

120  
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACION DE PROTEASAS DE  
EPIMASTIGOTES DE *Trypanosoma cruzi*

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**B I O L O G O**  
**P R E S E N T A**  
**CARLOS SALVADOR NAVA SUSANA**

DIRECTOR DE TESIS: DRA. BERTHA ESPINOZA GUTIERREZ

MEXICO, D. F.

1997

FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

CARACTERIZACIÓN DE PROTEASAS DE EPIMASTIGOTES DE Trypanosoma cruzi

realizado por CARLOS SALVADOR NAVA TUSAÑA

con número de cuenta 8722188-4 , pasante de la carrera de BIOLOGÍA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis PROP. BERTHA ESPINOZA GUTIERREZ

Propietario

Propietario PROF. GABRIELA ROSAS SALGADO

Propietario

PROP. LILIAN YEPES MUIA

Suplente

M. en I. D. M. DE LONDOES VALENZUELA SANCHEZ

Suplente

DR. GUILLERMO SALGADO MALDONADO

Consejo Departamental de Biología

COORDINADOR DE BILOGIA

**Este trabajo fue realizado bajo la asesoría de la Dra. Bertha Espinoza en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.**

**Agradezco a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA, UNAM), por haberme otorgado una beca para la elaboración del presente trabajo. La investigación formó parte del proyecto con clave IN 211794.**

## INDICE

<b>RESUMEN</b>	1
<b>I. INTRODUCCION</b>	2
<b>I.1. Generalidades y epidemiología</b>	2
<b>I.1.1. Patología de la enfermedad de Chagas</b>	3
<b>I.1.2. Vectores de <i>Trypanosoma cruzi</i></b>	4
<b>I.2. Biología de <i>T. cruzi</i></b>	4
<b>I.2.1. Ciclo biológico de <i>T. cruzi</i></b>	4
<b>I.3. Mecanismos de transmisión</b>	6
<b>I.4. Heterogeneidad en <i>T. cruzi</i></b>	6
<b>I.5. Enzimas proteolíticas</b>	7
<b>I.5.1. Clasificación de las proteasas</b>	8
<b>I.5.2. Las proteasas de serina</b>	9
<b>I.5.3. Las proteasas de cisteína</b>	11
<b>I.5.4. Las proteasas de ácido aspártico</b>	13
<b>I.5.5. Las metaloproteasas</b>	14
<b>I.5.6. Proteasas en <i>T. cruzi</i></b>	14
<b>I.6. Justificación del proyecto</b>	17
<b>II. OBJETIVOS</b>	18
<b>III. MATERIAL Y METODOS</b>	19
<b>III.1. Cepas utilizadas de <i>Trypanosoma cruzi</i></b>	19
<b>III.2. Cultivo de epimastigotes</b>	20
<b>III.3. Separación del medio de cultivo</b>	20
<b>III.4. Separación de proteínas en geles de poliacrilamida bajo condiciones disociantes (SDS-PAGE)</b>	21

III.5. Detección de actividad proteolítica en los sobrenadantes de varias cepas de <i>T. cruzi</i>	21
III.6. Inhibición de proteasas	22
III.7. Actividad proteolítica a diferentes valores de pH	23
III.8. Detección de la cruzipafna en el sobrenadante de diferentes cepas de <i>T. cruzi</i> por medio de inmunoréplicas tipo Western	23
III.9. Elusión de proteasas de geles de poliacrilamida por difusión	24
III.10. Determinación de la cantidad de protefnas	24
<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>25</b>
IV.1. Detección de actividad proteolítica en el medio de cultivo	25
IV.2. Inhibición de proteasas	25
IV.3. Actividad en presencia de cistefna	28
IV.4. Actividad a diferentes valores de pH	28
IV.5. Presencia de la cruzipafna en el medio de cultivo de diferentes cepas de <i>T. cruzi</i>	34
IV.6. Elusión de las proteasas del gel nativo	34
<b>V. DISCUSION</b>	<b>38</b>
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>44</b>
<b>VII. PERSPECTIVAS</b>	<b>45</b>
<b>APENDICE I</b>	<b>47</b>

**APENDICE II**

**48**

**APENDICE III**

**49**

**REFERENCIAS**

**50**

## RESUMEN

Las proteasas son enzimas que catalizan el rompimiento de enlaces peptídicos y desempeñan un papel importante en el metabolismo de las proteínas. Además, la actividad de estas enzimas es necesaria para el proceso patológico desarrollado por los parásitos ya sea para evadir al sistema inmune o para contribuir en la penetración de células hospederas o en la reproducción de los parásitos. Se han realizado trabajos sobre proteasas en *Trypanosoma cruzi* pero aún no se conoce con precisión la función de estas enzimas en este parásito. En el presente trabajo se reporta la secreción *in vitro* de dos proteasas por epimastigotes de *T. cruzi*. Se trabajó con 13 cepas mexicanas provenientes de diferentes partes de la República Mexicana y 3 cepas sudamericanas; todas secretaban una proteasa de 40 kDa y la cepa NINOA del estado de Oaxaca secretaba, además, una proteasa de 60-70 kDa. Este hallazgo indica la heterogeneidad biológica que existe entre las cepas de *T. cruzi*. La actividad de la proteasa de 40 kDa es afectada por TLCK, E64, Leupeptina y O-Fenantrolina; además es activada por cisteína por lo que se le considera una proteasa de cisteína. Su actividad es más alta a pH 4 y es nula a pH 11. La actividad de la proteasa de 60-70 kDa es afectada por O-Fenantrolina, EDTA y TLCK; no es activada por cisteína por lo que es probable que sea una metaloproteasa. Esta enzima es activa a pH ácido o básico sin diferencias significativas en sus niveles de actividad. Las características de la proteasa de 40 kDa son similares a la cruzipaina y anticuerpos policlonales dirigidos contra la cruzipaina reconocen una proteína de 40 kDa que es secretada por los epimastigotes. Sin embargo, aún no se puede afirmar que se trate de la misma enzima. Al intentar purificar la proteasa de 60-70 kDa se obtuvo por elusión de geles de poliacrilamida una proteína de 60 kDa pero sin actividad proteolítica.

# LINTRODUCCION

## I.1. Generalidades y epidemiología

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana descrita en 1909 por Carlos Chagas ha causado muchos problemas en Sudamérica -incluso se han reportado casos en el Caribe y en el sur de los E.U.A., además de México. La OMS señala que hay cerca de 20 millones de personas infectadas y están expuestas unos 90 millones en toda América Latina (OPS, 1990).

El ambiente ideal para que el parásito protozoario hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, causante de la tripanosomiasis, se establezca y en consecuencia se extienda la infección es el siguiente: casas de adobe con techo de palma, chiqueros, gallineros, paredes hechas de palos, personas, cerdos, gallinas y perros conviviendo estrechamente; escasez de agua, hábitos de limpieza casi inexistentes y ... la ignorancia.

