



FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

Producción recombinante de la enzima Trypanothione reductase (TryR) de *Trypanosoma cruzi* como blanco terapéutico para la enfermedad de Chagas.

Trabajo previo a la obtención del título Bióloga

Autora:

María José Ayala Jimbo

Director:

Rodrigo Caroca Cáceres, Ph. D.

Cuenca - Ecuador

2026

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mi familia, quienes han sido mi mayor apoyo y motivación a lo largo de este camino académico y personal. A mis padres, Luis Ayala y Diana Jimbo, por su amor, apoyo incondicional y por motivarme siempre a seguir adelante, incluso en los momentos más difíciles. Gracias por creer en mí y acompañarme en cada etapa de mi formación. A mi hermano, David Ayala, por estar siempre conmigo y brindarme su apoyo. A mis perros, por acompañarme durante las largas horas de trabajo y por convertirse en parte importante de este proceso. A mis tíos Miguel Ayala y Martha Cuesta, quienes han sido como unos segundos padres para mí, y a Miguel Ayala, Jessica Ayala, Jenny Ayala y Mia, por recibirme siempre como parte de su familia y hacerme sentir querida y acompañada. A mis tíos María del Carmen Jimbo y Cristian Jimbo, por estar presentes tanto en los buenos como en los malos momentos. A mis abuelos, José Jimbo y Carmen Pinos, por ser mi ejemplo, mi fortaleza y uno de los pilares más importantes de mi vida. Finalmente, a mis amigos y a todas las personas que de una u otra manera me acompañaron y apoyaron durante este camino académico. Gracias por creer en mí y ser parte de este logro.

Agradecimientos

Agradezco a mi director de tesis, Dr. Rodrigo Caroca, por su guía, apoyo y acompañamiento durante el desarrollo de este trabajo. Asimismo, agradezco a David Siddons por sus observaciones, recomendaciones y apoyo durante este proceso académico. De manera especial, agradezco a Dani Ortiz, Gabi Pulgarín, Samara Zeas y Daysi Guamán, por su paciencia, apoyo, guía y por compartir conmigo sus conocimientos y enseñanzas durante este proceso. Su ayuda y acompañamiento fueron fundamentales para la realización de esta tesis y para mi formación durante esta etapa. Asimismo, agradezco a Johanna Tacuri, Pedro Guerra y Nicole, quienes con su apoyo, compañía y momentos de alegría hicieron esta etapa más llevadera. Finalmente, agradezco a todas las personas que de una u otra manera formaron parte de este proceso y contribuyeron a la realización de este trabajo.

Resumen

La enfermedad de Chagas constituye uno de los principales problemas de salud pública en América Latina. La enzima trypanothione reductase (TryR) de *Trypanosoma cruzi* representa un blanco terapéutico altamente selectivo debido a su papel esencial en el metabolismo redox del parásito y a la ausencia de un homólogo funcional en humanos. El presente estudio, desarrollado en la Universidad del Azuay, tuvo como objetivo expresar, purificar y evaluar preliminarmente la actividad enzimática de la TryR recombinante producida en *Escherichia coli*. La correcta inserción del gen en el plásmido pET28-TryR se verificó mediante análisis *in silico* y digestión con enzimas de restricción. Posteriormente, la proteína fue expresada en *E. coli* Rosetta (DE3) y purificada mediante cromatografía de afinidad (IMAC). Los ensayos enzimáticos confirmaron la obtención de una enzima recombinante funcional. Estos resultados establecen una base experimental para futuros estudios de inhibición enzimática y evaluación de compuestos tripanocidas.

Palabras clave: Trypanothione reductase, expresión recombinante, *Escherichia coli*, actividad enzimática, blanco terapéutico.

Abstract

Chagas disease is one of the major public health problems in Latin America. The enzyme trypanothione reductase (TryR) from *Trypanosoma cruzi* represents a highly selective therapeutic target due to its essential role in the parasite's redox metabolism and the absence of a functional homolog in humans. This study, conducted at the University of Azuay, aimed to express, purify, and preliminarily evaluate the enzymatic activity of recombinant TryR produced in *Escherichia coli*. Correct insertion of the gene into the pET28-TryR plasmid was verified through *in silico* analysis and restriction enzyme digestion. Subsequently, the protein was expressed in *E. coli* Rosetta (DE3) and purified by immobilized metal affinity chromatography (IMAC). Enzymatic assays confirmed the successful production of a functional recombinant enzyme. These results establish an experimental basis for future enzyme inhibition studies and the evaluation of trypanocidal compounds.

Keywords: Trypanothione reductase, recombinant expression, *Escherichia coli*, enzymatic activity, therapeutic target.

Tabla de contenido

Dedicatoria	i
Agradecimientos	ii
Resumen	iii
Abstract	iv
Tabla de contenido	v
Índice de tablas	vi
Índice de figuras	vii
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	4
2.1 Diseño experimental.....	4
2.2 Extracción y verificación del ADN plasmídico	4
2.3 Transformación bacteriana.....	5
2.4 Selección de colonias recombinantes	6
2.5 Expresión recombinante de la proteína TryR.....	6
2.6 Recolección celular y lisis por sonicación	7
2.7 Purificación por cromatografía de afinidad.....	8
2.8 Análisis por SDS-PAGE	9
2.9 Ensayo de actividad enzimática	10
2.10 Análisis de datos.....	12
RESULTADOS	13
3.1 Verificación del constructo plasmídico.....	13
3.2 Expresión y purificación de la proteína recombinante TryR	15
3.3 Evaluación de la actividad enzimática	16
DISCUSIÓN	19
CONCLUSIÓN	21
REFERENCIAS	22

Índice de tablas

Tabla 1. Cálculos para realizar los ensayos enzimáticos a temperaturas de 20 °C y 37 °C...11

Índice de figuras

- Figura 1.** Análisis *in silico* de los sitios de restricción del plásmido pET28-TryR. Se observan los sitios de restricción identificados y los fragmentos de ADN predichos tras la digestión con enzimas específicas. 14
- Figura 2.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN plasmídico pET28-TryR. Carril 1: marcador de peso molecular (GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen). 14
- Figura 3.** Análisis por SDS-PAGE de la expresión y purificación de la proteína recombinante TryR. Carril 1: marcador de peso molecular proteico PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10–180 kDa, Thermo Scientific). NT: control no transformado (*Escherichia coli* Rosetta sin plásmido); SI: cultivo sin inducción (sin adición de IPTG). 16
- Figura 4.** Actividad de TryR registrado como cambios de absorbancia a 340 nm. Los ensayos se realizaron durante 20 minutos a 20 °C y 37 °C. La disminución de la absorbancia refleja la oxidación de NADPH catalizada por la enzima TryR. 17
- Figura 5.** Actividad relativa de la enzima TryR recombinante entre el extracto crudo y la fracción purificada, medida al minuto 4 de reacción a 20 °C. Las barras representan el promedio de tres réplicas independientes y las líneas de error indican el intervalo de confianza del 95 %. Los puntos muestran los valores de cada réplica. 18

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas, también conocida como tripanosomiasis americana, es una zoonosis parasitaria causada por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (Zingales & Bartholomeu, 2022). Constituye uno de los problemas de salud pública más relevantes en América Latina y continúa representando un desafío para los sistemas sanitarios de los países donde es endémico (Cucunubá et al., 2024). Además, debido a los procesos migratorios contemporáneos, la enfermedad ha emergido en regiones no endémicas como Norteamérica y Europa, lo que ha ampliado su impacto global (Nepomuceno de Andrade et al., 2024). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization* [WHO], 2026), se estima que entre siete y ocho millones de personas se encuentran infectadas a nivel mundial, muchas de ellas sin diagnóstico debido a la presentación clínica frecuentemente asintomática de la fase inicial de la enfermedad.

