



Universidad del Azuay

Facultad de Ciencia y Tecnología

Carrera de Biología

**PRODUCCIÓN RECOMBINANTE DE LA
ENZIMA CRUZIPAÍNA DE *TRYPANOSOMA
CRUZI* EN *ESCHERICHIA COLI***

Trabajo de graduación previo a la obtención del título de:
Biólogo

Autor:
William Játiva Neira.;

Director:
Josué Pozo Martínez

**Cuenca – Ecuador
Año 2025**

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de investigación principalmente a mis padres, por su apoyo constante e infinita paciencia además de mantenerme motivado durante todo el proceso de la carrera. A mis docentes, por compartir su conocimiento y plantear las bases necesarias para lograr los objetivos planteados. A mis amigos a quienes me apoyaron incondicionalmente y brindaron su tiempo a pesar de que varios de ellos no comprendían mucho del tema o se encontraban en situaciones complejas.

AGRADECIMIENTO

He de aprovechar este apartado como un recordatorio cuando eventualmente sienta nostalgia por las primeras cosas aprendidas.

He de agradecer primero que nada a mi director Josué y mi profe Rodrigo más que nada haberme tenido confianza y permitirme enlazarme a este proyecto y de ese modo poder realizar mi tesis, gracias a ello he podido consultarles bastantes cosas sobre un tema del que previamente había investigado un poco además de que agradezco la paciencia que han tenido y que siempre estuvieran dispuestos a corregirme.

De igual modo he de agradecer a Daniela porque me acompañó en el aprendizaje de los procedimientos de laboratorio desde el inicio, realmente fue crucial los primeros meses y aprecio bastante que incluso luego estuviera disponible para consultarle dudas que se generaban además de que siempre mantuvo una actitud positiva.

He de agradecer a Diego, Johanna y Nicole por enseñarme muchas cosas dentro del laboratorio y asistirme cuando tenía problemas en mis procedimientos además de indicarme los errores que cometía, agradezco que siempre fueron un gran apoyo.

Finalmente agradezco a mis compañeros de laboratorio Gabriela y Daniel que ofrecieron su apoyo en varios puntos de la investigación ya fuese corrigiendo algún procedimiento que realizaba o mostrándome cosas nuevas.

RESUMEN:

La enfermedad de Chagas (EC), o tripanosomiasis americana es causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). La EC es una enfermedad tropical desatendida endémica de América Latina y por efectos migratorios se encuentra a nivel mundial afectando a millones de personas. La EC presenta dos fases clínicas: aguda y crónica, las cuales se caracterizan por ser asintomáticas. La EC es la responsable de aproximadamente de 10,000 muertes anuales. Los tratamientos terapéuticos actuales, nifurtimox y benznidazol, son limitados y presentan efectos secundarios. Por lo que, la búsqueda de nuevos tratamientos menos tóxicos y más efectivos es importante. Estudios previos sugieren que la investigación de blancos terapéuticos que se encuentren únicamente en el parásito y no en el hospedero, por lo que el estudio de la enzima cruzipaína es de gran importancia. La enzima cruzipaína, es vital para el parásito, ya que le permite al *T. cruzi* realizar el proceso de infección a las células del mamífero. Pero lo más importante es que no se encuentra en humanos. Por lo que, en este trabajo se realizará la producción de la enzima recombinante cruzipaína. Para ello se realizará la transformación mediante shock térmico de bacterias competentes *E. coli* hasta la producción inducida con IPTG y su consecuente purificación mediante cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad. Los resultados obtenidos indicaron que se logró obtener la enzima recombinante de cruzipaína, lo cual se corroboró mediante estudios de electroforesis de proteína y de ADN. En conclusión, sería necesario realizar estudios posteriores que permitan evaluar la actividad de la enzima para realización de ensayos de distintos compuestos con potenciales actividades tripanocidas.

Palabras clave: cisteína proteasas, cruzipaína, enfermedad de Chagas, enzima recombinante, *Trypanosoma cruzi*

ABSTRACT:

Chagas Disease (CD), or American Trypanosomiasis, is caused by the *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) parasite. CD is a neglected tropical disease endemic to Latin America, and due to migratory effects, it is now present worldwide, affecting millions of people. CD has two clinical phases: acute and chronic, both of which are characterized by being asymptomatic. CD is responsible for approximately 10,000 deaths annually. The current therapeutic treatments, nifurtimox and benznidazole, are limited and have side effects. Therefore, the search for new, less toxic, and more effective treatments is essential. Previous studies suggest that research into therapeutic targets found only in the parasite and not in the host is promising. In this context, studying the cruzipain enzyme is of great importance. The cruzipain enzyme is vital for the parasite as it allows *T. cruzi* to infect mammalian cells. However, the most important aspect is that this enzyme is not found in humans. This work focuses on the production of recombinant cruzipain enzyme. To achieve this, the transformation of competent *E. coli* bacteria through heat shock will be performed, followed by IPTG-induced production and subsequent purification using high-speed protein liquid chromatography. The results showed that recombinant cruzipain enzyme was successfully obtained, which was confirmed through protein and DNA electrophoresis studies. In conclusion, further studies are necessary to evaluate the enzyme's activity for testing various compounds with potential trypanocidal activity.

Keywords: Chagas disease, cruzipain, cysteine proteases, recombinant enzyme, *Trypanosoma cruzi*

ÍNDICE

Índice de contenido

Contenido

DEDICATORIA.....	<i>I</i>
AGRADECIMIENTO	<i>II</i>
RESUMEN:	<i>III</i>
ÍNDICE.....	<i>IV</i>
Índice de contenido.....	<i>IV</i>
Índice de Tablas	<i>V</i>
Índice de Figuras.....	<i>V</i>
Índice de Anexos.....	<i>V</i>
INTRODUCCIÓN.....	- 1 -
Marco teórico	- 1 -
OBJETIVOS.....	- 4 -
OBJETIVO GENERAL.....	- 4 -
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	- 4 -
METODOLOGÍA.....	- 4 -
Equipos	- 4 -
Muestra	- 5 -
Procedimiento	- 5 -
Fase 1: Transformación de bacterias competentes.....	- 5 -
Fase 2: Comprobación presencia del plásmido	- 7 -
Fase 3: Producción de la enzima	- 9 -
Fase 4: Gel de Electroforesis para Proteínas SDS-PAGE.....	- 10 -
Fase 5: Purificación de la enzima.....	- 11 -
RESULTADOS	- 13 -

Transformación de Bacterias <i>E. coli</i>	- 13 -
Producción de la enzima recombinante	- 15 -
Purificación de la enzima recombinante por cromatografía preparativa	- 19 -
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	- 20 -
BIBLIOGRAFÍA	- 24 -
ANEXOS	- 28 -

Índice de Tablas

Tabla 1. <i>Preparación empleada para la digestión de enzimas de restricción.</i>	-8-
--	-----

Índice de Figuras

Figura 1. <i>Secuencia codificante de la enzima cruzipaína.</i>	-5-
Figura 2. <i>Secuencia plásmido pET28-cruzip.</i>	-6-
Figura 3. <i>Resultados Relevantes de Transformación en Cepas DH5α y C41.</i>	-13-
Figura 4. <i>Digestión de Enzimas de Restricción (BsaAI) en ADN plasmídico.</i>	-15-
Figura 4.1. <i>Acercamiento Digestión de Enzimas de Restricción (BsaAI) en ADN plasmídico.</i>	-16-
Figura 5. <i>Digestión de Enzimas de Restricción (XmnI y XhoI+EcoRV) en ADN plasmídico.</i>	-17-
Figura 6. <i>Gel de proteínas de pellets y sobrenadantes.</i>	-18-
Figura 7. <i>Gel de sobrenadantes y fracciones.</i>	-19-
Figura 8. <i>Ladder de proteínas.</i>	-28-
Figura 9. <i>Ladder de ADN.</i>	-28-

Índice de Anexos

Anexos.....	28
Ladders ADN y proteínas.....	28

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas (EC), causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), ha sido una de las principales preocupaciones debido a su impacto en las poblaciones de bajos recursos, principalmente en Centro y Suramérica. En las últimas décadas, la EC ha comenzado a ser reconocida como una enfermedad de interés mundial, debido a su expansión por procesos migratorios (Ndao et al., 2014; Scalise et al., 2016). La EC es endémica en América Latina, y aunque el número de casos ha disminuido en los últimos años, el parásito sigue afectando a millones de personas, con un estimado que supera los 7 millones de personas infectadas a nivel global, con un promedio de 10,000 muertes anuales, según la Organización Mundial de la Salud (2025). Sin embargo, los tratamientos disponibles, como nifurtimox y benznidazol, son ineficaces en la fase crónica de la enfermedad, presentando efectos secundarios tóxicos que limitan su uso (Ndao et al., 2014; Puente et al., 2018).

El principal desafío en el tratamiento de la enfermedad de Chagas reside en la falta de opciones terapéuticas eficaces, especialmente para las etapas crónicas, lo que hace urgente la búsqueda de nuevos enfoques farmacológicos. En este contexto, las cisteínas proteasas, en particular la cruzipaína, se han identificado como potenciales blancos terapéuticos. La cruzipaína, enzima clave en la patogénesis del parásito, facilita la invasión celular y la evasión del sistema inmune, adicionalmente es una enzima que no se encuentra presente en mamíferos, incluyendo al humano lo que la convierte en un objetivo estratégico para el desarrollo de tratamientos más específicos y menos tóxicos (Nery et al., 1997; Serveau et al., 1999).

Marco teórico

A lo largo de las últimas décadas, el enfoque en el tratamiento de la enfermedad de Chagas ha evolucionado. Los primeros estudios centrados en describir la biología y el ciclo de vida de *T. cruzi* han dado paso a investigaciones más orientadas a identificar y caracterizar proteínas clave, como las cisteínas proteasas, que son esenciales para la patogénesis del parásito. Un ejemplo reciente es el estudio de Aguilar (2022), que se centró en la producción recombinante de enzimas como la trans-sialidasa, una proteína crucial para la evasión del sistema inmune por parte del parásito. En el cual demostraron el potencial de las proteínas recombinantes en el desarrollo de tratamientos específicos,

dirigidos a inhibir las funciones esenciales del parásito, lo que representa un avance significativo en la lucha contra la EC.

