



**Obtención de la proteína paraflagelar recombinante de *Trypanosoma vivax*
mediante clonación y expresión en *Escherichia coli* BL21 (DE3)**

Bedoya Páez, Fausto Vinicio

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Dra. Chávez Larrea, María Augusta, M. Sc.

27 de julio de 2022

Resultados de análisis copleaks



Tesis_Proteína_Paraflagelar_copleaks.docx

Scanned on: 19:54 July 27, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	86
Words with Minor Changes	0
Paraphrased Words	349
Omitted Words	0



Escanea el código QR para:
MARIA AUGUSTA
CHAVEZ LARREA



Website | Education | Businesses

Certificación



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación: “Obtención de la proteína paraflagelar recombinante de *Trypanosoma vivax* mediante clonación y expresión en *Escherichia coli* BL21 (DE3)” fue realizado por el señor Bedoya Páez, Fausto Vinicio; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 26 de julio de 2022

Firma:



.....
Dra. Chávez Larrea, María Augusta, M.Sc.

C.C: 0201274842



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de autoría

Yo, **Bedoya Páez, Fausto Vinicio**, con cédula de ciudadanía n° 1717605594, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Obtención de la proteína paraflagelar recombinante de *Trypanosoma vivax* mediante clonación y expresión en *Escherichia coli* BL21 (DE3)”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 27 de julio de 2022

.....

Bedoya Páez Fausto Vinicio

C.C.: 1717605594



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de publicación

Yo, **Bedoya Páez, Fausto Vinicio**, con cédula de ciudadanía n° 1717605594 autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: “**Obtención de la proteína paraflagelar recombinante de *Trypanosoma vivax* mediante clonación y expresión en *Escherichia coli* BL21 (DE3)**” en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 27 de julio de 2022

.....

Bedoya Páez Fausto Vinicio

C.C.: 1717605594

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mis padres, Carla y Fausto; y a mi hermana María José. Por su apoyo incondicional en cada etapa del camino. Han sido mi fuente inagotable de motivación y mi refugio constante.

Fausto Vinicio Bedoya Páez

Agradecimientos

A mis padres, Carla y Fausto, por todas sus enseñanzas, por su comprensión y amor incondicional, han sido guía y aprendizaje diario.

A mi hermana, María José, por tu apoyo y consejos, gracias por siempre estar.

A mis amigos de vida, Diego, Ariana y Niqui, por todos los momentos vividos, por sus consejos y porque su amistad siempre me hace bien.

A todos los amigos que he hecho a lo largo de mis estudios, especialmente Joselyn y Karen, por lo vivido y por todos los logros que nos quedan por alcanzar.

A Nicolás, por tu tiempo, paciencia y cariño sincero. Hoy y siempre.

Al proyecto de vinculación con la sociedad e investigación “Establecimiento de una plataforma en apoyo a la formación y sensibilización, diagnóstico y desarrollo de una estrategia de control de la brucelosis y tripanosomosis en Ecuador (BruTryp)” y a la Academia de Investigación y Enseñanza Superior (ARES) de Bélgica por el financiamiento de este proyecto

A la Dr. María Augusta Chávez, al Dr. Jorge Ron y al Dr. Armando Reyna por darme la apertura en el laboratorio, y por su guía en el proceso.

A la Dr. Marbel Torres y Laboratorio de Inmunología y Virología por su colaboración técnica y científica.

A la Ing. Cristina Cholota, por todo su tiempo, paciencia y las enseñanzas a lo largo de la elaboración práctica de este trabajo.

Fausto Vinicio Bedoya Páez

Índice de Contenido

Resultados de análisis copyleaks	2
Certificación	3
Responsabilidad de autoría.....	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimientos	7
Listado de abreviaturas.....	14
Resumen	16
Abstract.....	17
Capítulo I: Introducción	18
Planteamiento del problema	18
Justificación del problema.....	19
Objetivos.....	19
Objetivo general	19
Objetivos específicos.....	20
Hipótesis.....	20
Capítulo II: Marco teórico	21
Tripanosomosis bovina	21
Sintomatología	21
Aspectos inmunológicos.....	21
<i>Trypanosoma vivax</i>	22
Distribución geográfica	22
Transmisión y ciclo de vida.....	23

Diagnóstico	23
Clasificación taxonómica	24
Morfología	25
Filamento paraflagelar (PFR)	27
Proteínas paraflagelares	28
Proteína recombinante.....	28
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	28
Vectores de expresión.....	29
Huéspedes de expresión.....	29
<i>Escherichia coli</i>	29
Cepa BL21 (DE3).....	30
Purificación de proteínas.....	30
IMAC	31
Cuantificación de proteínas.....	31
Método de Bradford.....	32
Método BCA.....	32
Espectrofotometría UV	32
Capítulo III: Materiales y métodos.....	34
Participantes	34
Zona de estudio	34
Duración de la investigación	34
Material de Trabajo	34

Extracción de ADN a partir de sangre total	35
Cuantificación de ADN y electroforesis horizontal	36
Estandarización de un ensayo PCR para la amplificación del gen que codifica la proteína paraflagelar de <i>T. vivax</i>	36
Gradiente de temperatura de hibridación.....	37
Gradiente de magnesio	39
Gradiente de Taq polimerasa	40
Gradiente de cebadores	41
Electroforesis horizontal para la visualización de los productos de PCR amplificados	43
Clonación.....	43
Ligación.....	43
Transformación bacteriana	43
PCR de colonias.....	44
Extracción de plásmido	44
Clonación en un vector de expresión	46
Ligación.....	46
Análisis por enzimas de restricción (RFLP).....	47
Cuantificación de plásmidos	48
Transformación de células <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	48
Criopreservación bacteriana	49

Expresión de la proteína paraflagelar recombinante en bacterias transformadas de <i>E. coli</i> BL21	50
Electroforesis SDS-PAGE.....	51
Preparación de las muestras.....	51
Corrida electroforética	51
Tinción y revelado	52
Lisis bacteriana.....	52
Lisis con tampón TES.....	52
Lisis con tampón urea	53
Cuantificación de proteínas totales.....	53
Purificación de la proteína PFR recombinante	53
Preparación de la columna.....	54
Unión de la proteína a la resina.....	54
Lavado de la resina y elución	54
Diálisis y concentración.....	55
Cuantificación de la proteína PFR mediante ensayo BCA.....	55
Westernblot de la proteína PFR purificada.....	56
Transferencia en tanque húmedo.....	57
Inmunomarcaje y revelado	57
Capítulo IV: Resultados	59
Estandarización del ensayo PFRL-PCR.....	59
Clonación.....	61

	12
Vector de clonación.....	61
Vector de expresión.....	62
Obtención de la proteína recombinante PFR	68
Determinación del peso molecular de la proteína	68
Optimización post-inducción.....	69
Comparación del rendimiento de lisis bacteriana.....	71
Purificación y análisis de pureza	72
Cuantificación de la proteína PFR y rendimientos de purificación	74
Westernblot	75
Capítulo V: Discusión.....	77
Capítulo VI: Conclusiones	85
Capítulo VII: Recomendaciones	86
Capítulo VIII: Bibliografía	87
Capítulo IX: Apéndices.....	102

Índice de tablas

Tabla 1 Clasificación taxonómica de <i>Trypanosoma vivax</i>	25
Tabla 2 Reactivos y concentraciones utilizados para el gradiente de temperatura de la PFRL-PCR.	38
Tabla 3 Condiciones de la PFRL-PCR para gradiente de temperatura	38
Tabla 4 Condiciones para la reacción de la PFRL-PCR	39
Tabla 5 Mezcla de reacción para el gradiente de magnesio.....	39
Tabla 6 Cantidades de magnesio y agua, en microlitros, calculados para el gradiente.	40
Tabla 7 Mezcla de reacción para el gradiente de Taq polimerasa.....	40
Tabla 8 Cantidades de Taq polimerasa y agua, en microlitros, calculados para el gradiente. ...	41

Tabla 9 Mezcla de reacción para el gradiente de cebadores.....	42
Tabla 10 Cantidades de cebadores y agua, en microlitros, calculados para el gradiente.	42
Tabla 11 Reactivos utilizados en el proceso de ligación.....	46
Tabla 12 Reactivos utilizados para la digestión enzimática	48
Tabla 13 <i>Reactivos y volúmenes utilizados en geles de poliacrilamida</i>	52
Tabla 14 <i>Volúmenes empleados en las diluciones estándar de BCA</i>	55
Tabla 15 <i>Efecto del crecimiento post-inducción sobre la densidad celular y la cantidad relativa de proteína PFR</i>	70
Tabla 16 <i>Concentración y rendimiento de la proteína PFR</i>	75

Índice de figuras

Figura 1 <i>Distribución geográfica de T. vivax basada en una revisión sistemática</i>	23
Figura 2 <i>Estructura subcelular de Trypanosoma sp.</i>	26
Figura 3 <i>Gradientes empleados para la estandarización de la PFRL-PCR</i>	60
Figura 4 <i>PCR de colonias</i>	62
Figura 5 <i>Clonación in silico del gen que codifica la proteína PFR de T. vivax</i>	63
Figura 6 <i>Plásmido en fase de codificación de la proteína PFR</i>	64
Figura 7 <i>Plásmido fuera de fase de codificación de la proteína PFR</i>	65
Figura 8 <i>PCR de colonias de células transformadas de E. coli JM109</i>	66
Figura 9 <i>PFRL-PCR de plásmidos y análisis por enzimas de restricción</i>	67
Figura 10 <i>PCR de colonias únicas de bacterias transformadas de E. coli BL21</i>	68
Figura 11 <i>Efecto de la incubación post-inducción en la expresión de la proteína PFR</i>	69
Figura 12 <i>Densidad celular post-inducción de expresión</i>	71
Figura 13 <i>Lisis celular con tampón TES y urea</i>	72
Figura 14 <i>Purificación de la proteína recombinante PFR</i>	73
Figura 15 <i>Purificación de la proteína recombinante PFR empleando 30 mM de imidazol</i>	74
Figura 16 <i>Ensayo westernblot de la proteína PFR</i>	76

Listado de abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
pb	Pares de bases
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfatos
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
g	Fuerza centrífuga relativa
IMAC	Cromatografía de afinidad de metal inmovilizado
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
kDa	Kilodalton
kb	Kilobases
LB	Luria – Bertani
ml	Mililitros
mM	Milimolar
MWCO	Corte de peso molecular
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
OD₆₀₀	Densidad óptica medida a 600 nanómetros
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFR	Paraflagelar
PFRL-PCR	PCR para la amplificación del gen que codifica la proteína paraflagelar
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SOC	Caldo super óptimo con represión catabólica
TviCatL-PCR	PCR para la amplificación de Catepsina L-Like
U	Unidades

μl	Microlitros
UV	Ultravioleta
V	Voltios

Resumen

La tripanosomosis bovina es una enfermedad hemoparasitaria ocasionada por diferentes parásitos del género *Trypanosoma*, incluyendo a la especie *Trypanosoma vivax*, la cual se ha reportado como la principal responsable a nivel mundial, además de poseer características más patogénicas. La sintomatología de la tripanosomosis incluye anorexia, anemia, infertilidad y abortos; generando pérdidas económicas al sector ganadero del país. Los métodos rápidos de detección a nivel de especie suelen ser escasos o presentan reacción cruzada, por lo que se ha sugerido emplear metodologías de clonación y expresión para obtener antígenos específicos que faciliten el diagnóstico.

Se realizó la estandarización de una PCR para la amplificación de un gen que codifique la proteína PFR de la especie *T. vivax* y su posterior clonación, expresión y purificación empleando un huésped bacteriano. La estandarización del ensayo PCR se logró mediante un gradiente de temperatura de hibridación, magnesio, taq polimerasa y cebadores que resultó en una banda definida de 1500 pb. La clonación y expresión se llevó a cabo en células *E. coli* BL21 y se comprobó mediante electroforesis SDS-PAGE obteniéndose una proteína de aproximadamente 64 kDa. La purificación posterior se logró empleando una cromatografía de afinidad Ni-NTA, logrando un porcentaje de pureza del 75,3 %. La concentración de la proteína PFR obtuvo valores de 0,14 y 0,25 mg/ml para la cromatografía de afinidad y filtración por centrifugación, respectivamente.

Palabras clave: proteína paraflagelar, *Trypanosoma vivax*, clonación, expresión.

Abstract

Bovine trypanosomosis is a hemoparasitic disease caused by different parasites of the genus *Trypanosoma*, including the species *Trypanosoma vivax*, which has been reported as the main responsible worldwide, besides having more pathogenic characteristics. Symptomatology of trypanosomosis includes anorexia, anemia, infertility and abortions, generating economic losses to the country's livestock sector. Rapid detection methods at species level are usually scarce or cross-reactive, so it has been suggested to use cloning and expression methodologies to obtain specific antigens to facilitate diagnosis.

The standardization of a PCR for the amplification of a gene encoding the PFR protein of *T. vivax* species and its subsequent cloning, expression and purification using a bacterial host was carried out. Standardization of the PCR assay was achieved using a gradient of hybridization temperature, magnesium, taq polymerase and primers resulting in a defined band of 1500 bp. Cloning and expression was carried out in *E. coli* BL21 cells and verified by SDS-PAGE electrophoresis resulting in a protein of approximately 64 kDa. Subsequent purification was achieved using Ni-NTA affinity chromatography, achieving a purity percentage of 75,3 %. The PFR protein concentration obtained values of 0,14 and 0,25 mg/ml for affinity chromatography and centrifugation filtration, respectively.

Key words: paraflagellar rod protein, *Trypanosoma vivax*, cloning, expression.

Capítulo I: Introducción

Planteamiento del problema

La tripanosomosis es una enfermedad parasitaria hemotrópica que en bovinos representa uno de principales afecciones que limitan el desarrollo ganadero, siendo los hemoparásitos responsables del 40% de la tasa de mortalidad total del ganado (Marc Desquesnes, 2004). *Trypanosoma vivax* es una de las especies más patogénicas y ha sido reportada en varios países de Latinoamérica (Gonzatti et al., 2014). En Ecuador, el primer reporte en sangre fue realizado por Wells et al., (1977) y recientemente mediante análisis moleculares (Chávez-Larrea et al., 2020). Dentro de la sintomatología producida en el ganado se encuentran la pérdida progresiva del peso, que afecta directamente a la producción de carne y leche, además de generar efectos adversos sobre la fertilidad, provocando pérdidas económicas al sector ganadero del país (Bolívar et al., 2007; Pereira et al., 2018).

De acuerdo con Fetene et al. (2021) en regiones en donde predomina la tripanosomosis, como es el caso del continente africano, muestran que esta enfermedad ha generado pérdidas económicas equivalentes a 5 billones de dólares al año e impedido la utilización de alrededor de diez millones de kilómetros cuadrados de tierra con capacidad para la producción de 125 millones de cabezas de ganado. Estudios más recientes en la región de África determinan que las pérdida económicas únicamente por drogas para el tratamiento contra esta infección rondan los 35 millones de dólares (Dagnachew & Bezie, 2015).

En países más cercanos a Ecuador, como Brasil, Seidl et al. (1999) determinaron pérdidas económicas que ascendían a 160 millones de dólares basados en observaciones de siete rodeos en la región del Pantanal, en Argentina; Abdala et al. (2020) evidenciaron pérdidas de 58 mil dólares en un rodeo lechero en una zona de la provincia de Santa Fe. Estos datos muestran la necesidad de herramientas diagnósticas más efectivas para establecer estrategias de control y prevención contra la tripanosomosis bovina.

Justificación del problema

La detección de tripanosomas se realiza usualmente empleando métodos de microscopia y tinción, sin embargo, las características morfológicas para la diferenciación a nivel de especie son reducidas en el género *Trypanosoma*, limitando así la utilidad del método. Las técnicas moleculares han sido ampliamente empleadas para la identificación de la enfermedad a nivel de especie, sin embargo éstas implican costos altos y mayores tiempos para el diagnóstico (Gómez-Piñeres et al., 2014).

Debido a la dificultad que existe en el aislamiento y caracterización de antígenos para *T. vivax*, se han empleado antígenos de *T. evansi* por su similitud antigénica para el diagnóstico, sin embargo esto supone inconvenientes en cuanto a resultados falsos positivos cuando existe presencia de ambas especies en algunas zonas ganaderas (Bolívar et al., 2007). Cabe recalcar que la importancia de la identificación a nivel de especie radica en la diferenciación del tratamiento que debe administrarse, empleándose para el tratamiento de *T. vivax* aceturato de diminazeno y el cloruro de isometamidio; mientras que para *T. evansi* se recomienda el uso de quinapiramina, suramina y melarsomina (Desquesnes et al., 2011; Giordani et al., 2016).

Una de las estrategias para mejorar la obtención de antígenos específicos es el empleo de métodos de clonación y expresión de proteínas recombinantes del patógeno de interés (Correira & Gonzalez, 2019). La presente investigación se centra en la producción de una proteína paraflagelar recombinante específica para la especie *Trypanosoma vivax*.

Objetivos

Objetivo general

Obtener la proteína paraflagelar recombinante de *Trypanosoma vivax* mediante clonación y expresión en *Escherichia coli* BL21 (DE3).

Objetivos específicos

- Estandarizar un ensayo PCR para la amplificación del gen que codifica la proteína paraflagelar de *Trypanosoma vivax*.
- Expresar la proteína paraflagelar recombinante en bacterias *Escherichia coli* BL21 (DE3) transformadas con el gen que la codifica.
- Purificar la proteína paraflagelar recombinante mediante cromatografía de afinidad en columnas de níquel.

Hipótesis

La proteína paraflagelar recombinante de *Trypanosoma vivax* se expresa en bacterias transformadas de *Escherichia coli* BL21 (DE3).

Capítulo II: Marco teórico

Tripanosomosis bovina

La tripanosomosis bovina suele presentarse como varias enfermedades que atraviesan por un período crónico y es causada por varias especies del género *Trypanosoma* que se reproducen en el hospedador, siendo la especie *T. vivax* la principal causante a nivel mundial, generando un cuadro patogénico de mayor gravedad y provocando la enfermedad denominada como “cachera” o “huequera” (Benavides et al., 2011; Gonzatti et al., 2014; Rivera, 1996).

Sintomatología

Durante la infección la enfermedad presenta tres fases bien definidas en cuanto a la sintomatología, las cuales se clasifican en prepatente, aguda y crónica. En la fase prepatente generalmente no se detecta síntomas y comprende desde el período de inoculación o contacto con el parásito hasta la presencia de los primeros síntomas. Tiene una duración de 2 días 10 días en bovinos (Osório et al., 2008). La fase aguda puede ser identificada con la aparición de los parásitos en sangre y la manifestación de los primeros síntomas, que incluyen aumento de la temperatura, anorexia, anemia debido a la baja cantidad de eritrocitos circulantes, además pueden presentarse trastornos reproductivos; en hembras, ciclo estral anormal, anestro temporal o permanente y abortos; en machos, inhibición de la espermatogénesis, degeneración testicular y esterilidad. Este periodo puede durar de 1 a 2 meses dependiendo de la patogenicidad (Hurtado, O., Castro, P., & Giraldo-Ríos, 2016; Sekoni, 1994). En la fase crónica existe una disminución del índice de parasitemia, siendo las pequeñas hemorragias a nivel de mucosa, cavidad corporal y anemia persistente los únicos signos observables (Suárez, et al., 2003).

Aspectos inmunológicos

Los tripanosomas salivarianos han desarrollado estrategias de evasión de la respuesta inmune para poder sobrevivir en la sangre del huésped, presentando características

antigénicas complejas (Soulsby, 1987). Las determinantes antigénica de estos parásitos se encuentran en una capa superficial cubierta por glicoproteínas y estimulan al huésped para producir anticuerpos protectores que posteriormente actúan eliminando a todos los parásitos que expresan esa variante antigénica en específico, sin embargo algunos parásitos individuales que poseen diferentes antígenos de superficie son capaces de sobrevivir y posteriormente multiplicarse hasta repoblar la sangre periférica provocando un nuevo cuadro de parasitemia, de hecho, un solo parásito posee la capacidad para producir células hijas con diferentes antígenos de superficie que se conocen como glicoproteínas variantes de superficie (VSG), cada parásito podría poseer hasta 1000 genes de esta glicoproteína y por lo tanto ser antigénicamente diferente uno de otro (de Gee, 1982; Gardiner, 1989).

Trypanosoma vivax

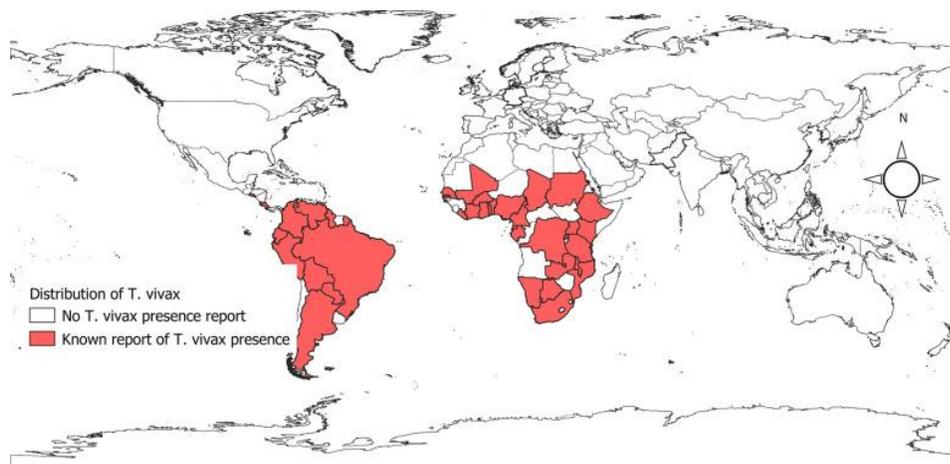
El hemoparásito *Trypanosoma vivax* es un protozoario monomórfico que infecta a rumiantes domésticos como bovinos, ovinos, caprinos y bufalinos, presenta una distribución mundial, aunque ha sido identificado mayormente en zonas tropicales de África y América Latina (Gómez-Piñeres, et al., 2014).