El ciclo biológico del parásito es complejo e involucra tanto a hospederos vertebrados como a insectos vectores de la subfamilia Triatominae, comúnmente conocidos como “chinches besuconas” (Hernández-Flores et al., 2025). La transmisión ocurre principalmente mediante la contaminación de mucosas o heridas con heces del insecto infectado; sin embargo, también se han documentado mecanismos alternativos, como la transmisión congénita, las transfusiones sanguíneas, el trasplante de órganos y la transmisión oral a través de alimentos contaminados (Gonzaga et al., 2023). Durante su permanencia en el organismo humano, el parásito enfrenta múltiples mecanismos de defensa del sistema inmunológico, entre ellos la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS), que pueden causar daño oxidativo en biomoléculas esenciales, como las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (González-Montero et al., 2024).

Clínicamente, la enfermedad presenta una fase aguda, generalmente leve o subclínica, seguida de una fase crónica que puede permanecer asintomática durante años (Medina-Rincón et al., 2021). Sin embargo, aproximadamente un 30–40 % de los pacientes desarrollan complicaciones cardíacas, digestivas o neurológicas que pueden comprometer gravemente la calidad de vida e incluso resultar fatales (Nunes et al., 2013). El tratamiento actual se basa en benznidazol y nifurtimox, fármacos desarrollados hace más de cinco décadas (Mendes et al., 2022). Aunque pueden ser eficaces durante la fase aguda de la infección, su eficacia disminuye en la fase crónica y presentan efectos adversos significativos, los cuales limitan el éxito de la

terapia y resaltan la necesidad de identificar nuevos blancos terapéuticos específicos del parásito (Kourbeli et al., 2021).

Una de las diferencias metabólicas más importantes entre los tripanosomátidos y las células de mamíferos radica en su sistema antioxidante. Mientras que los mamíferos dependen del sistema glutatión/glutatión reductasa para mantener el equilibrio redox intracelular, los tripanosomátidos poseen un sistema exclusivo basado en la tripanotiona [N¹,N⁸-bis(glutatiónil)espermidina] (Piñeyro et al., 2021). Este sistema desempeña un papel central en la detoxificación de las especies reactivas de oxígeno y en la protección frente al estrés oxidativo que se genera durante la infección (González-Montero et al., 2024).

Dentro de este sistema, la enzima trypanothione reductase (TryR) cataliza la reducción del tripanotión disulfuro TS₂ a su forma reducida [T(SH)₂], utilizando NADPH como donador de electrones (Augusto et al., 2025). Esta enzima es esencial para mantener el equilibrio redox intracelular y proteger al parásito frente al estrés oxidativo generado por el hospedero (De Rycker et al., 2023). Además, dado que esta enzima no posee un homólogo funcional en humanos, se considera un blanco terapéutico altamente selectivo (Teixeira et al., 2021). Estudios de modelado metabólico han demostrado que TryR ejerce un control significativo sobre el flujo redox en *Trypanosoma cruzi*, lo que refuerza su relevancia en la supervivencia del parásito (Olin-Sandoval et al., 2012).

En este sentido, para validar el potencial de TryR como blanco terapéutico, resulta indispensable caracterizar su actividad catalítica y sus propiedades bioquímicas en condiciones controladas (Íncir & Kaplan, 2024). Sin embargo, la obtención directa de esta enzima a partir del parásito presenta limitaciones técnicas y de rendimiento, por lo que es necesario recurrir a estrategias que permitan producirla en cantidades suficientes. En este contexto, la expresión heteróloga de proteínas recombinantes constituye una estrategia fundamental para la caracterización estructural y funcional de enzimas de interés biomédico. Entre los sistemas de expresión más utilizados se encuentra *Escherichia coli*, debido a su rápido crecimiento, facilidad de manipulación genética, bajo costo y alta capacidad de producción proteica (Zhang et al., 2022). Este sistema permite obtener cantidades suficientes de proteína para su purificación, análisis bioquímico y evaluación de la actividad enzimática (Ortega et al., 2022).

Los vectores de la serie pET son ampliamente utilizados para la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*, debido a que emplean promotores controlados por la ARN polimerasa

T7, lo que garantiza alcanzar altas producciones de proteína (Ojima-Kato, 2024). La inducción de la expresión se logra mediante la adición de IPTG (isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido), un análogo no metabolizable de la lactosa que activa el operón Lac, que desencadena la transcripción del gen de interés (De Marco, 2025). Este sistema permite controlar el momento de expresión de la proteína, lo cual es particularmente importante para evitar efectos tóxicos asociados a su sobreproducción.

Para optimizar la expresión de genes heterólogos, sobre todo en aquellos que provienen de organismos eucariotas o parasitarios, se emplean cepas modificadas, como *Escherichia coli* Rosetta (DE3), que contienen tRNAs adicionales que reconocen codones raros, lo que favorece una traducción más eficiente y aumenta el rendimiento de la proteína recombinante (Gustafsson et al., 2004).

Una vez producida, la proteína recombinante puede purificarse mediante cromatografía de afinidad, aprovechando la presencia de una etiqueta de histidina (His-tag), codificada por el plásmido de expresión (pET28) y fusionada a la proteína recombinante (Hochuli et al., 1988). Este método se basa en la interacción específica entre los residuos de histidina y los iones metálicos inmovilizados en la matriz cromatográfica, lo que permite aislar selectivamente la proteína de interés a partir del lisado celular (Bornhorst & Falke, 2000).

Finalmente, la evaluación de la actividad enzimática constituye una etapa clave para determinar si la proteína recombinante conserva su funcionalidad catalítica (Hamilton et al., 2012). En el caso de TryR, esta actividad puede evaluarse mediante ensayos espectrofotométricos que monitorean la oxidación de NADPH a 340 nm, lo que se refleja en una disminución de la absorbancia, directamente proporcional a la actividad enzimática (Olin-Sandoval et al., 2012).

Con estos antecedentes, el presente trabajo tuvo como propósito expresar y caracterizar preliminarmente la actividad enzimática de la Trypanothione reductase recombinante de *T. cruzi*, evaluando su comportamiento en diferentes condiciones de temperatura (20 °C y 37 °C), con el fin de establecer bases experimentales para estudios posteriores de inhibición enzimática y la búsqueda de compuestos antiparasitarios.

METODOLOGÍA

2.1 Diseño experimental

El presente estudio correspondió a una investigación experimental de laboratorio en la Universidad del Azuay, orientada a la expresión heteróloga, la purificación y la caracterización funcional preliminar de la enzima Trypanothione reductase (TryR) de *Trypanosoma cruzi*. El diseño experimental comprendió una fase de validación molecular del constructo plasmídico, transformación bacteriana en *Escherichia coli*, producción recombinante de la proteína, purificación mediante cromatografía de afinidad y evaluación de la actividad enzimática en dos condiciones de temperatura (20 °C y 37 °C). Todas las etapas se desarrollaron en condiciones controladas de laboratorio empleando técnicas estándar de biología molecular y bioquímica de proteínas.

2.2 Extracción y verificación del ADN plasmídico

La extracción del ADN plasmídico se realizó mediante el método de lisis alcalina descrito originalmente por Birnboim y Doly (1979). Este procedimiento se basa en la ruptura de las células bacterianas mediante una solución alcalina que contiene hidróxido de sodio y dodecil sulfato de sodio (SDS). Esto permite la liberación del ADN plasmídico y la desnaturalización tanto de proteínas como de ADN cromosomal. Posteriormente, la neutralización de la mezcla favorece la renaturalización selectiva del ADN plasmídico, mientras que el ADN cromosómico y otras macromoléculas precipitan. Tras la centrifugación, se recuperó el sobrenadante que contenía el ADN plasmídico para proceder a su purificación. Esta purificación se llevó a cabo utilizando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up (Promega), que emplea columnas de sílice con membrana que permiten la unión selectiva del ADN en condiciones de alta salinidad, lo que permite eliminar proteínas, nucleótidos libres y otros compuestos presentes en la muestra. Durante el procedimiento, la muestra se aplicó a la columna de purificación, seguida de los pasos de lavado necesarios para eliminar impurezas, según lo descrito por el fabricante. Finalmente, el ADN fue eluido con un buffer libre de nucleasas y almacenado a -20 °C hasta su uso posterior.