Así, el uso de proteínas recombinantes, especialmente aquellas derivadas de *T. cruzi*, sigue siendo una estrategia clave para desarrollar nuevas terapias. La producción de cruzipaína recombinante no solo contribuye a una mejor comprensión de la biología del parásito, sino que también ofrece nuevas vías para la creación de terapias más efectivas y menos tóxicas, abriendo un horizonte esperanzador para el tratamiento de la enfermedad de Chagas en el futuro cercano.

Sin embargo, para comprender realmente la importancia de ello es necesario recalcar que el ciclo de vida de *T. cruzi* es complejo, pero a grandes rasgos se inicia cuando el parásito se transmite a través de la picadura del vector siendo los insectos de la familia Reduviidae, conocidos como chinches en Ecuador. Estos insectos, al alimentarse de sangre de mamíferos infectados, se convierten en vectores del parásito, inicialmente un mamífero infectado contará con tripomastigotes, la forma infectiva del parásito. El insecto al picar al mamífero infectado lleva consigo la forma tripomastigote de *T. cruzi* posteriormente se diferencia a la forma epimastigote en el tracto digestivo, y finalmente al picar a un mamífero no infectado el insecto deposita las deyecciones que llevan consigo la forma tripomastigote metacíclico, el cual infecta a las células macrófagas del mamífero y se diferencia a la forma intracelular amastigote para multiplicarse y diferenciarse a la forma extracelular tripomastigote, los cuales lisan la célula y se dirigen al torrente sanguíneo para continuar con la infección (Yoshida, 2006; Osorio et al., 2012; Uehara et al., 2012).

La cruzipaína, una cisteína proteasa que juega un papel fundamental en la invasión celular y la modulación de la respuesta inmune, ha sido ampliamente estudiada debido a precedentes como los realizados por el equipo de Cazzulo quienes determinaron la importancia en la virulencia de *T. cruzi* (Argüello et al., 2023).

Previamente lo que se realizaba para estudiar la cruzipaína era cultivar al propio parásito y luego extraer sus enzimas, sin embargo, actualmente se cuenta con la producción recombinante de proteínas, una herramienta crucial en la investigación biomédica, permitiendo la obtención de enzimas de interés terapéutico sin los riesgos asociados con el manejo directo de patógenos y fácil manejo experimental debido a que es regulado por agentes bacterianos. En particular, la producción de cruzipaína mediante técnicas de ingeniería genética, utilizando bacterias como *Escherichia coli*, ha

demostrado ser una vía prometedora para la obtención de grandes cantidades de esta enzima, facilitando su estudio y posibles aplicaciones terapéuticas, en este caso sería referente a la capacidad de emplear diferentes cepas y plásmidos para obtener la enzima deseada (Lara, 2011; Wingfield, 2015; Rosano et al., 2019).

Este enfoque de producción recombinante ha sido exitoso en otras áreas, como en la obtención de proteínas de parásitos que son utilizadas en el desarrollo de vacunas. En el caso de *T. cruzi*, la producción de proteínas recombinantes como la cruzipaína puede facilitar el diseño de inhibidores específicos que alteren la interacción entre el parásito y el hospedador, ofreciendo una estrategia innovadora para el tratamiento de la enfermedad (Gauci et al., 2013; Hoffman et al., 2015). La producción de cruzipaína recombinante también podría aportar una mejor comprensión de su estructura y función, siendo una diferencia de estudios previos que al manejar el parásito existen modificaciones del propio organismo que terminan afectando a la enzima, pero con bacterias es posible que ese no sea el caso.

Hasta el momento se ha mencionado algunas veces la palabra recombinante en referencia a la producción de la enzima de *T. cruzi*, a modo de no causar confusión, es justamente una forma de expresar que se está empleando una secuencia específica en un organismo, típicamente siendo una secuencia de organismos diferentes como en este caso que se toma la secuencia de la enzima del parásito protista *T. cruzi* para su expresión en la bacteria *E. coli*. Para lograr este objetivo se emplean plásmidos que puedan cargar consigo estas secuencias y ser regulados de alguna forma como en el caso de los plásmidos pET, Khananisho et al. (2023) menciona que son plásmidos altamente usados y primordialmente que son plásmidos capaces de una alta producción siendo inclusive posible que la proteína recombinante alcance el 50% de la producción total de proteínas del organismo al que se le ha colocado el plásmido

Los plásmidos pET más usados son pET28a junto al pET15b, plásmidos similares en función con diferencias tales como el antibiótico de selección, una característica importante al momento de usarlos tiene que ver con las cepas de bacteria, para este estudio se emplean las cepas DH5α y C41, proveedores como Thermo Fisher Scientific (s.f.) y New England Biolabs (s.f.) exponen que la primera es una cepa encargada de mantener la estabilidad del plásmido usada típicamente para clonación de los mismos mientras que la segunda es un derivado de una cepa BL21 que puede soportar un mayor estrés y toxicidad, por ende es usada para expresión de proteínas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Producir la enzima recombinante cruzipaína de *T. cruzi* en *E. coli*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Transformar cepas de *E. coli* para la expresión de cruzipaína
- 2) Establecer un método para la producción de la enzima recombinante de cruzipaína de *T. cruzi* empleando cepas de *E. coli*
- 3) Desarrollar un protocolo para la purificación de la cruzipaína recombinante mediante cromatografía preparativa

METODOLOGÍA

Equipos

Los equipos que se utilizaron para la realización experimental fueron (incluyendo modelo/marca/ciudad/país de ser posible):

- Equipo de sonicación (Sonificador Omniruptor 400 W; Omni International; Kennesaw; Estados Unidos)
- Cámara vertical de electroforesis (Mini-PROTEAN® Tetra System; BIO RAD; Hercules; Estados Unidos)
- Thermobloque (Thermo Scientific; Waltham; Estados Unidos)
- ÄKTA Pure (General Electric Healthcare, Chicago; Estados Unidos)
- Centrífugas (Thermo Scientific; Waltham; Estados Unidos)
- Incubadora con agitación 35R (Cientec; Santiago de Chile; Chile)
- Espectrofotómetro (Espectrocrom; Quito; Ecuador)
- Autoclave (Tuttnauer; Beit Shemesh; Israel)
- Incubadoras (Mettler; N/A; Alemania)
- Sistema de documentación de geles GDS Touch Gel (ENDURO™; Copenhagen; Dinamarca)
- EPOCH Espectrofotómetro para microplacas (BioTek Instruments, Inc, Winooski, Estados Unidos)

Muestra

En el presente estudio se empleó la bacteria *E. coli*, específicamente las cepas C41 y DH5 α para la expresión del plásmido pET28-cruzip, que fue diseñado y optimizado por GenScript Biotech Corporation.

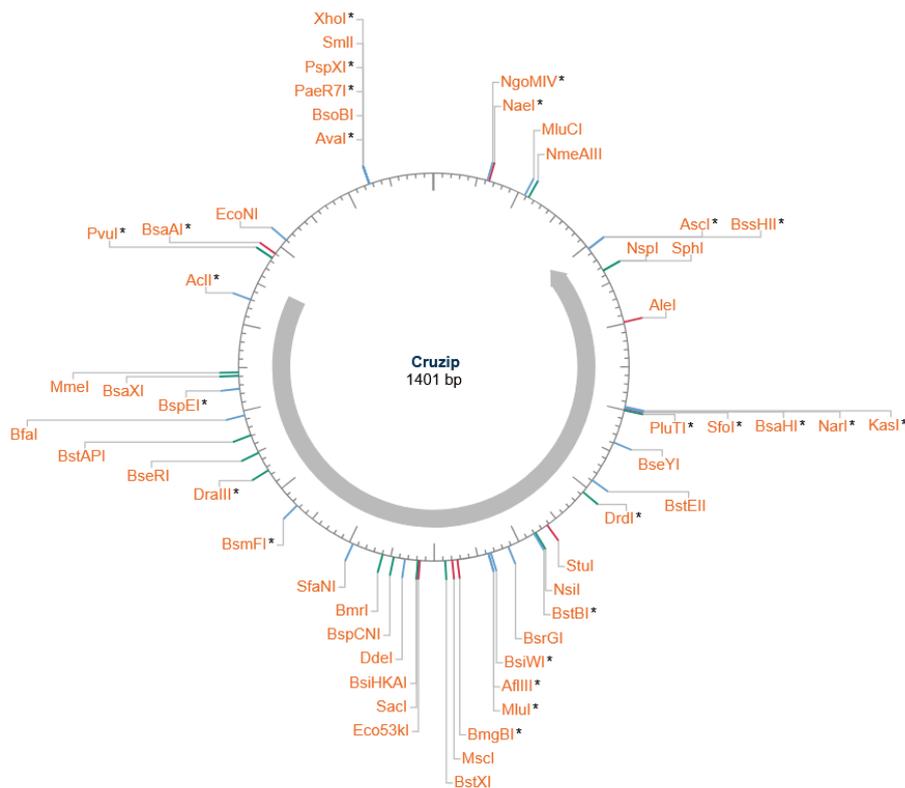
Procedimiento

Fase 1: Transformación de bacterias competentes

El plásmido pET28-cruzip fue optimizado por GenScript Biotech Corporation para su expresión en la bacteria *E. coli*. Este plásmido confiere resistencia al antibiótico kanamicina y emplea el operón Lac para regular la secuencia introducida de la cruzipaína.

Figura 1.

Secuencia codificante de la enzima cruzipaína.

