidad de seguir creciendo el cultivo ni añadir algún inductor en el momento adecuado y podría ser utilizado en sistemas de expresión a gran escala y con una alta reducción de costos (Studier, 2005). Además, la densidad celular del cultivo con respecto a la concentración de la proteína expresada es considerablemente más alta por mililitro de cultivo a la obtenida por inducción con IPTG (Studier, 2005; Blommel y col., 2007).

La baja expresión de la proteína podría deberse a diversos factores, tales como: el hospedador y elementos del vector utilizado y las condiciones de expresión como la concentración del inductor, la temperatura de inducción, la disponibilidad de oxígeno y los componentes del medio de cultivo (Makrides, 1996; Novagen, 2002; Quiagen, 2003; Shojaosadati y col., 2008). Estudios futuros podrían optimizar la expresión de dicha proteína mejorando las condiciones empleadas y utilizando otros vectores de expresión

que puedan favorecer una elevada expresión de la proteína de interés. Además, de utilizar los controles que sean necesarios para la detección de la proteína.

Con relación a los ensayos enzimáticos evaluados por medio de una zimografía, los resultados obtenidos no mostraron actividad gelatinasa bajo ninguna condición de pH (3; 4,2; 7,2 y 9,6), mientras que en el extracto de *T. evansi* se observó actividad en condiciones de buffer citrato 4,2 y en presencia de los activadores (Figura 21 y 22 respectivamente); esto se debe a la presencia de una Cp denominada “evansaína”. Yadav y col. (2011) reporta que la Cp de *T. evansi* presenta un peso aproximado de 28 kDa y tienden a activarse a pH ácido en un rango alrededor de 3-5,5 donde en presencia de sus activadores aumenta su actividad. González (2012) reportó que la proteína quimera Tv70CatL expresada en un sistema eucariota presentó actividad gelatinasa bajo un pH de 7,2; mostrando una banda de aproximadamente 53 kDa, la cual correspondía con el tamaño esperado. Sin embargo, en este estudio bajo esas condiciones de pH con sus correspondientes activadores no se encontró actividad gelatinasa (Figura 23 y 24).

Para la realización de este ensayo se plantea utilizar como control la proteína Tv70CatL expresada en levaduras por González (2012), debido a que esta proteína sí presentó actividad enzimática a un pH de 7,2 en presencia de los activadores L-Cys y CaCl₂. No se utilizó el más adecuado debido a que en el laboratorio no disponíamos de dicha proteína, ya que la misma presentó un bajo nivel de expresión en el sistema eucariota. La comparación entre ambas proteínas expresadas en diferentes sistemas de expresión nos permitiría saber si la falta de actividad enzimática se debía o no al plegamiento de ellas al ser expresadas en diferentes organismos.

Diversos autores indican que la falta de actividad en organismos procariotas pueda deberse a un mal plegamiento de la proteína, estando así inactivas, perdiendo su actividad biológica (Makrides, 1996; Jonasson y col., 2002; Choi y col., 2004). Al ser

una proteína quimera, es decir, formada por dos genes; no se conoce su real plegamiento al interactuar dos genes totalmente diferentes en un organismo *in vivo*, por lo que esto podría interferir en la actividad enzimática de la Cistein proteasa presente en dicha proteína.

Otra razón por la cual no se observó actividad podría ser por la expresión de la proteína en forma de cuerpos de inclusión, los cuales son agregados de proteínas mal plegadas que se forman comúnmente al expresar genes eucariotas en sistemas bacterianos (Jonasson, 2002; Singh y col., 2005; Sorensen y col., 2005; Terpe, 2006; Peti y col., 2007). Diversos autores muestran actividad enzimática de proteínas expresadas en sistemas procariontes; donde las mismas son expresadas como cuerpos de inclusión y replegadas correctamente para obtener actividad (Revell y col., 1993; Sanderson y col., 2000; Choudhury y col., 2009; Roschitzki y col., 2012).

6. CONCLUSIONES

- Se obtuvo la clonación y expresión la proteína Tv70CatL en un sistema bacteriano, utilizando como célula huésped *E. coli*.
- Se obtuvo la clonación del gen *Tv70CatL* en el vector de expresión pET28a, resultando 3 colonias positivas por medio de la amplificación con los cebadores *Hsp70*₃₅₉₋₆₁₀F/*TvCatLRcR*, confirmando la presencia del gen dentro del vector.
- La expresión de la proteína se obtuvo a 30 °C bajo una concentración de IPTG 1mM a las 8 horas de inducción y a 28 °C en condiciones de auto-inducción a las 72 horas de inducción con un tamaño de 55 kDa aproximadamente, detectada por western blot con el empleo de un anticuerpo policlonal anti-Hsp70.
- El mayor rendimiento en la expresión de la proteína Tv70CatL se obtuvo por la inducción con lactosa en comparación al obtenido con IPTG.
- La proteína quimera Tv70CatL no presentó actividad gelatinasa bajo la incubación con los diferentes buffer a pH 3; 4,2; 7,2 y 9,6 en ausencia y presencia de los activadores L-Cys y CaCl₂, posiblemente a un mal plegamiento de la misma o a la formación de cuerpos de inclusión al expresarla en un sistema bacteriano.