Para verificar la integridad del ADN plasmídico, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE (Tris-acetato-EDTA). Para ello, se cargaron 5 µL del marcador de peso molecular GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific), mientras que las muestras

se prepararon en un volumen final de 20 μL , incluyendo 2 μL de buffer de carga BlueJuice™ (Thermo Scientific).

Adicionalmente, se verificó el constructo plasmídico mediante digestión con enzimas de restricción. Previamente, se efectuó un análisis *in silico* del mapa plasmídico, utilizando el programa NEBcutter V3.0 (New England Biolabs, <https://nc3.neb.com/NEBcutter/>), con el fin de identificar sitios de restricción estratégicos y predecir los tamaños de los fragmentos esperados. Se prepararon tres reacciones independientes utilizando las siguientes combinaciones de enzimas de restricción: EcoRI + EcoRV, PstI + XmnI y NdeI + EcoRV, junto con sus respectivos buffers de reacción correspondiente (Thermo Fisher Scientific).

- La reacción 1 se preparó utilizando buffer Orange (2 μL), plásmido recombinante (10 μL), enzima EcoRI (0.5 μL), enzima EcoRV (0.5 μL) y agua libre de nucleasas (7 μL).
- La reacción 2 se preparó con buffer Tango (2 μL), plásmido recombinante (10 μL), enzima PstI (0.5 μL), enzima XmnI (0.5 μL) y agua libre de nucleasas (7 μL).
- La reacción 3 se preparó utilizando buffer Orange (2 μL), plásmido recombinante (10 μL), enzima NdeI (0.5 μL) y enzima EcoRV (0.5 μL) y agua libre de nucleasas (7 μL).

Las mezclas de reacción se incubaron a 37 °C durante 2 horas y posteriormente fueron analizadas bajo las mismas condiciones de electroforesis descritas previamente, permitiendo comparar los fragmentos observados con los tamaños esperados y confirmar la integridad del plásmido recombinante.

2.3 Transformación bacteriana

La transformación bacteriana se realizó con el objetivo de introducir el ADN plasmídico recombinante, previamente extraído de cultivos de *Escherichia coli* DH5 α , en células competentes de *Escherichia coli* Rosetta (DE3), cepa empleada para la expresión heteróloga de la proteína.

El procedimiento se llevó a cabo mediante el método de choque térmico, siguiendo el protocolo descrito por Sambrook y Russell (2001). Para ello, se tomaron 5 μL de ADN plasmídico purificado y se adicionaron a 50 μL de células competentes de *E. coli* Rosetta (DE3). La mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos para favorecer la interacción entre el ADN y la membrana bacteriana. Posteriormente, se realizó un choque térmico a 42 °C durante

aproximadamente 30 segundos, un procedimiento que genera poros en la membrana celular y favorece la entrada del ADN plasmídico a través de ella. Inmediatamente después, las células fueron devueltas al hielo para estabilizar la membrana y luego se añadió 1 mL de caldo LB (Luria–Bertani) tibio para permitir la recuperación celular y la expresión inicial del gen de resistencia al antibiótico. Tras un periodo de incubación con agitación a 1 hora a 37 °C a 200 rpm, se centrifugó a 16,000 g x 2 minutos y se descartó el sobrenadante hasta un aproximado de 50 µl. Las células fueron resuspendidas en este volumen y luego sembradas en placas de agar LB suplementadas con kanamicina a una concentración final de 50 µg/mL, lo que permitió la selección exclusiva de bacterias transformadas. Adicionalmente, como control, se cultivó la cepa *E. coli* Rosetta (DE3) no transformada (NT) en placas con kanamicina (control negativo de selección) y la misma cepa NT en placas de LB sin kanamicina (control de viabilidad). Las placas fueron incubadas durante toda la noche a 37 °C, tras lo cual se observaron colonias aisladas correspondientes a posibles transformantes recombinantes.

2.4 Selección de colonias recombinantes

Las colonias bacterianas obtenidas tras la transformación fueron seleccionadas individualmente con puntas de pipeta estériles y, posteriormente, inoculadas en tubos con 5 mL de caldo LB suplementado con kanamicina (50 µg/mL). Este medio está compuesto principalmente por triptona, extracto de levadura y cloruro de sodio, que proporcionan fuentes de nitrógeno, vitaminas y sales esenciales para el crecimiento bacteriano (Bertani, 1951).

En paralelo, se preparó un cultivo de control con la cepa *Escherichia coli* Rosetta (DE3) no transformada (NT), que se cultivó en un tubo con 5 mL de caldo LB sin antibiótico. Todos los cultivos se incubaron durante toda la noche a 37 °C con agitación a 110 rpm. Este paso permitió el crecimiento bacteriano y la amplificación de las células bajo presión de selección (en el caso de las colonias transformadas), las cuales posteriormente se utilizaron para los ensayos de expresión recombinante de la enzima Trypanothione reductase (TryR).

2.5 Expresión recombinante de la proteína TryR

A partir de los precultivos obtenidos en tubos (sección 2.4), se realizó la expresión recombinante de la enzima trypanothione reductase (TryR) de *Trypanosoma cruzi* en la cepa de *Escherichia coli* Rosetta (DE3). Brevemente, se inocularon 5.500 µL del precultivo en 275 mL de caldo LB suplementado con 1.375 µL de kanamicina (50 µg/mL final) para el cultivo de bacterias con plásmido recombinante. Para el control no transformado (NT), se inocularon

1.500 μL del precultivo en 75 mL de caldo LB sin antibiótico. Los cultivos se incubaron a 37 °C con agitación a 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica (OD₆₀₀) entre 0.6 y 0.8, correspondiente a la fase exponencial de crecimiento bacteriano (Sambrook & Russell, 2001). La densidad óptica se determinó utilizando un espectrofotómetro UV/Visible Genesys (Thermo Fisher Scientific) y cubetas desechables de 1.5 mL. Una vez alcanzada esta densidad celular, el cultivo de bacterias transformadas se dividió en dos fracciones experimentales. En la primera fracción se indujo la expresión de la proteína recombinante mediante la adición de 0.4 mM de Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). La segunda fracción se mantuvo sin la adición de IPTG, constituyendo el control sin inducir (SI), utilizado para evaluar la expresión basal de la proteína.

Los cultivos inducidos y los controles fueron incubados durante 16 horas a 20 °C con agitación constante (110 rpm) para favorecer el plegamiento adecuado de la proteína recombinante y reducir la formación de cuerpos de inclusión, una condición frecuentemente observada durante la sobreexpresión de proteínas heterólogas en sistemas bacterianos (Rosano & Ceccarelli, 2014). Posteriormente, las células bacterianas fueron recolectadas mediante centrifugación y empleadas en los procedimientos de lisis celular, purificación de la proteína recombinante y evaluación de la actividad enzimática, como se describirá a continuación.

2.6 Recolección celular y lisis por sonicación

Finalizado el periodo de expresión, los cultivos bacterianos fueron transferidos a tubos cónicos estériles de 50 mL y 15 mL, según el volumen disponible en cada condición experimental. Posteriormente, las células fueron recolectadas mediante centrifugación a $6,000 \times g$ durante 10 minutos a 4 °C en una centrífuga refrigerada (Sorvall ST 8R, Thermo Scientific), descartando cuidadosamente el sobrenadante y recuperando el pellet celular.

Para la lisis celular se preparó un buffer de resuspensión compuesto por 100 mM de trietanolamina ajustada a pH 7.4, 300 mM de cloruro de sodio (NaCl), 2 mM de imidazol y 1 mM PMSF (fenilmetilsulfonil fluoruro) como inhibidor de proteasas. Este buffer se preparó a partir de soluciones stock de trietanolamina 200 mM (pH 7.4), NaCl 1 M, imidazol 2 M y PMSF 200 mM, en un volumen final de 80 mL.

La ruptura celular se realizó mediante sonicación utilizando un homogeneizador ultrasónico Sonic Ruptor 400 (Omni International), aplicando pulsos durante 5 minutos (40 pulsos) al 40% de potencia, manteniendo las muestras en hielo para evitar el sobrecalentamiento y la posible

desnaturalización proteica. Este procedimiento permitió la liberación del contenido citoplasmático, incluyendo la proteína recombinante de interés.