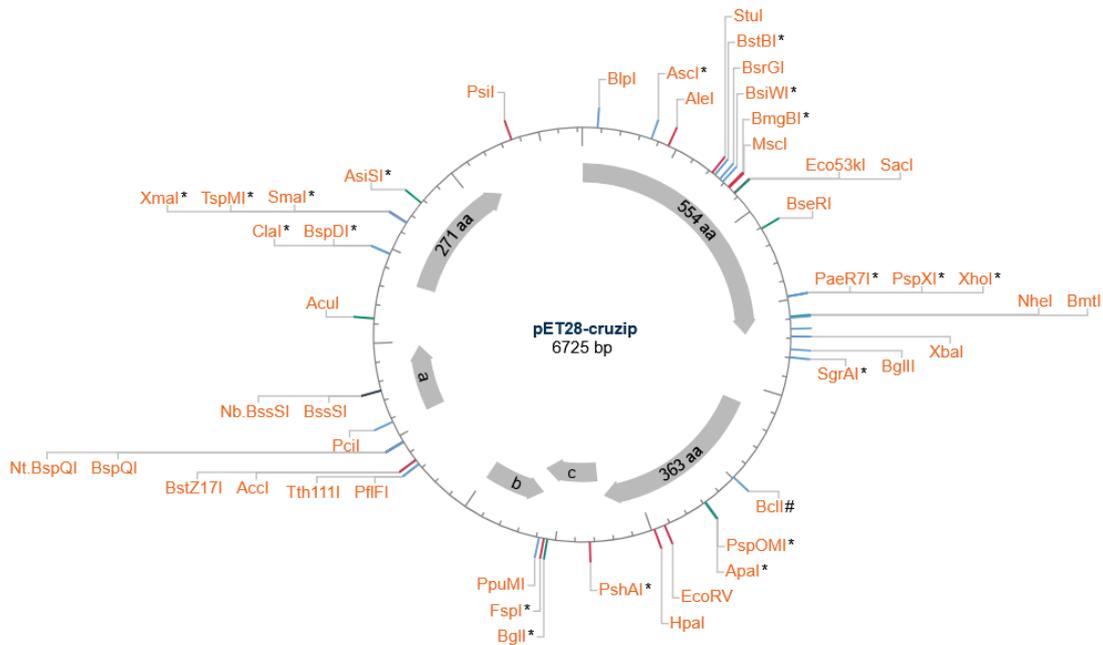


Secuencia de la secuencia de interés de la cruzipaína mediante NEBcutter 3.0, secuencia de 1401 pares de bases, la enzima de la cruzipaína de *T. cruzi* se conforma por 467 aminoácidos, ello se observa como una zona gris dentro de la secuencia del plásmido.

Fuente: Elaboración propia con uso de NEBcutter 3.0 (2025)

Figura 2.

Secuencia plásmido pET28-cruzip.



Secuencia del plásmido total observado mediante NEBcutter 3.0, secuencia de 6725 pares de bases, representa la secuencia de la enzima incorporada dentro del plásmido pET28a.

Fuente: Elaboración propia con uso de NEBcutter 3.0 (2025)

Para la transformación de bacterias se utilizó el protocolo descrito por Chang et al. (2017) que empleó shock térmico para introducir el plásmido en la bacteria y provocar la transformación. Se diferenciaron las colonias en base a su presencia, ya que, debido al uso del antibiótico las bacterias que no adquirieron el plásmido mueren. El protocolo de Chang et al. (2017) fue realizado de forma muy similar, sin embargo, hay algunos cambios que tienen importancia y se detallarán brevemente a continuación:

Se resuspendió el plásmido en 100µl de agua ultrapura libre de nucleasas, esto debido a que los plásmidos de GenScript cuentan con aproximadamente 4µg de ADN plasmídico en forma liofilizada, obteniendo una concentración final de 40µg/ml. Se añadió 4µl de este plásmido resuspendido a un volumen total de 50µl de bacterias competentes (tubos tanto para la cepa C41 para procesos posteriores y DH5α para los stocks de glicerol y extracción iniciales) por tubo eppendorf de 1.5ml, los tubos fueron introducidos en hielo por 30 minutos, finalizado el tiempo se colocó en el termobloque a una temperatura de 42°C por 30 segundos. Con la finalidad de romper las membranas y

permitir la integración del plásmido, finalizado los 30 segundos se retornó al hielo por 2 minutos, posteriormente se añadió 1ml de medio Lb líquido tibio por 1 hora en agitación a 37°C con 200 rpm.

Finalizado este proceso se centrifugaron los tubos con la muestra por 2 minutos a 14000g y se descartó el sobrenadante por inversión, el pellet resultante se resuspendió por pipeteo con el medio LB restante y se sembró en las placas el volumen total. Las placas sembradas fueron depositadas en las Incubadoras Memmert a una temperatura de 37°C por aproximadamente 15 horas.

Fase 2: Comprobación presencia del plásmido

Para comprobar la presencia del plásmido se realizaron cultivos de 5ml en medio líquido LB con Kanamicina, empleando tubos de ensayo de tapa rosca de 10ml, para ello con ayuda de una pipeta de 10µL se picaron colonias aisladas de las placas generadas en la fase previa. Este proceso únicamente se realizó a la cepa DH5α por su mayor estabilidad de la secuencia.

Las puntas de la pipeta se depositaron dentro de los 4 tubos que contenían medio LB con kanamicina, los 4 tubos se distribuyeron de tal manera que se cuenten con stocks de glicerol y extracciones. Los tubos se depositaron en la Incubadora con agitación 35R Cientec con 30°C a 60 rpm por 15 horas.

Terminado el proceso anterior, se siguen las instrucciones del kit de extracción “PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit”, específicamente el procedimiento de centrifugación. En donde se centrifuga entre 1 a 5 ml del medio LB, finalizando los pasos del kit se almacenó a -20°C los tubos con el plásmido recuperado, a su vez otros fueron empleados en digestión de enzimas de restricción.

Empleando tubos eppendorf de 0.5ml estériles se realizó la digestión enzimática en base a lo que exponen Checa y Santillan (2017) en su protocolo de digestión, los cambios realizados se hicieron tomando en cuenta las sugerencias de proveedores como Thermo Fisher con respecto a los buffers y enzimas correspondientes dentro de su catálogo web. Adicionalmente se planificó con ayuda del software de NEBcutter 3.0 a continuación se expone la preparación empleada y los cortes esperados:

Tabla 1. *Preparación empleada para la digestión de enzimas de restricción.*

Reactivos	Cantidad	Enzimas	Fragmentos
Agua ultrapura	8 µL	BsaAI	2984pb, 2151pb y 1590pb
Buffers: Green/ Red/ Tango	2 µL	XhoI + EcoRv	5280pb y 1445pb
ADN plasmídico	8 µL	XmnI	4692pb y 2033pb
Enzimas: BsaAI/ XhoI + EcoRV/ XmnI	2 µL	-	-
Total	20 µL	-	-

En esta tabla se muestra el Buffer Green para la enzima BsaAI, el Buffer Red para la digestión doble de XhoI y EcoRV y Buffer Tango para la enzima XmnI, en la tabla se muestran los fragmentos esperados, las diferentes enzimas empleadas.

Fuente: Modificado de Checa y Santillan (2017).

Para las extracciones de ADN plasmídico se duplicó el volumen total para llegar a 40µL, posteriormente los tubos fueron depositados en la incubadora Memmert a 30°C en el caso de la BsaAI y a 37°C para las otras enzimas, se colocó en incubación por 3 horas, finalizado el tiempo se preparó un gel de agarosa al 1%, el Ladder fue 1 Kb Plus DNA Ladder de Invitrogen, se cargó cada muestra usando el buffer de carga (BlueJuice Gel Loading Buffer) y se aplicó un voltaje de 110 V por 50 minutos y se observaron los resultados empleando el documentador de geles ENDURO™ GDS Touch Gel.

Fase 3: Producción de la enzima

Inducción con IPTG y espectrometría: Crecimiento y Producción de la Enzima

Para evaluar la producción de la cruzipaína se inocularon bacterias de la cepa C41 sin transformar, transformadas e inducidas con isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración de 1 mM. La presencia del IPTG favorece la transcripción de la secuencia de interés. Como control biológico se utilizaron cepas tanto sin transformar como transformadas, pero sin inducir.

Para facilitar el proceso se realizaron unos cambios al protocolo base de Koschorreck et al. (2008), se empleó un periodo de crecimiento previo, dejando a las bacterias en la incubadora con agitación 35R (Cientec) a 30°C con 100 rpm toda la noche (overnight). Posteriormente en matraces se agregó 60 ml de medio LB con kanamicina y aproximadamente 1600 μ l de los cultivos previos. Se deja en agitación a 37°C con 180 rpm aproximadamente por 4 horas en base a lo realizado por Cazorla et al. (2008) hasta obtener un OD (densidad óptica) de 0.4 a 0.6, estas mediciones se obtuvieron con el espectrofotómetro (Espectrocrom) a 600nm.

Se han tomado algunas de las consideraciones de la guía de usuario de Thermo Fisher Scientific (s.f.) con respecto a la cepa BL21 además del protocolo de Ferrão et al. (2015) en donde se mide a 600nm la OD, el rango de 0.4 a 0.6 es una medida estandarizada que permite una mejor estimación del crecimiento bacteriano, previo a la inducción se espera llegar a esos valores, la OD en este caso funciona como indicador del crecimiento y actividad óptima de las bacterias. Valores por debajo de 0.4 son el punto inicial, no es suficiente y las bacterias no han recuperado su actividad, por lo tanto, un rango ideal teóricamente puede ser de 0.4 a 0.8, donde el valor óptimo puede ser entre 0.5 y 0.6 ya que asegura que mientras se realiza la espectrofotometría las bacterias que siguen creciendo no lleguen a valores cercanos a 1 ya que no reflejan la misma proporcionalidad entre turbidez y crecimiento bacteriano viable (Widdel, 2007).

Sonicación: Extracción de la enzima

Para la extracción de la enzima se utilizó el protocolo descrito por Cazorla et al. (2008) y Ferrão et al. (2015). En dónde alcanzado el rango de la OD, se vertió el contenido de los matraces en tubos falcon de 50ml, estos tubos contienen las condiciones mencionadas previamente (sin transformar, transformadas e inducidas con IPTG), a estos

tubos se los centrifugó a 3220 rpm por 30 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante por inversión y se resuspendió con el buffer de lisis (20mM Tris-HCl pH 7.5, 100mM KCl, 5mM Ethylenediaminetetraacetic acid-EDTA), el pellet se resuspendió en un rango de 4 a 7 ml con buffer de lisis, se vertió el contenido en tubos falcon de 15ml cónicos.