Distribución geográfica

Estudios que se han realizado en 27 países africanos han demostrado la presencia de *T. vivax* en al menos una especie hospedadora. Por otro lado, en Latinoamérica se ha reportado la presencia de *T. vivax* en 12 de 13 países estudiados, los países del continente africano y sudamericano en cuestión se encuentran en la Figura 1. No se ha encontrado presencia de *T. vivax* en continentes como Antártida, Asia, América del Norte, Australia y Europa (Fetene et al., 2021).

Figura 1

Distribución geográfica de *T. vivax* basada en una revisión sistemática



Nota: Tomado de “Global distribution, host range and prevalence of *Trypanosoma vivax*: a systematic review and meta-analysis” (p. 5), por E. Fetene, S. Leta, F. Regassa, & P. Büscher, 2021, *Parasites & Vectors*, 14(1).

Transmisión y ciclo de vida

La transmisión de *T. vivax* puede ser de forma cíclica o mecánica, la primera se produce únicamente en África utilizando las moscas del género *Glossina* (tse-tsé) como vector en donde el parásito pasa de fase tripomastigote a epimastigote, diferenciándose en formas infecciosas de carácter meta cíclico con capacidad de infectar y reproducirse en los animales, por otro lado, la forma mecánica se produce en América Latina y también en África, mediante insectos hematófagos que generalmente pertenecen a las familias *Tabanidae* y *Stomoxysidae*, produciéndose la diferenciación de las formas parasitarias en el huésped (Anosa & Isoun, 1980; Valera et al., 2005).

Diagnóstico

Existen técnicas parasitológicas, inmunológicas y moleculares para el diagnóstico de *T. vivax*, dentro de las técnicas parasitológicas, la centrifugación por hematocrito (Woo, 1970) es

una técnica ampliamente utilizada, permitiendo la observación de tripanosomas en movimiento entre la capa de leucocitos y el plasma, sin embargo presenta sensibilidad baja en la fase crónica de la infección, debido a un descenso en la parasitemia por debajo de 200 parásitos/ml (Marc Desquesnes & Tresse, 1996; Osório et al., 2008).

Se han desarrollado técnicas inmunológicas para la detección de *T. vivax*, tales como ELISA sándwich o indirecto utilizando anticuerpos específicos o antígenos parasitarios, sin embargo éstos presentan problemas en relación a la sensibilidad y especificidad, ya que puede existir reacción cruzada con parásitos del mismo género, como *T. evansi*, por el momento la utilidad de las pruebas inmunológicas se centra específicamente para investigaciones epidemiológicas, especialmente para estudios de distribución de *T. vivax* (Desquesnes et al., 2022; Greiner et al., 1997; Madruga et al., 2000).

Las técnicas moleculares basadas en amplificación de ácidos nucleicos representan actualmente las más sensibles para la detección de *T. vivax*, logrando detección en animales asintomáticos y con parasitemia no detectable mediante técnicas de frotis o micro-hematocrito, a pesar de esto, la aplicación de técnicas moleculares necesita de equipos y reactivos costosos, por lo que su aplicación a gran escala en campo es limitada (Desquesnes & Dávila, 2002; Seye et al., 2000).

Clasificación taxonómica

Los géneros *Trypanosoma* emplean dos mecanismos de desarrollo dentro del huésped por los que han sido clasificadas en Salivaria y Estercolaria (Gonzatti et al., 2014), *T. vivax* pertenece a la primera de esta clasificación que se caracteriza por el desarrollo dentro de la porción frontal del sistema digestivo de los invertebrados y se transmite a través de la picadura de un insecto, en su estructura morfológica presentan una terminación en punta redonda y se multiplican en forma de tripomastigote (Kaufer et al., 2017; Stevens & Gibson, 1999).

La clasificación taxonómica de acuerdo con (Desquesnes, 2004) se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1

Clasificación taxonómica de Trypanosoma vivax

Clasificación taxonómica	
Reino	Protista
Subreino	Protozoa
Phylum	Sarcomastigophora
Subphylum	Mastigophora
Clase	Zoomastigophora
Orden	Kinetoplastida
Suborden	Trypanosomatina
Familia	Trypanosomatidae
Género	<i>Trypanosoma</i>
Subgénero	<i>Duttonella</i>
Especie	<i>vivax</i>

Morfología

El tamaño corporal de *Trypanosoma vivax* se encuentra en un rango de 18 a 31 μm que incluye un flagelo libre de 3 a 6 μm (Osório et al., 2008). Sin embargo en varias cepas suramericanas existen variaciones en el tamaño con longitudes que van de 16 a 26,5 μm (Shaw & Lainson, 1972). *T. vivax* presenta varios organelos esenciales para su supervivencia, internamente contiene una única mitocondria extendida a lo largo del cuerpo en forma reticular, el cinetoplasto es grande y terminal lo que de acuerdo con Uilenberg & Boyt (1998) es una característica distintiva de las demás especies, este cinetoplasto está formado por el ADN mitocondrial que se encuentra en el interior de la mitocondria en forma apelmazada (Bastin et al., 1996; Field & Carrington, 2009).

El núcleo de *T. vivax* se encuentra en la parte central del cuerpo, es de gran tamaño y densidad, y está circundado por dos membranas con poros y yuxtapuestas una de la otra (Vickerman, 1974). El citoplasma se encuentra en la parte posterior del cuerpo debido a que se

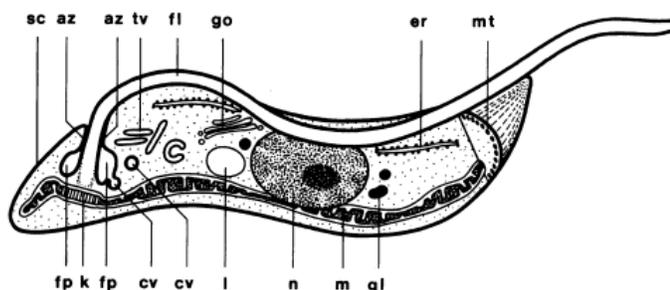
encuentra hinchado, éste contiene lípidos y lisosomas, además presenta organelos acídicos que almacenan cationes que participan en la regulación del pH y ósmosis (Docampo et al., 2005; Uilenberg & Boyt, 1998)

Los tripanosomátidos contienen en su superficie celular una membrana plasmática y una capa constituida por microtúbulos subpeliculares entrelazados que se adaptan al crecimiento y división celular, estos microtúbulos se encuentran fuertemente enlazados a la membrana plasmática. El sistema de locomoción de *T. vivax* presenta un solo flagelo que sale de la célula a través de un espacio en la matriz de microtúbulos y una invaginación correspondiente a la membrana plasmática conocida como bolsillo flagelar. El flagelo corre a lo largo del cuerpo celular en una espiral hacia la izquierda en el polo anterior, éste además contiene pliegues de los túbulos que lo conforman y presenta una membrana ondulante que permite la unión del flagelo al parásito (Field & Carrington, 2009; Vedrenne et al., 2002).

T. vivax también presenta una estructura compuesta por 9 + 2 microtúbulos que se encuentran ubicados en forma de anillo y el par restante de forma libre en la parte central, envueltos a su vez por una vaina denominada axonema; lateral a esta estructura se observa un filamento paraflagelar filamentoso y sumamente organizado y en el interior de éste se encuentra la proteína paraflagelar, cuya función está relacionada con la motilidad del parásito (McKean et al., 2003).

Figura 2

Estructura subcelular de Trypanosoma sp.



Nota: Las abreviaturas son: **az**, zona de adhesión a la entrada de la bolsa flagelar; **cv**, vesículas recubiertas; **er**, retículo endoplásmico; **fl**, flagelo; **fp**, bolsillo flagelar; **gl**, glucosoma, un orgánulo unido a la membrana implicado en la glucólisis y otras vías metabólicas; **go**, aparato de Golgi; **k**, cinetoplasto; **l**, lisosoma; **m**, mitocondria; **mt**, microtúbulos subpeliculares; **n**, núcleo, **sc**, recubrimiento superficial que contiene una variante de glicoproteína superficial; **tv**, estructura tubulovesicular. Tomado de “The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids” (p. 2), por S. Landfear & M. Ignatushchenko (2001), *Molecular & Biochemical Parasitology*, 115(1).

Filamento paraflagelar (PFR)

Los flagelos de tripanosomátidos presentan una estructura conocida como varilla o filamento paraflagelar (PFR), que es una estructura filamentosa que se extiende a lo largo del flagelo y el axonema de la mayoría de los flagelados de cinetoplasto (Wilson et al., 2008). A diferencia del axonema, que se conserva entre los eucariotas, el PFR está restringido a cinetoplastoides, euglenoides y dinoflagelados y es importante para la motilidad celular. El PRF está organizado por filamentos discretos estructurados en matrices en forma de rejilla con tres diferentes dominios: proximal, intermedio y distal (Farina et al., 1986).

El PFR ha sido ampliamente estudiado y los análisis bioquímicos, bioinformáticos e inmunológicos han llevado a la descripción de varias proteínas que están implicadas como componentes, estudios iniciales muestran la presencia abundante de dos proteínas PFR1 y PFR2 de 80 kDa y 69 kDa, respectivamente, como componentes definitorios de esta estructura, encontrándose la PRF1 en la zona proximal principalmente, mientras que en los dominios intermedio y distal la PRF2, estas proteínas, además de aproximadamente otras 40 adicionales le han concedido al PRF funciones metabólicas, reguladoras y de señalización (Maga et al., 1999; Portman & Gull, 2010; Rocha et al., 2010).

Proteínas paraflagelares

Dentro de las proteínas paraflagelares que se han encontrado mediante proteómica, la PRF1 se considera uno de los componentes principales del flagelo de los tripanosomas, y junto con la PRF2 han sido estudiadas como posibles antígenos capaces de generar una respuesta inmune contra algunas especies de tripanosomas. En *T. evansi* por ejemplo se ha demostrado que la PRF1 y PRF2 son antigénicas e inmunogénicas, resultados similares se han obtenido para otras especies como *T. cruzi* y *Leishmania mexicana* (Abdille et al., 2008; Saravia et al., 2005).

Proteína recombinante

Una proteína recombinante es una proteína cuyo código genético se formó a partir de un ADN recombinante, es decir que está formado por dos segmentos diferentes de ADN, un vector plasmídico y un gen de interés que ha sido insertado en el vector en cuestión. Hoy en día, la aplicación de bacterias para sintetizar proteínas recombinantes está muy desarrollada (Biswas et al., 2016). Los pasos para la obtención de una proteína recombinante se pueden resumir en el proceso de clonación, transformación y expresión, consistiendo el primero en la inserción de un gen de interés en un vector de expresión, posteriormente se realiza la transformación en un hospedador de nuestra elección y finalmente se induce la expresión de la proteína para su purificación y caracterización (Rosano & Ceccarelli, 2014).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La obtención del gen de interés se realiza mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se trata de una reacción enzimática que amplifica un fragmento de ADN partiendo de una muestra de ADN más grande. En la PCR se utiliza ADN molde, cebadores o primers, dNTPs, la enzima polimerasa, y una solución tampón, cada uno cumple una función específica dentro de la reacción que da lugar a un número elevado de copias de ADN idénticas (Garibyan & Avashia, 2013).

Vectores de expresión

Los vectores de clonación son plásmidos especializados en donde se inserta cualquier fragmento de ADN extraño para su posterior estudio o expresión. Algunos de estos vectores incluyen características para selección de colonias mediante la inserción de un gen LacZ para producción de galactosidasa, y también se han diseñado vectores que facilitan el proceso de purificación al incluir un sistema “His-tag” que permite recuperar la proteína expresada mediante cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados utilizando resinas de agarosa y ácido nitrilotriacético cargadas con Ni²⁺ o Co²⁺ (Clark & Pazdernik, 2016; Rosano & Ceccarelli, 2014).

Huéspedes de expresión

Se utilizan una variedad de huéspedes de expresión para la obtención de proteínas recombinantes, incluidas bacterias, células de mamíferos, levaduras, células de insectos, animales y plantas transgénicos.

Escherichia coli. Es una bacteria entérica gram-negativa, en forma de bastoncillo y con un genoma circular de 4.6 megabases. Es el huésped bacteriano preferido para la expresión de proteínas recombinantes, debido a su bajo costo, genética y bioquímica bien conocidas, rápido crecimiento y buena productividad (Owczarek et al., 2019; Tripathi & Shrivastava, 2019).

Existen algunas desventajas en cuanto a la producción de proteínas eucariotas en huéspedes de expresión procariontes, de entre los que destacan la incapacidad de producción de proteínas que contienen enlaces disulfuro complejos o la dificultad de realizar modificaciones post traduccionales como glicosilaciones que son procesos necesarios para la funcionalidad de algunas proteínas. La sobreexpresión de proteínas en *E. coli* genera que éstas se hallen agregadas en forma de cuerpos de inclusión (no solubles), sin embargo, este problema puede solucionarse aplicando técnicas de lisis celular, que por otro lado generan

proteínas desnaturalizadas que se renaturalizan en procesos posteriores a la purificación (Baneyx, 1999; J. H. Choi & Lee, 2004)

Cepa BL21 (DE3). La cepa *E. coli* BL21 (DE3) es derivada de un aislado temprano de *E. coli* B y se desarrolló para la expresión génica basada en la polimerasa de ARN T7 después del aislamiento temprano de un derivado que lleva el profago DE3 en su sitio de unión lambda. Es una de las favoritas en procesos de expresión debido a sus características como crecimiento celular rápido, disminución de la producción de acetato y capacidad de secreción superior (Pinske et al., 2011; Studier et al., 1990).

Purificación de proteínas

La recuperación de una proteína biológicamente activa previo a los procesos de expresión requiere de algunos pasos de purificación que son dependientes de la estrategia de producción que se haya utilizado, sin embargo, generalmente se suele necesitar de clarificaciones del producto, purificaciones iniciales y diferentes procesos cromatográficos (Jonasson et al., 2002)

Los procesos cromatográficos para purificación de proteínas suelen iniciarse con pasos de captura en donde se eliminan inicialmente ciertas impurezas, por medio de adsorbentes en donde se unen las proteínas de interés, para lo cual se aprovecha sus características físicas y químicas, la cromatografía de intercambio iónico y en algunos casos de intercambio hidrofóbico, suelen emplearse como primer paso. Para la eliminación de impurezas adicionales, tales como proteínas de la célula huésped, los ácidos nucleicos y las endotoxinas; se emplean técnicas cromatográficas de alta resolución, siendo la cromatografía de afinidad una de las más empleadas en productos proteicos de origen recombinante (Jonasson et al., 2002; Wingfield, 2015).

IMAC

La cromatografía de afinidad en metales inmovilizados fue formulada inicialmente por (Porath et al., 1975), el método está basado en la afinidad de algunos metales de transición como Ni^{2+} y Co^{2+} con aminoácidos como la histidina y la cisteína. Una de las aplicaciones más relevantes de la esta metodología es la purificación de proteínas recombinantes que contienen seis o más residuos de histidina, denominado His tag. La etiqueta de histidina empleada en muchos sistemas de expresión permite la purificación de proteínas a un porcentaje de pureza útil para un sinnúmero de aplicaciones empleando un único paso, esto debido a la especificidad y afinidad relativamente altas de la His tag (Block et al., 2009).

Algunas de las ventajas más importantes la purificación empleando el sistema IMAC además de su bajo costo y facilidad de uso, son; (i) la interacción His tag con el ligando funciona incluso en condiciones desnaturalizantes, en donde se han empleado tampones de lisis como urea 8 M o clorhidrato de guanidina 6 M que permite realizar procesos de renaturalización posteriores, así también (ii) condiciones tanto reductoras como oxidante, (iii) buena eficiencia de captura incluso en presencia de altas concentraciones de proteína, y (iv) escalabilidad de los proceso de purificación (Hochuli et al., 1988; Jungbauer et al., 2004).

Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas es importante para el monitoreo de los procesos de purificación, los métodos que se utilizan en la cuantificación de proteínas suelen basarse en la detección de aminoácidos específicos mediante absorbancia o interacciones de varios colorantes con aminoácidos o enlaces peptídicos. En general, la elección del método de cuantificación depende de la cantidad de proteína disponible, la composición de la muestra y la composición del buffer en el que ésta fue eluida. Dentro de los métodos más frecuentemente utilizados se encuentran Bradford, BCA y espectrofotometría UV (Goldring, 2012; Stepanchenko et al., 2011).

Método de Bradford

Bradford utiliza el colorante Azul de Commassie G-250 que presenta un color rojizo y tiene una absorbancia máxima a 465 nm, en condiciones ácidas este reactivo reacciona principalmente con la arginina y con residuos de otros aminoácidos como triptófano, tirosina, histidina, lisina y fenilalanina, generando un color azul con una absorbancia máxima a 595 nm. El tinte empleado en esta metodología podría interaccionar con ciertos tampones a base de detergentes en los que se encuentra eluida la proteína a cuantificar, por lo que es importante comprobar si existe algún tipo de reacción y de ser el caso se debe eliminar los componentes reactantes o en su defecto elegir una metodología alternativa (Bradford, 1976; Compton & Jones, 1985).

Método BCA

Este ensayo está basado en la reacción de los iones Cu^{2+} con las proteínas en condiciones alcalinas produciendo la oxidación del ion Cu^{2+} a Cu^+ que posteriormente es detecta por el ácido bicinconínico, en la reacción se forma un complejo pasando de un color verde a uno azul/púrpura que es más intenso a mayor concentración de proteína y debe ser leído a 562 nm. Presenta un rango de detección de hasta 2 mg/ml de proteína o hasta 50 μg . En contraste con el método descrito anteriormente, éste es compatible con varios componentes de las soluciones tampón, especialmente con detergentes. (Smith et al., 1985; Wiechelman et al., 1988)

Espectrofotometría UV

La espectrofotometría UV es descrita como un método rápido y simple para la cuantificación de proteínas, sin embargo, es de los métodos menos precisos. Su técnica se basa en la capacidad de la luz ultravioleta de detectar la presencia de aminoácidos aromáticos como la tirosina y el triptófano en las proteínas y son medidos a 280 nm, la aplicación de este método debe hacerse únicamente para evaluaciones preliminares de la concentración de

proteínas. El rango de detección del método es bastante amplio y va desde 20 hasta 3000 μg de proteína, además es particularmente útil para la medición de proteínas eluidas mediante cromatografía en columnas debido a que los volúmenes recuperados suelen ser bajos y así se evita la pérdida de proteína (Fasman, 1989; Layne, 1957)

Capítulo III: Materiales y métodos

Participantes

El presente trabajo de titulación fue elaborado por Fausto Vinicio Bedoya Páez, egresado de la carrera de Ingeniería en Biotecnología, bajo la tutoría de la Dra. María Augusta Chávez Larrea, M. Sc., docente-investigador de la Universidad de las Fuerzas ESPE, la asesoría del Dr. Armando Reyna Bello, Ph.D., docente-investigador de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE extensión Santo Domingo de los Tsáchilas y la Ing. Cristina Cholota Técnico Docente del laboratorio interdisciplinario de Biotecnología Animal.

Zona de estudio

El presente trabajo de titulación se realizó en laboratorio interdisciplinario de Biotecnología Animal de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, que se encuentra ubicado en la Av. Gral. Rumiñahui S/N, Sangolquí 171103. Sus coordenadas geográficas son: latitud 0°18'53.5" S y longitud 78°26'36.5" O.

Duración de la investigación

La investigación para la culminación del trabajo de titulación fue de 11 meses. Se inició en octubre de 2021 y culminó en agosto de 2022.

Material de Trabajo

Las muestras de sangre bovina positivas para *Trypanosoma vivax* mediante TviCatL-PCR fueron proporcionadas por el laboratorio interdisciplinario de Biotecnología Animal de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, como parte del proyecto de vinculación e investigación: "Establecimiento de una plataforma en apoyo a la formación y sensibilización, diagnóstico y desarrollo de una estrategia de control de la brucelosis y tripanosomosis en Ecuador (BruTryp)" financiado por la ARES de Bélgica.

Extracción de ADN a partir de sangre total

El ADN genómico fue extraído siguiendo el protocolo de GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit (ThermoScientific, USA) con modificaciones que se detallan a continuación.

Para romper los glóbulos rojos se agregó 1 ml de agua libre de nucleasas a 500 µl de sangre total que estuvo almacenada a -20 °C y fue previamente descongelada a temperatura ambiente durante 10 minutos, la mezcla se incubó por 5 minutos con agitación a 1200 rpm y posteriormente se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se descartó y el sedimento fue resuspendido en 200 µl de PBS a concentración 1X.

La lisis celular se logró añadiendo 20 µl de proteinasa K y 400 µl de solución de lisis a la mezcla anterior, seguido de vórtex hasta obtener una solución homogénea, esta solución fue incubada a 56 °C y 300 rpm en una incubadora con agitación (Thermo-Shaker MRC modelo DBS-001, Thermo Fisher Scientific, USA) durante 10 minutos y posteriormente se agregó 200 µl de etanol al 100% y se mezcló por pipeteo.