A pesar de que este es un ambiente muy común en México no se han reportado muchos casos de la Enfermedad de Chagas en el país desde que Mazzotti en 1940 reportó los primeros casos de este padecimiento. Hasta 1995 se han reportado alrededor de 300 casos humanos de infección por *T. cruzi* siendo Oaxaca y Jalisco los estados con mayor número de casos de infección reportados. Además, de 1961 a 1995, sólo se registraron 116 casos humanos de la enfermedad de Chagas diagnosticados etiológicamente o por el estudio de biopsias. La miocarditis es la patología, causada por este parásito, que se presenta con mayor frecuencia en Oaxaca, Jalisco y Guerrero. Sin embargo, se han encontrado índices muy elevados de serología positiva lo que podría indicar la transmisión activa de la tripanosomiasis en los estados mencionados anteriormente además de Querétaro y Puebla (Sánchez, 1996).

En México se han realizado varios trabajos sobre la virulencia de las cepas mexicanas de *T. cruzi* (Tay y cols., 1973; López, 1994), los reservorios del parásito (Aguirre-Pequeño, 1947; Velasco-Castrejón y cols., 1970; Tay y cols., 1979) e incluso la distribución geográfica de los vectores mexicanos (Mazzotti, 1936; Mazzotti, 1937; Mazzotti, 1962; Tay y Biagi, 1984). Sin embargo, aún no se conoce realmente la magnitud del problema; no se ha podido responder cuántos enfermos hay, cuántos infectados y cuántas personas están potencialmente en peligro de infectarse en todo el país. Aunque se han realizado varios trabajos epidemiológicos (Goldsmith y cols., 1978; Goldsmith y cols., 1983; Goldsmith y cols., 1985; Velasco-Castrejón y Guzmán-Bracho, 1986) aún hacen falta más que consideren gran parte del territorio nacional.

#### **1.1.1. Patología de la enfermedad de Chagas**

La Enfermedad de Chagas frecuentemente es letal debido a que causa graves problemas cardíacos y trastornos en colon y esófago que ocasionan una pobre calidad de vida en aquellos que la padecen. Se consideran 3 fases en el desarrollo de la enfermedad: fase aguda, fase indeterminada y fase crónica. La fase aguda, que es la fase inicial de la infección, se caracteriza por alta parasitemia sanguínea e inflamación en el sitio de entrada del parásito (chagoma); algunas veces se presenta fiebre y vómito; después de 1 o 2 meses baja la parasitemia por la respuesta inmune y los pacientes ingresan en la fase indeterminada que se caracteriza por ser casi asintomática (se puede presentar inflamación o leve fibrosis cardíaca); la duración de esta fase es indeterminada, puede ser un período de maduración de los síntomas característicos de la fase crónica, como resultado de una probable respuesta autoinmune. En la fase crónica se afecta el corazón y el tracto digestivo por la destrucción de los nervios circundantes a estos órganos y por la invasión parasítica de las células del músculo cardíaco y de otros músculos; estas anomalías provocan la muerte en el 60-70% de pacientes con la enfermedad de Chagas (Talle y Snary, 1993).

### **1.1.2. Vectores de *Trypanosoma cruzi***

*T. cruzi* es transmitido por insectos hematófagos de la familia Reduviidae principalmente de los géneros *Triatoma* y *Rhodnius*. *Triatoma barberi* es señalado como el vector principal de la enfermedad en México; Salazar y cols., 1988. Sin embargo, se calcula que existen más de 32 especies de vectores (Velasco-Castrejón, 1992).

### **1.2. Biología de *T. cruzi***

*T. cruzi* pasa por 3 estadios principales durante su ciclo de vida: epimastigote, tripomastigote y amastigote.

**Epimastigotes.** Tienen el cinetoplasto en posición anterior al núcleo, son fusiformes y miden de 20 a 40µm de longitud. Se localizan en el intestino medio de reduvidos en donde se multiplican y se mantienen ahí durante toda la vida del insecto; es decir, que el insecto es potencialmente capaz de transmitir la infección durante sus etapas larvaria y adulta.

**Tripomastigotes.** Tienen el cinetoplasto en la parte posterior en relación al núcleo y miden aproximadamente 20µm de longitud y 2µm de amplitud. Cuando están presentes en hospederos mamíferos se les localiza intracelularmente en tejidos y extracelularmente en el torrente sanguíneo y cuando están en las chinches holicomas, como popularmente se les conoce a estos reduvidos, se encuentran extracelulares en el intestino posterior.

**Amastigotes.** Son redondeados y poseen un flagelo corto; se multiplican por fisión binaria dentro de las células hospederas del mamífero (Pereira, 1990).

#### **1.2.1. Ciclo biológico de *T. cruzi***

El ciclo inicia cuando un insecto infectado con *T. cruzi* pica a un hospedero mamífero; cuando el insecto se está alimentando los tripomastigotes pueden salir de la chinche en las heces u orina y pueden ingresar al nuevo hospedero a través de escoriaciones en la piel o

partes mucosas. Existe entonces la posibilidad para el parásito de infectar células circundantes a través de varios mecanismos, como por ejemplo los siguientes: interacción de una glicoproteína de 85 kDa de *T. cruzi* con la fibronectina de la célula (Pereira, 1990); o a través de una glicoproteína de 60 kDa que une heparina -promoviendo la adhesión y penetración de tripomastigotes, (Ortega-Barria y Pereira, 1991); intervención del componente C1q del complemento, que al adherirse al tripomastigote le ayuda a invadir células con receptores para C1q (Rimoldi y cols., 1989); o de las integrinas  $\beta 1$ , un tipo especial de glicoproteínas membranales de la célula hospedera (Fernández y cols., 1993). Además los tripomastigotes pueden evadir al sistema inmune del hospedero: los tripomastigotes expresan una proteína con función similar al DAF (Factor de aceleración del decaimiento) que limita la activación de la vía alterna del complemento acelerando el decaimiento de las convertasas C3 y C5 en la superficie del parásito (Joiner y cols., 1986; Rimoldi y cols., 1988; Hall y Joiner, 1993). Por otro lado, *T. cruzi* cuenta con un complejo proteínico con función de Transilidasa y Neuraminidasa que ha sido propuesto para promover de una manera compleja la unión de los parásitos a la célula hospedera y la evasión del ataque de enzimas lisosomales del hospedero en acción conjunta con una enzima del parásito con función similar al elemento C9 del complemento (Andrews y cols., 1990; Hall y Joiner 1993; Vermelho y Meirelles, 1994).