Para la sonicación cada tubo falcon se depositó en hielo para conservarlo y evitar el calor generado por el equipo de sonicación (Sonificador Omniruptor 400 W), a cada tubo se le aplicó aproximadamente 4 minutos, con 50 pulser e intensidad intermedia. Finalizado este proceso se centrifugaron los tubos a 12000g por 15 minutos a 4°C, se conservó tanto el sobrenadante como el pellet resultante para la identificación de la presencia de la enzima. Con el pellet recuperado se continuó el protocolo de Ferrão et al. (2015), añadiendo buffer de desnaturalización (20mM Tris-HCl pH 7.5, 10mM imidazol, 300mM NaCl, 4M urea), con este buffer se resuspendió el pellet y se almacenó a 4°C.

Fase 4: Gel de Electroforesis para Proteínas SDS-PAGE

Cuantificación de proteínas

La cuantificación se realizó según la metodología de Bradford (1976). Para la determinación de la presencia de la enzima recombinante cruzipaína se realizaron ensayos de Bradford y electroquímica al sobrenadante y al pellet. Para ello, se cuantificó la cantidad de proteína con el espectrofotómetro EPOCH, con el fin de agregar proporciones iguales para la separación en los geles de proteína.

La preparación del gel SDS-PAGE se realizó de acuerdo con lo sugerido por el fabricante (Bio-Rad Laboratories, Inc).

En la cubeta del gel se empleó el buffer Laemmli 1x. Al gel de poliacrilamida se le colocó 3 µl de Ladder para proteínas (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa Invitrogen) y 20 µl de muestra mezclada con buffer de carga. Posteriormente se añadió el Buffer de carga (con azul de bromofenol) y se colocó los tubos en baño maría por 2 minutos previo a su carga en los pocillos. Las condiciones para la electroforesis fueron un voltaje de 120 V a 1 hora 20 minutos. Se emplearon soluciones basadas en acetato de sodio para la tinción y el decolorante del gel, dejando tiempos de agitación de 60 rpm a 30 minutos con 36°C para el colorante mientras que para el decolorante se lo deja overnight a temperatura ambiente. Finalmente, el resultado se observa mediante un panel de luz blanca. El resultado esperado en este caso es una banda de 49kDa, este peso se obtuvo mediante el uso del portal de bioinformática Expsy

(<https://www.expasy.org/resources/protparam>), con ayuda de esa página se obtuvo el peso molecular que fue 49835.98 y el punto isoeléctrico que fue 5.70.

La página de Expasy también fue empleada para traducir la secuencia de ADN y confirmar que su traducción coincide con la proteína esperada. Adicionalmente debido a la fase previa y en específico el uso de sonicación para liberar las proteínas, una parte que difiere de los protocolos base, se realizaron geles que incluían muestras luego de la sonicación y posterior a lavados, para identificar en qué parte del proceso se encontraba la mayor cantidad de proteínas y optimizar el protocolo.

Fase 5: Purificación de la enzima

Cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad

Se empleó el equipo ÄKTA Pure (General Electric) y una columna de níquel de cromatografía Histrap (General Electric). En primer lugar, se realizó un lavado del equipo con agua desionizada estéril y etanol al 20%. Posteriormente, se adaptó al equipo con el buffer (20mM Tris-HCl pH 7.5, 5mM imidazol, 300mM NaCl, 4M urea), el programa del equipo se configuró de tal manera que la concentración de imidazol vaya disminuyendo conforme avanza el tiempo de separación, siguiendo el gradiente propuesto por Ferrão et al. (2015), la concentración de imidazol se aumentó de la siguiente manera: buffer “A” a 5mM y para buffer “B” la concentración fue de 500mM, los buffers, agua y etanol se desgasifican por 10 minutos previo a su uso en el equipo.

El equipo ÄKTA Pure (General Electric) se maneja con el programa Unicorn 7.3 (Cytiva, UNICORN™ 7 control software) el programa permite controlar el flujo de líquido en los capilares del equipo, una vez estabilizado el equipo se cargaron las muestras de forma manual con ayuda de una jeringa de 3ml, en el caso de los sobrenadantes se colocaron 2.5ml, mientras que para los pellets se colocaron 2ml, en cada caso se cargaron por duplicado siendo el volumen final 5ml y 4ml respectivamente. Se visualizaron las curvas generadas en el programa Unicorn, en donde la presencia de una señal en el rango UV indicaba la presencia de la proteína. En función a su tiempo de retención, se recolectó el contenido de las fracciones y se almacenaron hasta su posterior análisis. La recolección de las fracciones se realizó desde el tiempo 0 en periodos de aproximadamente 5 minutos con un volumen de recolección de 5 ml por cada fracción.

Comprobación mediante Gel SDS PAGE

Nuevamente se cuantificaron las proteínas mediante reactivo de Bradford, se realizó tanto en sobrenadantes, pellets y fracciones obtenidas para su comparación y uso posterior a modo de identificar la presencia de la enzima.

Se preparó otro gel de proteínas para analizar las fracciones recolectadas del equipo. Basado en lo sugerido por el fabricante Bio-Rad Laboratories, Inc, se empleó el Ladder de 180kDa (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa Invitrogen), cada fracción se cargó junto al pocillo de su muestra de origen (sobrenadantes y pellets previos a su carga en el equipo ÄKTA Pure). La presencia de la enzima se determinó por la presencia de bandas con peso aproximado de 50-60KDa ya que es el rango que coincide con el peso molecular de la cruzipaína y toma en cuenta tamaños posiblemente superiores a lo esperado como sugiere Schnapp et al. (2002).

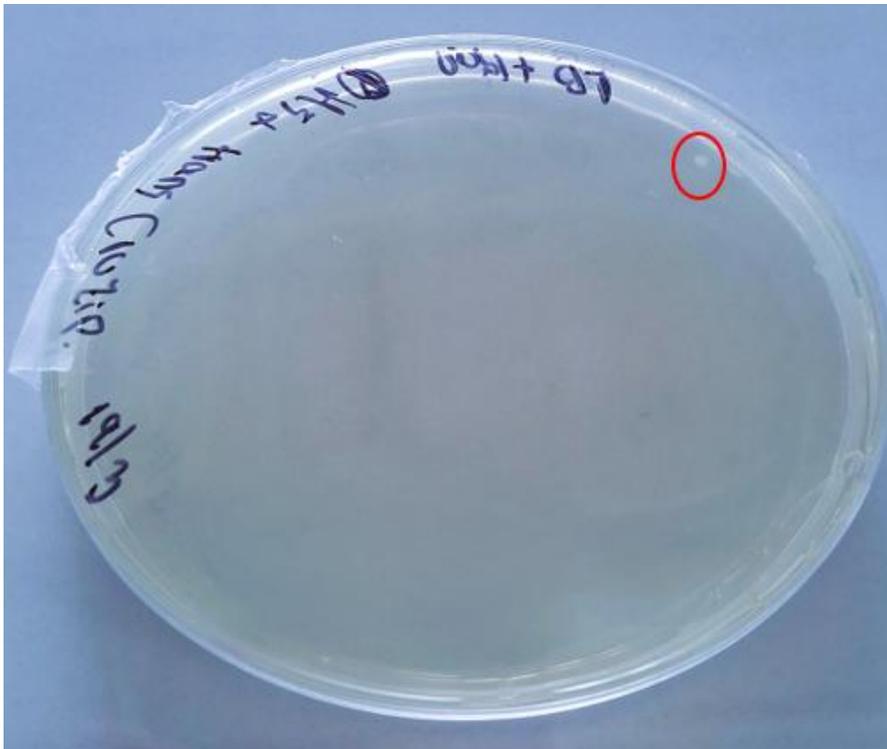
RESULTADOS

Transformación de Bacterias *E. coli*.

Figura 3.

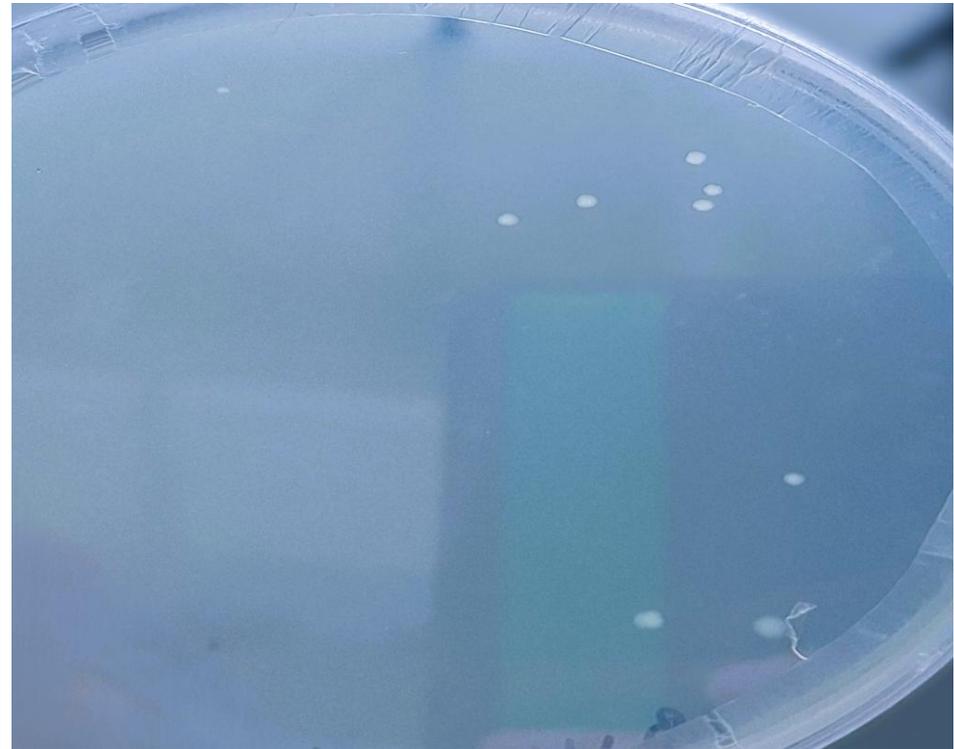
Resultados Relevantes de Transformación en Cepas DH5 α y C41.