La mezcla anterior se llevó a una columna de purificación y se centrifugó a 8000 rpm por 1 minuto, se descartó el tubo de colección y se colocó la columna en un nuevo tubo, se añadió en la columna 500 µl de la solución de lavado I y se centrifugó a 10000 rpm durante 1 minuto, se descartó el flujo, se añadió en la columna 500 µl de la solución de lavado II y se centrifugó a 1000 rpm durante 3 minutos, se descartó el flujo y finalmente se centrifugó la columna a máxima velocidad (14000 rpm) para evaporar cualquier resto de etanol.

Para la elución se colocó la columna en un tubo estéril de 1.5 ml y se agregó 50 µl de buffer de elución en el centro de la columna, se dejó incubar a temperatura ambiente por 2 minutos y posteriormente se centrifugó a 10000 rpm, se realizó el mismo procedimiento con 25

y 12.5 µl de buffer de elución para un volumen total de 87,5 µl. Se descartó la columna de purificación y se almacenó el ADN a -20 °C.

Cuantificación de ADN y electroforesis horizontal

Se estimó la concentración de ADN por espectrofotometría UV utilizando un Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

Previo a la cuantificación del ADN se limpió el sensor del equipo utilizando 2 µl de agua destiladas y HCL 0,5 N, se configuró el equipo para medición de ácidos nucleicos y se blanqueó agregando 2 µl del buffer de elución que se utilizó para la extracción de ADN, seguidamente se agregó 2 µl de cada muestra y se midió la concentración en µg/ml y la pureza en base a los ratios de absorbancia 260/280 y 260/230.

La integridad del ADN se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (p/v) que se tiñó con SYBR® Safe DNA Gel Stain. Se cargó 3 µl de muestra en cada pocillo utilizando 1 µl de buffer de carga Blue Juice 10x, el gel se corrió a 120 voltios durante 45 minutos y se visualizó posteriormente utilizando un equipo ChemiDoc™ Touch Imaging System (BioRad, CA, USA).

Estandarización de un ensayo PCR para la amplificación del gen que codifica la proteína paraflagelar de *T. vivax*

Para la estandarización de la PCR se tomaron en cuenta cuatro variables, temperatura de hibridación, concentración de magnesio, concentración de la enzima Taq polimerasa Platinum Taq DNA Polymerasa (Thermo Scientific) y concentración de los cebadores. Se realizaron diferentes ensayos en donde se evaluaron cada una de las variables antes mencionadas realizando gradientes hasta obtener las condiciones adecuadas.

La muestra de ADN "ADN-Bo-Napo-215" fue utilizada para todo el proceso de estandarización, esta muestra fue previamente cuantificada por espectrofotometría y es positiva

para *Trypanosoma vivax* mediante TviCatL-PCR (Chávez-Larrea et al., 2020). Se empleó además los cebadores PFRL-F (5'-ACGGAGGCATACGACATCAG-3') y PFRL-R (5'-GTGCTGTTGGCTCTGTAGCA-3') que fueron diseñados en un estudio previo en base al marco de lectura abierto del gen putativo de la proteína paraflagelar disponible de *T. vivax* (nº de acceso KAH8609245.1) y amplifican un fragmento de 1500 pares de bases (pb). Los cebadores fueron proporcionados por el laboratorio interdisciplinario de Biotecnología Animal de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

La temperatura de hibridación de los cebadores se calculó en el sitio web de Thermo Scientific (<http://www.thermoscientificbio.com/webtools/tmc/>) utilizando la herramienta T_m Calculator basándose en una modificación del método descrito por Allawi et al. (1997), se tomó esta temperatura como punto de partida hacia arriba para el gradiente que se describe a continuación.

Gradiente de temperatura de hibridación

El gradiente de temperatura de hibridación se realizó partiendo de una temperatura de 58 °C hasta 68 °C, con incrementos de 2 °C. El volumen final de reacción fue de 25 µl, en las tablas (2 y 3) se describen las concentraciones de los reactivos y las condiciones de la PCR. Se preparó la mezcla de reacción para un total de 7 muestras (168 µl), que incluían las temperaturas de hibridación 58, 60, 62, 64, 66 y 68 °C además de un control negativo, para este último se dispensó 24 µl de la mezcla en un tubo de 200 µl y se agregó 1 µl de agua destilada libre de ADNasa/ARNasa UltraPure™ (Invitrogen, EEUU)., a los restantes 144 µl de mezcla, se agregó 6 µl de ADN de la muestra "ADN-Bo-Napo-215" positiva para *Trypanosoma vivax* mediante TviCatL-PCR y se dispensó 25 µl en 6 tubos de 200 µl para las diferentes temperaturas de hibridación. Las muestras se centrifugaron brevemente y se llevó a cabo la reacción térmica en un termociclador ProFlex PCR System (Applied Biosystems, USA).

Tabla 2

Reactivos y concentraciones utilizados para el gradiente de temperatura de la PFRL-PCR.

Reactivos	Unidad	Stock	Concentración final	Volumen (μ l)
H ₂ O	μ l	N/A		119,35
Buffer	X	10	10	17,50
MgCl ₂	mM	50	2,5	8,75
PFRL-F	μ M	10	0,5	8,75
PFRL-R	μ M	10	0,5	8,75
dNTPs	μ M	40	0,8	3,50
Platinum Taq polimerasa	U/ μ l	5	1	1,40
ADN	ng/ μ l	100	100	7,00
Total				25,00

Nota: μ l: microlitro; μ M: micromolar; mM: milimolar; U/ μ l: unidades por microlitro; ng/ μ l: nanogramos por microlitro; dNTPs: mezcla de desoxinucleótidos.

Tabla 3

Condiciones de la PFRL-PCR para gradiente de temperatura

Proceso	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5	1
Desnaturalización	94	1	35
Hibridación	58-68 (variando 2 $^{\circ}$ C)	1	35
Extensión	72	2	35
Extensión final	72	1	1
Mantenimiento	4	∞	-

Nota: $^{\circ}$ C: grados centígrados; min: minutos.

Una vez establecida la temperatura de hibridación más adecuada, se realizó los gradientes de magnesio, Taq polimerasa y cebadores, de acuerdo con las condiciones de reacción que se describen en la Tabla 4.

Tabla 4*Condiciones para la reacción de la PFRL-PCR*

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5	1
Desnaturalización	94	1	35
Hibridación	62	1	35
Extensión	72	2	35
Extensión final	72	1	1
Mantenimiento	4	∞	-

Nota: °C: grados centígrados; min: minutos.

Gradiente de magnesio

El gradiente de magnesio se realizó a intervalos de concentración de 0,25 mM, partiendo desde 1,5 hasta 2,5 mM. Se preparó una mezcla de reacción base que no contenía agua ni magnesio, para un total de 7 muestras, como se describe en la Tabla 5.

Tabla 5*Mezcla de reacción para el gradiente de magnesio*

Reactivos	Unidad	Stock	Concentración final	Volumen (µl)
Buffer	X	10	10	17,50
PFRL-F	µM	10	0,5	8,75
PFRL-R	µM	10	0,5	8,75
dNTPs	µM	40	0,8	3,5
Platinum Taq polimerasa	U/µl	5	1	1,40
ADN	ng/µl	100	100	7,00

Nota: µl: microlitro; µM: micromolar; U/µl: unidades por microlitro; ng/ul: nanogramos por microlitro; dNTPs: mezcla de desoxinucleótidos.

El volumen total de la mezcla de reacción sin ADN fue de 39,9 µl que se dividieron para el número total de muestras (7), este valor fue de 5,7 µl por reacción. Posteriormente se calcularon las cantidades necesarias de magnesio y agua que se debían añadir para obtener las concentraciones deseadas, como se describe en la Tabla 6.

Tabla 6

Cantidades de magnesio y agua, en microlitros, calculados para el gradiente.

Reactivos	Concentración de magnesio (mM)				
	1,5	1,75	2,0	2,25	2,50
Mezcla de reacción	5,7	5,7	5,7	5,7	5,70
MgCl₂	0,75	0,88	1,00	1,13	1,25
H₂O	17,55	17,43	17,30	17,18	17,05
Total (µl)	24	24	24	24	24

Nota: µl: microlitro; mM: milimolar.

Una vez ensamblada la reacción, se agregó 1 µl de agua ultrapura para el control negativo y 1µl de ADN de la muestra “ADN-Bo-Napo-215” para las diferentes concentraciones de magnesio. La reacción térmica se llevó a cabo como se describe anteriormente en la Tabla 4.

Gradiente de Taq polimerasa

Una vez establecida la concentración óptima de magnesio, se llevó a cabo un gradiente de Taq polimerasa con el fin de optimizar la cantidad de reactivo utilizado por reacción, para este fin se probaron concentraciones desde 0,5 U hasta 1 U, en intervalos de 0,25 U. Se preparó una mezcla de reacción base que no contenía agua ni Taq polimerasa, para un total de 5 muestras, como se describe en la Tabla 7.

Tabla 7

Mezcla de reacción para el gradiente de Taq polimerasa.

Reactivos	Unidad	Stock	Concentración final	Volumen (µl)
Buffer	X	10	10	12,5
MgCl₂	mM	50	1,5	3,75
PFRL-F	µM	10	0,5	6,25
PFRL-R	µM	10	0,5	6,25
dNTPs	µM	40	0,8	2,5
ADN	ng/µl	100	100	5,00

Nota: **μl:** microlitro; **μM:** micromolar; **mM:** milimolar; **ng/ul:** nanogramos por microlitro; **dNTPs:** mezcla de desoxinucleótidos.

El volumen total de la mezcla de reacción sin ADN fue de 31,25 μl que se dividieron para el número total de muestras (4), este valor fue de 6,25 μl por reacción. Posteriormente se calcularon las cantidades necesarias de Taq polimerasa y agua que se debían añadir para obtener las concentraciones deseadas, como se describe en la Tabla 8.

Tabla 8

Cantidades de Taq polimerasa y agua, en microlitros, calculados para el gradiente.

Reactivos	Concentración de Taq Polimerasa (U)		
	0,5	0,75	1,0
Mezcla de reacción	6,25	6,25	6,25
Platinum Taq Polimerasa	0,10	0,15	0,20
H ₂ O	17,65	17,60	17,55
Total (μl)	24	24	24

Nota: **μl:** microlitro; **U:** unidades.

Una vez ensamblada la reacción, se agregó 1 μl de agua ultrapura para el control negativo y 1 μl de ADN de la muestra “ADN-Bo-Napo-215” para las diferentes concentraciones de Taq polimerasa. La reacción térmica se llevó a cabo como se describe anteriormente.

Gradiente de cebadores

Después de establecer la concentración adecuada de Taq polimerasa, se realizó un gradiente de los cebadores PFRL-F y PFRL-R, se probaron concentraciones de 0,2 hasta 0,5 μM en intervalos de 0,1 μM. Se preparó una mezcla de reacción base que no contenía agua ni cebadores, para un total de 6 muestras, como se describe en la Tabla 9.

Tabla 9

Mezcla de reacción para el gradiente de cebadores.

Reactivos	Unidad	Stock	Concentración final	Volumen (µl)
Buffer	X	10	10	15,00
MgCl ₂	mM	50	1,5	4,50
dNTPs	µM	40	0,8	3,00
Platinum Taq polimerasa	U/µl	5	0,5	0,60
ADN	ng/µl	100	100	6,00

Nota: µl: microlitro; µM: micromolar; mM: milimolar; U/µl: unidades por microlitro; ng/ul: nanogramos por microlitro; dNTPs: mezcla de desoxinucleótidos.

El volumen total de la mezcla de reacción sin ADN fue de 23,1 µl que se dividieron para el número total de muestras (6), este valor fue de 3,85 µl por reacción. Posteriormente se calcularon las cantidades necesarias de cebadores y agua que se debían añadir para obtener las concentraciones deseadas, como se describe en la Tabla 10.

Tabla 10

Cantidades de cebadores y agua, en microlitros, calculados para el gradiente.

Reactivos	Concentración de cebadores (µM)			
	0,5	0,4	0,3	0,2
Mezcla de reacción	3,85	3,85	3,85	3,85
PFRL-F	1,25	1,00	0,75	0,5
PFRL-R	1,25	1,00	0,75	0,5
H ₂ O	17,65	18,15	18,65	19,15
Total (µl)	24	24	24	24

Nota: µl: microlitro; µm: micromolar.

A la reacción se agregó 1 µl de agua ultrapura para el control negativo y 1µl de ADN de la muestra "ADN-Bo-Napo-215" para las diferentes concentraciones de cebadores. La reacción térmica se llevó a cabo como se describe anteriormente.

Electroforesis horizontal para la visualización de los productos de PCR amplificados

Los productos amplificados con el ensayo PFRL-PCR para la estandarización y posterior amplificación del gen que codifica la proteína paraflagelar de *T. vivax* se visualizaron en un gel de agarosa al 0,8 % (p/v) que se tiñó con SYBR® Safe DNA Gel Stain. Se cargó 3 µl de producto en cada pocillo utilizando 1 µl de buffer de carga Blue Juice 10x y 1 µl de marcador de peso molecular 1kb DNA Step Ladder (Promega), los geles se corrieron a 100 voltios durante 1 hora y se visualizaron utilizando un equipo ChemiDoc™ Touch Imaging System (BioRad, CA, USA).

Clonación

La clonación inicial se llevó a cabo en un vector de clonación TOPO-TA (TOPO TA Cloning® kit, Invitrogen™), para lo cual se empleó el fragmento amplificado mediante PFRL-PCR de la muestra “ADN-Bo-Napo-211”. El plásmido obtenido del este proceso de clonación se utilizó como control positivo para ensayos posteriores.

Ligación

La ligación se realizó en un tubo estéril de 200 µl en el cual se agregó 3 µl de agua estéril, 1 µl del fragmento amplificado, 1 µl de solución salina y finalmente 1 µl del vector TOPO® Vector, cada uno de los cuales se mezcló cuidadosamente antes de usarse mediante pipeteo y permanecieron en hielo durante todo el proceso. Posteriormente se incubó la mezcla por 15 minutos a 23 °C en una incubadora (Thermo-Shaker MRC modelo DBS-001, Thermo Fisher Scientific, USA)

Transformación bacteriana

Para la transformación se agregaron 2 µl del plásmido producto de la ligación en un vial de 50 µl que contenía células químicamente competentes *E. coli* JM109 (Promega, USA), la mezcla se dejó incubar en hielo a 4 °C durante 20 minutos, con ligeras agitaciones al vial cada 5 minutos. Seguidamente se realizó el choque térmico colocando el vial en baño maría a 42 °C

durante 30 segundos y en hielo rápidamente. Finalmente se añadió 250 µl de medio SOC al vial y se incubó horizontalmente a 200 rpm y 37 °C durante 1 hora.

Se agregaron 100 µl del producto de la transformación en 3 placas con medio LB que contenían kanamicina 50 µg/ml, 40 µl de IPTG 100mM y 40 µl de X-Gal a 40 mg/ml. Adicionalmente se agregó 50 µl de las bacterias transformadas en una placa que contenía únicamente medio LB para usarse como control. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante toda la noche y al día siguiente se seleccionaron 10 colonias positivas para confirmar la clonación mediante el ensayo PCR de colonias únicas.

PCR de colonias

Se preparó una mezcla de reacción a las condiciones de estandarización utilizando los cebadores PFRL-F y PFRL-R para un total de 12 muestras, se distribuyeron 24 µl de la mezcla en tubos de 200 µl. En una cámara de flujo laminar y utilizando un mechero se tomó con una punta cada una de las 10 colonias seleccionadas en el ensayo anterior y se mezclaron por pipeteo en sus respectivos tubos que contenían la mezcla de reacción. Se utilizó agua estéril para el control negativo. La PCR de colonias se llevó a cabo a las condiciones descritas anteriormente en la Tabla 4. Se corrieron 10 µl de las muestras en un gel de agarosa al 0,8 % (p/v) a 100 V durante 1 hora y se visualizó en un equipo ChemiDoc™ Touch Imaging System (BioRad, CA, USA).

Las mismas colonias fueron inoculadas además en 2 ml de medio LB que contenía ampicilina a 50 µg/ml y se dejó incubar a 37 °C y 200 rpm durante toda la noche.

Extracción de plásmido

De la PCR de colonias realizada previamente se obtuvo 6 colonias positivas, estas colonias se utilizaron para la extracción de plásmido mediante el kit Column-Pure Plasmid

Miniprep Kit (Applied Biological Materials, Canada) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, con ligeras modificaciones como se describe a continuación.

Se llenó el volumen de un tubo de 2 ml con cultivo de bacterias previamente incubadas de las colonias positivas a la PCR de colonias, y se centrifugó a 12000 gravedades (g) y 4 °C por 2 minutos en una centrifuga Sorvall ST 8R (Thermo scientific, Waltham, MA, US), se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 100 µl de la solución I y se homogenizó con vortex hasta obtener una solución homogénea. Seguidamente se agregó 200 µl de la solución II, se mezcló por inversión de 4-6 veces y se dejó incubar por 1 minuto a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó la solución III y se procedió como en el paso previo. Se centrifugó por 5 minutos a 10000 rpm.

Para el lavado, se transfirió el sobrenadante a una columna y se centrifugó por 2 minutos a 10000 rpm, se descartó el sobrenadante del tubo de colección y se colocó la columna nuevamente en el tubo, seguidamente se agregó 750 µl de solución de lavado y se centrifugó por 1 minuto a 10000 rpm, se descartó el sobrenadante y se repitió el proceso. Se centrifugó la columna por 1 minuto adicional para eliminar residuos de etanol.

Finalmente se transfirió la columna a un tubo estéril de 1.5 ml, se agregó 50 µl de buffer de elución y se incubó a temperatura ambiente por 2 minutos luego de los cuales se centrifugó a 10000 rpm durante 2 minutos. Se descartó la columna y se almacenó el plásmido a -20 °C hasta su uso.

La integridad de los plásmidos fue verificada posteriormente mediante PFRL-PCR y se visualizó el producto de la reacción térmica, así como los plásmidos extraídos en un gel de agarosa al 0,8 % (p/v) que se corrió por 2 horas a 100 V y 300 mA.

Nota: Las soluciones I, II, III, de lavado y buffer de elución, así como las columnas, fueron proporcionadas por el Kit. El plásmido nombrado como "Pla-027" se utilizó en adelante

como control positivo en los ensayos de PFRL-PCR. El protocolo aquí descrito se aplicó en las extracciones de plásmido posteriores.

Clonación en un vector de expresión

La clonación inicial en un vector de expresión se realizó utilizando las células químicamente competentes *E. coli* JM109 (Promega, USA) y el vector pTrcHis2 TOPO®

TA Expression Kit (Invitrogen) como se describe a continuación.

Ligación

La ligación se llevó a cabo agregando cuidadosamente los reactivos que se describen en la Tabla 11 en un tubo de 200 μ l, de mayor a menor volumen, posteriormente se dejó incubar la mezcla durante 5 minutos a 25 °C. El producto de PFRL-PCR se obtuvo el mismo día, ya que es recomendable trabajar con un fragmento amplificado fresco.

Tabla 11

Reactivos utilizados en el proceso de ligación

Reactivo	Volumen (μl)
ADN templado (producto de PFRL-PCR)	2
Agua estéril	2
TOPO® vector	1
Total	5

Nota: μ l: microlitro

Transformación

Para la transformación se agregó 2,5 μ l del producto de ligación en un vial que contenía 50 μ l de bacterias competentes *E. coli* JM109 (Promega, USA), esta mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos. El choque térmico se realizó a 42 °C durante 30 segundos y luego se transfirió el vial a hielo rápidamente. Se agregó 250 μ l de medio SOC en el vial y se dejó incubar horizontalmente por 1 hora a 37 °C y 250 rpm, posteriormente se agregó 150 μ l del cultivo en placas que contenían medio LB, ampicilina 50 mg/ml y 25 mM de glucosa. Se usó 50

µl de cultivo como control negativo en una placa que contenía medio LB y glucosa a la concentración antes mencionada. Las placas se incubaron a 37 °C durante toda la noche.

Al día siguiente se tomaron 20 colonias y se realizó PCR de colonias para verificar el proceso de clonación, de estas colonias se extrajo el plásmido de 9 colonias positivas a la PCR siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

Una vez extraídos los plásmidos se realizó una electroforesis horizontal para verificar el tamaño y la integridad de éstos, se agregó 2 µl de cada plásmido en un gel de agarosa al 0,8 % (p/v) y se corrió a 100 V y 300 mA durante 2 horas.

Análisis por enzimas de restricción (RFLP)

La clonación *in silico* realizada en el programa bioinformático Snapgene, mostró un plásmido de aproximadamente 5880 pb, sin embargo, cabe destacar que el vector seleccionado para la expresión utiliza una tecnología de inserción de fragmentos mediante complementariedad, por lo que en el proceso de clonación el fragmento en cuestión puede insertarse en el vector en ambos sentidos.

En el análisis por enzimas de restricción se utilizó la enzima Eco321 (*EcoRV*) (Thermo Scientific, USA), la cual genera 2 cortes en el plásmido, uno en el interior del fragmento insertado y otro en el vector TOPO® vector, el tamaño de estos los fragmentos que se generan mediante estos cortes depende del sentido en el que se haya insertado el gen de interés, generándose dos fragmentos de 4757 y 1123 pb cuando el gen se ha insertado en fase de codificación de la proteína; y dos fragmentos de 4041 y 1839 pb cuando el gen se ha insertado en el sentido inverso y por tanto producirá una proteína no deseada.