7. PERSPECTIVAS

- Optimizar el sistema de expresión bacteriano utilizado para aumentar el rendimiento de la proteína heteróloga expresada, variando la concentración de IPTG utilizada, la temperatura, la disponibilidad de oxígeno y aumentando la cantidad de medio de cultivo para el crecimiento celular.
- Optimizar los ensayos de actividad enzimática aumentando el rango de pH y temperatura utilizado, así como el empleo de inhibidores que puedan caracterizar la posible actividad de la proteasa.
- Realizar ensayos inmunológicos con la proteína, ya que podría ser utilizada como blanco en el diagnóstico de la tripanosomosis bovina.
- Utilizar la proteína como posible vacuna terapéutica para la tripanosomosis en el ganado venezolano.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Agüero, J., Hotzel, H., Aguilar, L., Lima, C., Sachse, K., Martínez, S. 2011. Expresión *in vitro* en *Escherichia coli*, de un fragmento del gen *vlh.5.02* de la principal familia de hemaglutininas de *Mycoplasma gallisepticum*. *Rev Salud Anim.* **33**: 32-37.
2. Alane B., Salvatore G., Masini C., D'Ávila L. 2007. Trypanosomatidae Peptidases: A Target for Drugs Development. *Curr Enz Inh.* **3**: 19-48.
3. Alejos, M. 2011. Desarrollo de la técnica de amplificación isotérmica mediada por asas (LAMP) para su amplificación en la detección de *Trypanosoma vivax* en ovinos infectados experimentalmente. Tesis de Pregrado. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela.
4. Anosa, V. 1988. Haematological and biochemical changes in human and animal trypanosomiasis. *Med Vet Trop.* **1**:65-78.
5. Authie, E., Boulange, A., Muteti, D., Lalmanach, G., Gauthier, F., Musoke, A. 2001. Immunisation of cattle with cysteine proteinases of *Trypanosoma congolense*: targetting the disease rather than the parasite. *Int J Parasitol.* **31**:1429–1433.
6. Balbas, P., Bolivar, F. 1990. Design and Construction of Expression Plasmid Vectors in *Escherichia coli*. *Method Enzymol.* **185**: 14-37.
7. Baneyx, F. 1999. Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotech.* **10**: 411 – 421.
8. Bannai, H., Sakurai T., Inoue, N., Sugimoto, C., Igarashi, I. 2003. Cloning and Expression of Mitochondrial Heat Shock Protein 70 of *Trypanosoma*

- congolense* and Potential use as a diagnostic Antigen. *Clin Diagn Lab Immunol.* **10**:926-933.
9. Barret, A., Rawlings, N., Woessner, J. 1998. Handbook of Proteolytic enzymes. *Acad Press.* 1-1666.
 10. Becker, J., Craig, E. 1994. Heat shock proteins as molecular chaperones. *Eur J Biochem.* **2**: 11-23.
 11. Birnboim, H., Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **13**: 1513-1523.
 12. Blommel, P., Becker, K., Duvnjak, P., Fox, B. 2007. Enhanced bacterial protein expression during auto-induction obtained by alteration of lac repressor dosage and medium composition. *Biotechnol.* **3**: 585-598.
 13. Bolivar, A., Reyna, A., García, F., García, P., Crisante, G., Rojas, A., Añez, N. 2007. Uso de proteínas como alternativa diagnóstica para discriminar infecciones entre *Trypanosoma vivax* y *Trypanosoma evansi*. *Boletín de Malariología y salud ambiental.* **47(1)**: 83-88.
 14. Borst, P., Fase, F., Weijers P., Barry, J., Laurence, T., Vickerman, K. 1985. Kinetoplast DNA from *Trypanosoma Vivax* and *T. congolense*. *Mol Bio Par.* **15**:129-142.
 15. Boulange, A., Serveau, C., Brillard, M., Minet, C., Gauthier, F., Diallo, A., Lalmanach, G., Authie, E. 2002. Functional expression of the catalytic domains of two cysteine proteinases from *Trypanosoma congolense*. *Int J parasitol.* **13**: 1435-1440.
 16. Buttle, D., Mort, J., Cystein Proteases, en: Lennarz, W., Lane, M. 2004. Encyclopedia of Biological Chemistry Págs. 516-520, Primera edición, Nueva York, E.U.A.