A)



DH5 α

B)

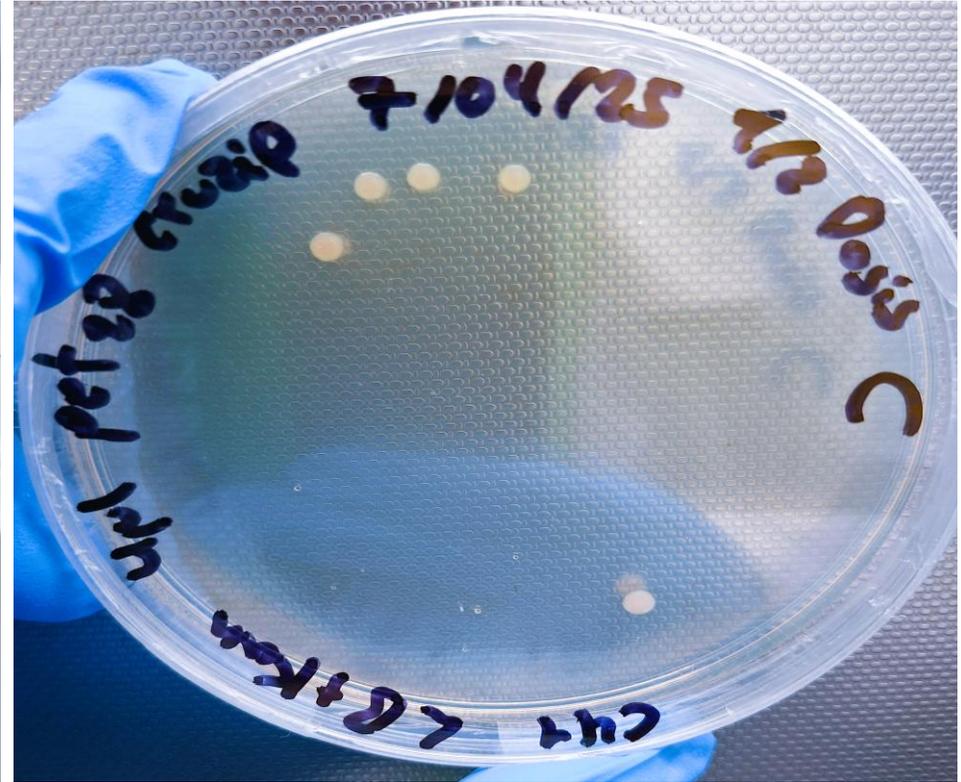


C)



C41

D)



Los resultados de las transformaciones de las cepas, se observa la **Figura 3A** que corresponde a una placa cuyo volumen total depositado fue de 50µl del medio LB de bacteria transformada; la **Figura 3B** representa una de las placas con el volumen total, tanto la Figura 3A como 3B son de la cepa DH5α; la **Figura 3C** corresponde a una placa con el volumen total de sembrado; la **Figura 3D** corresponde a una placa a la que el volumen total de medio LB depositado fue de 50µl., tanto la Figura 3C como 3D son de la cepa C41.

Fuente: Elaboración propia (2025)

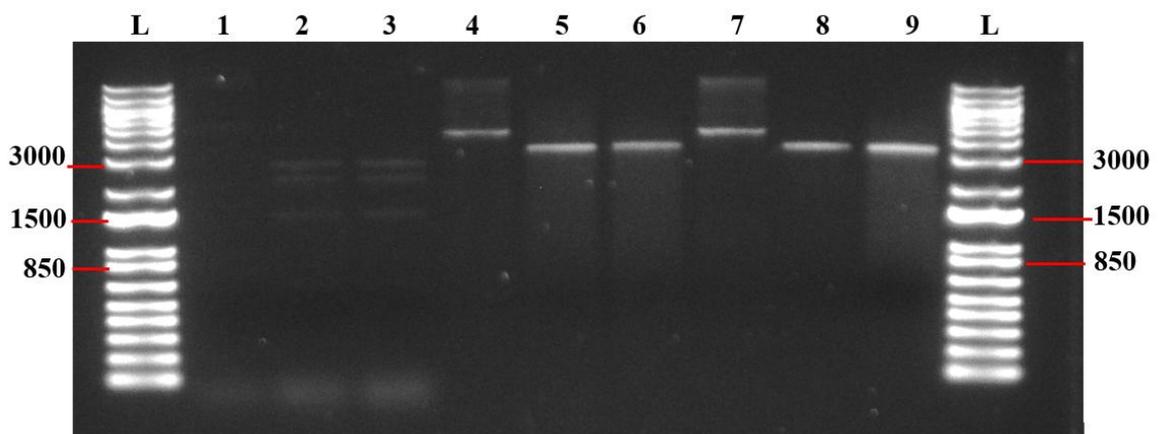
Estas figuras demuestran una diferencia en la transformación de las bacterias, lo cual se evidencio en los tamaños de las colonias generadas por las cepas. En donde la cepa C41 presentaba tamaños más grandes, así como un mayor número de colonias, esto se evidenciaba cuando se depositaba un menor volumen, lo cual puede observarse en la **Figura 3A y 3D** siendo las placas que contienen 50µl de medio sembrado.

Producción de la enzima recombinante

Para asegurar la presencia e integridad del plásmido en las colonias transformadas de la cepa DH5α se realizaron cortes con enzimas de restricción y se observó el resultado con electroforesis, a continuación, se encuentran las digestiones realizadas:

Figura 4.

Digestión de Enzimas de Restricción (BsaAI) en ADN plasmídico.



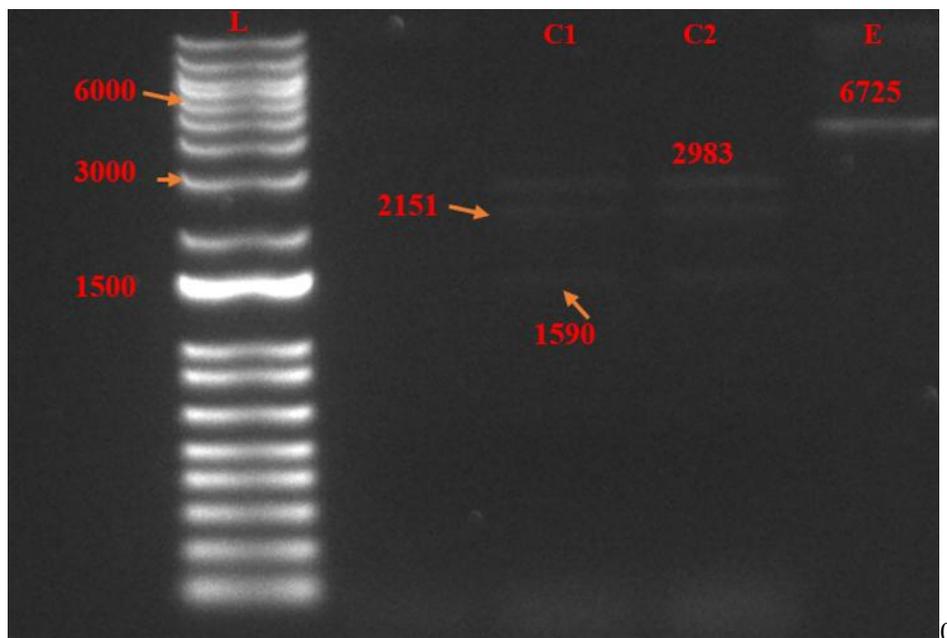
Gel de Electroforesis donde **L**: Ladder de ADN, indicado con pares de bases en los bordes, **Pocillo 1**: Plásmido original completo, **Pocillos 2-3**: Plásmido original digerido por BsaAI, **Pocillos 4 y 7**: Plásmido extraído de bacterias DH5α transformadas y **Pocillos 5-6 y 8-9**: Plásmido extraído digerido por BsaAI.

Fuente: Elaboración propia (2025)

Se observó en la **Figura 4** que los pocillos con las extracciones coinciden con lo esperado dentro del tamaño final del plásmido siendo aproximadamente 6000pb, en el caso de las digestiones y tomando en cuenta los cortes de la BsaAI se observa que están presentes los 3 fragmentos esperados en los pocillos 2 y 3 que son del plásmido original, mientras que en los pocillos de las extracciones solo contienen la primera banda, aquella banda cercana a los 3000pb.

Figura 4.1.

Acercamiento Digestión de Enzimas de Restricción (BsaAI) en ADN plasmídico.



Gel de Electroforesis donde **L**: Ladder de ADN, **E**: Plásmido extraído completo, **C1** y **C2**: Plásmido Recortado por enzima BsaAI.

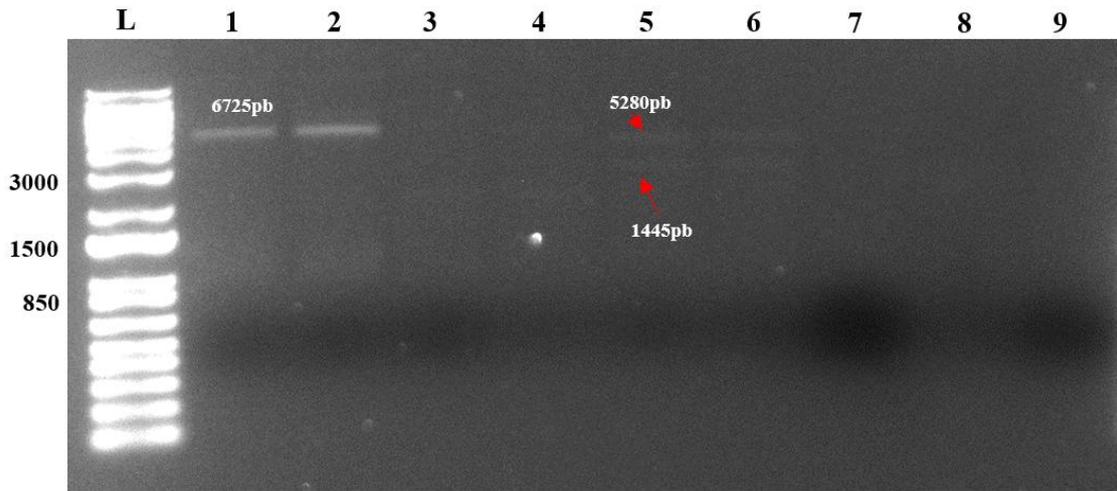
Fuente: Elaboración propia (2025)

La **Figura 4.1** es un acercamiento debido a que las bandas fueron opacas en el caso del plásmido original, el gel muestra los cortes realizados con la enzima BsaAI, los cortes obtenidos son muy similares a lo esperado mediante el uso de NEBcutter 3.0, es decir, el plásmido muestra las bandas esperadas.