Dentro de la célula los tripomastigotes se diferencian en amastigotes algunos de los cuales son capaces de multiplicarse por fisión binaria y de rediferenciarse en tripomastigotes que ahora pueden dejar la célula infectada para iniciar un nuevo ciclo en las células vecinas o pueden ingresar al torrente sanguíneo con la posibilidad de propagar la infección a diferentes partes del cuerpo. Los tripomastigotes pueden ser ingeridos por las chinches cuando éstas se alimenten de la sangre del hospedero; dentro del insecto los tripomastigotes se transforman en epimastigotes pocas horas después de la ingestión (García y Azambuja, 1991). Los epimastigotes migran al intestino medio donde se multiplican para después trasladarse al intestino posterior en donde se adhieren a las

glándulas rectales; los epimastigotes adheridos se diferencian en tripomastigotes mediante un proceso conocido como metacicloénesis en el que al parecer intervienen factores como: una glicoproteína de 72 kDa, que está altamente glicosilada, interactúa con la lectina del intestino del insecto (Pereira, 1990); un péptido derivado de hemoglobina indirectamente activa la diferenciación (Fraidtenraich y cols., 1993) y probablemente intervengan proteasas. Los tripomastigotes metacíclicos pueden ser excretados en las heces durante una nueva ingesta de sangre.

### **1.3. Mecanismos de transmisión**

La vía principal de transmisión de la enfermedad es a través de las excretas de los vectores, que contaminan la piel y sus partes mucosas, cuando éstos se están alimentando. Existen otros mecanismos de importancia: vía transplacentaria, trasplante de órganos y tejidos, leche materna, accidentes de laboratorio, desollamiento de animales silvestres, ingesta de carne parasitada no muy bien cocida o de bebidas contaminadas con materia fecal de triatomas (Velasco-Castrejón y cols., 1992). La donación de sangre de personas infectadas con *T. cruzi* está adquiriendo notable importancia ya que constituye el segundo mecanismo de transmisión y es la causa de aproximadamente el 20% de los casos de personas infectadas con el parásito (Velasco-Castrejón y cols., 1991).

### **1.4. Heterogeneidad en *T. cruzi***

El estudio y control de la Enfermedad de Chagas se ha complicado por la diversidad en las características biológicas que presentan las diferentes cepas y aislados de *T. cruzi* que se ven reflejadas en el tropismo celular, infectividad, patogenicidad (Giovanni de Simone y cols., 1987), capacidad de transformación de epimastigotes a tripomastigotes (metacicloénesis), crecimiento, virulencia e infección *in vitro* (López, 1994) e *in vivo*

(González y cols., 1995). Además se han observado diferencias en otras características: polimorfismo en la expresión de una proteína de 72 kDa que está presente tanto en tripomastigotes como en epimastigotes (Pereira, 1990); algunas diferencias en la interferencia sobre el metabolismo celular de mioblastos *in vitro* también están relacionadas con las cepas de *T. cruzi* (citado en Morris y cols., 1991).

Por otro lado se han encontrado patrones isoenzimáticos (zimodemos) al analizar cepas provenientes de varios países que demuestran una notable variabilidad genética entre ellas (Tibayrec y Ayala, 1988). Al analizar aislados de *T. cruzi* de distintas partes de México y Sudamérica se demostró la heterogeneidad existente a nivel genético al analizar DNA total, encontrando grupos muy bien delimitados de aislados del parásito que correlacionan con el origen geográfico de tales aislados (Zavala-Castro y cols., 1992).

Otras diferencias entre las cepas de *T. cruzi* se han encontrado en la expresión de proteasas. Se ha observado que la expresión de algunas metaloproteasas varía entre las cepas y estadios del parásito (Lowndes y cols., 1996). Además, se han encontrado isoformas génicas de la cruzipaina que es la proteasa principal de cisteína de *T. cruzi*, que podría indicar que cada isoforma interviene en etapas distintas durante el desarrollo del parásito (Lima y cols., 1994).

### **1.5. Enzimas proteolíticas**

Tradicionalmente las enzimas proteolíticas han sido vistas como enzimas "destructivas" capaces de sólo dividir proteínas en péptidos pequeños y aminoácidos y cuyo papel es digerir proteínas nutritivas o participar en el recambio de las proteínas celulares. Esto es cierto en las proteasas mejor caracterizadas, tales como las enzimas digestivas tripsina, quimiotripsina y pepsina y las enzimas lisosomales Cathepsina B y D. Sin embargo, recientemente se han reunido evidencias que demuestran que la proteólisis tiene un papel clave en diversos procesos celulares. La habilidad de las enzimas proteolíticas para

modificar selectivamente a las proteínas por rompimiento de enlaces específicos, como por ejemplo, en la activación de hormonas, les confiere una función regulatoria. Como resultado del descubrimiento de más procesos proteolíticos específicos y el uso de sustratos más selectivos, cada vez más proteasas están siendo detectadas en todos los tipos de organismos (North, 1982).

La proteólisis puede intervenir en varias etapas durante la morfogénesis y diferenciación en los organismos. Puesto que el cambio de estadio frecuentemente ocurre como resultado de la inanición, la degradación de proteínas no esenciales es fundamental en el abastecimiento de aminoácidos para la síntesis de proteínas *de novo*. La actividad de las proteasas también puede ser necesaria para la inactivación selectiva de proteínas específicas de una determinada fase de crecimiento no requeridas durante la siguiente etapa del desarrollo y para la activación y modificación de otras que sí son requeridas. Otros procesos celulares en los cuales intervienen las proteasas son la reorganización del citoesqueleto, la síntesis de proteínas, corte de péptidos señal, control de la presión sanguínea, coagulación de la sangre, la defensa inmunológica, etc. (Branden y Tooze, 1991).

La degradación o procesamiento de proteínas también puede intervenir en diversas formas en la patogénesis provocada por los microorganismos, por ejemplo en la penetración del organismo hospedero, en el enfrentamiento con los mecanismos de defensa del hospedero y en la nutrición durante la infección, por lo tanto, el estudio de las enzimas proteolíticas puede ser invaluable para el entendimiento de la patogénesis y puede abrir nuevas expectativas en la búsqueda de mecanismos de control de los patógenos (North, 1982).

### **1.5.1. Clasificación de las proteasas**

Las proteasas que requieren la presencia de grupos amino o carboxilo terminales se les denomina exoproteinasas, mientras que aquellas que catalizan el rompimiento de un

enlace peptídico no terminal son llamadas endopeptidasas o proteinasas. Sobre la base del mecanismo catalítico que está intrínsecamente relacionado con los grupos químicos importantes en su sitio activo Hartley en 1960 separó a las proteasas en cuatro clases principales (citado en Barret, 1986): proteasas de serina, que presentan residuos de Ser e His en su sitio catalítico, proteasas de cisteína, que presentan residuos de Cys e His, proteasas de ácido aspártico que usan en su proceso catalítico dos residuos ácidos y metaloproteasas que utilizan un ión metálico y un residuo de Glu en su mecanismo de acción (McKerrow, 1989, Pólgar, 1989).

### **1.5.2. Las proteasas de serina**

El grupo de las proteasas de serina muestra un pH óptimo de 7.5 a 8. Está formado por dos familias: la familia de la Quimiotripsina (que incluye a la tripsina, la elastasa de leucocitos, enzimas de coagulación, la trombina y a las endopeptidasas A y B de *Streptomyces griseus*, entre otras) y la de la Subtilisina (algunos de sus miembros son: la endopeptidasa K, la endopeptidasa de *Vibrio*, la elastasa de *Bacillus*, la cucumisina, etc.); estas dos familias conservan la tríada catalítica compuesta por los residuos de Asp, His y Ser y por lo tanto su mecanismo de reacción es el mismo; sin embargo, la secuencia polipeptídica y los patrones de plegamiento son muy diferentes entre las dos familias.