17. Caffrey, C., Steverding, D. 2009. Kinetoplastid papain-like cysteine peptidases. *Mol Biochem Parasitol.* **167**: 12-19.
18. Carmelo, E., Zurita, A., González, A., Martínez, E., Valladares, B. 2006. Proteínas de choque térmico en parásitos: La Hsp70 y el sistema inmune. *Rev Iber Parasitol.* **66**:1-4.
19. Castillo, A. 2010. Evaluación de la proteína recombinante p20, semejante a calpaína como antígeno en el diagnóstico de la enfermedad del chagas en fase III. Tesis de Maestría. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas.
20. Cazzulo, J. 1999. La cruzipaina, cisteína proteinasa principal del *Trypanosoma cruzi*: Secuencia y organización genómica de los genes que la codifican. *Med.* **59**:7-10.
21. Choi, J., Lee, S. 2004. Secretory and Extracellular Production of Recombinant Proteins Using *Escherichia coli*. *Appl Microbiol and Biotechnol.* **64**: 625–635.
22. Choudhury, D., Roy, S., Biswas, C., Dattagupta, J. 2009. Production and recovery of recombinant propapain with high yield. *Phytochem.* 465-472.
23. Cortez, A., Rodrigues, A., Garcia, H., Neves, L., Batista, J., Bengaly, Z., Paiva, F., Teixeira, M. 2009. Cathepsin L-like genes of *Trypanosoma vivax* from Africa and South America- characterization, relationships, and implications diagnostic. *Moll and cell.* 44-51.
24. Cuervo C., Mayorga D., Lopez, M., Puerta, C. 2005. Caracterización parcial de los genes codificantes para la proteína de choque térmico HSP70 de *Trypanosoma rangeli*. *Infection.* **8**: 268-278.
25. Dávila, A., Silva, R. 2000. Animal trypanosomiasis in South America. Current status, partnership, and information technology. *Ann N. y Acad Sci.* **916**:199-212.

26. Delespaux, V., De Koning, H. 2007. Drugs and drug resistance in African trypanosomiasis. *Drug Resist.* **10**: 30-50.
27. Demain, A., Vaishnav, P. 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol.* 297-306.
28. Desquesnes, M. 2004b. Ivestock trypanosomoses and their vectors in Latin America. World organization for animal health. 174pp.
29. Desquesnes, M., Lamine, M., 2004a. Mechanical transmission of *Trypanosoma Vivax* in cattle by the African tabanid *Atylotusfuscipes*. *Vet Parasitol.***119**:9-19.
30. Eakin, A., Mills, A., Harth, G., McKerrow, J., Craik, C. 1992. The sequence, organisation, and expression of the major cysteine protease (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem.* **267**: 7411-7420.
31. Eckart R., Bussineau M. 1996. Quality and Authenticity of Heterologous Proteins Synthesized in Yeast. *Curr Opin Biotech.* **7**: 525-530.
32. Ellis, R., Hartl, F. 1999. Principles of protein folding in the cellular environment. *Curr Opin Struct Biol.* **9**: 102-110.
33. Espejo J., Sosa, A., Carrascal, A., Cifuentes, C., Barreto, A. 2004. Producción de la proteína recombinante humana HSC70 y su aplicación en el desarrollo de un sistema de detección por ELISA. *Revista Universidad Javeriana.* **9**: 69-80.
34. Espinoza, E. 1988. Evaluación clínica, Parasitológica y serológica de bovinos infectados experimentalmente con *Trypanosoma vivax*. Tesis MSc. Universidad Central de Venezuela. Maracay. Venezuela.

35. García, F., Suarez, C., Daza, E., Simoes, D., Rivera, M. 2002. Brotes causados por *Trypanosoma vivax* en rebaños de caprinos y ovinos del estado Falcón, Venezuela. *SEOC*. 599-604.
36. Geerts, S., Holmes, P., Eisler, M., Dially, O. 2001. African bovine trypanosomiasis: the problem of drug resistance. *Trends Parasitol.* **17**: 25-28.
37. Gómez, E. 2011. Caracterización clínica, morfométrica y molecular de aislados venezolanos de *Trypanosoma vivax*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Central de Venezuela.
38. González, A., Thomas, M., Martínez, E., Carmelo, E., López, M., Valladares, B. 2004. Molecular and immunological characterization of L14 ribosomal protein from *Leishmania braziliensis*. *Parasitol.* **128**:139-47.
39. González, B. 2012. Uso de la Catepsina L de *Trypanosoma vivax* en diagnóstico molecular y caracterización parcial de su quimera con HSP70. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Simón Bolívar.
40. Grossman, T., Kawasaki, A., Punreddy, M., Osburne, M. 1998. Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. *Gene* **209**: 95–103.
41. Hartl, F.1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*. **381**: 571-579.
42. Hartl, G., Andrews, N., Mills, A., Engel, J., Smith, R., McKerrow, J. 1993. Peptide-fluoromethyl ketones arrest intracellular replication and intracellular transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* **58**:17-24.
43. Hoare, C., 1972. The trypanosomes of Mammals: The Salivaria. *Black Scien Publ.* 401-429.