Con el fin de mejorar la separación de las bandas se realizó un nuevo corte enzimático utilizando las enzimas XhoI + EcoRV y XmnI.

Figura 5.

Digestión de Enzimas de Restricción (XmnI y XhoI+EcoRV) en ADN plasmídico.



Gel de Electroforesis donde **L**: Ladder de ADN con los pares de bases indicados en el borde, **Pocillos 1-2**: Plásmido extraído completo, **Pocillos 3-4**: Plásmido Cortado por enzima XmnI, **Pocillos 5-6**: Plásmido Cortado por enzimas XhoI y EcoRV, **Pocillo 7**: Extracción de DH5 α sin transformar, **Pocillo 8**: Extracción de DH5 α sin transformar con enzima XmnI, **Pocillo 9**: Extracción de DH5 α sin transformar con enzimas XhoI y EcoRV.

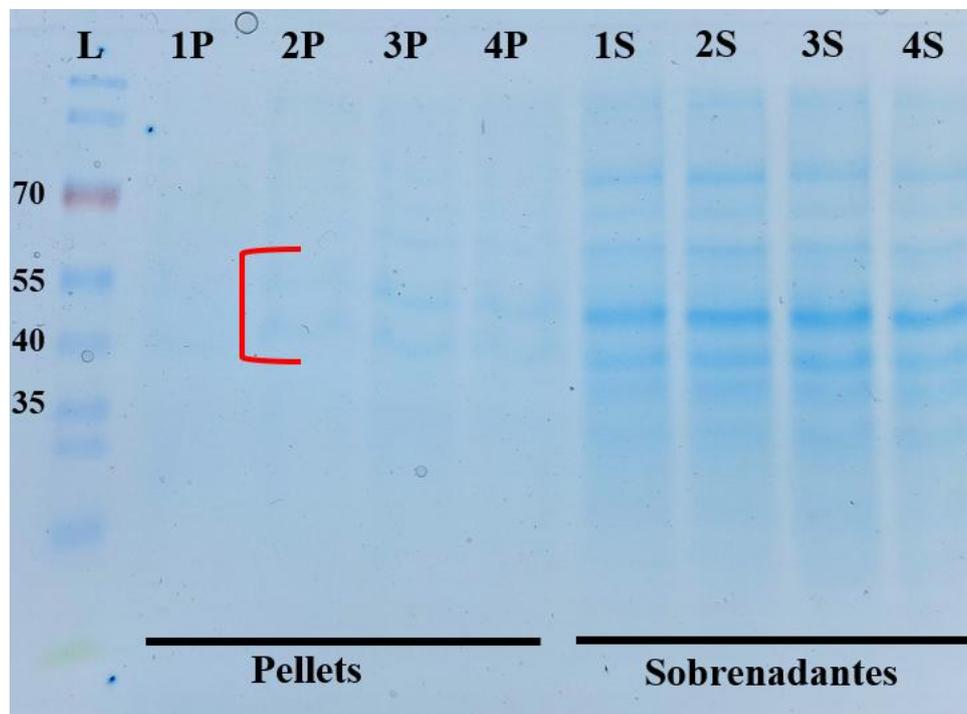
Fuente: Elaboración propia (2025)

La **Figura 5** demuestra la presencia del plásmido con la digestión doble de las enzimas XhoI y EcoRV, las bandas son muy tenues y es posible que también estén presentes los cortes en los pocillos de la enzima XmnI, lo cual no confirma la presencia en dichos pocillos. Asimismo, a pesar de que las bandas son opacas, estas se encuentran presentes en las colonias transformadas y no en las bacterias sin transformar, notándose en los pocillos 7 a 9, la mancha oscura en el gel es el buffer de carga (BlueJuice Gel Loading Buffer).

Para asegurar la presencia de la enzima se realizó electroforesis en gel SDS PAGE, siendo el gel a continuación el primer paso de la fase en donde se pretende observar si la enzima se encuentra en los sobrenadantes o pellets, siendo el resultado el siguiente:

Figura 6.

Gel de proteínas de pellets y sobrenadantes.



Gel de proteínas en donde los pocillos representan lo siguiente: **1)** C41 sin transformar, **2)** C41 inducido con 1mM de IPTG; **3)** C41 transformado con plásmido pET28-cruzip; **4)** C41 transformado con plásmido pET28-cruzip inducido con 1mM de IPTG. Las iniciales P y S son únicamente para indicar su pertenencia al grupo de pellets o sobrenadantes

Fuente: Elaboración propia (2025)

La **Figura 6** muestra una cantidad alta de proteínas en los sobrenadantes, lo cual es esperado ya que potencialmente se liberan más proteínas propias de la bacteria y no solamente la enzima de interés al momento de la sonicación, se observan bandas en el rango esperado marcado con rojo, es decir, se pueden visualizar bandas que coinciden con el peso molecular esperado de la cruzipaína de 49kDa, el limitante es la presencia de bandas en los controles de C41 y C41 inducido sin transformar que indican que la bacteria tiene sus propias proteínas que coinciden en peso molecular. Por ello fue necesario realizar un proceso de purificación de las muestras mediante cromatografía preparativa.

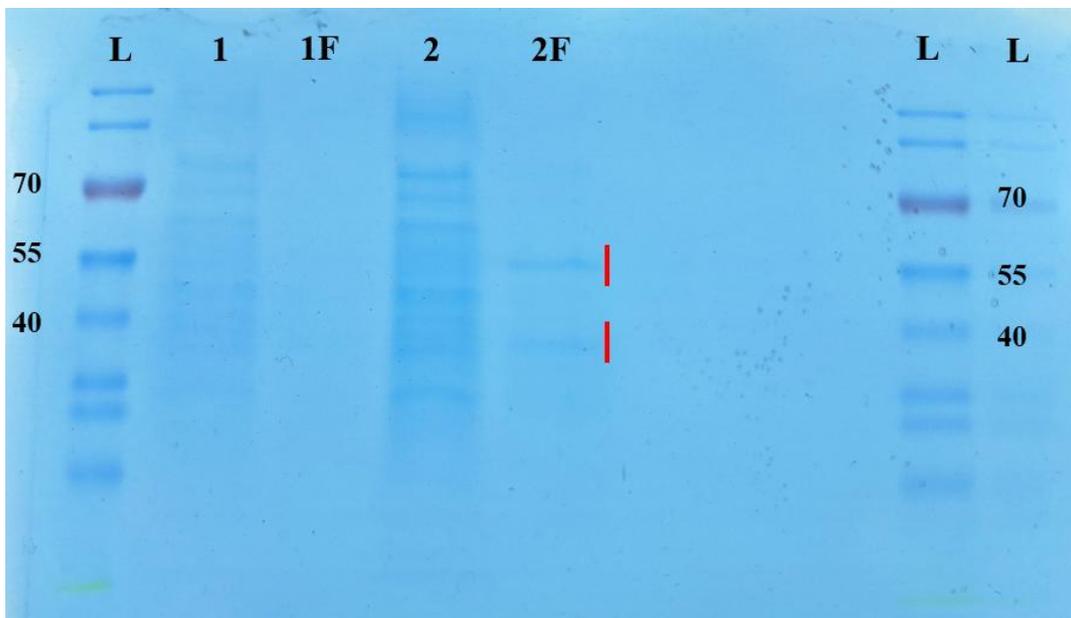
Purificación de la enzima recombinante por cromatografía preparativa

En base al resultado previo de la **Figura 6** se observó que el pellet podría contener parte de la enzima, sin embargo, la producción es baja. En base a estudios previos como el de Silva et al. (2014) establecen que el método de sonicación puede liberar las proteínas y evitar la formación de cuerpos de inclusión esperados en los artículos de Cazorla et al. (2008) y Ferrão et al. (2015) y por ende no sea necesario el buffer de resuspensión sino únicamente el buffer de lisis y el procedimiento de sonicación.

Al emplear el equipo ÄKTA Pure (General Electric) se intentó nuevamente un gel de proteínas para los pellets y sus fracciones, pero no se observó nada. A partir de esto se realizó un gel a las fracciones de los sobrenadantes y se observó lo siguiente:

Figura 7.

Gel de sobrenadantes y fracciones.



Gel de proteínas en donde los pocillos representan lo siguiente: **1)** C41 no transformado; **1F)** Fracción de C41 no transformado; **2)** C41 transformado con pET28-cruzip y **2F)** Fracción de C41 transformado con pET28-cruzip. Notar que ambos casos corresponden a bacterias inducidas donde C41 no transformado funciona como control.

Fuente: Elaboración propia (2025)

Como se observa en la **Figura 7**, la fracción de C41 del sobrenadante no tiene ninguna banda, eso tiene sentido puesto que las proteínas no deberían pegarse a la columna ya que esa bacteria no cuenta con un plásmido alguno, por otro lado con la

fracción de C41 transformada se muestran dos bandas ligeras, la primera se encuentra en el rango esperado considerando que tiene un tamaño de 49kDa, indicando posiblemente que sí corresponde a la enzima deseada, sin embargo, debajo de ella hay otra banda muy ligera que se encuentra por debajo de los 40kDa, lo cual podría ser un arrastre de la banda u otra proteína que también se pegó a la columna.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican que la transformación de las bacterias competentes DH5 α y C41 fue correcto, en ese sentido se determinó que la cepa DH5 α tenía una tendencia a generar colonias de menor tamaño a comparación de la cepa C41. Lo cual puede deberse a son cepas utilizadas mayoritariamente para la clonación y conservación de plásmidos como dejan claro los proveedores como New England Biolabs (s.f.) y Thermo Fisher Scientific (s.f.), adicionalmente artículos como el presentado por Dumon-Seignovert et al. (2004) sobre expresión y toxicidad en células expone que se pueden dar dificultades si el plásmido llega a ser “tóxico”, en su artículo esto se define mediante la ausencia de colonias en placas con agar luego de la transformación.