El mecanismo de reacción de las proteasas de serina se puede resumir en dos pasos:

- 1) La formación del complejo enzima-sustrato cuando un carbono del sustrato forma un enlace covalente con el grupo hidroxilo del residuo de Ser del sitio catalítico de la enzima. Se forma entonces un estado de transición intermedio donde los enlaces del carbono poseen una geometría tetrahédrica. Por medio de dicho estado de transición se forma un intermediario acilo, proceso conocido como acilación (Figura 1). En este paso se libera un producto peptídico, mientras que el resto del péptido se mantiene unido al intermediario acilo de la enzima.

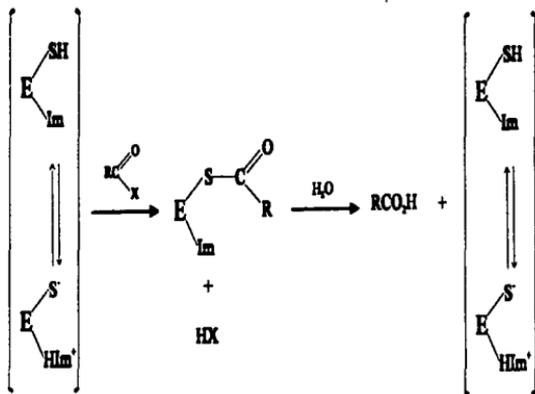


Figura 2. Mecanismo de reacción de las proteasas de cisteína. SH representa el grupo tiol de la cisteína; Im representa el grupo imidazol de la histidina. RCOX representa al sustrato.

2) El siguiente paso llamado desacilación consiste en que el intermediario acil-enzima es hidrolizado por una molécula de agua, de manera que se libera el segundo péptido con un extremo carboxilo y se regenera el grupo hidroxilo de la serina (Figura 1). El residuo His de la tríada catalítica es capaz de aceptar un protón durante la formación del estado de transición tetrahédrico. El residuo Asp de la misma tríada permanece cargado negativamente y estabiliza a la His cargada positivamente durante el estado de transición (Kraut, 1988; Branden y Tooze, 1991).

### **1.5.3. Las proteasas de cisteína**

Las proteasas de cisteína son activas a pH's ligeramente ácidos aunque algunas funcionan en pH's definitivamente ácidos. Existen dos familias de proteasas de cisteína, una de ellas es la de la papaína (la papaína es extraída de *Carica papaya*, además esta familia incluye a las catepsinas B, H, L y S, la ficina, la actinidina y varias proteasas de plantas y protozoarios) y la otra es la de las calpaínas o proteasas de cisteína dependientes de calcio (incluye a las endopeptidasas de cisteína de *Streptococcus* y la clostripaina); existen proteasas de cisteína provenientes de virus que no han sido clasificadas dentro de estas familias (Barret y Rawlings, 1991).

Las proteasas de cisteína han sido detectadas en la mayoría de los grupos de protozoarios parásitos. Las enzimas tienen alta actividad en al menos un estado del ciclo de vida, frecuentemente en el estado presente en el hospedero mamífero. Se conoce poco acerca de sus substratos blanco, así que las funciones específicas de estas enzimas sólo pueden ser deducidas tomando en cuenta factores tales como distribución subcelular, pH óptimo y aparición durante la diferenciación celular; la especificidad de las proteasas es determinada en parte por la secuencia aminoacídica de los substratos sintéticos.

El sitio activo de las proteasas de cisteína está formado por un grupo cistein-sulfhidril catalíticamente activo en la Cys 25 (según numeración de la papaína) y un grupo histidin-imidazol en la His 159. La catálisis procede a través de la formación temporal de un



grupo tiol éster entre el sustrato y una cisteína de la enzima (intermediario tetrahédrico); el oxígeno del tiolato de la cisteína ataca nucleofílicamente al átomo de carbono del grupo carbonilo del sustrato; el residuo de His actúa como base formando un puente con el protón del grupo tiolato que está libre; posteriormente el tioléster temporal se rompe por la transferencia del protón (capturado por el imidazol), al grupo amino del sustrato que al protonarse se convierte en grupo saliente y la cisteína se acila; el último paso es la desacilación que utiliza moléculas de agua para aumentar la nucleofilicidad con la ayuda del grupo imidazol (Figura 2; Brocklehurst, 1987). Para alcanzar la actividad máxima las proteasas de cisteína requieren un agente como el ditioneitol (DTT) para mantener la cisteína del sitio activo en su forma reducida; este tipo de proteinasas tienden a tener poca especificidad con respecto a las secuencias polipeptídicas, pero frecuentemente muestran preferencia por arginina en la posición P1 (North y cols., 1990).

#### **1.5.4. Las proteasas de ácido aspártico**

Las proteasas de aspártico son más activas a pH's ácidos ya que su actividad catalítica depende de la existencia en la molécula de dos grupos carboxilo. Estos grupos son un par de residuos de ácido aspártico, Asp 32 y Asp 215 (según numeración de la pepsina) que se encuentran en dos segmentos polipeptídicos muy similares. Los dos grupos carboxilo están lo suficientemente cercanos el uno del otro como para compartir un puente de hidrógeno entre dos de sus oxígenos. Las proteasas de aspártico al igual que las metaloproteasas, no forman un intermediario covalente entre la enzima y el sustrato y actúan eficientemente en los enlaces peptídicos que se forman entre dos aminoácidos hidrofóbicos voluminosos como es el caso de Leu-Tyr, Tyr-Leu, Phe-Phe y Phe-Tyr (Barret, 1986).

Existe sólo una familia de estas proteasas que incluye a la pepsina, la gastricina, la renina, las catepsinas D y E y algunas proteasas de hongos. Además existen proteasas de aspártico provenientes de virus que no tienen familia definida (Barret y Rawlings, 1991).

### **1.5.5. Las metaloproteasas**

Las metaloproteasas necesitan un metal para su mecanismo de acción; son enzimas hidrolíticas que al igual que las proteasas de aspártico no forman un intermediario covalente. En su forma natural tienen como metal catalíticamente activo al zinc, aunque algunos otros metales de transición pueden sustituirlo; muestran una actividad máxima a pH 7. La metaloproteasa mejor caracterizada es una termolisina de *Bacillus thermoproteolyticus*; su sitio activo posee un átomo de zinc unido a dos cadenas laterales de His y una de Glu. Existe sólo una familia de estas proteasas que es la de la termolisina que incluye, además, a la bacilolisina, la elastasa de *Pseudomonas*, la colagenasa intersticial, la colagenasa de neutrófilos y las gelatinasas A y B, entre otras. Además, existen metaloproteasas que no tienen familia definida como las colagenasas microbianas, las metalopeptidasas  $\beta$ -líticas, la proteasa D de levadura y la metaloendopeptidasa de membrana, entre otras (Barret y Rawlings, 1991).