44. Huson, L., Authie, E., Boulange, A., Dean, J., Coetzer, T. 2009. Modulation of the immunogenicity of the *Trypanosoma congolense* cysteine protease, congopain, through complexation with α_2 macroglobulin. *Vet Res.*40-52.
45. Invitrogen. 2001. Easy select *Pichia* Expression Kit.
46. Jackson, A., Berry, A., Aslett, M., Allison, H., Burton, P., Vavrova, J., Brown, R., Browne, H., Corton, N., Hauser, H., Gamble, J., Marcello, L., McQuillan, J., Giger, M., Berriman, M. 2011. Antigenic diversity is generated by distinct evolutionary mechanisms in African. *Evolution.* 1-6.
47. Jonasson T., Sissela L., Per-Ake N., Stanl S. 2002. Genetic desing for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Botechnol App Biochem.* **35**: 91-105.
48. Kiang J., George C. 1998. Heat shock protein 70Kda: Molecular Biology, Biochemistry and Phisiology. *Pharmacol.* **80**(2):183-201.
49. Kilikian, B., Suárez, I., Liria, C.; Gombert, A. 2000. Process strategies to improve heterologous protein production in *Escherichia coli* under lactose or IPTG induction. *Process Biochem.* **35**: 1019-1025.
50. Krautz, G., Peterson, J., Godsel, L., Krettli, A., Engman, D. 1998. Human antibody responses to *Trypanosoma cruzi* 70-kD heat-shock proteins. *Am J Trop Med Hyg.* **58**(2): 137-143.
51. Kubes, V. 1944. El *Trypanosoma vivax* Americano. Agente de la tripanosomiasis bovina en Venezuela. Su comparación con el de África. Editorial Grafolit. Caracas, Venezuela.
52. Kurland, C., Gallant, J.1996. Errors of heterologous protein expression. *Curr Opin Biotech.* **7**:489-493.

53. Lee, S., Keasling, J. 2008. Heterologous protein production in *Escherichia coli* using the propionate inducible pPro system by conventional and auto-induction methods. *Protein Express Purif.* **61**:197-203.
54. Leger, A.; Vienne, M. 1919. Epizootic a trypanosomeschez les bovides de la GuyanFrancaise. *Bul Soc Pathol Exot.* **12**: 258-266.
55. Levine, N., Corliss, J., Cox, F., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B., Leedale, G., Loeblich, A., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E., Page, F., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J.; Wallace, F. 1980. A newly revised classification of the Protozoa. *J Protozool.* **27**:37-58.
56. Li, X., Yang, X., Li, L., Liu, H., Liu, J. 2006. A truncated C-terminal fragment of Mycobacterium tuberculosis Hsp70 gene enhanced potency of HBV DNA vaccine. *Vaccine.* **16**: 3321-3331.
57. Luque, J., Herraez, A. 2008. Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética: Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. *Elsevier España.*
58. Mahmood, T., Yang, P. 2012. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *N Am J Med Sci.* **4**: 429-434.
59. Makeyev, E., Bamford, D. 2000. Replicase activity of purified recombinant protein P2 of doubled-stranded RNA bacteriophage 6. *EMBO Journal.* **19**: 124-133.
60. Makrides, C.1996. Strategies for Achieving High-level Expression of Genes in *Escherichia coli*. *Microbiological Review.***60**: 512–538.
61. Maresca, B., Carratu, L. 1992. The biology of the heat shock response in parasites. *Parasitol Today.* **8**: 260-266.