Se realizó el análisis por enzimas de restricción de los 9 plásmidos positivos a la PCR de colonias utilizando la enzima de restricción Eco321 (*EcoRV*) (Thermo Scientific, USA) de

acuerdo con el protocolo del fabricante. La Tabla 12 describe los reactivos utilizados en la digestión enzimática.

Tabla 12

Reactivos utilizados para la digestión enzimática

Reactivos	Volumen (µl)
Agua estéril	15
Buffer	2
ADN (plásmido)	2
Enzima <i>EcoRV</i>	1
Total	20

Nota: µl: microlitro

El volumen final de la reacción enzimática fue de 20 µl que se agregaron de mayor a menor volumen, los reactivos utilizados permanecieron en hielo durante todo el proceso de mezcla, posteriormente ésta se incubó a 37 °C por 3 horas. Se corrió todo el volumen de la digestión en un gel de agarosa al 0,8 % (p/v) a 100 V y 300 mA durante 2 horas.

Cuantificación de plásmidos

El análisis RFLP mostró la presencia de dos plásmidos que se encontraban en fase de codificación de la proteína paraflagelar de *T. vivax*, estos plásmidos que fueron nombrados “Pla-034” y “Pla-035” se cuantificaron mediante espectrofotometría UV utilizando un Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

El promedio de las concentraciones producto de la cuantificación fue de 212,65 y 207,65 ng/µl para los plásmidos “Pla-034” y “Pla-035”, respectivamente.

Transformación de células *E. coli* BL21 (DE3)

La transformación de las bacterias *E. coli* BL21 (DE3) (Promega, USA), se realizó utilizando los plásmidos “Pla-034” y “Pla-035” a una concentración final de 10ng, y siguiendo las instrucciones del fabricante como se describe a continuación.

Se tomó un vial de que contenía 200 μ l de bacterias *E. coli* BL21 y se dejó incubar por 5 minutos en hielo, seguidamente y empleando un mechero se transfirieron 100 μ l de células a tubos estériles de 1,5 ml, se mezcló ambos tubos lentamente. Para la transformación se agregó 5 μ l de plásmido 34 y 35 en cada tubo moviendo la punta a través de las células. Se transfirió los tubos a hielo inmediatamente y se incubó por 10 minutos.

El choque térmico se realizó a 42 °C por 50 segundos en baño maría y se transfirieron los tubos rápidamente a hielo por 2 minutos. Se añadió 900 μ l de medio SOC a 4 °C en cada tubo y se incubó por 1 hora a 225 rpm y 37 °C. Finalmente se sembró 400 μ l del cultivo en placas que contenían medio LB, ampicilina 50 mg/ml y 25 mM de glucosa. Se usó 50 μ l de cultivo como control negativo en una placa que contenía medio LB y glucosa a la concentración antes mencionada. Las placas se incubaron a 37 °C durante toda la noche. Se realizó PCR de colonias de un total de 10 colonias pertenecientes en partes iguales a la transformación con el plásmido 34 y 35.

Criopreservación bacteriana

Las bacterias *E. coli* JM109 que fueron transformadas mediante el vector de clonación TOPO-TA (TOPO TA Cloning® kit, Invitrogen™), así como las bacterias *E. coli* JM109 y BL21 en fase de codificación de la proteína que fueron transformadas con el vector de expresión pTrcHis2 TOPO® TA Expression Kit (Invitrogen) fueron criopreservadas como se describe a continuación.

Partiendo de colonias únicas de cada una de las bacterias, se inoculó 2 ml de medio LB que contenía ampicilina a 50 μ g/ml y glucosa 25 mM, se dejó incubar a 37 °C y 200 rpm durante toda la noche. Posteriormente, se agregó 100 μ l del medio cultivado previamente en crioviales Microbank™ (Pro-Lab Diagnostics, Reino Unido) y se dejó incubar durante 20 minutos, se descartó todo el líquido del interior del criovial y éste fue almacenado a -80 °C hasta su uso.

Expresión de la proteína paraflagelar recombinante en bacterias transformadas de *E. coli* BL21

Las colonias únicas se obtuvieron inoculando 5 ml de medio LB que contenía ampicilina a 50 µg/ml utilizando una perla del criovial con bacterias transformadas de *E. coli* BL21, para el control negativo también se inoculó 5 ml de medio LB sin ampicilina con una perla que contenía bacterias *E. coli* BL21 de tipo salvaje. Se dejó incubar toda la noche a 37 °C y 200 rpm. Al día siguiente en placas con ampicilina 50 µg/ml y sin ampicilina, se sembró utilizando estriado por agotamiento, el cultivo previamente incubado tanto de las bacterias transformadas de *E. coli* BL21, así como las de tipo salvaje. Las placas se incubaron toda la noche a 37 °C.

Posteriormente se inoculó 2 ml de medio LB que contenía ampicilina a 50 µg/ml y LB sin ampicilina con una colonia única de las placas incubadas previamente. Se dejó incubar toda la noche a 37 °C y 200 rpm. Al día siguiente se agregó 1 ml de cultivo (inóculo) en dos matraces Erlenmeyer previamente autolavados y que contenían 10 ml de medio LB con ampicilina a 50 µg/ml y LB sin ampicilina, se incubó a 37 °C y 250 rpm hasta $OD_{600} = 0,6$; este proceso tarda aproximadamente 1 hora y 30 minutos.

Cuando el cultivo llegó a la absorbancia de $OD_{600} = 0,6$; se tomó 1 ml de éste en una celda plástica y se midió la densidad óptica a OD_{600} , seguidamente se transfirió el cultivo a un tubo estéril de 1.5 ml y se centrifugó a 14000 rpm durante 30 segundos, se separó el sobrenadante en otro tubo y se conservaron a -20 °C como el tiempo 0 (h_0). Para la inducción de la expresión se agregó en los 10 ml de cultivo restantes, 10 µl de IPTG 1M y se siguió incubando a 37 °C y 250 rpm. Para probar el tiempo óptimo de expresión, se tomaron alícuotas de 1 ml cada hora durante 8 horas y se procedió como se describió previamente, éstas correspondieron a los tiempos: 1(h_1), 2(h_2), 3(h_3), 4(h_4), 5(h_5), 6(h_6). Para el control negativo se tomó únicamente una alícuota de 1 ml a las 5 horas de la inducción de expresión.

Electroforesis SDS-PAGE

Preparación de las muestras

El tamaño teórico de la proteína paraflagelar se calculó en el sitio web <https://web.expasy.org/> operado por el Instituto Suizo de Bioinformática (SIB) mediante la herramienta Compute pI/Mw, la verificación de expresión proteica se realizó mediante electroforesis vertical utilizando una cámara Mini-Protean® Tetra Vertical Electrophoresis Cell (BioRad, CA, USA). Las soluciones empleadas en el proceso de electroforesis se muestran en el Anexo 1.

Las muestras para electroforesis se prepararon utilizando un tampón Laemmli a concentración 2X, para los sedimentos producto de la centrifugación a tiempo t_0 hasta t_8 se agregó 50 μ l de la solución tampón y se mezcló por pipeteo hasta obtener una solución homogénea, seguidamente se incubó en un a 100 °C durante 10 minutos. La preparación de las muestras que contenían el sobrenadante se realizó agregando la muestra y la solución tampón en relación 1:1. Los sedimentos y sobrenadante pertenecientes al control negativo se prepararon como se describió anteriormente.

Corrida electroforética

Se prepararon dos geles de poliacrilamida, el de concentración (upper) al 4% y el de separación (lower) al 12 % (p/v), como se muestra en la Tabla 13, y se ensamblaron en el módulo que contenía los electrodos, con el vidrio delgado del gel en dirección a la parte interna del tanque de corrida, seguidamente éste fue llenado desde la parte interna del módulo hacia afuera con tampón de corrida hasta la señal indicada para dos geles. Se cargaron 15 μ l de muestra proveniente de los sedimentos en cada pocillo, y se agregó 3 μ l de marcador de peso molecular Precision Plus Protein Dual Color Standards (BioRad), los mismos volúmenes fueron utilizados para las muestras provenientes del sobrenadante. Se corrió el gel a 120 V durante 1

hora y 30 minutos. Los geles fueron analizados posteriormente en el software Image Lab versión 6.0.

Tabla 13

Reactivos y volúmenes utilizados en geles de poliacrilamida

	Gel (%)	H ₂ O (ml)	Acrilamida/Bisacrilamida 37:5:1 40%	Buffer de concentración o separación (ml)	APS (10%) (μl)	TEMED (μl)
Gel de concentración	4	3	0,5	1,25	25	8
Gel de separación	12	4,4	3	2,5	50	14

Nota: μl: microlitro; ml: mililitros.

Tinción y revelado

Ambos geles fueron teñidos en una solución que contenía azul brillante de Coomassie R-250 durante 30 minutos con agitación a 300 rpm, seguidamente se descartó el colorante y se agregó 20 ml de solución decolorante y se dejó en agitación a 400 rpm durante 30 minutos, se realizaron lavados con esta solución por tres ocasiones. Finalmente se visualizaron los geles utilizando un equipo ChemiDoc™ Touch Imaging System (BioRad, CA, USA).

Lisis bacteriana

Después de la electroforesis vertical se comprobó que la proteína se expresa intracelularmente, por lo que se probaron dos protocolos de lisis celular, con el fin de obtener la proteína soluble previo al proceso de purificación.

Lisis con tampón TES

Se cosechó el sedimento celular de 50 ml de cultivo y se agregó 2 ml de tampón TES a pH 7,2 que contenía Tris-HCl 50 mM, EDTA 0,53 mM y sacarosa al 20 % (p/v), se agitó con vórtex y posteriormente se incubó en hielo durante 60 minutos. Seguidamente se transfirió 1 ml de la muestra en dos tubos estériles de 1,5 ml y éstos se centrifugaron a 10000 g durante 20

minutos a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y fue analizado por electroforesis SDS-PAGE como se describió anteriormente.

Lisis con tampón urea

Se cosechó el sedimento celular de 50 ml de cultivo y se agregó 10 ml de tampón urea, que contenía urea 8M, bifosfato de sodio 100 mM y Tris-HCl 10 mM. Posteriormente se agitó la mezcla durante 1 hora en un agitador orbital a velocidad mínima para evitar la formación de espuma. La lisis se completó cuando se observó una solución traslúcida. Finalmente se centrifugó la solución a 10000 g durante 20 minutos y se analizó el sobrenadante mediante electroforesis SDS-PAGE.

El análisis SDS-PAGE de las lisis realizadas previamente mostró que el tampón TES tenía una eficiencia muy baja, mientras que gran parte de la proteína de interés fue lisada de forma efectiva utilizando el tampón Urea, por lo cual se utilizó éste para las lisis posteriores.

Cuantificación de proteínas totales

Previo a la cuantificación de proteínas totales se limpió el sensor del equipo Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) utilizando 2 µl de agua destiladas y HCL 0,5 N, se configuró el equipo para medición de proteínas y se blanqueó agregando 2 µl del tampón urea que se utilizó para la lisis previamente, seguidamente se agregó 2 µl de cada muestra y se midió la concentración en mg/ml en base a la absorbancia a 280 nanómetros.

Purificación de la proteína PFR recombinante

El vector utilizado para la expresión de la proteína PFR deja un residuo de 6 aminoácidos de histidina que tienen alta afinidad por metales como el níquel, por lo que el proceso de purificación se llevó a cabo utilizando un sistema de Ni-NTA empleando una resina

ProBond™ (Invitrogen, CA, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante con modificaciones que se describen a continuación.

Preparación de la columna

Se resuspendió la resina por inversión hasta obtener una solución homogénea, posteriormente se colocaron 5 ml de resina en una columna de cromatografía Econo-Column® (BioRad) de dimensiones 2,5 x 20 cm y se dejó sedimentar hasta que se separó totalmente del alcohol y cuidadosamente se aspiró el sobrenadante. Se agregó 8 ml de agua estéril libre de nucleasas y se resuspendió la resina agitando circularmente, se dejó asentar y se aspiró el sobrenadante. Seguidamente se agregó 8 ml de tampón de unión a pH 7,8 que contenía urea 8 M, fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 500 mM y 30 mM de imidazol, se resuspendió la resina agitando circularmente, se dejó sedimentar y se aspiró el sobrenadante, se realizó este lavado una vez más.

Unión de la proteína a la resina

Se agregó a la columna 10 ml de solución de lisis que contenía la proteína PFR y 30 mM de imidazol, que fue preparado como se describió previamente utilizando tampón de urea a pH 7,8, se mezcló la resina con el lisado agitando circularmente durante 30 minutos, permitiendo que la proteína se enlace con la resina cargada con níquel (NiCl_2), se dejó sedimentar la resina y se aspiró el sobrenadante.

Lavado de la resina y elución

Con la finalidad de eliminar todas las proteínas no unidas a la resina se realizaron dos lavados agregando 8 ml de tampón de unión a pH 7,8 y agitando circularmente por 2 minutos. Seguidamente se realizaron dos lavados utilizando un tampón de lavado a pH 6 que contenía urea 8 M, fosfato de sodio 20 mM y cloruro de sodio 500 mM y finalmente a pH 5,3 hasta obtener una absorbancia OD_{280} cercana a cero.

Para la elución, se agregó a la columna 10 ml de tampón de elución a pH 4 que contenía urea 8 M, fosfato de sodio 20 mM y cloruro de sodio 500 mM, se mezcló hasta resuspender totalmente la resina y se colectó 10 ml de la fracción purificada, finalmente se midió su absorbancia a OD₂₈₀.

Diálisis y concentración

El proceso de diálisis se empleó para eliminar las altas concentraciones de urea presentes en la fracción eluida, para lo cual se colocaron los 10 ml, previamente recuperados, en una unidad de filtración centrífuga Ultra-15 Amicon® de 30000 MWCO y se centrifugó por 20 minutos a 4500 RPM y 4 °C en una centrífuga Sorvall ST 8R (Thermo scientific, Waltham, MA, US), se descartó el flujo y se agregó al filtro 10 ml de agua estéril libre de nucleasas y se centrifugó nuevamente en las condiciones descritas previamente. Finalmente se recuperaron de 200 – 400 µl de proteína PFR dializada y concentrada.

Cuantificación de la proteína PFR mediante ensayo BCA

La cuantificación se realizó mediante el procedimiento en microplaca empleando el kit comercial Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo scientific). Partiendo de un stock de BSA de concentración 2 mg/ml se realizaron las diluciones estándar de acuerdo con la Tabla 14, se utilizó agua estéril libre de nucleasas como diluyente.

Tabla 14

Volúmenes empleados en las diluciones estándar de BCA

Vial	Volumen del diluyente (µl)	Volumen y fuente de BSA (µl)	Concentración final de BSA (µg/ml)
A	0	300 de stock	2000
B	125	375 de stock	1500
C	325	325 de stock	1000
D	175	175 de la dilución B	750
E	325	325 de la dilución C	500
F	325	325 de la dilución E	250
G	325	325 de la dilución F	125
H	400	100 de la dilución G	25
I	400	0	0

Nota: **µl:** microlitro; **ml:** mililitros; **µg:** microgramo.

La solución de trabajo se calculó en para un total de 10 muestras y 9 estándares de concentración por duplicado de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen WR requerido} = (\# \text{ estándares} + \# \text{ incógnitas}) * (\# \text{ réplicas}) * (\text{volumen de WR por muestra})$$

(Ecuación 1)

$$\text{Volumen WR requerido} = (9 + 10) * (2) * (200\mu\text{l}) = 7,2 \text{ ml}$$

La solución de trabajo se preparó mezclando 7,05 ml del reactivo A con 0,15 ml del reactivo B (50:1). Posteriormente en una placa se agregó 10 µl de cada uno de los estándares y muestras a cuantificar por duplicado, seguido de 200 µl de solución de trabajo, la placa se mezcló en un agitador de placas digital (Thermo Scientific™ 88880023, USA) a 250 rpm durante 30 segundos, seguidamente se tapó la placa y se llevó a incubación a 37 °C por 30 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente y finalmente se midió la absorbancia a 562 nm en un lector de placas Multiskan™ GO (Thermo Scientific™, USA)

Westernblot de la proteína PFR purificada

El ensayo de westernblot se llevó a cabo para verificar la presencia de la proteína PFR purificada y su unión a anticuerpos policlonales empleando una muestra de suero de un bovino positivo a *T. vivax*. Las soluciones preparadas para el ensayo se muestran en el Anexo 2.

Se realizó un gel de acrilamida en base a las concentraciones descritas previamente en la Tabla 13. Las muestras de proteína se prepararon en tubos de 200 µl para una masa final de 50 µg y se disolvieron utilizando tampón de carga Laemmli a concentración 2X y se corrieron a 120 V durante 1 hora y 30 minutos.

Transferencia en tanque húmedo

La transferencia se realizó utilizando un equipo Mini Trans-Blot® (Biorad), para lo cual se equilibró el gel corrido previamente, la membrana de nitrocelulosa de dimensiones 8,5 x 6 cm, el papel filtro y las almohadillas en tampón de transferencia durante 10 minutos. Posteriormente se procedió a ensamblar el casete empleando el método del sándwich para lo cual se colocó en una superficie limpia la parte gris del casete hacia abajo, encima de ésta se colocó una almohadilla y luego dos papeles filtros, sobre éstos se colocó seguidamente el gel y finalmente la membrana de nitrocelulosa, se completó el sándwich y se cerró el casete firmemente. Se colocó el casete en el módulo de transferencia y se corrió a 100 V durante 1 hora y 30 minutos. Para verificar la transferencia se tiñó la membrana empleando una solución de rojo Ponceau (Sigma Aldrich) durante 10 minutos y se lavó con agua destilada para observar las bandas de interés.

Inmunomarcaje y revelado

Posterior a la tinción se lavó la membrana con tampón TBS en agitación durante 10 minutos y seguidamente se procedió a realizar el bloqueo de la membrana utilizando una solución que contenía tampón TTBS y BSA al 5%, este proceso se llevó a cabo con agitación a temperatura ambiente durante 1 hora, posteriormente se realizaron seis lavados de 5 minutos cada uno en agitación constante y utilizando tampón TTBS. Luego la membrana fue incubada en agitación a 4 °C durante toda la noche en una solución de anticuerpo primario que contenía tampón TTBS, BSA al 3% y suero bovino 1:100.

Al día siguiente se lavó la membrana con TTBS, y se incubó en oscuridad y agitación constante durante 90 minutos en una solución de anticuerpo secundario que contenía TTBS, y Anti-bovino conjugado con HRP 1:20000. Para el revelado se utilizó 500 µl de sustrato Clarity™ Western ECL (BioRad) que se preparó en relación 1:1 (peróxido y luminol), este volumen se

agregó en la membrana y se dejó incubar en oscuridad durante 10 minutos y finalmente se observó en un equipo ChemiDoc™ Touch Imaging System (BioRad, CA, USA)

Capítulo IV: Resultados

Estandarización del ensayo PFRL-PCR

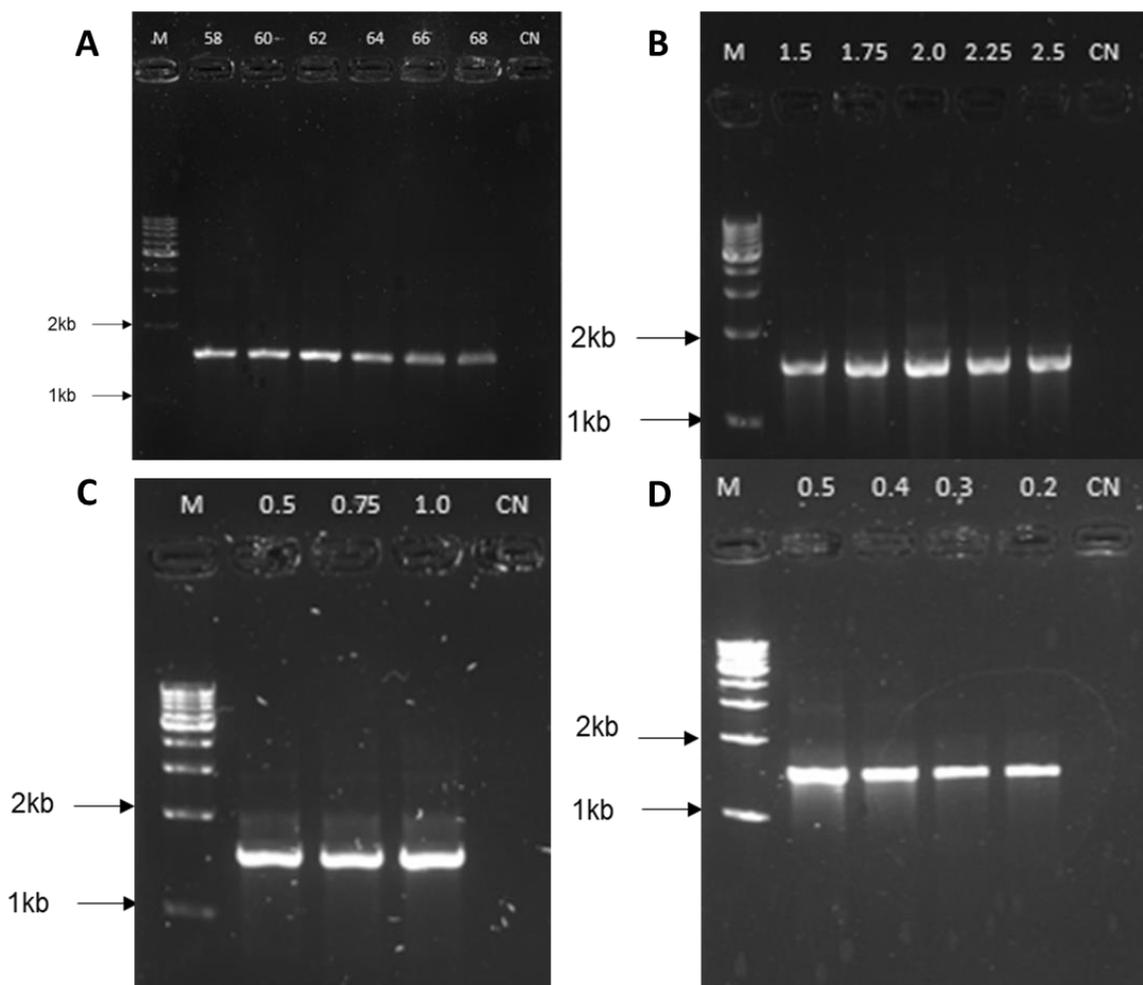
La estandarización del ensayo PCR para la amplificación del gen que codifica la proteína paraflagelar de *T. vivax* se realizó empleando gradientes para las variables: temperatura de hibridación, concentración de magnesio, concentración de la enzima Taq polimerasa y concentración de los cebadores.