En el mecanismo de reacción de la termolisina, el zinc actúa como un catalizador electrofílico para polarizar el grupo carbonilo del sustrato y estabilizar la carga negativa del oxígeno del mismo radical. El residuo de ácido glutámico en la posición 143 promueve el ataque de una molécula de agua sobre el grupo carbonilo que ha sido polarizado por el ión de zinc; por otro lado, His 231 dona protones al grupo saliente (Fersht, 1985).

### **1.5.6. Proteasas en *T. cruzi***

La existencia de aminoácidos libres presentes en el protoplasma de *T. cruzi* tales como: prolina, glicina, ácido glutámico y L-alanina que pueden utilizarse para la síntesis de proteínas o para la producción de energía indica que ellos son probablemente resultado de la proteólisis de proteínas exógenas o endógenas o que podrían ser absorbidos directamente del medio que los rodea (Cazzulo, 1992). La actividad proteolítica es de suma importancia en el metabolismo de los epimastigotes debido a que éstos cambian de

fuerza de energía durante su crecimiento; en la fase exponencial de su crecimiento degradan glucosa para obtener energía pero en la fase estacionaria utilizan preferentemente aminoácidos como recurso energético (Cazzulo y cols., 1985); igualmente los tripomastigotes metacíclicos utilizan proteínas y aminoácidos para obtener energía (Cazzulo, 1992); los amastigotes utilizan preferentemente glucosa (Engel y cols., 1987).

Han aparecido varios reportes de actividad proteolítica en los diferentes estadios de *T. cruzi* desde los trabajos de Itow y Camargo (1977) y Avila y colaboradores (1979). Hasta el momento tres proteinasas del grupo de las proteinasas de cisteína han sido estudiadas con mayor profundidad; una de ellas tiene un peso molecular de 200 kDa e hidroliza *in vitro* benzoyl-arginina -p-nitroanilido (BAPA) a pH alcalino (Bongertz y Hungerer, 1978), es probable que esta enzima sea la misma que reportó Ashall en 1990; las otras dos tienen un peso molecular estimado de 60 kDa (Rangel y cols., 1981; Bontempi y cols., 1984) y presentan diferencias en la especificidad de sustrato y de inhibidores por lo que se cree que se trata de dos enzimas diferentes.

Una de las proteinasas de 60 kDa ha sido ampliamente estudiada, se trata de una glicoproteína con alta cantidad de carbohidratos 10 % de manosas (Cazzulo y cols., 1989; Cazzulo y cols., 1990a) y tiene 3 sitios potenciales de N-glicosilación lo que explica el porqué esta enzima que tiene un peso molecular de 36.3 kDa calculado a partir de su secuencia aminoácídica, aparece en algunos reportes con un peso molecular que va de 40 a 60 kDa (Martínez y Cazzulo, 1992); además, muestra alta homología en su extremo N-terminal con la papaina y la catepsina L (Cazzulo y cols., 1989; Eakin y cols., 1990). Esta enzima, a la que se le ha propuesto el nombre de cruzipaina o cruzafina (Cazzulo y cols., 1990b), es la proteína principal de cisteína de *T. cruzi*, además es el antígeno principal presente en humanos infectados (Scharfstein y cols., 1986; Murta y cols., 1990). La cruzipaina se localiza principalmente en lisosomas pero también se le encuentra en la superficie de epimastigotes, amastigotes y bolsa flagelar de tripomastigotes (Campetella y

cols., 1990; Souto-Padrón y cols., 1990). En epimastigotes los niveles detectados de actividad enzimática son más altos que en amastigotes y tripomastigotes lo que sugiere que la expresión de la enzima es regulada durante el desarrollo del parásito (Campetella y cols., 1990). Por otro lado, la cruzipafina es blanco de investigaciones encaminadas en la búsqueda de una droga específica para *T. cruzi* que sea inocua para el humano (Mckerrow y cols., 1995).

Además de estas proteasas de cisteína, se reportó recientemente una proteasa de 55/60 kDa que al parecer es secretada por tripomastigotes, pero aún falta caracterizar a esta enzima y establecer si se trata de una proteína distinta a las que ya están caracterizadas (Yokoyama-Yasunaka y cols., 1994). También, han surgido evidencias -por análisis de comparación de secuencias de DNA- de la presencia de una proteasa de serina (Sakanari y cols., 1989) y de una metaloproteína que presenta semejanza con una proteasa de *Leishmania sp* (Grieg y Ashall, 1990).

Se han reportado varios trabajos donde las proteasas de *T. cruzi* juegan un papel importante en la biología del parásito: algunas intervienen en la replicación de los amastigotes (Harth y cols., 1993); existen evidencias que demuestran su influencia en el proceso de transformación de amastigote a tripomastigote (Harth y cols., 1993; Meirelles y cols., 1992); se ha observado que durante la metacicloogénesis varía la expresión de proteasas del parásito (Bonaldo y cols., 1991); también se sugiere la participación de proteasas en la adhesión e infección a fibroblastos (Piras y cols., 1985); asimismo, al inhibir tales proteasas con inhibidores químicos o tratarlas con anticuerpos monoclonales monoespecíficos se encontró que disminuía significativamente la ingestión de parásitos por macrófagos y células musculares de corazón (Meirelles y cols., 1992; Souto-Padrón y cols., 1990). Por otro lado los tripomastigotes pueden romper moléculas de IgG unidas a la membrana desprendiendo la parte Fc y quedándose sólo con la parte Fab, este proceso podría ayudarles a pasar inadvertidos al circular por el organismo del hospedero (citado en Pereira, 1990).

## 1.6. Justificación del proyecto

Como ya se ha revisado las proteasas de *T. cruzi* están involucradas en varios procesos metabólicos y, por lo tanto, parecen ser muy importantes para el parásito; ya sea que intervengan en el desarrollo de los mecanismos patogénicos que desencadenan la enfermedad de Chagas en el hospedero mamífero o para establecerse en el intestino de los vectores. Así que, su estudio es crucial para conocer más detalladamente la biología del parásito.

Por otro lado, existe la posibilidad que algunas proteasas sean secretadas al medio para facilitar su labor en la nutrición del parásito o en los procesos de adhesión e invasión de células hospederas. Por ejemplo, la cruzipafna se localiza principalmente en lisosomas lo que sugiere su función digestiva; sin embargo, también se le localiza en la superficie de todos los estadios del parásito (Campetella y cols., 1990; Souto-Padrón y cols., 1990), así que, es probable que la cruzipafna sea liberada de la membrana celular para contribuir más eficientemente en la nutrición del parásito.

La importancia de estudiar este tipo de enzimas en la fase de epimastigote en *T. cruzi* radica en la facilidad de su manejo y en la posibilidad de extrapolar estos análisis a la fase de tripomastigote para contribuir en la búsqueda de mecanismos de control de la enfermedad de Chagas.