- 62.** Martínez-Luaces, V., Guineo-Cobs, G., Velásquez, B. 2006. Bifactorial Design Applied to Recombinant Protein Expression. *J Data Sci.* **4**:247-255.
- 63.** Mayer, M., Bukau, B. 2005. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci.* **62**: 670-684.
- 64.** McPherson, M., Moller, S. 2006. PCR. Segunda edición. Thebasic. Cornwall, UK.
- 65.** Meimaridou, E., Gooljar S., Chapple, P. 2009. From hatching to dispatching: the multiple cellular roles of Hsp70 molecular chaperone machinery. *J Mol Endocrinol.* **42**: 1-9.
- 66.** Morell, M., Thomas C., Caballero, T., Alonos, C., López, M. 2006. The genetic immunization with paraflagellar rod protein-2 fused to the HSP70 confers protection against late *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine.* **24**:7046-7055.
- 67.** Morshauer, R., Wang, H., Flynn, G., Zuiderweg, E. 1995. The peptide-binding domain of the chaperone protein hsc70 has an unusual secondary structure topology. *Biochemistry-US.* **34**: 6261–6266.
- 68.** Mottram, J., North, M., Barry, D., Coombs, G. 1989. A cysteine proteinase cDNA from *Trypanosoma Brucei* predicts an enzyme with an unusual C-terminal extension. *FEBS Lett.* **258**:211–215.
- 69.** Nadkarni, A., Kelley, L., Momany, C. 2007. Optimization of a mouse recombinant antibody fragment for efficient production from *Escherichia coli*. *Protein Express Purif.* **52**: 219-229.
- 70.** North M., Mottram J., Coombs G. 1990. Cysteine proteinases of parasitic protozoa. *Parasitol Today.* **6(8)**:270–275.
- 71.** Novagen. 2003. pET System Manual.

72. Novy, R., Drott, D., Yaeger, K., Mierendorf, R. 2001. Overcoming the codon bias of *E. coli* for enhanced protein expression. *Novagen*. **12**:11-13.
73. O'Brien, T., Mackey, Z., Fetter, R., Choe, Y., Craik, C., Caffrey, C., McKerrow, J. 2008. A parasite cysteine protease is key to host protein degradation and iron acquisition. *J Biol Chem*. **43**: 28934-28943.
74. Oliveira, J., Hernandez, J., Jimenez, C., Zeledon, R., Blandon, M., Urbina, A. 2009. First report of *Trypanosoma vivax* infection in dairy cattle from Costa Rica. *Vet Parasitol*. **163**: 136-139.
75. Osório, A., Madruga, C., Desquesnes, M., Soares, C., Rios, L., Gonçalves, S. 2008. *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis and introduction in the new world- A Review. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*. **103(1)**: 1-13.
76. Perrone, T., Lesseur, I., Reverón, E., Espinoza, E., Aso, P. 1991. Análisis seroepidemiológico de la tripanosomiasis bovina en la zona de Santa María de Ipire. *Acta Científ Vlna*. 42 (supl.1): 208.
77. Peti, W., Page, R. 2006. Strategies to maximize heterologous protein expression in *Escherichia coli* with minimal cost. *Protein Expres Purif*. **51**: 1-10.
78. Planelles, L., Thomas, M., Alonso, C., López, M. 2001. DNA immunization with *Trypanosoma cruzi* HSP70 fused to the KMP-11 protein elicits a cytotoxic and humoral immune response against the antigen and leads to protection. *Infect Immun*. **69**:6558-6563.
79. Quiagen. 2003. A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins.

- 80.** Revell, D., Cummings, N., Baker, K., Collins, M., Taylor, M., Sumner, I., Pickersgill, R., Connerton, I., Goodenough, P. 1993. Nucleotide sequence and expression in *Eschericia coli* of cDNAs encoding papaya proteinase omega from *Carica papaya*. *Gene*. 127-221.
- 81.** Reyna, A. 2007. Estado actual de la tripanosomosis y anaplasmosis a partir de muestras realizadas de 4 estados de Venezuela. *Boletín de Malariología y salud ambiental*. XLVII. 1:72-76.
- 82.** Rivera, M. 1996. Hemoparasitosis Bovinas. Universidad Central de Venezuela.
- 83.** Robert, J. 2003. Evolution of shock protein and immunity. *Dev Comp Immunol*. **27**:449-464.
- 84.** Roschitzki, H., Schroeder, T., Lenherr, E., Frolich, F., Schweizer, A., Donepudi, M., Ganesan, R., Mittl, P., Baici, A., Grutter, M. Human caspases *in vitro*: Expression, purification and kinetic characterization.
- 85.** Ruiz, H., Encizo, N., Piñales, R., Barrera, L. *Pichia pastori* una alternativa para la producción de glicoproteínas humanas de uso terapéutico. 2003. Estrategias de fermentación. *Rev Colomb Biotech*. **5 (2)**: 1-16.
- 86.** Sajid, M., McKerrow, J. 2002. Cistein proteases of parasitic organisms. *Mol Bioch Parasitol*. **120(1)**: 1-21.
- 87.** Sanderson, J., Pollock, K., Hilley, J., Meldal, M., Hilaire, P., Juliano, M., Juliano, L., Mottram, J., Coombs, G. 2000. Expression and characterization of a recombinant cysteine proteinase of *Leishmania mexicana*. *J Biochem*. 347-383.