Posteriormente, el lisado celular fue sometido a centrifugación a 4 °C en una centrífuga refrigerada (Sorvall ST 8R, Thermo Scientific) a 4,500 rpm durante 30 minutos, con el fin de separar la fracción soluble de los restos celulares insolubles y posibles agregados proteicos.

Para la purificación se prepararon dos buffers complementarios. El buffer A, utilizado en la etapa de lavado de la columna cromatográfica, estuvo compuesto por 100 mM de trietanolamina (pH 7.4), 300 mM de NaCl y 10 mM de imidazol, en un volumen final de 250 mL. El buffer B, empleado para la elución de la proteína recombinante, contenía 100 mM de trietanolamina (pH 7.4), 300 mM de NaCl y 300 mM de imidazol, en un volumen final de 80 mL. Estos buffers permitieron eliminar proteínas unidas inespecíficamente y recuperar la proteína TryR etiquetada con histidinas mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC), respectivamente.

2.7 Purificación por cromatografía de afinidad

La fracción soluble obtenida tras la lisis celular y la centrifugación fue sometida a purificación mediante Cromatografía de Afinidad por Metal Inmovilizado (IMAC), utilizando un sistema automatizado ÄKTA Pure (General Electric) acoplado a una columna de afinidad tipo HisTrap, previamente cargada con iones níquel (Ni^{2+}). Esta columna se basa en la interacción específica entre los residuos de histidina presentes en la etiqueta His-tag de la proteína recombinante y los iones metálicos inmovilizados en la matriz cromatográfica.

Antes de cargar la muestra, la columna se equilibró con Buffer A. La inclusión de una baja concentración de imidazol en el buffer de equilibrio permitió reducir la unión inespecífica de proteínas endógenas de *Escherichia coli* sin afectar la interacción específica con la proteína recombinante etiquetada.

Posteriormente, el sobrenadante correspondiente a la fracción soluble obtenida tras la centrifugación se cargó directamente en la columna previamente equilibrada. Tras la unión de la proteína recombinante a la matriz, se realizaron pasos de lavado con Buffer A para eliminar proteínas que no estaban específicamente unidas.

La elución de la proteína TryR recombinante se llevó a cabo utilizando Buffer B. La alta concentración de imidazol en este buffer compitió con los residuos de histidina por los sitios de unión al metal, lo que permitió la liberación controlada de la proteína purificada.

Las fracciones eluidas fueron recolectadas automáticamente por el sistema cromatográfico y posteriormente analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) para evaluar la pureza y el peso molecular aparente de la proteína obtenida.

2.8 Análisis por SDS-PAGE

Con el fin de evaluar la expresión y la pureza de la proteína recombinante TryR, las distintas fracciones obtenidas durante el proceso se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), utilizando el sistema TGX Stain-Free™ FastCast™ (Bio-Rad Laboratories).

Las muestras evaluadas fueron las siguientes:

- Fracción crudo sonicado inducido con 0.4 mM IPTG
- Fracción 1 purificado (0.4 mM IPTG)
- Fracción 2 purificado (0.4 mM IPTG)
- Fracción 3 purificado (0.4 mM IPTG)
- Control NT (crudo sonicado no transformado)
- Control SI (crudo sonicado sin inducción)

Las muestras fueron mezcladas en tubos Eppendorf en una proporción de 24 μ L de muestra + 6 μ L de buffer de carga (compuesto por SDS, glicerol, azul de bromofenol y β -mercaptoetanol como agente reductor), para un volumen final de 30 μ L. Posteriormente, fueron sometidas a desnaturización térmica a 95 °C durante 5 minutos en un baño seco digital (Digital Dry Bath/Block Heater, Thermo Scientific™) con el fin de favorecer la ruptura de estructuras secundarias y terciarias de las proteínas.

Para la electroforesis, se cargó 25 μ L de cada mezcla por pocillo del gel, junto con 4 μ L del marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10–180 kDa, Thermo

Scientific). Durante la corrida electroforética, las proteínas migraron a través del gel en función de su peso molecular.

Finalizada la electroforesis, el gel fue teñido con Coomassie Brilliant Blue R-250 al 0.1% mediante incubación en una solución de tinción (preparada en 40% metanol, 10% ácido acético y 50% agua destilada) durante aproximadamente 30–60 minutos con agitación suave. Posteriormente, se realizó la decoloración utilizando una solución de 30% metanol, 10% ácido acético y 60% agua destilada, eliminando el exceso de colorante hasta obtener un fondo claro y bandas proteicas bien definidas.

La identificación de la proteína recombinante TryR se realizó considerando su peso molecular teórico aproximado de ~53-55 kDa, estimado a partir de la secuencia de la proteína recombinante (Olin-Sandoval et al., 2012), y comparándolo con las bandas del marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10–180 kDa, Thermo Scientific), lo que permitió localizar la banda correspondiente en el gel de poliacrilamida.

2.9 Ensayo de actividad enzimática

La actividad catalítica de la enzima TryR recombinante se evaluó mediante un ensayo espectrofotométrico basado en la oxidación de NADPH, monitoreando la disminución de la absorbancia a 340 nm, correspondiente a la conversión de NADPH a NADP⁺ (Olin-Sandoval et al., 2012).

Las mediciones se realizaron con un espectrofotómetro de microplacas Varioskan LUX (Thermo Scientific). El ensayo se realizó en un volumen final de 300 µL utilizando como buffer de reacción HEPES 40 mM (pH 7.4) suplementado con 1 mM EDTA. Además, la mezcla contenía TS₂ (sustrato de la TryR) a una concentración final de 0.24 mM y NADPH a 0.2 mM.

Previo al ensayo, la concentración proteica de las fracciones fue determinada mediante el método de Bradford protein assay (Bradford, 1976), con el fin de calcular el volumen de muestra necesario para asegurar cantidades comparables de enzima en cada reacción (Tabla 1).

Tabla 1.

Cálculos para realizar los ensayos enzimáticos a temperaturas de 20 °C y 37 °C.

		Purificado inducido	Blanco purificado	Crudo inducido sonicado	NT crudo sonicado	Blanco crudo
Hepes	+	150 µL	150 µL	150 µL	150 µL	150 µL
EDTA						
Enzima		76.8 µL	76.8 µL (buffer B)	51.54 µL	50.20 µL	50 µL (buffer resuspensión)
dH ₂ O		34.2 µL	34.2 µL	59.46 µL	60.8 µL	61 µL
Ts2		15 µL	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL
NADPH		24 µL	24 µL	24 µL	24 µL	24 µL

Nota. Composición de las reacciones para los ensayos enzimáticos de TryR a 20 °C y 37 °C. Se indica el volumen de cada componente agregado para alcanzar un volumen final de 300 µL por reacción. La cantidad de extracto crudo o proteína purificada se ajustó según la concentración proteica determinada por el método de Bradford.

Condiciones de medición

Las reacciones enzimáticas fueron monitoreadas a 340 nm, registrando la disminución de absorbancia asociada a la oxidación de NADPH. Las mediciones se registraron durante 20 minutos, realizando lecturas de absorbancia cada 30 segundos.

Para el cálculo de la actividad enzimática se consideró la velocidad inicial de reacción, estimada a partir del cambio de absorbancia (Δ Abs) durante los primeros 4 minutos del ensayo. Este intervalo corresponde a la fase inicial, donde la relación entre absorbancia y tiempo es lineal, permitiendo una determinación confiable de la velocidad de reacción a partir de la pendiente.

Los ensayos se realizaron tanto a 20 °C como a 37 °C para evaluar el efecto de la temperatura sobre la actividad catalítica de la enzima recombinante.

2.10 Análisis de datos

El análisis de la cinética enzimática se basó en los registros de absorbancia a 340 nm obtenidos durante 20 minutos. Para la comparación cuantitativa de la actividad, se seleccionó el valor de absorbancia al minuto 4 de reacción, correspondiente a la fase lineal inicial, en la que la disminución de la absorbancia es directamente proporcional a la oxidación de NADPH. Este punto permitió estandarizar las comparaciones entre las diferentes muestras analizadas, evitando posibles desviaciones asociadas a fases posteriores de la reacción, como la disminución del sustrato o la acumulación de productos.