Para la temperatura de hibridación se diseñó un gradiente partiendo desde 58°C que fue la temperatura calculada en base a la secuencia de los cebadores PFRL-F y PFRL-R con incrementos de 2 °C hasta 68 °C, en la Figura 3 se muestran los resultados del gradiente de temperatura, se puede observar que existe poca presencia de bandas inespecíficas en general y un fragmento esperado de 1500 pb, por otro lado, la temperatura de 62 °C muestra una banda de mayor intensidad en comparación con las temperaturas tanto inferiores como superiores, por lo que fue considerada como la temperatura óptima de hibridación.

Para el gradiente de magnesio (Figura 3B, carril 2), enzima Taq polimerasa (Figura 3C, carril 2) y cebadores (Figura 3D, carril 4) se seleccionaron las concentraciones de 1,5 mM, 0,5 U y 0,3 µM; respectivamente, esto debido a que se observó presencia de bandas bien definidas, sin inespecificidades apreciables y un fragmento de tamaño esperado.

Figura 3

Gradientes empleados para la estandarización de la PFRL-PCR



Nota: Electroforesis en gel de agarosa al 8 %. Se cargaron 3 μ l de muestra en todas las pruebas y se utilizó en el carril 1 (M) el marcador de peso molecular 1kb DNA Step Ladder (Promega). Figura 3A: gradiente de temperatura, carril 2-6: Temperaturas de hibridación en $^{\circ}$ C. carril 7: control negativo (CN). Figura 3B: gradiente de magnesio, carril 2-6: concentraciones de magnesio ($MgCl_2$) en mM. carril 7: control negativo (CN). Figura 3C: gradiente de enzima Taq polimerasa, carril 2-4: concentraciones de enzima Taq polimerasa (Platinum Taq DNA Polymerasa, Thermo Scientific) en U. carril 5: control negativo (CN). Figura 3D: gradiente de

cebadores, carril 2-5: concentraciones de cebadores PFRL-F y PFRL-R en μM . Carril 6: control negativo (CN).

La PFRL-PCR se estandarizó con un volumen final de reacción de 25 μl , que contenían Buffer - Cl_2Mg 1X, Cl_2Mg 1,5 mM, 0,3 μM de cada cebador, 0,8 μM de dNTPs, 0,5 U de Platinum Taq DNA Polimerasa (Thermo Scientific) y 100 $\mu\text{g/ml}$ de ADN. La reacción térmica se llevó a cabo en un termociclador ProFlex PCR System (Applied Biosystems, USA). Las condiciones de la PCR consistieron en una desnaturalización inicial a 95 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 minuto, alineamiento a 62 °C por 1 minuto y extensión a 72 °C por 2 minutos, con una extensión final a 72 °C por 10 minutos.

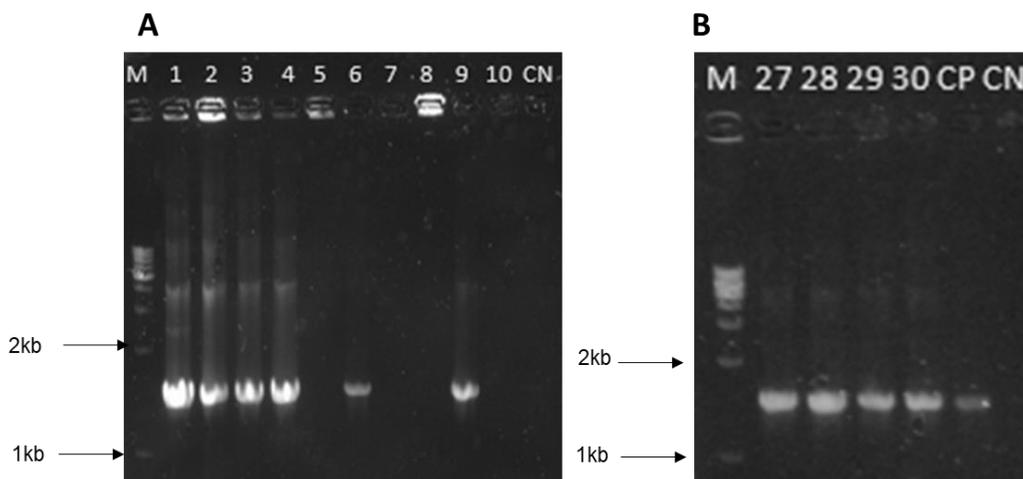
Clonación

Vector de clonación

La clonación inicial que se realizó en el vector de clonación TOPO-TA (TOPO TA Cloning® kit, Invitrogen™) con el fin de obtener plásmidos que pudieran utilizarse como controles positivos en la PFRL-PCR, dio como resultado cuatro colonias positivas que fueron analizadas mediante PFRL-PCR como se muestra en la Figura 4A, posteriormente se realizó la extracción del ADN plasmídico de estas colonias y el producto de la extracción fue verificado una vez más mediante PCR como se muestra en la Figura 4B, con el fin de corroborar la presencia del gen que codifica la proteína paraflagelar.

Figura 4

PCR de colonias



Nota: Figura 4A. Carril 1: marcador de peso molecular 1kb DNA Step Ladder (Promega) (M), carril 2-11: PFRL-PCR de 10 colonias blancas producto del proceso de clonación. Carril 12: Control negativo (CN). Figura 4B. Carril 1: marcador de peso molecular 1kb DNA Step Ladder (Promega) (M), carril 2-5: PFRL-PCR de los plásmidos extraídos de las colonias (1-4). Carril 6: control positivo (CP). Carril 7: control negativo (CN).

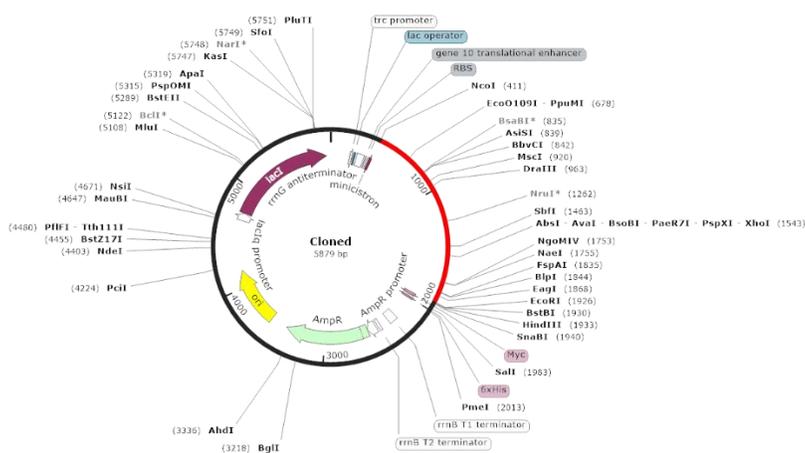
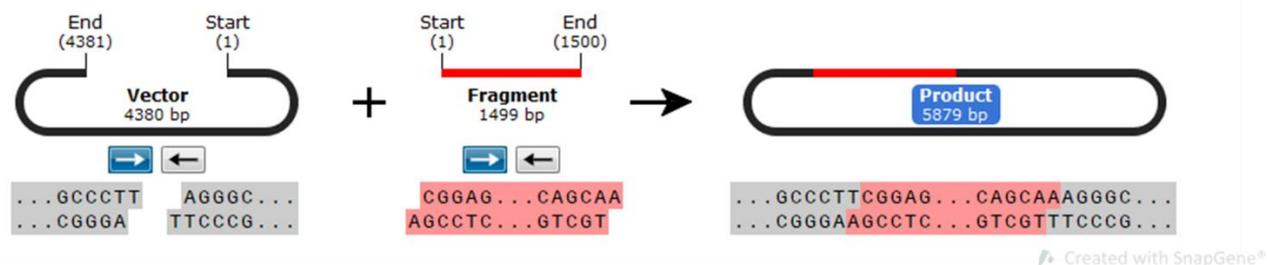
Estos plásmidos se nombraron posteriormente como “Pla-027” hasta “Pla-030” y se utilizaron como controles positivos en ensayos posteriores.

Vector de expresión

La clonación *in silico* realizada utilizando el programa SnapGene mostró que el fragmento puede insertarse en sentido o antisentido en el vector pTrcHis2, como se muestra en la Figura 5, el plásmido producto de la clonación tiene un tamaño de aproximadamente 5880 pares de bases.

Figura 5

Clonación *in silico* del gen que codifica la proteína PFR de *T. vivax*

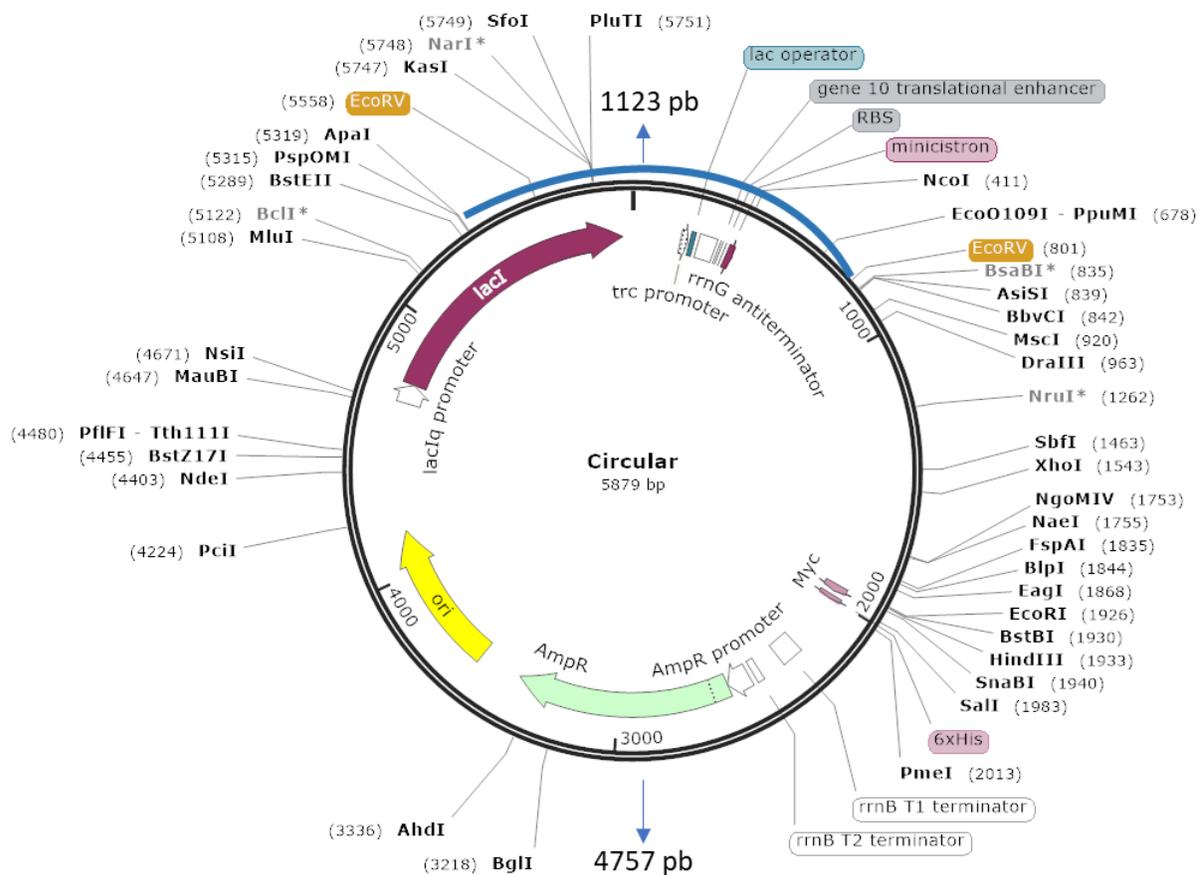


Nota: Se observa el tamaño del vector (4380 pb) y el tamaño del fragmento (1499 pb), así como el tamaño del plásmido ensamblado luego de la inserción del gen de interés, éste se observa en color rojo. Realizado en SnapGene.

Para determinar los tamaños de fragmentos que se obtendrían mediante análisis RFLP, se escogió la enzima *EcoRV* ya que ésta genera un único corte en el interior de la secuencia de interés así como en el vector, produciendo dos fragmentos que van a variar en función del sentido de inserción del gen de interés, como se muestra en la Figura 6, cuando el gen se ha insertado en sentido de codificación de la proteína, la enzima produce dos fragmentos de 1123 pb y 4757; por otro lado en la Figura 10 se observa el plásmido generado producto de la inserción del gen de interés en el sentido inverso, cuyos cortes con la enzima generan dos fragmentos de 1839 pb y 4041 pb.

Figura 6

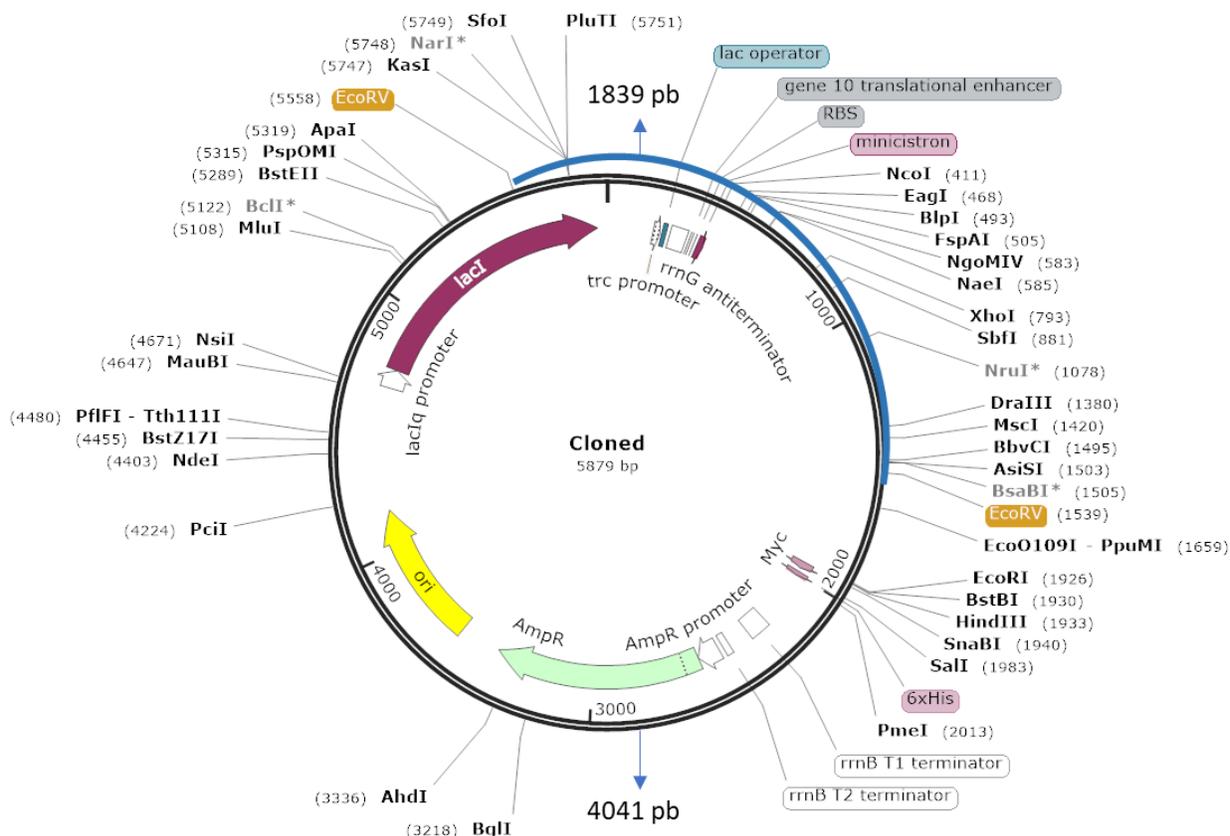
Plásmido en fase de codificación de la proteína PFR



Nota: Se muestra en color marrón la enzima *EcoRV* donde se realizarán los cortes que generan los fragmentos del tamaño mostrado en flechas celestes. Realizado en SnapGene.

Figura 7

Plásmido fuera de fase de codificación de la proteína PFR

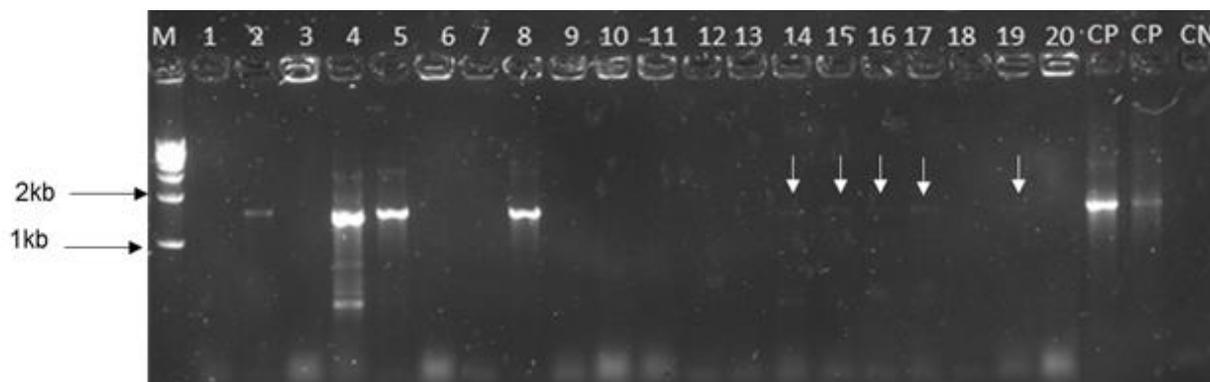


Nota: Se muestra en color marrón la enzima *EcoRV* donde se realizarán los cortes que generan los fragmentos del tamaño mostrado en flechas celestes. Realizado en SnapGene.

La clonación en células *E. coli* JM109 se realizó empleando el vector de expresión pTrcHis2 TOPO® TA Expression Kit (Invitrogen). En base a la Figura 8 se verificó la presencia del gen de interés en 9 de 20 colonias sometidas a PCR, se observó la presencia de bandas de un tamaño aproximado de 1,5 kb, sin embargo, como se puede observar en la misma figura, en las colonias 14, 15, 16, 17 y 19 la banda presente tiene una intensidad muy baja, por lo que no fueron consideradas para el proceso de extracción de plásmido, que se realizó únicamente en las colonias 2, 4, 5 y 8 y se nombraron como “Pa-034” hasta “Pa-038”, respectivamente.

Figura 8

PCR de colonias de células transformadas de *E. coli* JM109

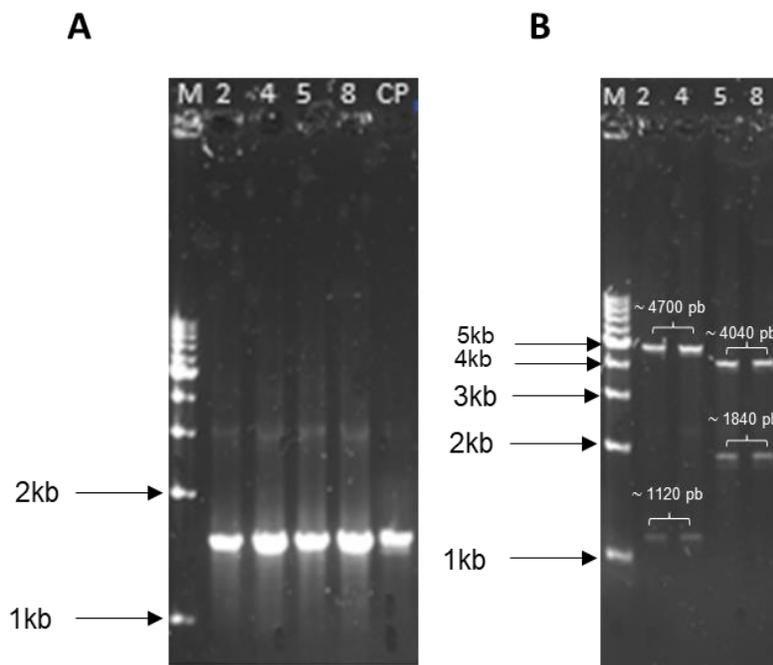


Nota: Carril 1: marcador de peso molecular 1kb DNA Step Ladder (Promega) (M), carril 2-21: PCR de 20 colonias producto del proceso de clonación, carril 22: control positivo (CP), plásmido 27 diluido 1/20, carril 23: control positivo (CP), plásmido 28 diluido 1/20, carril 24: control negativo (CN).