- 88.** Shapira, M., McEwen, J., Jaffe, C. 1988. Temperature effects on molecular processes which lead to stage differentiation in *Leishmania*. *EMBO J.* **7**: 2895-2901.
- 89.** Shaw, J., Lainson, R. 1972. *Trypanosoma Vivax* in Brasil. *Ann Trop Med Parasitol.* **66(1)**: 25-32.
- 90.** Shin, C., Hong, M., Shin, H., Lee, J. 2001. High-level production of recombinant human IFN- α 2a with co-expression of tRNA Arg (AGG/AGA) in high-cell-density cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioproc E.* **6**: 301-305.
- 91.** Shojaosadati, S., Kolaei, S., Babaeipour, V., Farnoud, A. 2008. Recent advances in high cell density cultivation for production of recombinant protein. *J Biotechnol.* **2**: 63-84.
- 92.** Silva, R., Seidl, A., Ramírez, L, Dávila, A. 2002. *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*: Biología: Diagnóstico e Controle. Editorial Embrapa. Primera edición, Corumba- Brasil.
- 93.** Simoes, D., Sánchez, M., González, Y., Rivera, F., Parra, P., Gil, M., García, M., Quijada, J., García, F. 2009. Brote de tripanosomosis en un rebaño doble propósito del municipio Mara del estado Zulia, Venezuela. *Ciencias* **17 (2)**: 124-132.
- 94.** Simpson, L.1987. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication and evolution. *Annu Rev Microbiol.* **41**: 363-382.
- 95.** Singh, S., Panda, A. 2005. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Biotechnol.* **99 (4)**: 303-310.

96. Sorensen, H., Mortensen, K. 2005. Advanced Genetic Strategies for Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli*. *J Biotech.* **115**: 113 – 128.
97. Studier, F. 2005. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein expres purify.* **41**: 207-234.
98. Studier, F; Moffatt, B. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol.* **186**: 113–130.
99. Suárez, C., García, F., Román, D., Coronado, A., Perrone, T., Reyna, A. y Parra, N. 2009. Factores de riesgo asociados a la tripanosomosis bovina en explotaciones ganaderas de Venezuela. *Zootecnia Trop.* **27(4)**:363-372.
100. Terpe, K. 2006. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotech.* **72**: 211–222.
101. Toro, M. 1990. Seroepidemiología de los hemoparásitos en Venezuela. Curso de ampliación de conocimientos sobre técnicas de inmunodiagnóstico de enfermedades causadas por hemoparásitos. Universidad Simón Bolívar/ Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Central de Venezuela.
102. Toro, M., Arenas, E., Boyer, R., Garcia, J., Ruiz, A. 1980. Resultados de un muestreo sobre tripanosomiasis bovina mediante técnicas serológicas. *Vet Trop* **05**: 43-50.
103. Uzcanga, G., Perrone, T., Noda, J., Perez, J., Medina, R., Hoebeke, J., Bubis, J. 2009. Variant surface glycoprotein from *Trypanosoma evansi* is partially responsible for the cross-reaction between *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma vivax*. *Biochem.* **3**: 595-606.

- 104.** Van den Bossche, P., Shumba, W., Makhambera, P. 2000. The distribution and epidemiology of bovine trypanosomosis in Malawi. *Vet Parasitol.* **88:** 163-176.
- 105.** Van der Ploeg, L., Gianni, S., Cantor, C. 1985. Heat shock genes: regulatory role for differentiation in parasitic protozoa. *Scienc.* **228:** 1478-1446.
- 106.** Vermelho, A., Salvatore, G., Levy, C., Souza, A., Melo, A., Silva, F., Pinto, E., Branquinha, M. 2007. Trypanosomatidae peptidases: A target for drugs development. *Current enzyme inhibition.* **3:**19-48.
- 107.** Wang, Y., Lehner, T., Whittall, T., Kelly, C., Singh, M. 2004. Functional domains of Hsp70 stimulate generation of cytokines and chemokines, maturation of dendritic cells and adjuvanticity. *Biochem Soc.* 629-632.
- 108.** Woyski, D; Cupp-Vickery, J. 2001. Enhanced Expression of Cytochrome P450s from *lac*-Based Plasmids Using Lactose as the Inducer *Biochem Biophys.* **388:** 276-280.
- 109.** Yavad, S., Kumar, R., Kumar, S., Tatu, U. 2011. Identification and characterization of cysteine proteinases of *Trypanosoma evansi*. *Parasitol Res.* 2284-2289.
- 110.** Zurita, A., Rodríguez, J., Piñero, J., Pacheco, R., Carmelo, E., Del Castillo, A., Valladares, B. 2003. Cloning and characterization of the *Leishmania (Viannia) braziliensis* HSP70 gene. Diagnostic utility of the C-terminal fragment rLb70 (513-663). *J Parasitol.* **89:**372-78.