Con respecto a la cepa C41 se aplicó el mismo protocolo que a las DH5 α , sin embargo, el crecimiento fue mayor con menor tiempo de incubación, la cepa C41 es una cepa optimizada para la expresión de proteínas recombinantes lo cual evidencia lo visualizado en la **Figura 3C y 3D**. Adicionalmente esta cepa es conocida nuevamente por proveedores como New England Biolabs (s.f.) y Thermo Fisher Scientific (s.f.) por soportar mayor estrés en la expresión de proteínas y en la inducción, en general es más tolerante frente a las presiones aplicadas a comparación de la cepa DH5 α , en futuros ensayos se podría reducir la cantidad de plásmido aplicado sin que afecte negativamente la transformación de la cepa.

En el caso de este estudio no se realizó un análisis o estimado de la toxicidad del plásmido, pero se puede asumir según lo visto como pocas colonias además de un crecimiento lento que el plásmido era de algún modo tóxico, algo que pudo contribuir a ello quizás sea la actividad descrita de la cruzipaína en estudios como el de Nery et al. (1997) en donde se expone que la cruzipaína es capaz de hidrolizar enlaces peptídicos y eso de algún modo podría influenciar en detrimento de la bacteria al interferir con las propias proteínas de esta. Se asume que tiene que ver con la actividad de la enzima expresada debido a que artículos sobre optimización como Hannig et al. (1998) y Kaur et

al. (2018) presentan soluciones que ya se han tomado en este caso, como optimizar los codones del plásmido para que sea fácil la expresión en la bacteria además de usar el método de inducción apropiado y contar con una forma simple de purificación como es el añadir la cola de histidina para su captación en la columna de níquel.

Por lo que es recomendable cambios como pre-incubación de las placas, aumentar el volumen final de medio LB sembrado ya que se ha visto que ayuda a incrementar el tamaño de las colonias y quizás pueda deberse a algún efecto de temperatura y recuperación de las colonias, una recomendación adicional que se podría realizar es emplear la cepa C43 como queda sugerido por Dumon-Seignovert et al. (2004) ya que, si bien tanto la C43 como C41 son cepas que toleran la toxicidad y se usan para sobreexpresión de proteínas, sería bueno analizar el procedimiento con la cepa C43 a modo de mejorar y optimizar protocolos.

Adicionalmente, es importante emplear bacterias recién sembradas en las placas de agar para los procedimientos posteriores, esto debido a que si bien la kanamicina es un antibiótico duradero como lo menciona Khananisho et al. (2023), es posible que con el paso del tiempo las bacterias no transformadas aumenten en la placa o las bacterias transformadas con el plásmido lo pierdan eventualmente. Esto puede resultar en un problema, ya que por ejemplo en algunos de los ensayos se emplearon bacterias de una semana previa y se notó que hay un crecimiento menor en base a las mediciones de OD a comparación con ensayos que emplearon bacterias sembradas hace poco. La estabilidad del plásmido como menciona Dumon-Seignovert et al. (2004) depende bastante de la secuencia que contiene y la toxicidad siendo que para la bacteria puede llegar un punto en el que no le conviene conservarlo, para solventar ese problema se han realizado ajustes en especial en los medios líquidos como duplicar la dosis de kanamicina, esto ha presentado una mejor extracción de plásmidos, aunque como se pudo ver en la **Figura 4 y 5**, es muy poco.

Como recomendaciones para mejorar la transformación en base a lo realizado se puede: precalentar placas, recolectar mayor cantidad de pellet centrifugando por más tiempo a las bacterias transformadas y sembrar un mayor volumen de medio Lb, si bien lo que expone Chang et al. (2017) con su protocolo de transformación se centra en los tiempos del shock térmico y de adherencia del plásmido hay que considerar que la enzima podría estar causando un estrés y estos cambios que si bien son opcionales, presentan una mejora en el tamaño y número de colonias.

Mencionando los procesos de purificación, en este estudio se hizo uso del método de sonicación para liberar proteínas de las células, Silva et al. (2014) explica que si bien la sonicación suele ser común para dicho propósito tiene sus desventajas como un posible deterioro de las proteínas por el calor generado, para contrarrestar esto se implementó contenedores de hielo en los que reposar cada muestra y evitar el calor excesivo que pudiese generar el equipo, teniendo ello en cuenta es posible que si bien el proceso como tal es muy útil en liberar proteínas quizás la baja cantidad se deba a que se han deteriorado inclusive teniendo en cuenta la precaución tomada.

La razón por la que se realizó la sonicación es por su alta capacidad de liberar proteínas y porque posiblemente podría liberar a la enzima de los cuerpos de inclusión, facilitando el proceso, sin embargo, teniendo en cuenta la limitación de que quizás se podría degradar parte de la enzima deseada quizás se puedan intentar otros métodos. Comparando con los protocolos de Cazorla et al. (2008) y Ferrão et al. (2015) es difícil conocer si realmente la baja cantidad de proteína recolectada depende de la cantidad inicial sonicada o si por su parte dependía de la toxicidad del plásmido, pero se observó que para recolectar la proteína solamente fue necesario el buffer de lisis y no buffers de lavado ya que al momento de realizar procesos adicionales se perdía totalmente la enzima.

En el caso de los geles Schnapp et al. (2002) da a entender que no necesariamente se observan las bandas esperadas debido a que la migración que suele tener la cruzipaína no siempre coincide con la masa molecular esperada de su secuencia de aminoácidos, es por ello que se asume y se considera que realmente se obtuvo la enzima en los geles visualizados en la **Figura 6 y 7**, adicionalmente la presencia de la cola de histidina y la cromatografía preparativa aseguran de mejor manera que si se encuentra la enzima, es por ello mismo que en la Figura 7 cuando se observa 2 bandas aquellas más cercana a los 49KDa correspondería a la cruzipaína mientras que la segunda banda podría ser un arrastre debido a que no se realizó un procedimiento para ajustar el plegamiento de la proteína posterior a la sonicación por lo que podría ser o una proteína que debido a su plegamiento migró de una forma no esperada o por su parte era una proteína que se degradó como se consideraba por Silva et al. (2014) pero todavía contaba con la cola de histidina.

En conclusión y para responder a los objetivos de este estudio, se obtuvo la enzima recombinante de cruzipaína ya que se obtuvieron bandas correspondientes a los análisis de Expasy y NEBcutter 3.0. Además, se obtuvieron bacterias transformadas, lo cual se

confirmó con placas de kanamicina con colonias, esto se pudo ver de forma consistente luego de los primeros ensayos, cumpliendo en su totalidad el primer objetivo específico. Asimismo, la utilización del equipo purificador de proteínas permitió separar a la cruzipaina del restante de proteínas presentes en la bacteria, lo cual determina que este método es eficiente para la obtención de enzimas recombinantes, con ello cumpliendo los 2 objetivos específicos relacionados a establecer y generar protocolos de producción y purificación. Se recomienda que en futuros trabajos se realice un Western Blot o un ensayo de actividad de la enzima, en específico de su capacidad de hidrolizar como lo expone Nery et al. (1997) a modo de confirmar su presencia con total seguridad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar, A. E., Silva, K., Rodriguez, E., & Reyes, J. (2022). Producción recombinante de la enzima TcTS para el desarrollo de tratamientos contra Chagas. *JÓVENES EN LA CIENCIA*, 16, 1–7. Recuperado a partir de <https://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/3624>
2. Aoki, M., Cano, R. C., Pellegrini, A. V., Tanos, T., Guiñazú, N. L., Coso, O. A., & Gea, S. (2006). Different signaling pathways are involved in cardiomyocyte survival induced by a Trypanosoma cruzi glycoprotein. *Microbes and infection*, 8(7), 1723–1731. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.02.010>
3. Argüello-García, R., Carrero, J. C., & Ortega-Pierres, M. G. (2023). Extracellular Cysteine Proteases of Key Intestinal Protozoan Pathogens-Factors Linked to Virulence and Pathogenicity. *International journal of molecular sciences*, 24(16), 12850. <https://doi.org/10.3390/ijms241612850>
4. 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, 248–254. https://hoffman.cm.utexas.edu/courses/bradford_assay.pdf
5. Cazorla, S. I., Frank, F. M., Becker, P. D., Corral, R. S., Guzmán, C. A., & Malchiodi, E. L. (2008). Prime-boost immunization with cruzipain co-administered with MALP-2 triggers a protective immune response able to decrease parasite burden and tissue injury in an experimental Trypanosoma cruzi infection model. *Vaccine*, 26(16), 1999–2009. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.02.011>
6. Chang, A. Y., Chau, V., Landas, J. A., & Pang, Y. (2017). Preparation of calcium competent Escherichia coli and heat-shock transformation. *JEMI methods*, 1(22-25). <https://static.igem.org/mediawiki/2018/d/d2/T--NYMU-Taipei--protocol-competent-cell.pdf>
7. Checa, A., Santillan, O. (2017). *Método: Digestión por enzimas de restricción*. Conogasi. <https://conogasi.org/articulos/metodo-digestion-por-enzimas-de-restriccion/>
8. Dumon-Seignovert, L., Cariot, G., & Vuillard, L. (2004). The toxicity of recombinant proteins in Escherichia coli: a comparison of overexpression in BL21 (DE3), C41 (DE3), and C43 (DE3). *Protein expression and purification*, 37(1), 203-206. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2004.04.025>
9. Ferrão, P., d'Avila-Levy, C., Araujo-Jorge, T., Degraeve, W., Gonçalves, A., Garzoni, L., Lima, A., Feige, J., Bailly, S., Mendonça-Lima, L., & Waghbi, M. (2015). Cruzipain Activates Latent TGF- β from Host Cells during T. cruzi Invasion. *PloS one*, 10(5), e0124832. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124832>
10. Gauci, C., Jayashi, C., & Lightowers, M. W. (2013). Vaccine development against the Taenia solium parasite: the role of recombinant protein expression in