Luego de la extracción de plásmido, se comprobó mediante PFRL-PCR la presencia del gen de interés (Figura 9A) y posteriormente se realizó un análisis RFLP utilizando la enzima *EcoRV*, en la Figura 9B se presentan los resultados de la digestión, en donde se observa que los plásmidos 34 y 35 producen dos fragmentos de aproximadamente 4750 y 1120 pb que concuerdan con los resultados *in silico* obtenidos cuando el gen de interés se ha insertado en fase de codificación de la proteína; por su parte los plásmidos 36 y 37 presentan dos fragmentos de aproximadamente 4040 y 1840 pb, que son consistentes con la inserción del gen de interés en el sentido inverso al esperado.

Figura 9

PFRL-PCR de plásmidos y análisis por enzimas de restricción

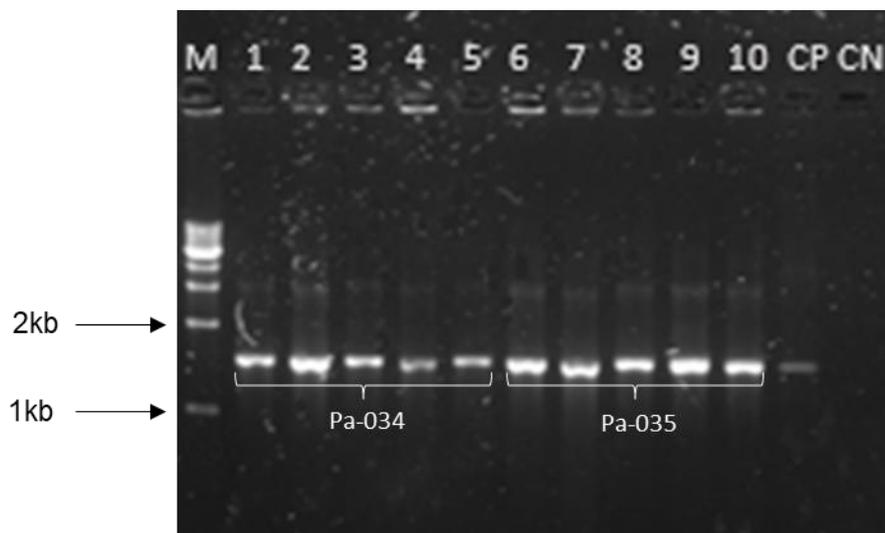


Nota: Figura 9A. Carril 1: marcador de peso molecular 1kb DNA Step Ladder (Promega) (M), carril 2-5: PFRL-PCR de los plásmidos 34, 35, 36 y 37, correspondientes a las colonias 2, 4 5 y 8. Carril 6: control positivo (CP), plásmido 27 diluido 1/20. Figura 9B. Carril 1: marcador de peso molecular 1kb DNA Step Ladder (Promega) (M), carril 2-5: digestión enzimática (*EcoRV*) de los plásmidos 34, 35, 36 y 37, correspondientes a las colonias 2, 4 5 y 8.

Los dos plásmidos en fase generados producto de la clonación en las células *E. coli* JM109 y cuyas concentraciones fueron de 212,65 y 207, 65 ng/ μ l, se utilizaron para transformar las células de expresión *E. coli* BL21 como se describió previamente en la metodología, en la Figura 10 se muestran los resultados de la PCR de colonias realizada a 5 colonias transformadas con el plásmido 34 y 5 colonias con el plásmido 35, se puede observar que el gen de interés se encuentra presente en ambas transformaciones, por lo que se utilizaron posteriormente estas bacterias para el proceso de expresión.

Figura 10

PCR de colonias únicas de bacterias transformadas de *E. coli* BL21



Nota: Carril 1: marcador de peso molecular 1kb DNA Step Ladder (Promega) (M), carril 2-6: PCR de colonias BL21 transformadas con el plásmido 34, carril 7-11: PCR de colonias BL21 transformadas con el plásmido 35, carril 12: control positivo (CP), carril 13: Control negativo (CN).

Obtención de la proteína recombinante PFR

La expresión se realizó en bacterias transformadas de *E. coli* BL21 agregando IPTG a una concentración final de 1 mM. Los resultados del análisis mediante electroforesis SDS-PAGE mostraron que la proteína PFR se expresó de manera intracelular formando cuerpos de inclusión.

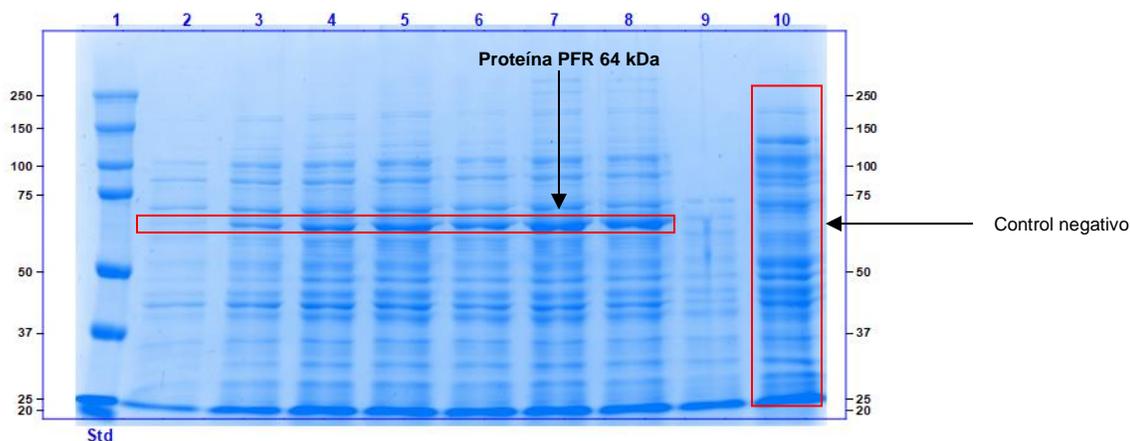
Determinación del peso molecular de la proteína

El peso molecular de la proteína expresada se calculó utilizando el valor de distancia de migración relativa (R_i) de los estándares de peso molecular del marcador Precision Plus Protein Dual Color Standards (BioRad), generando una curva de calibración que arrojó un peso molecular aparente de 64 kDa para la proteína PFR como se muestra en la Figura 11, el cual

difiere en 4 kDa con el valor teórico calculado mediante la herramienta Compute pI/Mw que fue de 60 kDa. En el carril 10 se observa el perfil protéico de las bacterias *E. coli* BL21 sin transformar como control negativo.

Figura 11

Efecto de la incubación post-inducción en la expresión de la proteína PFR.



Nota: Carril 1: marcador de peso molecular Precision Plus Protein Dual Color Standards (BioRad), carril 2-9: Sedimento de 1 ml de cultivo tomado a la 0(h₀), 1(h₁), 2(h₂), 3(h₃), 4(h₄), 5(h₅), 6(h₆) y 24(h₂₄) horas post-inducción, respectivamente. carril 10: Control negativo, *E. coli* BL21 no transformadas.

Optimización post-inducción

La optimización de la incubación posterior a la inducción indicó que los niveles máximos de rendimiento y cantidad relativa de la proteína PFR fueron alcanzados a las 5 horas de haber inducido la expresión, (Figura 11 y Tabla 14).

Tabla 15

Efecto del crecimiento post-inducción sobre la densidad celular y la cantidad relativa de proteína PFR.

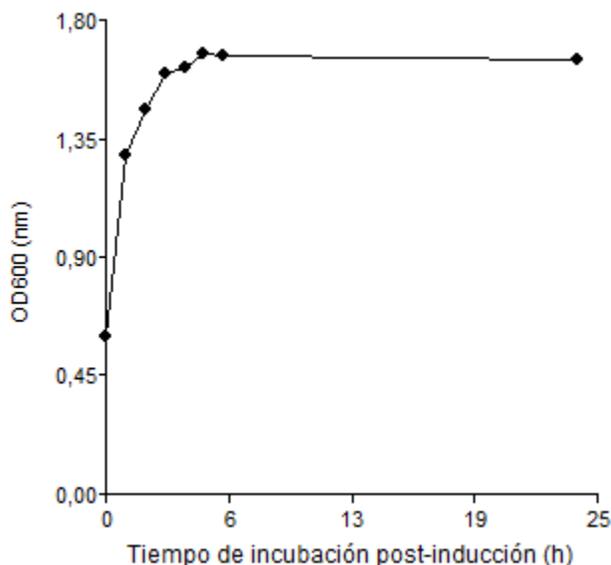
Tiempo transcurrido post-inducción (h)	Densidad celular post-inducción (OD₆₀₀)	Cantidad relativa de la banda
0	0,6	-
1	1,285	0,580
2	1,461	1
3	1,598	1,366
4	1,621	1,051
5	1,672	1,553
6	1,661	1,3872
24	1,652	-

Nota: **h:** horas; **OD₆₀₀:** absorbancia a 600 nanómetros

El análisis del crecimiento celular post-inducción en relación con el tiempo que se muestra en la Figura 12 indica que existe un incremento en la densidad celular hasta 5 horas después de la inducción, posteriormente se puede observar que el OD₆₀₀ se mantiene constante hasta 24 horas después, indicando que las bacterias han llegado a su fase de crecimiento estacionario.

Figura 12

Densidad celular post-inducción de expresión



Nota: Representación gráfica de la fase de crecimiento exponencial y estacionaria en unidades de densidad celular de bacterias transformadas de *E. coli* (BL21) hasta 24 horas de incubación a 250 RPM y 37 °C después de la inducción de expresión.

El análisis del crecimiento celular post-inducción en relación con el tiempo que se muestra en la Figura 12 indica que existe un incremento en la densidad celular hasta 5 horas después de la inducción, posteriormente se puede observar que el OD₆₀₀ se mantiene constante hasta 24 horas después, indicando que las bacterias han llegado a su fase de crecimiento estacionario.

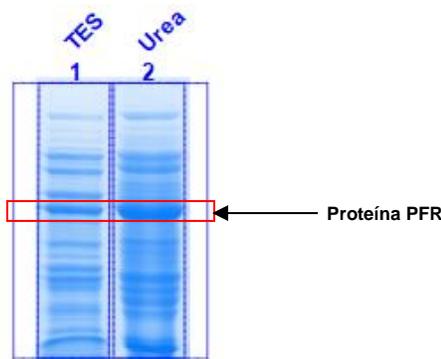
Comparación del rendimiento de lisis bacteriana

Para liberar la proteína expresada en cuerpos de inclusión, se probó dos tipos de lisis, utilizando un tampón Tris-EDTA-Sucrosa (TES) y uno a base de urea, en la Figura 13 se muestra los resultados de la lisis celular mediante análisis por electroforesis vertical de los sobrenadantes obtenidos luego del proceso de lisis celular, se observa que el tampón a base de urea logró recuperar mayor cantidad de proteína recombinante PFR en comparación con el

tampón TES. En la recuperación de la proteína PFR empleando tampón urea se obtuvo rendimientos de $137,83 \pm 7,07$ mg de PFR por / L de cultivo.

Figura 13

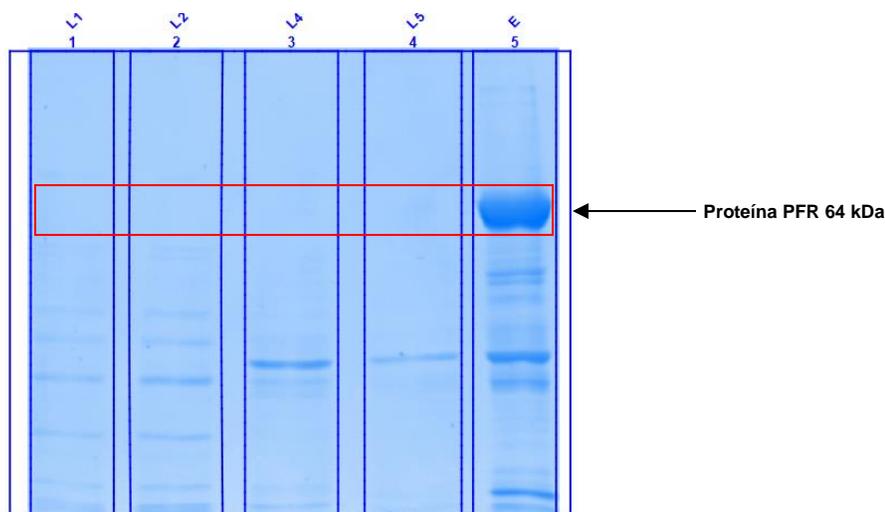
Lisis celular con tampón TES y urea



Nota: Carril 1: lisis bacteriana con tampón TES, carril 2: lisis bacteriana con tampón urea. Se observa mayor recuperación de proteína empleando el tampón urea.

Purificación y análisis de pureza

El proceso de purificación se realizó mediante cromatografía de afinidad empleando una resina cargada con níquel, la resina fue equilibrada mediante dos volúmenes de tampón de unión a un pH de 7,8 y posteriormente se agregó un volumen de lisado bacteriano que contenía la proteína recombinante PFR y se encontraba al mismo pH, posteriormente se realizaron lavados a pH 6 y 5,3; finalmente la proteína fue eluida en un volumen de tampón de elución a pH 4. En la Figura 14 se observa que los lavados a pH 6 y 5,3 eliminan ciertas proteínas no específicas en el proceso de purificación, además también se puede observar que la proteína de interés no es eluida durante estos lavados, también se puede observar que a pH 4 la proteína PFR se eluye completamente, sin embargo, se observa presencia de otras bandas inespecíficas que no fueron eliminada en los lavados previos. El análisis del porcentaje de pureza para la proteína de acuerdo con el software Image Lab fue de 30,7 %.

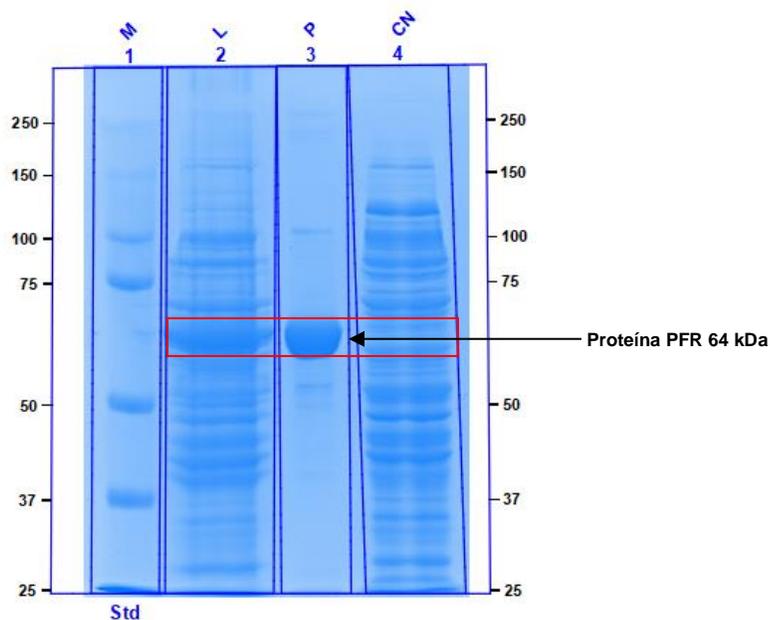
Figura 14*Purificación de la proteína recombinante PFR*

Nota: Carril 1 y 2: lavados a pH 6, carril 3 y 4: lavados a pH 5,3, carril 5, proteína eluida y concentrada mediante filtración centrífuga.

Con la finalidad de mejorar el proceso de purificación y disminuir la cantidad de proteínas inespecíficas presentes, se probó agregar una concentración baja de imidazol (30 mM) al tampón de unión y al lisado bacteriano, manteniendo idénticas las demás condiciones del proceso. En la Figura 15 se observa que la purificación empleando pequeñas cantidades de imidazol logró reducir el número de bandas inespecíficas obteniéndose una proteína con un porcentaje de pureza del 75,3 %.

Figura 15

Purificación de la proteína recombinante PFR empleando 30 mM de imidazol



Nota: Carril 1: marcador de peso molecular Precision Plus Protein Dual Color Standards (BioRad), carril 2, lisado bacteriano que se corrió como control positivo del proceso de expresión, carril 3: proteína PFR purificada con 30 mM de imidazol y concentrada mediante filtración centrífuga, carril 4: control negativo, *E. coli* BL21 no transformadas.

Cuantificación de la proteína PFR y rendimientos de purificación

La proteína PFR fue purificada mediante cromatografía de afinidad Ni-NTA y posteriormente diálisis y concentración empleando filtración por centrifugación, en la Tabla 16 se muestran las concentraciones obtenidas del proceso de cuantificación, así como sus respectivos rendimientos en relación con la masa.

Tabla 16

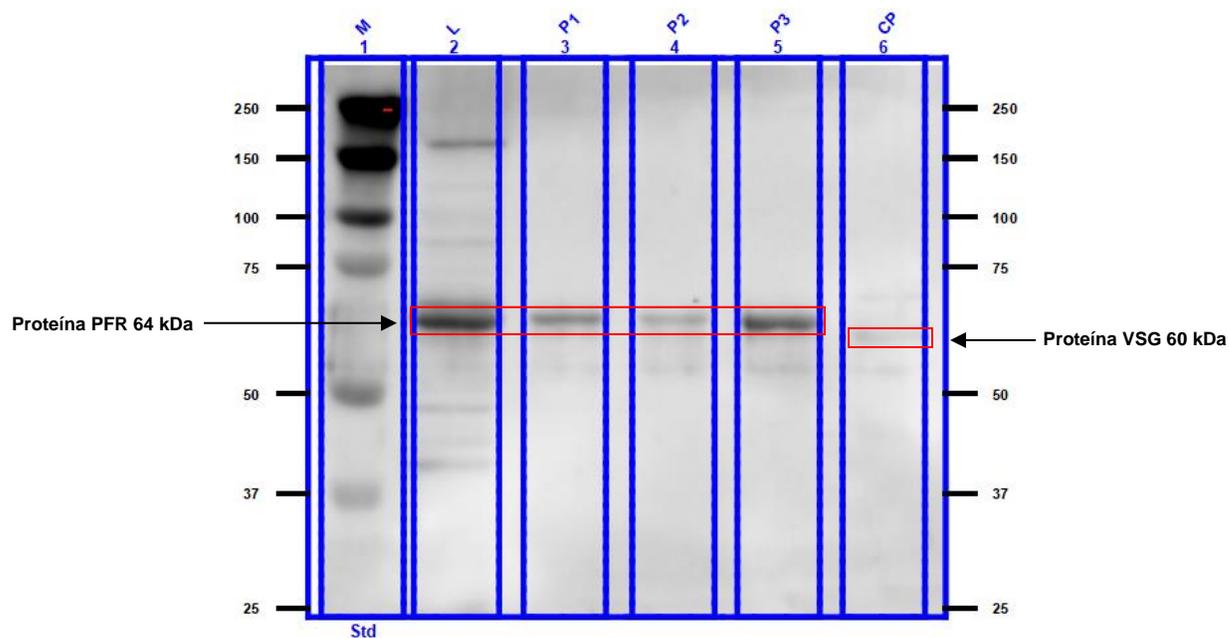
Concentración y rendimiento de la proteína PFR

Etapa de purificación	Concentración proteína PFR (mg/ml)	Rendimiento (mg/ L de cultivo)
Cromatografía de afinidad	0,14 ± 0,01	28
Filtración por centrifugación	0,25 ± 0,01	1,5

Nota: **mg**: miligramos; **ml**: mililitros; **L**: litros

Westernblot

Una vez purificada la proteína PFR, se realizó un análisis de interacción antígeno-anticuerpo empleando la técnica inmunológica Westernblot, para la cual se empleó como anticuerpo primario una muestra de suero bovino positivo para *T. vivax* mediante PCR. Como se aprecia en la Figura 16, existe interacción entre la proteína recombinante PFR (antígeno) frente al suero bovino (anticuerpo), sin embargo, también se observa la presencia de otras bandas que interaccionan en la banda del lisado, esto correspondería a proteínas pertenecientes al huésped de expresión *E. coli* BL21.

Figura 16*Ensayo westernblot de la proteína PFR*

Nota: Carril 1: marcador de peso molecular Precision Plus Protein Dual Color Standards (BioRad), carril 2, lisado bacteriano que se corrió como control positivo del proceso de expresión, carril 3-5: proteína PFR purificada con 20 mM de imidazol y concentrada mediante filtración centrífuga, carril 6: extracto crudo del parásito *Trypanosoma evansi*, se empleó como control positivo del ensayo.

Capítulo V: Discusión

En el presente estudio, se realizó la estandarización de una PCR para la amplificación del gen que codifica una proteína paraflagelar perteneciente al hemoparásito *Trypanosoma vivax*, para lo cual se analizaron las variables de temperatura de hibridación, concentración de magnesio, Taq polimerasa y cebadores, que de acuerdo con Cha & Thilly (1993) intervienen en la especificidad y sensibilidad de la PCR, además Lorenz (2012) menciona que de todas las variables a considerar que afectan la rigurosidad de un ensayo PCR, las dos primeras variables previamente mencionadas podrían resolver la mayoría de los problemas de amplificación.