## **II. OBJETIVOS**

### **II.1. Objetivo General:**

**Caracterizar bioquímicamente las proteasas secretadas por epimastigotes de diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*.**

### **II.2. Objetivos particulares:**

- Buscar proteasas liberadas al medio de cultivo por epimastigotes de *T. cruzi*.
- Determinar a que familia proteolítica pertenecen dichas proteasas de acuerdo al tipo de inhibidores que las afectan.
- Determinar algunas condiciones que favorezcan la actividad de estas proteasas (pH y presencia de agentes reductores).
- Determinar si existe la cruzipaina en los medios de cultivo de epimastigotes de *T. cruzi*.

### III. MATERIAL Y METODOS

#### III.1. Cepas utilizadas de *Trypanosoma cruzi*

Se emplearon distintas cepas de *T. cruzi* provenientes de varios estados de la República Mexicana y de Brasil aisladas de vectores, reservorios y de humanos infectados (Tabla I).

TABLE I. Cepas de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* cultivados *in vitro*

NOMBRE	PROCEDENCIA	ORIGEN
C4	JALISCO	<i>Triatoma barberi</i> (v)
EA	MORELOS	humano
ZACATECAS	ZACATECAS	humano
CID	OAXACA	humano
NINOA	OAXACA	humano
H1	YUCATAN	humano
H3	YUCATAN	humano
H5	YUCATAN	humano
H9	YUCATAN	humano
H10	YUCATAN	humano
HG	YUCATAN	humano
Z21	YUCATAN	<i>Didelphis marsupialis</i> (r)
QRO	QUERETARO	humano
Y	BRASIL	humano
SILVIO X10	BRASIL	humano
CL 1	BRASIL	humano

v: vector r: reservorio

### **III.2. Cultivo de epimastigotes**

Epimastigotes de diferentes cepas de *T. cruzi* fueron cultivados en medio LIT (Liver Infusion Tryptose) con la siguiente composición por litro: 4g de NaCl, 0.4g de KCl, 8g de  $\text{NaHPO}_4$ , 2g de glucosa, 5g de Triptosa (DIFCO) y 5g de Caldo de infusión de hígado (DIFCO); ajustado a pH 7.2 y complementado con 25  $\mu\text{g/ml}$  de hemina (SIGMA) y 10% de suero fetal de bovino (SFB; GIBCO) previamente inactivado a 56°C durante 30 min. Cultivos de 5 ml de volumen inicial fueron incubados a 28°C. Con el propósito de aumentar el volumen del cultivo, a los 7 días de iniciada la incubación (tiempo aproximado que comprende las dos etapas del crecimiento de epimastigotes: fase exponencial y fase estacionaria) se tomaron los 5 ml del cultivo, se mezclaron con 45 ml de medio LIT enriquecido con hemina y SFB y nuevamente se incubaron durante 7 días a 28°C. Finalmente se mezclaron estos 50 ml con 250 ml de medio LIT enriquecido y se incubó en las mismas condiciones para obtener al cabo de una semana, un cultivo total de 300 ml.

### **III.3. Separación del medio de cultivo**

Los cultivos de 300 ml se centrifugaron a 654 g durante 10 min a 4°C desechando el sobrenadante; los botones de parásitos fueron lavados dos veces como sigue: se resuspendieron con 200 ml de medio LIT más hemina sin suero y nuevamente se centrifugaron a 654 g durante 10 min a 4°C y se retiraron los sobrenadantes. El procedimiento descrito se realizó para eliminar la presencia de proteínas del SFB en el medio de cultivo. Los botones obtenidos en el último lavado se resuspendieron en un volumen determinado de medio LIT más hemina de tal manera que los parásitos quedaron en una concentración de  $1 \times 10^9$  parásitos/ml. Después de realizado este ajuste los cultivos se incubaron durante 1 h a 4°C. Para obtener las proteínas liberadas por los epimastigotes al medio de cultivo, se centrifugaron los cultivos a 654 g durante 10 min, se tomaron los

sobrenadantes y éstos fueron centrifugados a 14 243 g durante 30 min, se recuperaron los sobrenadantes resultantes y se almacenaron a -20°C.

Antes de iniciar el proceso descrito y al término del mismo, los cultivos fueron revisados para asegurar que estuvieran libres de contaminación. Se contó el número de parásitos/ml para realizar el ajuste a  $1 \times 10^9$  parásitos/ml y para asegurarse que los epimastigotes segufan vivos.

#### **III.4. Separación de proteínas en geles de poliacrilamida bajo condiciones disociantes (SDS-PAGE)**

En geles de poliacrilamida al 10%, utilizando el sistema de amortiguadores discontinuos de Laemmli (1970) y la técnica y equipo de Bio-Rad (Apéndice I), se analizaron muestras del sobrenadante producto de la incubación de los epimastigotes durante 1h a 4°C. Posteriormente se utilizó la técnica de tinción con plata de Bio-Rad (Apéndice II) para detectar la presencia de proteínas del sobrenadante en los geles.

#### **III.5. Detección de actividad proteolítica en los sobrenadantes de varias cepas de *T. cruzi***

En geles de poliacrilamida al 11% con 0.1% de gelatina copolimerizada utilizada como sustrato (Apéndice III) se analizaron muestras de los sobrenadantes de varias cepas de *T. cruzi* para detectar la presencia de proteasas en un sistema de electroforesis (Heussen y Dowdle, 1980). Las muestras se diluyeron en proporción 1:2 con amortiguador para muestras de Laemmli: TRIS 0.125 M, SDS (dodecil sulfato de sodio) 0.07 M, 20% (v/v) de glicerol, 0.001% (p/v) de Azul de bromofenol, todo lo anterior disuelto en agua desionizada a pH 6.8 sin  $\beta$ -mercaptoctanol (agente reductor); posteriormente, las muestras se incubaron 10 min. La electroforesis se llevó a cabo a 130 V durante 4 h a 4°C. Después de la separación electroforética los geles se trataron con Tritón X-100 al 2.5% (v/v) durante 1 h a temperatura ambiente (el tritón se utilizó para eliminar el SDS

del gel) y se incubaron durante 2 h en un amortiguador de digestión de glicina 0.1 M, pH 8.3 a 37°C. Finalmente los geles fueron teñidos con una solución de **Amido Black** al 0.1%, metanol al 30% y 10% de ácido acético durante 1 h y desteñidos con una solución de metanol al 30% y ácido acético al 10%.

### III.6. Inhibición de proteasas

Para conocer el tipo de proteasas detectadas se utilizaron inhibidores catalíticos de proteasas (SIGMA): **Bestatina** ((2S, 3R)-3-amino-2-hidroxi-4-fenilbutanoil-L-leucina) que afecta peptidasas de serina; **E64** (trans-Epoxy succinil-L-Leucilamido-[4-guanidino]-Butano) que actúa sobre proteasas de cisteína; **EDTA** (ácido etilendiaminotetraacético) para metaloproteasas; **Leupeptina** afecta proteasas de serina y de cisteína; **Pepstatina A** (ácido Isovaleryl-Val-Val-Sta-Ala-Sta-4-amino-3-hidroxi-6-metilheptanoico) para proteasas con ácido aspártico; **O-Fenantrolina** para metaloproteasas; **PMSF** (Fluoruro de fenilmetilsulfonilo) afecta a proteasas de serina; **TLCK** (1-cloro-3-tosilamido-7-amino-L-2-heptanona) afecta a proteasas de serina y de cisteína.