- Escherichia coli*. *Bioengineered*, 4(5), 343–347.
<https://doi.org/10.4161/bioe.23003>
11. Hannig, G., & Makrides, S. C. (1998). Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends in biotechnology*, 16(2), 54–60.
[https://doi.org/10.1016/s0167-7799\(97\)01155-4](https://doi.org/10.1016/s0167-7799(97)01155-4)
 12. Hoffman, S. L., Vekemans, J., Richie, T. L., & Duffy, P. E. (2015). The March Toward Malaria Vaccines. *American journal of preventive medicine*, 49(6 Suppl 4), S319–S333. <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2015.09.011>
 13. Kaur, J., Kumar, A., & Kaur, J. (2018). Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. *International journal of biological macromolecules*, 106, 803–822.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.080>
 14. Khananisho, D., Cumming, A. J., Kulakova, D., Shilling, P. J., & Daley, D. O. (2023). Tips for efficiently maintaining pET expression plasmids. *Current genetics*, 69(4-6), 277–287. <https://doi.org/10.1007/s00294-023-01276-0>
 15. Koschorreck, K., Richter, S. M., Ene, A. B., Roduner, E., Schmid, R. D., & Urlacher, V. B. (2008). Cloning and characterization of a new laccase from *Bacillus licheniformis* catalyzing dimerization of phenolic acids. *Applied microbiology and biotechnology*, 79(2), 217–224.
<https://doi.org/10.1007/s00253-008-1417-2>
 16. Lara, Á. R. (2011). Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista mexicana de ingeniería química*, 10(2), 209–223.
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382011000200006&lng=es&tlng=es
 17. Maeda, F. Y., Cortez, C., & Yoshida, N. (2012). Cell signaling during *Trypanosoma cruzi* invasion. *Frontiers in immunology*, 3, 361.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00361>
 18. Ministerio de Salud Pública. (2024). Enfermedades Transmitidas Por Vectores. <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2024/06/Eventos-VECTORIALES-SE-21-.pdf>
 19. Monteiro, A. C., Abrahamson, M., Lima, A. P., Vannier-Santos, M. A., & Scharfstein, J. (2001). Identification, characterization and localization of chagasin, a tight-binding cysteine protease inhibitor in *Trypanosoma cruzi*. *Journal of cell science*, 114(Pt 21), 3933–3942.
<https://doi.org/10.1242/jcs.114.21.3933>
 20. Montemartini, M., Búa, J., Bontempi, E., Zelada, C., Ruiz, A. M., Santomé, J. A., Cazzulo, J. J., & Nowicki, C. (1995). A recombinant tyrosine aminotransferase from *Trypanosoma cruzi* has both tyrosine aminotransferase and alanine aminotransferase activities. *FEMS microbiology letters*, 133(1-2), 17–20. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07854.x>
 21. Morales, D., Quinatoa, P., Sánchez, D., Cagua, J., & Veloz, H. (2022). Enfermedad de Chagas en el Ecuador: una revisión sistemática de los aspectos epidemiológicos y entomológicos. *INSPILIP*, 5(1).
<https://doi.org/10.31790/inspilip.v5i1.2>

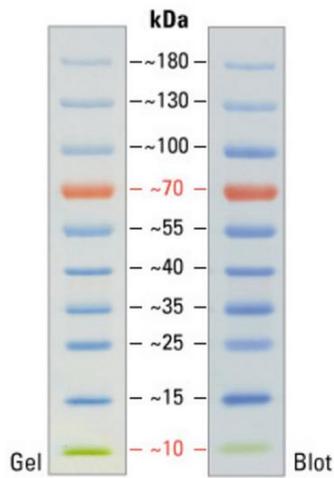
22. Ndao, M., Beaulieu, C., Black, W. C., Isabel, E., Vasquez-Camargo, F., Nath-Chowdhury, M., Massé, F., Mellon, C., Methot, N., & Nicoll-Griffith, D. A. (2014). Reversible cysteine protease inhibitors show promise for a Chagas disease cure. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *58*(2), 1167–1178. <https://doi.org/10.1128/AAC.01855-13>
23. Nery, E. D., Juliano, M. A., Meldal, M., Svendsen, I., Scharfstein, J., Walmsley, A., & Juliano, L. (1997). Characterization of the substrate specificity of the major cysteine protease (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* using a portion-mixing combinatorial library and fluorogenic peptides. *The Biochemical journal*, *323* (Pt 2) (Pt 2), 427–433. <https://doi.org/10.1042/bj3230427>
24. New England Biolabs. (s.f.). *BL21(DE3) Competent E. coli*. <https://www.neb.com/en/products/c2527-bl21de3-competent-e-coli>
25. New England Biolabs. (s.f.). *NEB® 5-alpha Competent E. coli (Subcloning Efficiency)*. <https://www.neb.com/en/products/c2988-neb-5-alpha-competent-e-coli-subcloning-efficiency>
26. Osorio, L., Ríos, I., Gutiérrez, B., & González, J. (2012). Virulence factors of *Trypanosoma cruzi*: who is who?. *Microbes and infection*, *14*(15), 1390–1402. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.09.003>
27. Puente, V., Demaria, A., Frank, F. M., Batlle, A., & Lombardo, M. E. (2018). Anti-parasitic effect of vitamin C alone and in combination with benznidazole against *Trypanosoma cruzi*. *PLoS neglected tropical diseases*, *12*(9), e0006764. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006764>
28. Rosano, G. L., Morales, E. S., & Ceccarelli, E. A. (2019). New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. *Protein science: a publication of the Protein Society*, *28*(8), 1412–1422. <https://doi.org/10.1002/pro.3668>
29. Salas-Sarduy, E., Landaburu, L. U., Karpiak, J., Madauss, K. P., Cazzulo, J. J., Agüero, F., & Alvarez, V. E. (2017). Novel scaffolds for inhibition of Cruzipain identified from high-throughput screening of anti-kinetoplastid chemical boxes. *Scientific reports*, *7*(1), 12073. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12170-4>
30. Santos, V. C., Oliveira, A. E. R., Campos, A. C. B., Reis-Cunha, J. L., Bartholomeu, D. C., Teixeira, S. M. R., Lima, A. P. C. A., & Ferreira, R. S. (2021). The gene repertoire of the main cysteine protease of *Trypanosoma cruzi*, cruzipain, reveals four sub-types with distinct active sites. *Scientific reports*, *11*(1), 18231. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97490-2>
31. Scalise, M. L., Arrúa, E. C., Rial, M. S., Esteva, M. I., Salomon, C. J., & Fichera, L. E. (2016). Promising Efficacy of Benznidazole Nanoparticles in Acute *Trypanosoma cruzi* Murine Model: In-Vitro and In-Vivo Studies. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, *95*(2), 388–393. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0889>
32. Schnapp, A. R., Eickhoff, C. S., Sizemore, D., Curtiss, R., 3rd, & Hoft, D. F. (2002). Cruzipain induces both mucosal and systemic protection against *Trypanosoma cruzi* in mice. *Infection and immunity*, *70*(9), 5065–5074. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.9.5065-5074.2002>

33. Serveau, C., Lalmanach, G., Hirata, I., Scharfstein, J., Juliano, M. A., & Gauthier, F. (1999). Discrimination of cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, and mammalian cathepsins B and L, by a pH-inducible fluorogenic substrate of trypanosomal cysteine proteinases. *European journal of biochemistry*, 259(1-2), 275–280. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00032.x>
34. Silva, T., Menna-Barreto, R. F., Britto, C., Samudio, F., Brandão, A., & Kalume, D. E. (2014). Cell disruption using a different methodology for proteomics analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. *Analytical biochemistry*, 448, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.11.010>
35. Siqueira-Neto, J. L., Debnath, A., McCall, L. I., Bernatchez, J. A., Ndao, M., Reed, S. L., & Rosenthal, P. J. (2018). Cysteine proteases in protozoan parasites. *PLoS neglected tropical diseases*, 12(8), e0006512. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006512>
36. Thermo Fisher Scientific. (s.f.). *1 Kb Plus DNA Ladder*. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/10787018>
37. Thermo Fisher Scientific. (s.f.). *BL21(DE3) Competent Cells*. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/EC0114?SID=srch-srp-EC0114>
38. Thermo Fisher Scientific. (s.f.). *DH5a Competent Cells*. <https://www.thermofisher.com/ec/en/home/life-science/cloning/competent-cells-for-transformation/competent-cells-strains/dh5a-competent-cells.html>
39. Thermo Fisher Scientific. (s.f.). *PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa*. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/26616>
40. Uehara, L. A., Moreira, O. C., Oliveira, A. C., Azambuja, P., Lima, A. P., Britto, C., dos Santos, A. L., Branquinha, M. H., & d'Avila-Levy, C. M. (2012). Cruzipain promotes *Trypanosoma cruzi* adhesion to *Rhodnius prolixus* midgut. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(12), e1958. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001958>
41. Widdel, F. (2007). Theory and measurement of bacterial growth. *Di dalam Grundpraktikum Mikrobiologie*, 4(11), 1-11.
42. Wingfield, P. T. (2015). Overview of the purification of recombinant proteins. *Current protocols in protein science*, 80, 6.1.1–6.1.35. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0601s80>
43. World Health Organization: (2025). *Enfermedad de Chagas (trypanosomiasis americana)*. [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
44. Yoshida, N. (2006). Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 78(1), 87–111. <https://doi.org/10.1590/s0001-37652006000100010>

ANEXOS

Figura 8.

Ladder de proteínas.

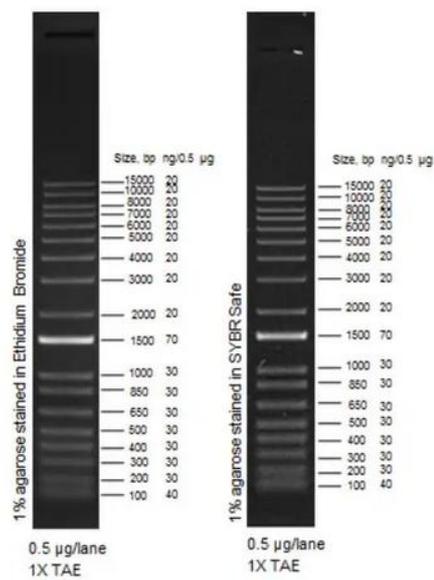


PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa

Fuente: Thermo Fisher Scientific - US (s.f.)

Figura 9.

Ladder de ADN.



1 Kb Plus DNA Ladder

Fuente: Thermo Fisher Scientific - US (s.f.)