



**UNIVERSIDAD  
DEL AZUAY**

UNIVERSIDAD DEL AZUAY  
FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA  
Carrera de Biología

Expresión heteróloga de la enzima GAPDH de *Trypanosoma cruzi* en  
*Escherichia coli*

Trabajo previo a la obtención de grado académico de biología

Autora:

**Daysi Nicole Guamán Piña**

Director:

**Rodrigo Sebastián Caroca Cáceres, PhD.**

**CUENCA – ECUADOR**

**2026**

## **Dedicatoria**

A mi madre, Alicia Piña. Siempre has sido mi apoyo y mi mayor ejemplo de fortaleza. Te agradezco que siempre me hayas dado un lugar donde encontrar paz y que me hayas abrazado desde el primer día de este viaje. Incluso en los momentos en que dudaba de mí misma, tu confianza inquebrantable en mis capacidades fue la luz que me guió hasta el final. Te agradezco tus innumerables sacrificios silenciosos, tu amor inagotable y por enseñarme que con perseverancia se puede alcanzar cualquier meta. Esta graduación es, en esencia, fruto de tu dedicación. Todo lo que soy hoy y todo lo que he logrado es gracias a ti.

A mi tío Santiago Piña, quien más que un tío, ha sido un hermano mayor con el que tuve la suerte de crecer. Agradezco tu presencia en cada etapa de mi vida, tu apoyo constante y por ser mi guía en los momentos de mayor duda. La fe y confianza que has depositado en mis habilidades y tus palabras motivadoras en los momentos complicados han sido fundamentales para lograr esta meta. Este triunfo lo comparto contigo, sabiendo que siempre has estado a mi lado caminando conmigo.

A mis abuelitos Luis Piña y Zoila Tacuri, porque son la base y el alma de mi familia. Estoy agradecida por su amor incondicional, por la sabiduría que me han compartido a través de sus consejos y por ser ese refugio al que siempre puedo volver. Observar su dedicación y esfuerzo a lo largo de los años me ha enseñado el verdadero significado de la constancia y el sacrificio. Su modelo es la guía que orienta mis decisiones, y este título es un homenaje al cariño que me han brindado desde que tengo memoria. Los quiero con todo mi corazón.

A mi pareja, Juan Garzón, por ser mi compañero y el mayor apoyo que podría haber pedido a lo largo de este camino. Gracias por estar a mi lado en cada paso del camino, por celebrar mis pequeñas victorias y por apoyarme en los momentos más frustrantes. Tu infinita paciencia durante mis largas noches de estudio, tu comprensión ante mis ausencias y tus palabras de ánimo cuando sentía que no podía seguir adelante fueron la fuerza motriz que me permitió alcanzar mi meta. Gracias por creer en mí, por tu amor incondicional y por caminar de la mano conmigo en este camino que hoy completamos juntos.

## **Agradecimientos**

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a Rodrigo Caroca, no solo por su experta orientación y su paciencia, sino también por creer en mis capacidades desde el primer momento y enseñarme que el conocimiento se construye sobre la perseverancia.

También doy las gracias a mis compañeras del laboratorio: Daniela Ortiz, Gabriela Purgarin y Samara Zeas. Gracias a todos por apoyarme, compartir mis preocupaciones y hacer que el tiempo pasado con el sonicador y la columna fuera soportable. Sin su ayuda y su alegría, todo este proceso no hubiera sido el mismo.

A mi amiga, Paulina Koppel, gracias por estar ahí para mí en los momentos más difíciles. Gracias por animarme cuando no veía ningún progreso y por celebrar cada éxito, por pequeño que fuera, a lo largo del camino. Sin tu ayuda, me habría rendido.

Por último, agradezco a la Universidad del Azuay y a quienes forman parte del Laboratorio de Biotecnología que me proporcionaron las instalaciones y el equipo necesarios para realizar este trabajo y que esto se haga realidad.

## Resumen

La enfermedad de Chagas, causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, requiere con urgencia nuevas vías terapéuticas debido a la toxicidad asociada a los tratamientos actuales. La glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), que desempeña un papel esencial en el metabolismo energético del parásito, constituye una diana molecular prometedora. En este estudio nos hemos centrado en la expresión heteróloga de TcGAPDH en *Escherichia coli* Rosetta 2 (DE3) utilizando el vector pET-15b. Los resultados obtenidos confirmaron que el plásmido contiene el gen TcGAPDH y que, a partir de él, se expresa de manera eficiente una proteína de 45 kDa, lo cual se corroboró mediante SDS-PAGE. Esta proteína se purificó con éxito mediante cromatografía de afinidad (IMAC) y, en el ensayo cinético, se observó la reducción de NAD<sup>+</sup> a NADH. Esto permitió comprobar la actividad biológica de la enzima mediante la observación de un punto de saturación a 1.2 mM de sustrato DL-G3P. Este sistema de producción fiable constituye una base sólida para el desarrollo futuro de inhibidores selectivos contra este tipo de parásito.

**Palabras clave:** *Trypanosoma cruzi*, GAPDH, expresión heteróloga, purificación de proteínas, glicosoma.

## **Abstract**

Chagas disease, caused by the parasite *Trypanosoma cruzi*, urgently requires new therapeutic approaches due to the toxicity associated with current treatments. Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), which plays an essential role in the energy metabolism of the parasite, is a promising molecular target. In this study, we focused on the heterologous expression of TcGAPDH in *Escherichia coli* Rosetta 2 (DE3) using the pET-15b vector. The results confirmed that the plasmid contains the TcGAPDH gene and that a 45-kDa protein is efficiently expressed from it, as verified by SDS-PAGE. This protein was successfully purified by affinity chromatography (IMAC), and in the kinetic assay, the reduction of NAD<sup>+</sup> to NADH was observed. This allowed us to verify the biological activity of the enzyme by observing a saturation point at 1.2 mM of the substrate DL-G3P. This reliable production system provides a solid foundation for the future development of selective inhibitors against this type of parasite.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*, GAPDH, Heterologous expression, Protein purification, Glycosome