Todas las mediciones se realizaron por triplicado. Los valores de absorbancia se normalizaron respecto al valor máximo observado entre las réplicas de cada experimento. La comparación de la actividad enzimática entre el extracto crudo y la fracción purificada se realizó de forma indirecta mediante la absorbancia normalizada a los 4 minutos.

Los datos fueron registrados en hojas de cálculo de Microsoft Excel y exportados para su análisis estadístico. El procesamiento y análisis se realizó utilizando el software R (R Core Team, 2025). Para cada condición se calcularon el promedio, la desviación estándar y el intervalo de confianza del 95%. La comparación entre el extracto crudo y la fracción purificada se realizó mediante ANOVA de una vía, considerando un valor de $p < 0.05$ como criterio de significancia estadística.

RESULTADOS

3.1 Verificación del constructo plasmídico

Con el fin de confirmar la correcta construcción del plásmido recombinante pET28-TryR, se realizó un análisis *in silico* del mapa plasmídico mediante la herramienta NEBcutter V3.0. Este análisis permitió identificar los sitios de restricción y predecir los tamaños de los fragmentos esperados tras la digestión con diferentes combinaciones de enzimas (Figura 1).

Posteriormente, el ADN plasmídico fue extraído mediante miniprep y purificado. Su integridad fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, donde se observaron bandas correspondientes al ADN plasmídico. El plásmido fue digerido con tres combinaciones de enzimas de restricción: EcoRI + EcoRV; PstI + XmnI; y NdeI + EcoRV. Los productos de digestión se analizaron en el mismo gel de agarosa al 1% (Figura 2). En los carriles de las digestiones enzimáticas se observaron patrones de fragmentación que coincidieron con los tamaños predichos por el análisis *in silico* (Figuras 1 y 2), lo que confirmó la integridad del constructo y la correcta inserción del gen de TryR en el vector pET28. En el carril del plásmido sin digerir se observó una banda de alto peso molecular y baja resolución, compatible con ADN genómico residual, un fenómeno común en este tipo de extracciones.

Confirmado que el plásmido contiene el inserto correcto, se procedió a las etapas de transformación y expresión recombinante de la proteína.

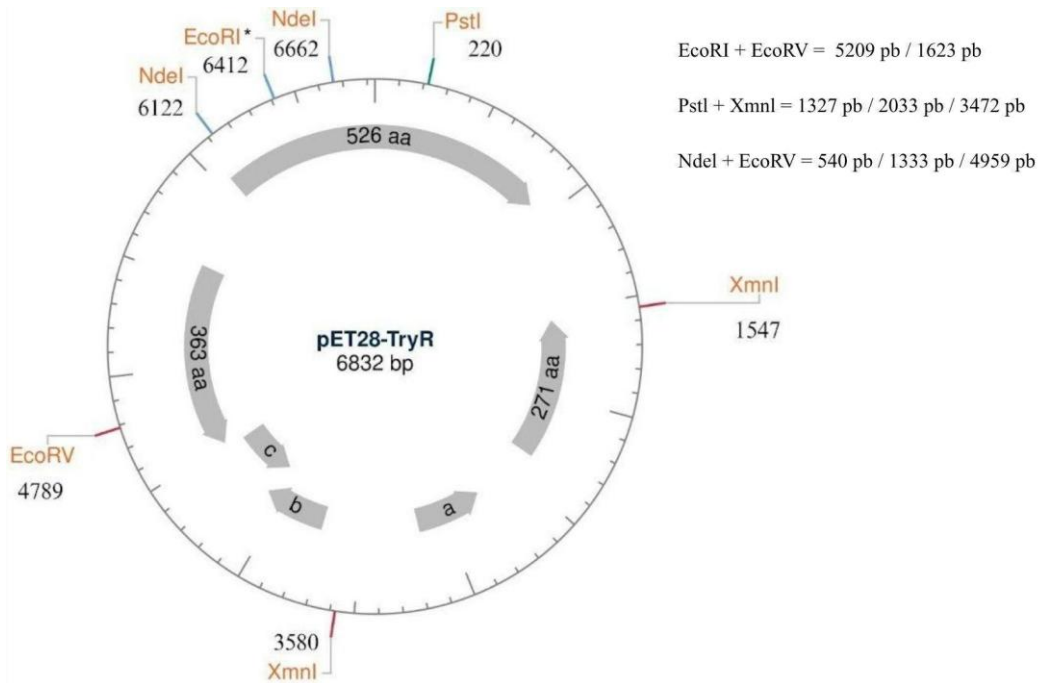


Figura 1. Análisis *in silico* de los sitios de restricción del plásmido pET28-TryR. Se observan los sitios de restricción identificados y los fragmentos de ADN predichos tras la digestión con enzimas específicas.

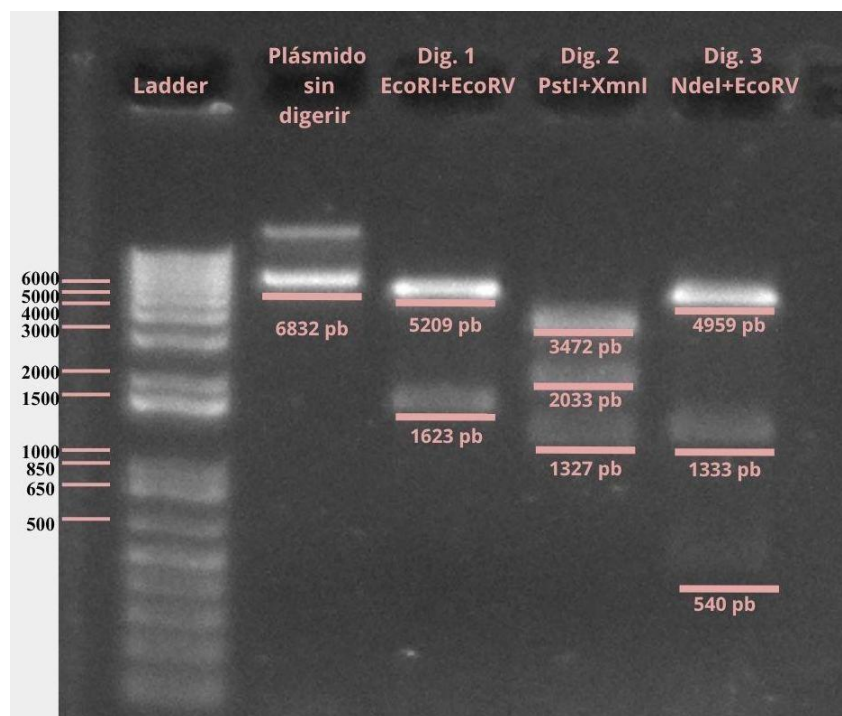


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN plasmídico pET28-TryR. Carril 1: marcador de peso molecular (GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen).

3.2 Expresión y purificación de la proteína recombinante TryR

Una vez verificada la integridad del constructo plasmídico recombinante pET28-TryR, el plásmido fue transformado en células competentes de *Escherichia coli* Rosetta (DE3), con el objetivo de expresar la enzima TryR. La expresión proteica fue inducida mediante la adición de IPTG a una concentración final de 0.4 mM. Se incluyeron dos controles: un cultivo sin inducción (SI) para evaluar la expresión basal del sistema y un cultivo no transformado (NT) para identificar posibles proteínas endógenas de *E. coli* con migración similar.

El análisis por SDS-PAGE reveló una banda en el rango de ~53-55 kDa en el extracto crudo del cultivo inducido (+IPTG), correspondiente al peso molecular esperado de la enzima TryR (Figura 3). En el cultivo sin inducción (SI), a pesar de no haberse adicionado IPTG, se observó una banda tenue en la misma región, lo que sugiere expresión basal. Esta expresión basal es común en sistemas basados en el promotor T7 y se debe a una ligera fuga transcripcional incluso en ausencia del inductor. Por su parte, el control no transformado (NT) mostró una señal débil en la misma zona, atribuible a proteínas endógenas de *E. coli*.