Los inhibidores se utilizaron en las siguientes concentraciones finales (expresadas en mM):

O-Fenantrolina	100
Bestatina	0.1
EDTA	100
PMSF	10
E64	2
TLCK	1
Pepstatina	1
Leupeptina	1

Siguiendo la técnica de detección de actividad de proteasas antes descrita, se analizaron muestras de sobrenadantes en geles preparativos (un solo carril). Después de la electroforesis y de sumergir los geles en Tritón X-100 al 2.5%, cada gel fue cortado en

varias tiras verticales; a cada una de estas tiras se le incubó en un inhibidor específico diluido a las concentraciones requeridas en glicina 0.1 M pH 8.3 y se le dejó reposar durante 2 h a 37°C. Finalmente se tiñeron con Amido Black.

Se analizó la actividad enzimática en presencia de los distintos inhibidores utilizando un programa computacional de análisis de imágenes: Programa *Ambis* versión 2.1 (AMBIS).

### **III.7. Actividad proteolítica a diferentes valores de pH**

Utilizando la técnica de detección de proteasas ya descrita, minigeles con gelatina copolimerizada fueron cortados en tres secciones longitudinales después del tratamiento con Tritón; las secciones fueron incubadas a distintos valores de pH: 4, 8 y 11 en un amortiguador de glicina 0.1 M y cisteína 50 mM durante 2 h a 37°C.

### **III.8. Detección de la cruzipaina en el sobrenadante de diferentes cepas de *T. cruzi* por medio de inmunorréplicas tipo Western**

Se tomaron muestras del sobrenadante de varias cepas de *T. cruzi* obtenido mediante el proceso ya descrito y se separaron en geles de SDS-PAGE; después se transfirieron a membranas de nitrocelulosa con poro de 0.45µm utilizando el minisistema de transferencia de Bio-Rad a 100 V durante 1 h en frío (Buffer de transferencia: 25mM de TRIS, 192mM de glicina, 20% de metanol v/v, pH 8.3). Las membranas de nitrocelulosa fueron bloqueadas con albúmina sérica de bovino (BSA; SIGMA) al 1% durante la noche; después del bloqueo las membranas se cortaron en tiras de 0.5cm de ancho y se incubaron con suero de conejo preinmunizado (control negativo) y anticuerpos policlonales anticruzipaina de conejo, ambos diluidos 1:1000 con BSA al 1%, agitándose durante 2 h a temperatura ambiente. Después se hicieron tres lavados con Tween 20 (Monolaurato de polioxicetileno sorbitan; SIGMA) diluido al 0.1% en un amortiguador de fosfatos (PBS) (Apéndice III) de 10 min cada uno en agitación rápida. Se agregó un conjugado enzimático (SIGMA): peroxidasa-Anti IgG de conejo diluido 1:1000 en

Tween 20 al 0.1% en PBS y se incubó durante 2 h en agitación moderada. Nuevamente se hicieron tres lavados con Tween 20 al 0.1% en PBS durante 10 min cada uno en agitación rápida. Finalmente se añadió el sustrato Diaminobenzidina (SIGMA) 0.5 mg/ml y peróxido de hidrógeno al 0.02% en PBS durante 5 min y se detuvo la reacción con agua desionizada.

### **III.9. Elución de proteasas de geles de poliacrilamida por difusión**

El sobrenadante obtenido de epimastigotes de la cepa NINOA fue dializado contra PBS diluido 10 veces y después contra agua desionizada a 4°C; posteriormente fue concentrado 10 veces en una centrifuga por sublimación en vacío (Centrifuga SAVANT). 200 µl de este concentrado fueron mezclados con 200 µl de amortiguador para muestras de Laemmli sin β-mercaptoetanol, dejándose incubar a temperatura ambiente durante 10 min para después ser separado electroforéticamente en un minigel preparativo con 10 % de acrilamida durante 90 min a 125 V. Después de la electroforesis el gel se incubó en Tritón X-100 2.5% durante 15 min con un lavado, para entonces ser cortado en varias tiras horizontales en un área que comprendía a las proteínas de 70 kDa a 40 kDa aproximadamente (se usó como guía estándares de pesos moleculares preteñidos); cada trozo fue cortado en pedazos muy pequeños que se incubaron durante la noche con 500µl de Tris-HCl 200 mM pH 8, en refrigeración (aproximadamente 8°C) (Shahabuddin y cols., 1993). Finalmente, se colectó el sobrenadante y se concentró 10 veces por sublimación en vacío.

### **III.10. Determinación de la cantidad de proteínas**

La cantidad de proteína presente en el sobrenadante y en el extracto celular de epimastigotes se determinó utilizando la técnica de Bio-Rad que está basada en el método descrito por Bradford (1976).

## **IV. RESULTADOS**

### **IV.1. Detección de actividad proteolítica en el medio de cultivo**

En los geles de poliacrilamida de la figura 3 se observa que en todas las cepas aparece una banda blanca que indica la degradación de la gelatina (por esta razón esta zona no se tinte); tal banda parece tener en todos los casos un peso molecular de 40 kDa. En el carril que corresponde al sobrenadante de la cepa NINOA apareció una banda extra de actividad proteolítica lo que indica la presencia de una enzima de 60-70 kDa. Este hallazgo exigió el análisis de estas actividades proteolíticas para determinar si se trataba de 2 enzimas distintas o bien, si una de ellas era el producto de degradación de la otra.

Por otro lado, fue importante establecer que las protefnas encontradas en las muestras tomadas del medio de cultivo no eran producto de la lisis de los parásitos. En la figura 4 se aprecian claras diferencias en la cantidad y el tipo de protefnas (respecto al peso molecular) que hay tanto en el extracto celular de parásitos como en el medio de cultivo.

### **IV.2. Inhibición de proteasas**

Una manera de clasificar a las proteasas es de acuerdo al tipo de inhibidor catalítico que les afecta. De esta manera, utilizando una batería de inhibidores, se puede identificar cual es el grupo importante en el sitio activo de estas enzimas y, por lo tanto, establecer a que familia pertenece.