La temperatura de hibridación óptima está relacionada con la especificidad de la PCR, por lo que es importante determinarla (Kramer & Coen, 2002), partiendo de una T_m de 58°C calculada mediante bioinformática se realizó un gradiente de temperatura con incrementos de 2 °C, en los resultados mostrados en la Figura 3A se observa que a una temperatura de 62 °C existe menor presencia de bandas inespecíficas y una banda más prominente, de acuerdo con Innis et al. (2012) las temperaturas de hibridación que se encuentran en un rango de 55 a 72 °C generalmente obtienen mejores resultados, además también se menciona que aumentar la temperatura de hibridación, como se realizó en el presente estudio, evita la unión de cebadores de forma inespecífica y reduce la extensión incorrecta de nucleótidos en el extremo 3' de los cebadores.

El magnesio actúa como cofactor de la enzima Taq polimerasa y regula su actividad, generalmente su concentración óptima varía entre 0,5 hasta 3,0 mM (Rumsby, 2006), en este trabajo se partió de una concentración de 1,5 hasta 2,5 mM para determinar la mejor concentración de magnesio, los resultados de la Figura 3B mostraron que la concentración óptima de magnesio fue de 1,5 mM, ya que en comparación con la concentración de 2,5 mM se observa una reducción significativa en la cantidad de bandas inespecíficas, esto debido a que como se ha mencionado previamente, concentraciones altas de magnesio favorecen la

estabilidad de cebadores permitiendo que se adhieran de forma incorrecta en el ADN templado mientras fomenta la unión de la enzima a la plantilla del cebador que da como resultado una acumulación de productos amplificados no específicos, por lo que disminuye la especificidad y aumenta la sensibilidad de la PCR (Bartlett & Stirling, 2003; Michael Innis & Gelfand, 1999; Lorenz, 2012).

El gradiente de concentración de enzima Taq polimerasa se realizó con el fin de optimizar la cantidad que se utiliza por reacción, manteniendo la concentración de magnesio estandarizada previamente. De acuerdo con Innis et al. (2012) la concentración óptima de polimerasa está entre 0,5 y 2,5 U por 100 μ l de reacción mientras que otros autores como (Van Pelt-Verkuil et al. (2008) mencionan una concentración óptima de 0,5 a 5 U por 100 μ l de reacción térmica, en este estudio se probó un gradiente de 0,5 hasta 1 U de enzima para un volumen final de 25 μ l de reacción, los resultados mostrados previamente en la Figura 3C muestra que no existe diferencias entre las concentraciones analizadas, es decir que la intensidad de la banda se muestra igual, por lo que se escogió la menor concentración de Taq polimerasa, otros estudios de optimización de la enzima polimerasa como el realizado por Saiki (1989) presentan un gradiente que va desde 8 hasta 0,25 U y se puede apreciar la diferencia en las cantidad de producto amplificado, por lo que en este caso sería recomendable ampliar el rango del gradiente utilizado.

La concentración óptima de los cebadores está en el rango de 0,1 a 0,5 μ M, por lo que para estandarizarla se realizó un gradiente desde 0,2 hasta 0,5 μ M como se observó en la Figura 3D, las concentraciones de 0,2 y 0,3 μ M mostraron una disminución de bandas inespecíficas en comparación con las más altas, por lo que se escogió la concentración de 0,3 μ M como estándar para la PCR, los resultados de este gradiente son consistentes con lo descrito por Innis et al. (2012) y Bartlett & Stirling (2003), quienes mencionan que una concentración elevada de cebadores conduce a una unión no específica y acumulación de

productos inespecíficos, además, podría incrementar la unión entre cebadores que a su vez producen dímeros de cebadores mejor conocidos como “primer-dimers” como subproductos de la reacción térmica.

De acuerdo con Cha & Thilly (1993) cuando el producto amplificado contiene como única banda el producto deseado, no es necesario realizar una purificación posterior, los resultados del proceso de estandarización de la PFRL-PCR en el presente trabajo mostraron una banda única de 1500 pb que concuerda con el tamaño esperado, debido a esto se procedió a realizar la clonación utilizando este producto de PCR.

Inicialmente se realizó el proceso de clonación en el vector TOPO-TA y se confirmó mediante PCR de colonias la presencia de un fragmento de 1500 pb de acuerdo con la herramienta MW Analysis Tool del programa Image Lab (Biorad), el plásmido producto de la clonación se usó posteriormente como control positivo. Para la clonación en el vector de expresión se utilizaron en primera instancia las células *E. coli* JM109 ya que poseen actividad endonucleasa (endA⁻) negativas, lo que evita la pérdida del plásmido por degradación y mejora la calidad del ADN plasmídico (Hanahan et al., 1991), esto permitió confirmar la presencia de dos colonias en donde se había insertado el gen de interés en la orientación correcta utilizando análisis RFLP en los plásmidos extraídos como se describe en Ausubel et al. (1994) mediante la selección de una enzima de restricción (EcoRV) que cortó una vez en el vector y una vez en el gen insertado, los resultados de este procedimiento se mostraron en la Figura 9B obteniéndose dos fragmentos esperados de aproximadamente 4700 y 1120 pb. Otros estudios de expresión de proteínas recombinantes han utilizado secuenciación con la finalidad de identificar el gen amplificado y su correcta inserción en un vector de expresión (Clark et al., 2005; Maharana et al., 2018). La transformación en las bacterias de expresión *E. coli* BL21 (DE3) se logró utilizando 10 ng ADN plasmídico (“Pa-34 y Pa-35”) y se confirmó mediante PCR de colonias como se mostró en la Figura 10, además, se pudo corroborar lo mencionado por

Green & Sambrook (2012) respecto a que la eficiencia de la transformación mejora al utilizar un ADN plasmídico en lugar de una mezcla de ligación (resultados no mostrados).

E. coli es el huésped de expresión favorito para la producción de proteínas recombinantes, debido a su fácil manipulación genética, rápida expresión y costos bajos de cultivo (Francis & Page, 2010; Yin et al., 2007), la cepa *E. coli* BL21 (DE3) se escogió para la expresión de la proteína PFR debido a que además de las características previamente mencionadas, posee disminución de producción de acetato, deficiencia de proteasas que evitan la degradación, reducción de producción basal, entre otras que la hacen ideal como huésped de expresión (Rosano & Ceccarelli, 2014).

Los resultados de la expresión de la proteína PFR mostraron que ésta se expresa en forma de cuerpos de inclusión y no de forma soluble, de acuerdo con Choi et al. (2006) cuando la proteína de interés se expresa en el citoplasma en niveles elevados, se producen cuerpos de inclusión debido a la acumulación de proteínas desplegadas. En un estudio realizado por Kane & Hartley (1988) se analizaron algunos factores que podrían llevar a la formación de cuerpos de inclusión, sin embargo, se concluyó que no es posible generalizar o predecir qué tipos de proteínas llevarían a su formación, ya que no se observó relación entre el origen, hidrofobicidad de la proteína diana o el promotor empleado. Por su parte, otros estudios en donde se analizó el tamaño de la proteína expresada sugieren que la probabilidad de formar cuerpos de inclusión aumenta con el tamaño de la proteína, especialmente cuando ésta supera los 60 kDa (Canaves et al., 2004; C. S. Goh et al., 2004), ya que el tamaño de la proteína obtenido en el presente trabajo es de 64 kDa, podría considerarse esta característica como un factor que favorece su insolubilidad. Existen varias estrategias en cuanto a la adaptación del medio de cultivo que podrían favorecer la expresión de una proteína soluble, se ha observado que la reducción de la temperatura óptima de crecimiento en *E. coli* (37 °C) hasta un rango de 15-20 °C produjo proteínas solubles y con alta actividad enzimática (Shirano & Shibata, 1990; Yang & Zhang,

2013), otros estudios como los realizados por Donovan et al. (1996) han concluido que la reducción de la tasa de expresión mediante la disminución de la concentración de IPTG permite el correcto plegamiento de las proteínas recombinantes y su consiguiente expresión en forma soluble.

Como se había mencionado previamente en los resultados, el tamaño de la proteína PFR obtenida (64 kDa) es 4kDa mayor al esperado (60 kDa), que fue calculado en la herramienta Compute pI/Mw; sin embargo, hay que destacar que este cálculo teórico se realizó únicamente en relación al número de aminoácidos que se codifican con el gen de interés, en este sentido es importante tomar en cuenta que el vector empleado para la expresión posee dos etiquetas Myc-tag y His-tag con pesos moleculares de 1,6 y 2,5 kDa (Booth et al., 2018; Piedras et al., 2000), respectivamente; que permiten la caracterización y purificación de la proteína en pasos posteriores, y que juntas suman ~4 kDa, explicando el incremento encontrado en el peso molecular final de la proteína PFR. En un estudio realizado por Goh et al. (2011) en donde se empleó el mismo vector (pTrcHis2-TOPO) para la producción de una proteína de 43 kDa del virus *M. rosenbergii* se reportó un peso molecular final de 46 kDa cuyo incremento también fue atribuido a la presencia de las etiquetas Myc y His-tag.

La recuperación de la proteína PFR mediante lisis bacteriana utilizando un tampón TES en condiciones nativas fue inferior a la observada al utilizar el tampón urea 8M en condiciones desnaturizantes (Figura 11), Ghamghami et al. (2020) demuestran la eficiencia del tampón TES cuando la proteína se localiza en el periplasma, debido a esto se presume que la proteína se encontraba expresada en el citoplasma bacteriano por lo que el uso de condiciones desnaturizantes resultó en un mejor enfoque al ser el tampón urea 8M un clásico desnaturizante de proteínas que ha sido empleado ampliamente en lisis bacteriana y en procesos de purificación mediante cromatografía de afinidad sin generar interferencias (Crowe et al., 1994; Prakash et al., 1981).

En el proceso de expresión de la proteína PFR se alcanzó su máximo rendimiento 5 horas después de la inducción, esto se pudo verificar mediante un análisis de densitometría (cuantificación relativa) utilizando el software Image Lab, el cual arrojó un valor de 1,55, de igual forma la densidad celular medida a 600 nm alcanzó su máximo valor (1,67) a las 5 horas de inducción, luego de lo cual entró en fase de crecimiento estacionario ya que su valor no incrementó hasta 24 horas después (Figura 13), estos resultados concuerdan con el estudio realizado por Yildir et al., (1998) en donde se demostró que el nivel de inducción de la proteína recombinante aumenta hasta la fase exponencial mientras que se reduce en la fase de crecimiento estacionario. Otros estudios realizados en la expresión de la proteína paraflagelar 1 (PFR1) y 2 (PFR2) de *Trypanosoma evansi* mostraron tiempos óptimos de post-inducción de 5 y 6 horas respectivamente (Abdille et al., 2008; Maharana et al., 2018), concordando con el tiempo óptimo obtenido en el presente trabajo.

La purificación de la proteína PFR que se realizó empleando cromatografía de afinidad Ni-NTA seguida de diálisis y concentración utilizando filtración por centrifugación mostró inicialmente un pureza del 30,7% analizado mediante el software Image Lab, se pudo observar la presencia de bandas que se copurificaron (Figura 14), Crowe et al., (1994) mencionan que en el proceso de purificación de proteínas expresadas en *E. coli* normalmente existe presencia de proteínas que se han unido de forma inespecífica a la resina debido a la formación de enlaces disulfuro o proteínas que contienen más de dos residuos de histidina. Por su parte estudios realizados por Bornhorst & Falke (2000) muestran que concentraciones bajas de imidazol de hasta 40 mM, aplicado al tampón de unión y muestra a purificar, podría reducir la unión de proteínas inespecíficas en el proceso y por lo tanto generar una proteína con mayor grado de pureza, en base a estos resultados se probó la aplicación de 30 mM de imidazol en un proceso de purificación posterior (Figura 15) y se observó una disminución sustancial de las

bandas inespecíficas y un incremento mayor al doble en el porcentaje de purificación final que fue del 75,3 %.

La purificación mediante cromatografía de afinidad Ni-NTA presenta varias ventajas, la etiqueta de seis residuos de histidina que se agrega a la proteína tiene un peso molecular muy bajo y una carga neutra, evitando así interacción en el proceso de plegado además de no interferir con la estructura proteica y su función biológica (Carson et al., 2007), presenta compatibilidad con tampones desnaturizantes (Hochuli et al., 1988); como es el caso del tapón urea 8M aquí empleado y se puede realizar de forma exitosa en un solo paso debido a su relativamente alta afinidad y especificidad a la etiqueta de histidinas (Spriestersbach et al., 2015). Por otro lado, una de las principales desventajas encontradas en el proceso de purificación empleando esta metodología es la presencia de bandas inespecíficas, como se pudo observar en los resultados previos (Figura 14), sin embargo este problema puede solventarse mediante varias estrategias que incluyen: incrementar la concentración de sal (NaCl) hasta 2 M, incluir imidazol de 20-40 mM en el tamón de unión o adicionar concentraciones bajas de detergentes (Block et al., 2009), sin embargo, se considera que una de las estrategias más importantes a emplear para evitar las uniones inespecíficas residen en el correcto ajuste de la cantidad de proteína a purificar que existe en la muestra frente al volumen de resina Ni-NTA utilizada (Gräslund et al., 2008).

Los resultados de la cuantificación que se muestran en la Tabla 16 evidencian que el proceso de diálisis y concentración empleando filtración por centrifugación disminuye el rendimiento de la masa de proteína obtenida, de 28 a 1,5 mg/ L de cultivo, esto debido a que el volumen final obtenido luego de la cromatografía de afinidad es de 10 ml, comparado con los 0,3 ml obtenidos al someter esta muestra a diálisis, de acuerdo con Phillips & Signs (2004) el intercambio de tampón o eliminación de sales también se puede lograr empleando una bolsa

de diálisis estándar, sin embargo, este proceso también supone pérdidas de volumen de hasta el 50%.

El ensayo inmunológico de westernblot se realizó empleando 5 μ l de proteína PFR purificada, frente a un suero bovino positivo a *T. vivax*, como se muestra en la Figura 16, en los carriles P1, P2 y P3 se observa una banda de 64 kDa consistente con la proteína expresada, estos resultados son consistentes con estudios realizados previamente, en donde se han detectado bandas de 66 y 64 kDa al exponer extractos crudos de *T. vivax* frente a sueros bovinos positivos al mismo hemoparásito (Bolívar et al., 2007; Ramírez-Barrios et al., 2015) y sugieren que la proteína PFR obtenida en el presente estudio es antigénica por lo que su utilidad como método diagnóstico podría ser evaluada en estudios posteriores.

Capítulo VI: Conclusiones

La temperatura de hibridación y la concentración de magnesio resultaron ser las variables más relevantes en la estandarización de la PFRL-PCR, ajustándose a una temperatura de 62 °C y 1,5 mM; y generando una banda esperada de 1500 pb sin presencia de bandas inespecíficas. Otras variables que se consideraron como la concentración de enzima Taq polimerasa se estandarizó a 0,5 U, mientras que la concentración de cebadores a un valor de 0,3 μ M.

La correcta inserción del gen de interés en el vector de expresión se pudo comprobar mediante análisis RFLP empleando el plásmido de bacterias transformadas de *E. coli* JM109 y mostró dos fragmentos de 4700 y 1120 pb, por otro lado, la transformación en las bacterias de expresión *E. coli* BL21 (DE3) se logró empleando 10 ng del plásmido en lugar de una mezcla de producto de ligación.

La expresión de la proteína PFR se dio en forma de cuerpos de inclusión que se lisaron empleando condiciones desnaturalizantes con urea 8M, la cantidad relativa máxima de proteína generada fue de 1,55 y se logró a las 5 horas post-inducción. El análisis del peso molecular de la proteína empleando una curva de calibración mostró un valor de 64 kDa, que concuerda con el tamaño esperado al sumarse las etiquetas Myc y His-tag presentes en el vector de expresión.

El uso de 30 mM de imidazol en el tampón de unión y lisado bacteriano en la cromatografía Ni-NTA incrementó el porcentaje de pureza de la proteína PFR de 30,7% a 75,3%. El ensayo westernblot permitió identificar una banda de 64 kDa contra un suero positivo a *T. vivax*, por lo que se presume que existe reacción antígeno-anticuerpo.

Capítulo VII: Recomendaciones

Pese a que el análisis RFLP permite identificar de forma robusta el tamaño de la secuencia y si ésta fue insertada en la orientación correcta en el vector de expresión, es recomendable complementar este análisis mediante secuenciación que permita el análisis del producto amplificado.

Se recomienda reducir la temperatura a un rango de 15-20 °C u optimizar las concentraciones de IPTG en el proceso de expresión de la proteína ya que podría favorecer la liberación de la proteína en el medio de cultivo; evitando la lisis bacteriana.

En el proceso de purificación, incrementar la concentración de sal hasta 2 M, adicionar concentraciones bajas de detergentes y estandarizar la relación entre el volumen de resina Ni-NTA frente a la cantidad de proteína en la muestra a purificar son estrategias que se deberían emplear para mejorar aún más el porcentaje de pureza de la proteína PFR.

La eliminación de sales producto del proceso de lisis podría realizarse empleando una bolsa de diálisis en lugar de filtración con centrifugación para disminuir la pérdida de masa producido.

Dado que los resultados mostrados sugieren que la proteína PFR es antigénica, se recomienda analizar esta propiedad mediante estandarización de ensayos inmunológicos como Westernblot o ELISA.

Capítulo VIII: Bibliografía

- Abdala, A., Larriestra, A., & Porchietti, M. S. (2020). Estimación de pérdidas económicas causadas por *Trypanosoma vivax* en un rodeo lechero de Argentina. *Revista Veterinaria ISSN*, 2, 115–119. <https://repositorio.inta.gob.ar/handle/20.500.12123/9860>
- Abdille, M. H., Li, S. Y., Ding, J., & Suo, X. (2008). *Trypanosoma evansi*: Paraflagellar rod protein 1 and 2 are similar but lack common B cell epitopes. *Experimental Parasitology*, 120(4), 411–416. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.08.007>
- Allawi, H. T., & Santalucia, J. (1997). Thermodynamics and NMR of internal G-T mismatches in DNA. *Biochemistry*, 36(34), 10581–10594. <https://doi.org/10.1021/bi962590c>
- Anosa, V. O., & Isoun, T. T. (1980). Haematological studies on *Trypanosoma vivax* infection of goats and intact and splenectomized sheep. *Journal of Comparative Pathology*, 90(1), 155–168. [https://doi.org/10.1016/0021-9975\(80\)90036-5](https://doi.org/10.1016/0021-9975(80)90036-5)
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J., & Struhl, K. (1994). Current protocols in molecular biology. In *New York: Greene Publishing Associates and WileyInterscience*. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(88\)80264-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(88)80264-3)
- Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(5), 411–421. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(99\)00003-8](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(99)00003-8)
- Bartlett, J. M. S., & Stirling, D. (2003). *PCR protocols*. Humana Press. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1385/1592593844.pdf>
- Bastin, P., Matthews, K. R., & Gull, K. (1996). The paraflagellar rod of Kinetoplastida: Solved and unsolved questions. In *Parasitology Today* (Vol. 12, Issue 8, pp. 302–307). [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(96\)10031-4](https://doi.org/10.1016/0169-4758(96)10031-4)
- Benavides Ortiz, E., Marco, /, Rozo, L., Luis, /, Alayón Flórez, E., Veterinario, M., &

- Agropecuarias, C. (2011). Livestock Diseases in La Macarena Region (Meta): An Exercise of Participative Epidemiology. *Rev. Med. Vet.: N.º, 21*, 41.
- Biswas, K., Pandey, P., Kumar, R., & Gupta, M. M.-N. (2016). 1. Microbial recombinant protein: An epic from fundamental to future panorama of life science. In *Researchgate.Net* (Vol. 661, Issue 2). <https://www.researchgate.net/publication/305407403>
- Block, H., Maertens, B., Spriestersbach, A., Brinker, N., Kubicek, J., Fabis, R., Labahn, J., & Schäfer, F. (2009). Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC): a review. *Methods in Enzymology*, 463(C), 439–473. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63027-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63027-5)
- Bolívar, A. M., Reyna-Bello, A., García, F., García-Lugo, 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. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1690-46482007000100007
- Booth, W. T., Schlachter, C. R., Pote, S., Ussin, N., Mank, N. J., Klapper, V., Offermann, L. R., Tang, C., Hurlburt, B. K., & Chruszcz, M. (2018). Impact of an N-terminal polyhistidine tag on protein thermal stability. *ACS Omega*, 3(1), 760–768. https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.7B01598/SUPPL_FILE/AO7B01598_SI_001.PDF
- Bornhorst, J. A., & Falke, J. J. (2000). Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. In *Methods in Enzymology* (Vol. 326, pp. 245–254). NIH Public Access. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(00\)26058-8](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(00)26058-8)
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