La cromatografía de afinidad (IMAC) permitió obtener la proteína recombinante en un estado más puro. Las fracciones eluidas mostraron un enriquecimiento progresivo de la banda de ~53–55 kDa. La fracción 1 presenta una banda tenue, mientras que la fracción 2 muestra la mayor intensidad de la señal correspondiente a TryR (punto de mayor enriquecimiento de la proteína). En la fracción 3 se observa una disminución de la intensidad, lo que sugiere una menor concentración de la proteína recombinante en las etapas finales de la elución (Figura 3).

Estos resultados demuestran la expresión heteróloga exitosa de TryR en *E. coli* Rosetta (DE3) y su purificación efectiva, lo cual proporciona material de suficiente calidad y cantidad para los ensayos de actividad enzimática.

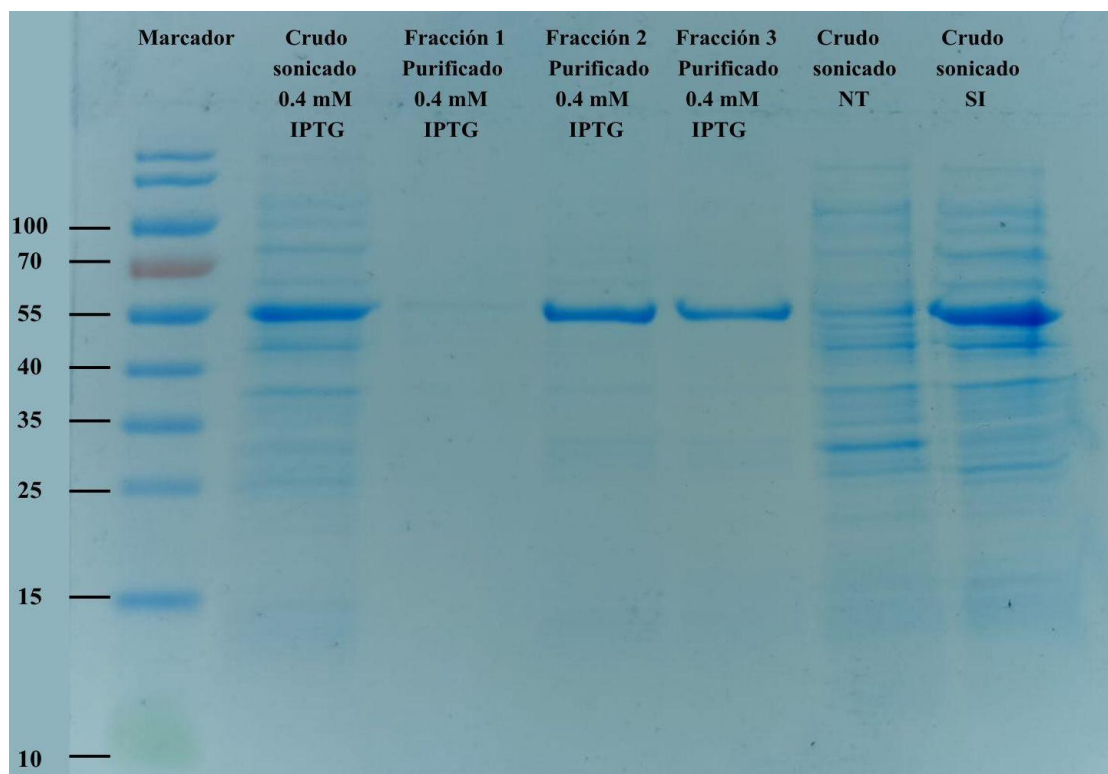


Figura 3. Análisis por SDS-PAGE de la expresión y purificación de la proteína recombinante TryR. Carril 1: marcador de peso molecular proteico PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10–180 kDa, Thermo Scientific). NT: control no transformado (*Escherichia coli* Rosetta sin plásmido); SI: cultivo sin inducción (sin adición de IPTG).

3.3 Evaluación de la actividad enzimática

Una vez obtenida la proteína recombinante purificada, se procedió a evaluar su actividad enzimática mediante un ensayo espectrofotométrico que monitorea la oxidación del cofactor NADPH a 340 nm.

Las mediciones se realizaron durante 20 minutos, registrando la absorbancia cada 30 segundos, tanto a 20 °C como a 37 °C. Como se observa en la (Figura 4), en ambas temperaturas se observó una disminución progresiva de la absorbancia únicamente en las muestras que contenían TryR, lo que refleja el consumo de NADPH. La fracción purificada mostró una disminución más pronunciada que la del extracto crudo, especialmente a 37 °C. Sin embargo, a esta temperatura, la reacción transcurrió demasiado rápido en los primeros minutos, lo que dificultó obtener registros lineales confiables.

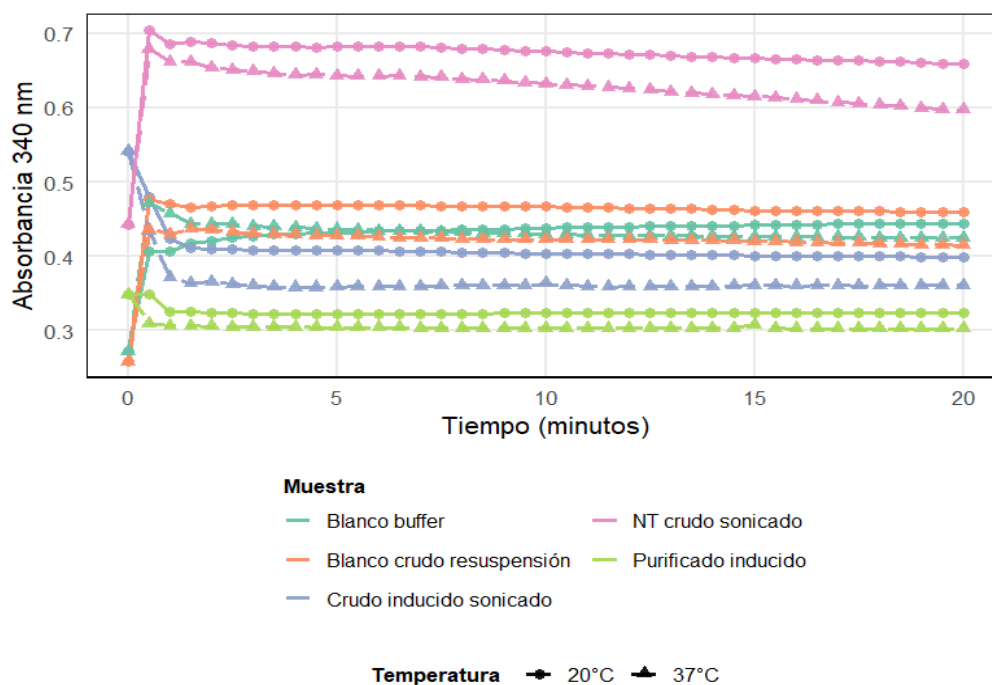


Figura 4. Actividad de TryR registrado como cambios de absorbancia a 340 nm. Los ensayos se realizaron durante 20 minutos a 20 °C y 37 °C. La disminución de la absorbancia refleja la oxidación de NADPH catalizada por la enzima TryR.

Debido a la cinética rápida observada a 37 °C, se seleccionó el punto de 4 minutos a 20 °C como referencia para la comparación cuantitativa entre muestras de extracto crudo y proteína purificada. Esta selección se justifica porque, en este intervalo, la reacción presentó una fase lineal adecuada. Los valores de absorbancia de tres réplicas independientes fueron normalizados respecto al valor máximo observado entre todas las mediciones, al cual se le asignó un valor de 1. Luego se calcularon el promedio y el intervalo de confianza del 95 % para cada condición. Como se muestra en la (Figura 5), la fracción purificada presentó una mayor actividad enzimática (menor absorbancia normalizada) que el extracto crudo. El análisis estadístico mediante ANOVA de una vía reveló una diferencia con tendencia clara, aunque no alcanzó significancia estadística convencional ($F_{1,4} = 4.73$; $p = 0.095$). No obstante, se observó una tendencia clara y consistente hacia una mayor actividad en el extracto purificado.