9. APÉNDICES

Medios de cultivo

- Medio de cultivo líquido Luria Bertani (LB).

Reactivo	Cantidad
Cloruro de Sodio	5 g
Triptona	5 g
Extracto de levadura	10 g
Agua destilada	800 mL
Ajustar pH a 7,2 y enrasar a 1 Lt	

- Medio de cultivo sólido Luria Bertani (LBP)

Reactivo	Cantidad
Cloruro de Sodio	5 g
Triptona	5 g
Extracto de levadura	10 g
Agua destilada	800 mL
Ajustar pH a 7,2 y enrasar a 1 Lt	
Agar	15 g

- Medio de cultivo autoinducción

Solución	Reactivo	Cantidad
1	Triptona	2 g
	Extracto de levadura	1 g
Disolver en 30 ml de H₂O		
2	Glicerol	1 mL
	Glucosa	0,1 g
Disolver en 30 ml de H₂O		
3	Lactosa	0,4 g
	Sulfato de magnesio 2mM	0,01 g
Disolver en 30 ml de H₂O y mezclar solución 1, 2 y 3		
4	Fosfato ácido de disodio 25 mM	0,71 g
	Cloruro de amonio 50 mM	0,54 g
	Fosfato diácido de potasio 25 mM	0,68 g
	Sulfato de sodio 50 mM	0,14 g
Disolver en 30 ml de H₂O una a una las sales y mezclar con la solución Completar hasta 200 mL. Esterilizar 20 min.		

Reactivos para extracción de plásmido (Miniprep)

- Solución de resuspensión (Solución A)

Reactivo	Concentración	Cantidad
Tris HCL 25 mM, pH 7.5	25 mM	(1,5 g /500 mL)
EDTA 10 mM	10 mM	(1,46 g /50 mL)
Glucosa 50 mM	50 mM	(4,51 g /500 mL)
Autoclavar por 15 min y alicuotar para almacenar a 4°C.		

- Solución de lisis (Solución B)

Reactivo	Concentración	Cantidad
Hidróxido de sodio	5N	40 mL
SDS	10%	100 mL
H ₂ O	-	800 mL
Hacerla previa a la extracción		

- Solución de neutralización (Solución C)

Reactivo	Concentración	Cantidad
Acetato de Potasio	5M	60 mL
Ácido acético glacial	-	1,5 mL
Agua destilada (d)	-	28,5 mL

Reactivos para geles de Acrilamida

- Acrilamida 30%

Reactivo	Cantidad
Acrilamida	29,2 g
N,N'-metilen-bis acrilamida	0,8 g
Agua destilada	Hasta 100 mL

- Tris 1,5M pH 8,8

Reactivo	Cantidad
Tris base	181 g
Agua destilada	Hasta 1 L
Ajustar pH con HCL	

- Tris 10 mM pH 6,8

Reactivo	Cantidad
Tris base	12,1 g
Agua destilada	Hasta 100 mL
Ajustar pH con HCL	

- SDS 10%

Reactivo	Cantidad
SDS	10 g
Agua destilada	100mL

- Persulfato de amonio (APS) 10%

Reactivo	Cantidad
APS	0,5 g
Agua destilada	5 mL

- Buffer muestra Lammeli 2X

Reactivo	Cantidad
SDS 10%	4 mL
Glicerol	2 mL
Tris pH 6,8	1,2 mL
Agua destilada	2,8 mL
Azul de bromofenol	0,01%
Para solución de trabajo 1X: mezclar 5 partes de buffer muestra lammeli 2X + 4 partes de agua + 1 parte de β mercaptoetanol.	

- Solución de corrida 10X

Reactivo	Cantidad
Tris base	303 g
Glicina	1442 g
SDS	100 g
Agua destilada	Hasta 10 L
Para tampón de corrida 1X: diluir 100 L de stock 10X en 900 de agua destilada.	