- Canaves, J. M., Page, R., Wilson, I. A., & Stevens, R. C. (2004). Protein biophysical properties that correlate with crystallization success in *Thermotoga maritima*: Maximum clustering strategy for structural genomics. *Journal of Molecular Biology*, *344*(4), 977–991.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.09.076>
- Carson, M., Johnson, D. H., McDonald, H., Brouillette, C., & DeLucas, L. J. (2007). His-tag impact on structure. *Urn:Issn:0907-4449*, *63*(3), 295–301.
<https://doi.org/10.1107/S0907444906052024>
- Cha, R. S., & Thilly, W. G. (1993). Specificity, efficiency, and fidelity of PCR. *Genome Research*, *3*(3), S18–S29. <https://doi.org/10.1101/gr.3.3.S18>
- Chávez-Larrea, M. A., Medina-Pozo, M. L., Cholota-Iza, C. E., Jumbo-Moreira, J. R., Saegerman, C., Proaño-Pérez, F., Ron-Román, J., & Reyna-Bello, A. (2020). First report and molecular identification of *Trypanosoma* (Duttonella) *vivax* outbreak in cattle population from Ecuador. *Wiley Online Library*, *68*(4), 2422–2428.
<https://doi.org/10.1111/tbed.13906>
- Choi, J. H., & Lee, S. Y. (2004). Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *64*(5), 625–635.
<https://doi.org/10.1007/S00253-004-1559-9>
- Choi, Jong Hyun, Keum, K. C., & Lee, S. Y. (2006). Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chemical Engineering Science*, *61*(3), 876–885.
<https://doi.org/10.1016/j.ces.2005.03.031>
- Clark, A. K., Kovtunovych, G., Kandlikar, S., Lal, S., & Stryker, G. A. (2005). Cloning and expression analysis of two novel paraflagellar rod domain genes found in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research*, *96*(5), 312–320. <https://doi.org/10.1007/s00436-005-1370-2>

- Clark, D. P., & Pazdernik, N. J. (2016). Recombinant DNA Technology. In *Biotechnology* (Vol. 2, pp. 63–95). Academic Cell. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385015-7.00003-X>
- Compton, S. J., & Jones, C. G. (1985). Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical Biochemistry*, *151*(2), 369–374. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90190-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90190-3)
- Correia, M., & Gonzalez, B. (2019). Clonación del gen quimera tv70catl de *Trypanosoma vivax* en un sistema bacteriano. *Observador Del Conocimiento*, *4*(1), 95–104.
- Crowe, J., Döbeli, H., Gentz, R., Hochuli, E., Stüber, D., & Henco, K. (1994). 6xHis-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 31, pp. 371–387). <https://doi.org/10.1385/0-89603-258-2:371>
- Dagnachew, S., & Bezie, M. (2015). Review on *Trypanosoma vivax*. *African Journal of Basic & Applied Sciences*, *7*(1), 41–64. <https://doi.org/10.5829/idosi.ajbas.2015.7.1.92116>
- de Gee, A. L. (1982). Host parasite relationships in *Trypanosoma (duttonella) vivax* with special reference to the influence of antigenic variation. In *The Veterinary quarterly* (Vol. 4, Issue 1, pp. 32–35). <https://doi.org/10.1080/01652176.1982.9693835>
- Desquesnes, M., & Dávila, A. M. R. (2002). Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: a review and perspectives. *Veterinary Parasitology*, *109*(3–4), 213–231. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00270-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00270-4)
- Desquesnes, Marc. (2004). *Livestock Trypanosomoses and their Vectors in Latin America* (Vol. 8, pp. 1–64). OIE.
- Desquesnes, Marc, Gonzatti, M., Sazmand, A., Thévenon, S., Bossard, G., Boulangé, A., Gimonneau, G., Truc, P., Herder, S., Ravel, S., Sereno, D., Jamonneau, V., Jittapalapong,

- S., Jacquet, P., Solano, P., & Berthier, D. (2022). A review on the diagnosis of animal trypanosomoses. *Parasites and Vectors*, *15*(1), 1–24. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05190-1>
- Desquesnes, Marc, & Tresse, L. (1996). Evaluation de la sensibilité du test de Woo pour la détection de *Trypanosoma vivax*. *Revue d'élevage et de Médecine Vétérinaire Des Pays Tropicaux*, *49*(4), 315–321. <https://doi.org/10.19182/remvt.9503>
- Docampo, R., de Souza, W., Miranda, K., Rohloff, P., & Moreno, S. N. J. (2005). Acidocalcisomes - Conserved from bacteria to man. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 3, Issue 3, pp. 251–261). <https://doi.org/10.1038/nrmicro1097>
- Donovan, R. S., Robinson, C. W., & Click, B. R. (1996). Review: Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter. *Journal of Industrial Microbiology*, *16*(3), 145–154. <https://doi.org/10.1007/BF01569997>
- Farina, M., Atijas, M., Souto, T., & De Souza, W. (1986). Further Studies on the Organization of the Paraxial Rod of Trypanosomatids. *The Journal of Protozoology*, *33*(4), 552–557. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1986.tb05661.x>
- Fasman, G. D. (1989). Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology. In *CRC press*. [https://doi.org/10.1016/0307-4412\(91\)90020-9](https://doi.org/10.1016/0307-4412(91)90020-9)
- Fetene, E., Leta, S., Regassa, F., & Büscher, P. (2021). Global distribution, host range and prevalence of *Trypanosoma vivax*: a systematic review and meta-analysis. *Parasites and Vectors*, *14*(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04584-x>
- Field, M. C., & Carrington, M. (2009). The trypanosome flagellar pocket. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 7, Issue 11, pp. 775–786). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2221>
- Francis, D. M., & Page, R. (2010). Strategies to Optimize Protein Expression in *E. coli*. *Current*

Protocols in Protein Science, 61(1), 5.24.1-5.24.29.

<https://doi.org/10.1002/0471140864.PS0524S61>

Gardiner, P. R. (1989). Recent Studies of the Biology of *Trypanosoma vivax*. *Advances in Parasitology*, 28(C), 229–317. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60334-6](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60334-6)

Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), 1–4. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>

Ghamghami, E., Abri Aghdam, M., Tohidkia, M. R., Ahmadikhah, A., Khanmohammadi, M., Mehdipour, T., Mokhtarzadeh, A., & Baradaran, B. (2020). Optimization of Tris/EDTA/Sucrose (TES) periplasmic extraction for the recovery of functional scFv antibodies. *AMB Express*, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01063-x>

Goh, C. S., Lan, N., Douglas, S. M., Wu, B., Echols, N., Smith, A., Milburn, D., Montelione, G. T., Zhao, H., & Gerstein, M. (2004). Mining the Structural Genomics Pipeline: Identification of Protein Properties that Affect High-throughput Experimental Analysis. *Journal of Molecular Biology*, 336(1), 115–130. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.11.053>

Goh, Z. H., Tan, S. G., Bhasu, S., & Tan, W. S. (2011). Virus-like particles of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus produced in bacteria. *Journal of Virological Methods*, 175(1), 74–79. <https://doi.org/10.1016/J.JVIROMET.2011.04.021>

Goldring, J. P. D. (2012). Protein quantification methods to determine protein concentration prior to electrophoresis. *Methods in Molecular Biology*, 869, 29–35. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-821-4_3

Gómez-Piñeres, E; Boada-Sucre, A; Bretaña, A; Contreras-Bretaña, M; García, F & Reyna-Bello, A. (2014). Morfometría Comparativa de Cinco Aislados Venezolanos *Trypanosoma vivax*. *Revista de La Facultad de Ciencias Veterinarias*, 55(1), 25–33.

- Gonzatti, M. I., González-Baradat, B., Aso, P. M., & Reyna-Bello, A. (2014). *Trypanosoma* (duttonella) *vivax* and typanosomosis in latin America: Secadera/Huequera/Cacho Hueco. *Trypanosomes and Trypanosomiasis*, 261–285. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1556-5_11
- Gräslund, S., Nordlund, P., Weigelt, J., Hallberg, B. M., Bray, J., Gileadi, O., Knapp, S., Oppermann, U., Arrowsmith, C., Hui, R., Ming, J., Dhe-Paganon, S., Park, H. W., Savchenko, A., Yee, A., Edwards, A., Vincentelli, R., Cambillau, C., Kim, R., ... Gunsalus, K. C. (2008). Protein production and purification. *Nature Methods*, 5(2), 135–146. <https://doi.org/10.1038/NMETH.F.202>
- Green, M., & Sambrook, J. (2012). Cloning and Transformation with Plasmid Vectors. In: Molecular Cloning: A Laboratory Manual. In *Cold Spring Harbor* (4th ed.). Cold Spring Harbor.
- Greiner, M., Kumar, S., & Kyeswa, C. (1997). Evaluation and comparison of antibody ELISAs for serodiagnosis of bovine trypanosomosis. *Veterinary Parasitology*, 73(3–4), 197–205. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(97\)00134-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(97)00134-9)
- Hanahan, D., Jessee, J., & Bloom, F. R. (1991). Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods in Enzymology*, 204(C), 63–113. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)04006-A](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)04006-A)
- Hochuli, E., Bannwarth, W., Dobeli, H., Gentzi, R., & Stuber, D. (1988). Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. *Bio/Technology*, 6(11), 1321–1325. <https://doi.org/10.1038/nbt1188-1321>
- Hurtado, O., Castro, P., & Giraldo-Ríos, C. (2016). Reproductive failures associated with *Trypanosoma* (Duttonella) *vivax*. In *Veterinary Parasitology* (Vol. 229, pp. 54–59). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.09.017>

- Innis, MA, Gelfand, D., Sninsky, J., & White, T. (2012). *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press.
<https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=Z5jwZ2rbVe8C&oi=fnd&pg=PP1&dq=PCR+Protocols:+A+guide+to+methods+and+applications.&ots=IBKYli0O9v&sig=VEjMgk2asWiWGF6nfnLJwdU9pcE>
- Innis, Michael, & Gelfand, D. (1999). Optimization of PCR. *PCR Applications*, 3–22.
<https://doi.org/10.1016/B978-012372185-3/50002-X>
- Jonasson, P., Liljeqvist, S., Nygren, P.-Å., & Ståhl, S. (2002). Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 35(2), 91–105. <https://doi.org/10.1042/ba20010099>
- Jungbauer, A., Kaar, W., & Schlegl, R. (2004). Folding and refolding of proteins in chromatographic beds. *Current Opinion in Biotechnology*, 15(5), 487–494.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2004.08.009>
- Kane, J. F., & Hartley, D. L. (1988). Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology*, 6(5), 95–101. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(88\)90065-0](https://doi.org/10.1016/0167-7799(88)90065-0)
- Kaufer, A., Ellis, J., Stark, D., & Barratt, J. (2017). The evolution of trypanosomatid taxonomy. In *Parasites and Vectors* (Vol. 10, Issue 1). BioMed Central Ltd.
<https://doi.org/10.1186/s13071-017-2204-7>
- Kramer, M. F., & Coen, D. M. (2002). The polymerase chain reaction. *Current Protocols in Protein Science*, 29(1), A-4J. <https://doi.org/10.1002/0471140864.PSA04JS29>
- Landfear, S. M., & Ignatushchenko, M. (2001). The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. In *Molecular & Biochemical Parasitology* (Vol. 115).

Layne, E. (1957). *Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins* (Vol 3). Academic Press.

https://scholar.google.com/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=Spectrophotometric+and+Turbidimetric+Methods+for+Measuring+Proteins&btnG=

Lorenz, T. C. (2012). Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 63(63), 3998.

<https://doi.org/10.3791/3998>

Madruga, C. R., Araújo, F. R., Marques, A. P. C., Carvalho, C. M. E., Cusinato, F. Q., Crocci, A. J., Kessler, R. H., & Miguita, M. (2000). Desenvolvimento de uma prova de imunoadsorção enzimática para detecção de anticorpos contra *Babesia bovis*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 20(4), 167–170. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2000000400007>

Maga, J. A., Sherwin, T., Francis, S., Gull, K., & LeBowitz, J. H. (1999). Genetic dissection of the *Leishmania* paraflagellar rod, a unique flagellar cytoskeleton structure. *Journal of Cell Science*, 112(16), 2753–2763. <https://doi.org/10.1242/jcs.112.16.2753>

Maharana, B., Kumar Tewari, A., Sudhakar, N., & Mishra, C. (2018). Molecular cloning, expression and characterization of para flagellar rod protein 1 of *Trypanosoma evansi*. *Iranian Journal of Parasitology*, 13(4), 618–626. [/pmc/articles/PMC6348229/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31444429/)

McKean, P. G., Baines, A., Vaughan, S., & Gull, K. (2003). γ -tubulin functions in the nucleation of a discrete subset of microtubules in the eukaryotic flagellum. *Current Biology*, 13(7), 598–602. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00174-X](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00174-X)

Osório, A. L. A. R., Madruga, C. R., Desquesnes, M., Soares, C. O., Ribeiro, L. R. R., & Da Costa, S. C. G. (2008). *Trypanosoma* (*Duttonella*) *vivax*: Its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World - A review. In *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* (Vol. 103, Issue 1, pp. 1–13). Fundação Oswaldo Cruz.

<https://doi.org/10.1590/S0074-02762008000100001>

Owczarek, B., Gerszberg, A., & Hnatuszko-Konka, K. (2019). A Brief Reminder of Systems of Production and Chromatography-Based Recovery of Recombinant Protein Biopharmaceuticals. In *BioMed Research International* (Vol. 2019).

<https://doi.org/10.1155/2019/4216060>

Pereira, H. D., Simões, S. V.D., Souza, F. A. L., Silveira, J. A. G., Ribeiro, M. F. B., Cadioli, F. A., & Sampaio, P. H. (2018). Clinical and epidemiological aspects and diagnosis of *Trypanosoma vivax* infection in a cattle herd, state of Maranhão, Brazil. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 38(5), 896–901. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5303>

Phillips, A. T., & Signs, M. W. (2004). Desalting, Concentration, and Buffer Exchange by Dialysis and Ultrafiltration. *Current Protocols in Protein Science*, 38(1), 4–4.

<https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0404s38>

Piedras, P., Rivas, S., Dröge, S., Hillmer, S., & Jones, J. D. G. (2000). Functional, c-myc-tagged Cf-9 resistance gene products are plasma-membrane localized and glycosylated. *The Plant Journal*, 21(6), 529–536. <https://doi.org/10.1046/J.1365-313X.2000.00697.X>

Pinske, C., Bönn, M., Krüger, S., Lindenstrauß, U., & Sawers, R. G. (2011). Metabolic deficiencies revealed in the biotechnologically important model bacterium *Escherichia coli* BL21(DE3). *PLoS ONE*, 6(8), e22830. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022830>

Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., Nature, G. B.-, & 1975, U. (1975). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature.Com*, 258(5536), 598–599. <https://www.nature.com/articles/258598a0>

Portman, N., & Gull, K. (2010). The paraflagellar rod of kinetoplastid parasites: From structure to components and function. In *International Journal for Parasitology* (Vol. 40, Issue 2, pp.

135–148). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.10.005>

Prakash, V., Loucheux, C., Scheufele, S., Gorbunoff, M. J., & Timasheff, S. N. (1981).

Interactions of proteins with solvent components in 8 m urea. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 210(2), 455–464. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(81\)90209-5](https://doi.org/10.1016/0003-9861(81)90209-5)

Ramírez-Barrios, R. A., Valera, Z., Parra, O., Chacin, E., Tavares-Marques, L., Holzmüller, P., Martínez-Moreno, Á., & Reyna-Bello, A. (2015). Immunoreactive proteins of *Trypanosoma vivax*. *Revista Científica de La Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad Del Zulia*, 25(4), 311–316. <https://agritrop.cirad.fr/579750/1/579750.pdf>

Rivera, M. (1996). *Hemoparasitosis bovinas. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico UCV. Colección Estudios. Caracas, Venezuela. 237.* <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IscScript=UADY.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=004169>

Rocha, G. M., Teixeira, D. E., Miranda, K., Weissmüller, G., Bisch, P. M., & de Souza, W.

(2010). Structural changes of the paraflagellar rod during flagellar beating in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS ONE*, 5(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011407>

Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 5, Issue APR, p. 172).

Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>

Rumsby, G. (2006). An introduction to PCR techniques. *Methods in Molecular Biology*, 324, 75–89. <https://doi.org/10.1385/1-59259-986-9:75>

Saiki, R. K. (1989). The Design and Optimization of the PCR. In *PCR Technology* (pp. 7–16).

Palgrave Macmillan UK. https://doi.org/10.1007/978-1-349-20235-5_1

Saravia, N. G., Hazbón, M. H., Osorio, Y., Valderrama, L., Walker, J., Santrich, C., Cortázar, T.,

- LeBowitz, J. H., & Travi, B. L. (2005). Protective immunogenicity of the paraflagellar rod protein 2 of *Leishmania mexicana*. *Vaccine*, 23(8), 984–995.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.07.044>
- Seidl, A., Dávila, A. M. R., & Silva, R. A. M. S. (1999). Estimated Financial Impact of *Trypanosoma vivax* on the Brazilian Pantanal and Bolivian Lowlands. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(2), 269–272. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000200027>
- Sekoni, V. O. (1994). Reproductive disorders caused by animal trypanosomiasis: A review. In *Theriogenology* (Vol. 42, Issue 4, pp. 557–570). *Theriogenology*.
[https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)90373-Q](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)90373-Q)
- Seye, M., Diaite, A., Ndiaye, T. D., & Diouf, A. (2000). Trypanosomosis due to *Trypanosoma vivax* in ruminants in Latin America: A review. *Animal Trypanosomosis: Diagnosis and Epidemiology*, 105–110. http://inis.iaea.org/Search/search.aspx?orig_q=RN:32006375
- Shaw, J. J., & Lainson, R. (1972). *Trypanosoma vivax* in Brazil. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 66(1), 25–32. <https://doi.org/10.1080/00034983.1972.11686794>
- Shirano, Y., & Shibata, D. (1990). Low temperature cultivation of *Escherichia coli* carrying a rice lipoygenase L-2 cDNA produces a soluble and active enzyme at a high level. *FEBS Letters*, 271(1–2), 128–130. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80388-Y](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80388-Y)
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76–85.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)
- Soulsby, E. J. L. (1987). Immune Responses in Parasitic Infections: Immunology,

- Immunopathology and Immunoprophylaxis. In *Immunopathology, immunology and immunoprophylaxis of Theileria infections* (pp. 1–23). <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US19890061937>
- Spriestersbach, A., Kubicek, J., Schäfer, F., Block, H., & Maertens, B. (2015). Purification of His-Tagged Proteins. In *Methods in Enzymology* (Vol. 559, pp. 1–15). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2014.11.003>
- Stepanchenko, N. S., Novikova, G. V., & Moshkov, I. E. (2011). Protein Quantification. *Russian Journal of Plant Physiology*, 58(4), 737–742. <https://doi.org/10.1134/S1021443711040182>
- Stevens, J., & Gibson, W. (1999). The evolution of salivarian trypanosomes. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(2), 225–228. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000200019>
- Suárez, C., Garcia, F., Baldizán, G., M. (2003). Comportamiento parasitológico, clínico y hematológico em ovinos infectados experimentalmente con un aislado venezolano de *Trypanosoma vivax*. *Veterinaria Tropical*, 28(1), 79–92.
- Tripathi, N. K., & Shrivastava, A. (2019). Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 420. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00420>
- Uilenberg, G., & Boyt, W. (1998). *A field guide for the diagnosis, treatment and prevention of African animal trypanosomosis*. 1–170.
- Valera, Z., Parra, O., Alvarado, M., Barboza, G., Escalona, F., & Ramírez, R. (2005). Effect of experimental *Trypanosoma vivax* infection on hematological parameters in sheep. *Revista Científica*, XV(5), 412–420.
- Van Pelt-Verkuil, E., Van Belkum, A., & Hays, J. P. (2008). Principles and technical aspects of

- PCR amplification. In *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6241-4>
- Vedrenne, C., Giroud, C., Robinson, D. R., Besteiro, S., Bosc, C., Bringaud, F., & Baltz, T. (2002). Two related subpellicular cytoskeleton-associated proteins in *Trypanosoma brucei* stabilize microtubules. *Molecular Biology of the Cell*, 13(3), 1058–1070. <https://doi.org/10.1091/mbc.01-06-0298>
- Vickerman, K. (1974). Antigenic variation in African trypanosomes. *Wiley Online Library*, 53.
- Wells, E., Betancourth, A., & Ramirez, L. (1977). The epidemiology of *Trypanosoma vivax* in Latin America: some results from the use of an indirect fluorescent antibody test. *Journal of Protozoology*, 24, 41A-2A.
- Wiechelman, K. J., Braun, R. D., & Fitzpatrick, J. D. (1988). Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Analytical Biochemistry*, 175(1), 231–237. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90383-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90383-1)
- William Studier, F., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., & Dubendorff, J. W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods in Enzymology*, 185(C), 60–89. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)85008-C](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)85008-C)
- Wilson, N. F., Iyer, J. K., Buchheim, J. A., & Meek, W. (2008). Regulation of flagellar length in *Chlamydomonas*. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 19, Issue 6, pp. 494–501). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2008.07.005>
- Wingfield, P. T. (2015). Overview of the purification of recombinant proteins. *Current Protocols in Protein Science*, 2015, 6.1.1-6.1.35. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0601s80>
- Woo, P. T. (1970). The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Acta Tropica*, 27(4), 384–386.

<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19712901397>

Yang, X., & Zhang, Y. (2013). Effect of temperature and sorbitol in improving the solubility of Carboxylesterases protein CpCE-1 from *Cydia pomonella* and biochemical characterization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(24), 10423–10433.

<https://doi.org/10.1007/s00253-013-5236-8>

Yildir, C., Önsan, Z. I., & Kirdar, B. (1998). Optimization of starting time and period of induction and inducer concentration in the production of the restriction enzyme EcoRI from recombinant *Escherichia coli* 294. *Turkish Journal of Chemistry*, 22(3), 221–226.

Yin, J., Li, G., Ren, X., & Herrler, G. (2007). Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes.

Journal of Biotechnology, 127(3), 335–347.

<https://doi.org/10.1016/J.JBIOTECH.2006.07.012>

Capítulo IX: Apéndices