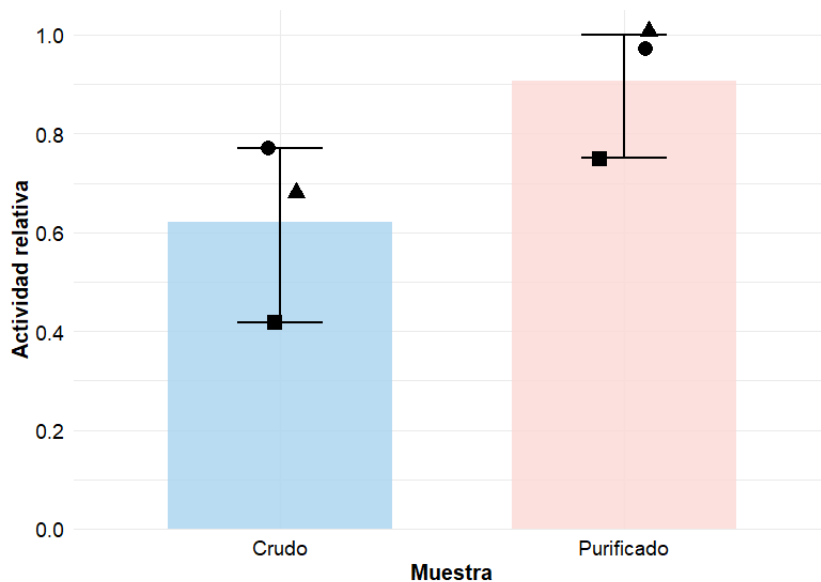


Figura 5. Actividad relativa de la enzima TryR recombinante entre el extracto crudo y la fracción purificada, medida al minuto 4 de reacción a 20 °C. Las barras representan el promedio de tres réplicas independientes y las líneas de error indican el intervalo de confianza del 95 %. Los puntos muestran los valores de cada réplica.

Los resultados obtenidos indican que la enzima TryR recombinante fue expresada exitosamente en *E.coli* Rosetta (DE3), purificada mediante cromatografía de afinidad (IMAC) y mantiene su funcionalidad catalítica. Esto confirma el logro del objetivo principal del presente trabajo, lo que proporciona una base experimental confiable para realizar ensayos de inhibición en estudios futuros.

DISCUSIÓN

La producción recombinante de la trypanothione reductase (TryR) de *Trypanosoma cruzi* en *Escherichia coli* permitió obtener una enzima funcional, validando así la utilidad del sistema pET28-Rosetta (DE3) para esta proteína de interés terapéutico. Sin embargo, el proceso presentó diversos desafíos, los cuales brindan información valiosa sobre las condiciones óptimas para su expresión y caracterización.

La verificación del constructo plasmídico mediante análisis *in silico* con NEBcutter V3.0 y digestión restrictiva con tres combinaciones de enzimas mostró patrones de fragmentación consistentes con los esperados, confirmando la correcta inserción del gen de la TryR. Este resultado es comparable con reportes previos de clonación de enzimas de tripanosomátidos en vectores pET (Wilkinson & Kelly, 2009). La presencia de una banda de alto peso molecular en el plásmido no digerido es un fenómeno común en minipreparaciones y no afectó la integridad del constructo, tal como se ha reportado en protocolos estándar de extracción plasmídica (Birnboim & Doly, 1979).

En la fase de expresión, el bajo rendimiento inicial en la cepa C41(DE3) evidencia las dificultades de expresar proteínas de organismos parasitarios en bacterias. El cambio exitoso a la cepa Rosetta (DE3) confirma que el uso de tRNAs para codones raros es un factor determinante, tal como se documenta para proteínas heterólogas (Tegel et al., 2010). La detección de expresión basal en ausencia de IPTG, si bien es un fenómeno común en los sistemas basados en el promotor T7 debido a fugas transcripcionales (Studier & Moffatt, 1986), sugiere que el control de la expresión podría mejorarse en futuros trabajos mediante el uso de cepas con mayor represión basal o vectores más estrictos.

La purificación por IMAC resultó eficiente, logrando un enriquecimiento claro de la banda de ~53-55 kDa. Sin embargo, la distribución de la proteína en las diferentes fracciones eluidas sugiere que la afinidad de la etiqueta His₆ o las condiciones de lavado podrían ajustarse para lograr el mayor el rendimiento y pureza posibles. Este hallazgo coincide con lo reportado por Olin-Sandoval et al. (2012), quienes también observaron variabilidad en las fracciones de elución al purificar TryR recombinante.

Uno de los aspectos más relevantes fue la confirmación de la actividad catalítica. La mayor disminución de absorbancia en la fracción purificada respecto al extracto crudo demuestra que la proteína no solo se produjo en forma soluble, sino que conservó su plegamiento y

funcionalidad. La marcada diferencia en la velocidad de reacción entre 20 °C y 37 °C es particularmente interesante, ya que refleja el comportamiento esperado de una enzima adaptada a las condiciones fisiológicas del hospedero mamífero, donde *T. cruzi* debe resistir el ataque oxidativo del sistema inmune (Krauth-Siegel & Comini, 2008).

Aunque se observa una tendencia clara, el resultado no alcanzó niveles estadísticos significativos ($p = 0.095$). Esto puede atribuirse al número limitado de réplicas ($n=3$) y a la alta variabilidad de los ensayos enzimáticos con extractos biológicos. Esta situación, junto a las dificultades para determinar la actividad específica por la cinética rápida, representa la principal limitación del estudio y subraya la necesidad de optimizar el protocolo de medición en trabajos posteriores.

La obtención de TryR recombinante activa es clave. Al tratarse de una enzima esencial para la defensa antioxidante del parásito y ausente en mamíferos, representa un blanco terapéutico altamente selectivo (Fairlamb et al., 1985). Los estudios de control metabólico han demostrado que la inhibición de enzimas de esta vía puede tener un impacto significativo sobre la viabilidad del parásito (Olin-Sandoval et al., 2012).

Los resultados del presente trabajo proporcionan una plataforma experimental reproducible que servirá de base para evaluar en el futuro el potencial inhibidor de las series de nitrocompuestos que se están estudiando, contribuyendo al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas contra *Trypanosoma cruzi*.

CONCLUSIÓN

El presente trabajo permitió la expresión, purificación y evaluación preliminar de la actividad enzimática de la trypanothione reductase (TryR) recombinante de *Trypanosoma cruzi* en *Escherichia coli*. La validación del constructo plasmídico, la obtención de una proteína con el peso molecular esperado y la conservación de la actividad catalítica, evidenciaron que el sistema experimental empleado fue adecuado para la producción de TryR recombinante funcional.

Además, la purificación mediante cromatografía de afinidad permitió obtener un enriquecimiento significativo de la proteína de interés, mientras que los ensayos enzimáticos confirmaron la funcionalidad de la enzima recombinante. Estos resultados permitieron establecer una plataforma experimental reproducible para futuros estudios bioquímicos y de inhibición enzimática.