- Coloración fuerte azul de coomassie R-250

Reactivo	Cantidad
Brillan blue R-250	0,375 g
Metanol	150 mL
Acido acético	30 mL
Agua destilada	150 mL

- Solución decolorante

Reactivo	Cantidad
Metanol	180 mL
Acido acético	40 mL
Agua destilada	180 mL

Reactivos para Western blot

- Buffer PBS pH 7,5

Compuesto	Concentración	Cantidad
Cloruro de sodio	100 mM	11,36 g
Fosfato ácido de disodio	80 mM	2,96 g
Fosfato diácido de sodio	80 mM	5,89 g
Agua Destilada	1000 mL	
Ajustar pH a 7,5 con HCl		

- Solución de lavado: Buffer PBS-Tween-20 pH 7,5

Compuesto	Concentración	Cantidad
Cloruro de sodio	100 mM	11,36 g
Fosfato ácido de disodio	80 mM	2,96 g
Fosfato diácido de sodio	80 mM	5,89 g
Tween-20	0,05%	500 µL
Agua Destilada	1000 mL	

- Solución de saturación 5% leche descremada

Compuesto	Cantidad
Leche descremada en polvo	2,5 g
PBS	50 L

- Solución de saturación 1% leche descremada: Para 100 ml

Compuesto	Cantidad
Leche descremada en polvo	0,1 g
PBS	100 mL

- Buffer de transferencia

Compuesto	Concentración	Cantidad
Glicina	39 mM	1,465 g
Tris-base	48 mM	2,905 g
SDS	0,0375 %	0,1875 g
Metanol	20 %	100 mL
Agua destilada	Completar hasta 500 mL	

Reactivos para Zimografía.

- Buffer Tris-HCl 20 mM pH: 7,5

Reactivo	Cantidad
Tris-base	2,422 g
Agua destilada	Hasta 1 L
Llevar a pH 7,5 con HCl	

- Buffer Tris-HCl 0,1 M pH: 8,8

Reactivo	Cantidad
Tris-base	12, 11 g
Agua destilada	Hasta 1 L
Llevar a pH 8,8 con HCl	

- Buffer Tris-HCl 0,1 M pH: 8,8 en presencia de Tritón X-100 al 1%

Reactivo	Cantidad
Tris-base	12, 11 g
Agua destilada	Hasta 1 L
Tritón X-100	10 mL
Llevar a pH 8,8 con HCl	

- Buffer fosfato 0, 2 M pH:7,2

Reactivo	Concentración	Cantidad
Fosfato diácido de sodio	0,2 M	390 mL
Fosfato ácido de disodio	0,2 M	610 mL
Ajustar pH añadiendo alguna de las 2 soluciones, no ajustar con NaOH o HCl		

- Buffer citrato 0,1 M pH: 4.2

Reactivo	Concentración	Cantidad
Ácido cítrico	0,1 M	630 mL
Citrato de sodio	0,1 M	370 mL

- Buffer citrato 0,1 M pH: 3.

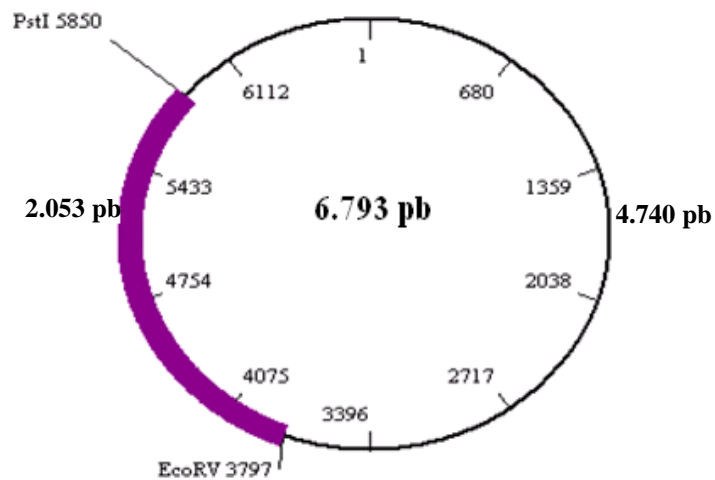
Reactivo	Concentración	Cantidad
Ácido cítrico	0,1 M	800 mL
Citrato de sodio	0,1 M	200 mL

- Buffer carbonato-bicarbonato 0,1 M pH: 9,6.

Reactivo	Concentración	Cantidad
Bicarbonato de sodio	0,1 M	45,3 mL
Carbonato de sodio	0,1 M	18,2 mL
Completar con agua destilada hasta 1L de solución		

10. ANEXOS

Anexo 1. Análisis de restricción con las enzimas *EcoRV* y *PstI* para la digestión del vector recombinante pET28a/*Tv70CatL*, utilizando el programa Bioedit.



Anexo 2. Usaje de codones raros para *Escherichia coli*.

Aminoácido	Codón
Arginina	AGG
	AGA
	CGG
	CGA
Glicina	GGA
Ileucina	AUA
Leucina	CUA
Prolina	CCC

Anexo 3. Usaje de codones raro para *E. coli* de la proteína Tv70CatL.

Aminoácido	Codón	Cantidad
Glicina	GGA	3
Prolina	CCC	7
Arginina	AGG	1

Anexo 4. Mapa del vector pRARE (Novagen, 2003).