Debido al papel esencial de la TryR en el metabolismo redox de *Trypanosoma cruzi* y a la ausencia de un homólogo funcional en humanos, esta enzima constituye un blanco terapéutico altamente selectivo y prometedor. En conclusión, los resultados obtenidos permiten establecer una base experimental sólida para futuras investigaciones orientadas al diseño y evaluación de compuestos tripanocidas con potencial aplicación terapéutica para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

REFERENCIAS

- Augusto, A., Costa, I., Conceição, J., & Cristiano, M. L. S. (2025). Targeting Trypanothione Synthetase and Trypanothione Reductase: Development of Common Inhibitors to Tackle Trypanosomatid Disease. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 18(8), 1182. <https://doi.org/10.3390/ph18081182>
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 62(3), 293–300. <https://doi.org/10.1128/jb.62.3.293-300.1951>
- Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513–1523. <https://doi.org/10.1093/nar/7.6.1513>
- Bornhorst, J. A., & Falke, J. J. (2000). Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods in Enzymology*, 326, 245–254. [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, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Cucunubá, Z. M., Gutiérrez-Romero, S. A., Ramírez, J. D., Velásquez-Ortiz, N., Ceccarelli, S., Parra-Henao, G., Henao-Martínez, A. F., Rabinovich, J., Basáñez, M. G., Nouvellet, P., & Abad-Franch, F. (2024). The epidemiology of Chagas disease in the Americas. *Lancet regional health. Americas*, 37, 100881. <https://doi.org/10.1016/j.lana.2024.100881>
- De Marco A. (2025). Recent advances in recombinant production of soluble proteins in *E. coli*. *Microbial cell factories*, 24(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s12934-025-02646-8>
- De Rycker, M., Wyllie, S., Horn, D., Read, K. D., & Gilbert, I. H. (2023). Anti-trypanosomatid drug discovery: progress and challenges. *Nature reviews. Microbiology*, 21(1), 35–50. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00777-y>
- Fairlamb, A. H., Blackburn, P., Ulrich, P., Chait, B. T., & Cerami, A. (1985). Trypanothione: A novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science*, 227(4693), 1485–1487. <https://doi.org/10.1126/science.3883489>

- Gonzaga, B. M. S., Ferreira, R. R., Coelho, L. L., Carvalho, A. C. C., Garzoni, L. R., & Araujo-Jorge, T. C. (2023). Clinical trials for Chagas disease: Etiological and pathophysiological treatment. *Frontiers in Microbiology*, *14*, 1295017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1295017>
- González-Montero, M. C., Andrés-Rodríguez, J., García-Fernández, N., Pérez-Pertejo, Y., Reguera, R. M., Balaña-Fouce, R., & García-Estrada, C. (2024). Targeting trypanothione metabolism in trypanosomatids. *Molecules*, *29*(10), 2214. <https://doi.org/10.3390/molecules29102214>
- Gustafsson, C., Govindarajan, S., & Minshull, J. (2004). Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in Biotechnology*, *22*(7), 346–353. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.04.006>
- Hamilton, C. J., Saravanamuthu, A., Eggleston, I. M., & Fairlamb, A. H. (2012). Ellman's reagent: A convenient substrate for measuring trypanothione reductase activity. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *181*(2), 178–181. <https://doi.org/10.1042/BJ20021298>
- Hernández-Flores, A., Elías-Díaz, D., Cubillo-Cervantes, B., Ibarra-Cerdeña, C. N., Morán, D., Arnal, A., & Chaves, A. (2025). Fighting Strategies Against Chagas' Disease: A Review. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, *14*(2), 183. <https://doi.org/10.3390/pathogens14020183>
- Hochuli, E., Bannwarth, W., Döbeli, H., Gentz, R., & Stüber, D. (1988). Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. *Nature Biotechnology*, *6*(11), 1321–1325. <https://doi.org/10.1038/nbt1188-1321>
- İncir, İ., & Kaplan, Ö. (2024). *Escherichia coli* as a versatile cell factory: Advances and challenges in recombinant protein production. *Protein Expression and Purification*, *219*. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2024.106463>
- Krauth-Siegel, R. L., & Comini, M. A. (2008). Redox control in *Trypanosoma brucei* and other trypanosomatids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1780*(11), 1236–1248. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.03.006>
- Kourbeli, V., Chontzopoulou, E., Moschovou, K., Pavlos, D., Mavromoustakos, T., & Papanastasiou, I. P. (2021). An Overview on Target-Based Drug Design against Kinetoplastid Protozoan Infections: Human African Trypanosomiasis, Chagas Disease and

- Leishmaniases. *Molecules* (Basel, Switzerland), 26(15), 4629. <https://doi.org/10.3390/molecules26154629>
- Medina-Rincón, G. J., Gallo-Bernal, S., Jiménez, P. A., Cruz-Saavedra, L., Ramírez, J. D., Rodríguez, M. J., Medina-Mur, R., Díaz-Nassif, G., Valderrama-Achury, M. D., & Medina, H. M. (2021). Molecular and Clinical Aspects of Chronic Manifestations in Chagas Disease: A State-of-the-Art Review. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 10(11), 1493. <https://doi.org/10.3390/pathogens10111493>
- Mendes, F. S. N. S., Perez-Molina, J. A., Angheben, A., Meymandi, S. K., Sosa-Estani, S., & Molina, I. (2022). Critical analysis of Chagas disease treatment in different countries. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 117, e210034. <https://doi.org/10.1590/0074-02760210034>
- Nepomuceno de Andrade, G., Bosch-Nicolau, P., Nascimento, B. R., Martins-Melo, F. R., Perel, P., Geissbühler, Y., Demacq, C., Quijano, M., Mosser, J. F., Cousin, E., Machado, Í. E., Rodrigues, M. L. A. C., Ribeiro, A. L. P., & Molina, I. (2024). Prevalence of Chagas disease among Latin American immigrants in non-endemic countries: an updated systematic review and meta-analysis. *The Lancet regional health. Europe*, 46, 101040. <https://doi.org/10.1016/j.lanep.2024.101040>
- New England Biolabs. (s.f.). *NEBcutter* (Versión 3.0) [Software de computación]. <https://nc3.neb.com/NEBcutter/>
- Nunes, M. C. P., Dones, W., Morillo, C. A., Encina, J. J., & Ribeiro, A. L. (2013). Chagas disease: An overview of clinical and epidemiological aspects. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(9), 767–776. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.05.046>
- Ojima-Kato T. (2024). Advances in recombinant protein production in microorganisms and functional peptide tags. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 89(1), 1–10. <https://doi.org/10.1093/bbb/zbae147>
- Olin-Sandoval, V., Moreno-Sánchez, R., & Saavedra, E. (2012). Targeting trypanothione metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 181(1), 75–84. <https://doi.org/10.3390/molecules29102214>

- Ortega, C., Opezzo, P., & Correa, A. (2022). Overcoming the Solubility Problem in *E. coli*: Available Approaches for Recombinant Protein Production. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2406, 35–64. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1859-2_2
- Piñeyro, M. D., Arias, D., Parodi-Talice, A., Guerrero, S., & Robello, C. (2021). Trypanothione Metabolism as Drug Target for Trypanosomatids. *Current pharmaceutical design*, 27(15), 1834–1846. <https://doi.org/10.2174/138161282666620121115329>
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5, 172. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
- R Core Team. (2025). R: *A language and environment for statistical computing*. R Project for Statistical Computing. https://www.r-project.org/?utm_source=chatgpt.com
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://es.scribd.com/document/321016869/Molecular-Cloning-Sambrook-Russel-Vol-1-2-3>
- Studier, F. W., & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, 189(1), 113–130. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90385-2)
- Tegel, H., Tourle, S., Ottosson, J., & Persson, A. (2010). Increased levels of recombinant human proteins with the *Escherichia coli* strain Rosetta(DE3). *Protein Expression and Purification*, 69(2), 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2009.08.017>
- Teixeira, O., Lacerda, P., Froes, T. Q., Nonato, M. C., & Castilho, M. S. (2021). Druggable hot spots in trypanothione reductase: novel insights and opportunities for drug discovery revealed by DRUGpy. *Journal of computer-aided molecular design*, 35(8), 871–882. <https://doi.org/10.1007/s10822-021-00403-8>
- Wilkinson, S. R., & Kelly, J. M. (2009). Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 11, e31. <https://doi.org/10.1017/S1462399409001252>

- World Health Organization. (2026). *Chagas disease (American trypanosomiasis)*. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
- Zingales, B., & Bartholomeu, D. C. (2022). Trypanosoma cruzi genetic diversity: impact on transmission cycles and Chagas disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 117, e210193. <https://doi.org/10.1590/0074-02760210193>
- Zhang, Z. X., Nong, F. T., Wang, Y. Z., Yan, C. X., Gu, Y., Song, P., & Sun, X. M. (2022). Strategies for efficient production of recombinant proteins in Escherichia coli: Alleviating the host burden and enhancing protein activity. *Microbial cell factories*, 21(1), 191. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01917-y>