Como se observa en la figura 5 la actividad proteolítica de la molécula de 40 kDa desaparece en presencia de TLCK, Leupeptina y E64 que afectan a proteasas de cisteína y por O-Fenantrolina que afecta a metaloproteasas. Por otro lado, la actividad de la molécula de 60-70 kDa se ve reducida por O-Fenantrolina y TLCK principalmente. Los

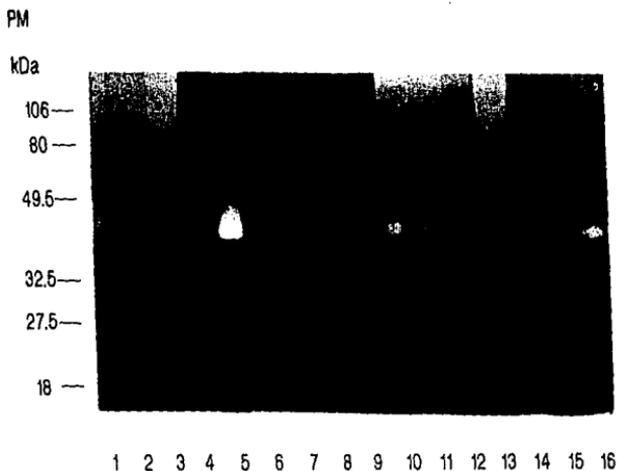
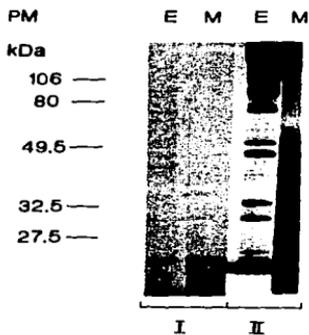


Figura 3. Detección de proteasas en los medios de cultivo de epimastigotes de diferentes cepas de *T. cruzi*. Se analizaron 2µg de proteína total de cada cultivo en un gel con 0.1% de gelatina copolimerizada. Se observan bandas blancas sobre un fondo oscuro, indicando la digestión de la gelatina, en todas las cepas. 1: C4; 2: EA; 3: Zac; 4: CID; 5: Ninoa; 6: H1; 7: H3; 8: H5; 9: H9; 10: H10; 11: HG; 12: Z21; 13: Querétaro; 14: Y; 15: Silvio; 16: CL.



**Figura 4.** Proteínas en el medio de cultivo condicionado y proteínas de extracto celular de epimastigotes. 10  $\mu$ g de proteína de extracto celular (E) y 10  $\mu$ g de proteína de medio de cultivo condicionado (M) con la cepa NINOA fueron separados en SDS-PAGE y teñidos con azul de Coomassie (I) y con plata (II).

resultados de los análisis densitométricos realizados a varios geles con gelatina copolimerizada al 0.1% –como el de la figura 5- aparecen en las tablas II y III. Los porcentajes de inhibición se obtuvieron al considerar como 100% de actividad proteolítica (0% de inhibición) al control (ausencia de inhibidor). En la tabla II se observa el efecto muy marcado de algunos inhibidores sobre la proteasa de 40 kDa: E64, TLCK, Leupeptina y O-Fenantrolina inhiben completamente su actividad y el resto no le afectan la actividad en absoluto.

Con respecto a la actividad de la proteasa de 60-70 kDa no se presentan efectos tan marcados; sin embargo, su actividad es afectada por O-Fenantrolina (60% de inhibición), EDTA (50% de inhibición) que afectan metaloproteasas y por TLCK (70% de inhibición).

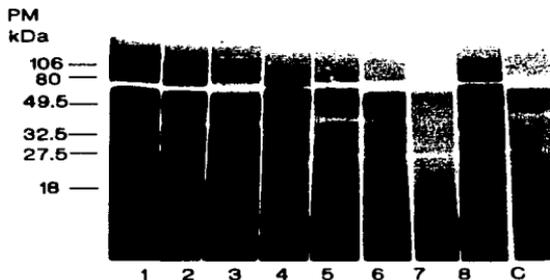
Por otro lado, en la figura 5 aparece una tercera banda de actividad proteolítica de –25 kDa que probablemente sea producto de degradación de la proteasa de 40 kDa ya que ambas presentan un patrón similar de inhibición. Además, esta banda sólo apareció en el experimento que se presenta en la figura 5 ya que no apareció en ninguna otra ocasión.

#### **IV.3. Actividad en presencia de cisteína**

La cisteína activa a proteasas que tienen en su sitio activo uno o varios residuos de este aminoácido. Así que para establecer claramente el tipo de proteasa al que pertenecen las enzimas de 40 y 60-70 kDa se utilizó la misma técnica para detectar proteasas en gel pero ahora el gel se incubó en presencia de cisteína. Como se observa en la figura 6 sólo la proteasa de 40 kDa es estimulada por este aminoácido.

#### **IV.4. Actividad a diferentes valores de pH**

Para determinar a que pH presentan mayor actividad estas proteasas, se utilizó nuevamente la técnica de detección de proteasas en gel incubando trozos del gel a diferente pH. En la figura 7 se observa que la proteasa de 40 kDa es activa principalmente



**Figura 5.** Inhibición catalítica de las proteasas con inhibidores químicos. Una muestra de medio de cultivo condicionado con epimastigotes de la cepa N1NOA (1µg de proteína total) fue analizada en gel con 0.1% de gelatina copolimerizada. El gel fue cortado en varias tiras y cada una fue incubada con un inhibidor distinto. 1: Leupeptina; 2: PMSF; 3: Pepstatina; 4: TLCK; 5: EDTA; 6: Bestatina; 7: E64; 8: O-Fenantrolina; C: control (sin inhibidor). Las concentraciones de cada inhibidor aparecen en la sección de material y métodos.

**TABLA II. INHIBICION DE LA PROTEASA DE 40 kDa**

Inhibidor	Concentración (mM)	Inhibición (%)*
O-Fenantrolina	100	100
Bestatina	0.1	0
EDTA	100	0 **
PMSF	10	0
E64	2	100
TLCK	1	100
Pepstatina	1	0
Leupeptina	1	100

\* porcentaje promedio de 3 diferentes experimentos

\*\* porcentaje promedio de 2 diferentes experimentos

**TABLA III. INHIBICION DE LA PROTEASA DE 60-70 kDa**

Inhibidor	Concentración (mM)	Inhibición (% ± SD)*
O-Fenantrolina	100	60 ± 23
Bestatina	0.1	8 ± 13
EDTA	100	50 ± 27**
PMSF	10	20 ± 19
E64	2	16 ± 6
TLCK	1	70 ± 19
Pepstatina	1	12 ± 20
Leupeptina	1	10 ± 9

\* porcentaje promedio ± desviación estándar de 3 diferentes experimentos

\*\* porcentaje promedio ± desviación estándar de 2 diferentes experimentos

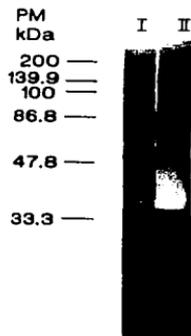
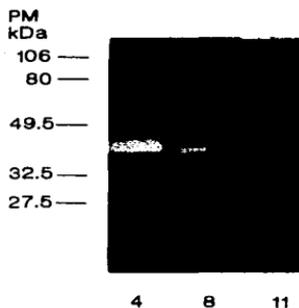


Figura 6. Efecto de la cisteína sobre la actividad de las proteasas. Se tomaron muestras del medio de cultivo condicionado con epimastigotes de la cepa NINOA y se analizaron en gel con gelatina copolimerizada. El gel fue dividido para incubar una parte en amortiguador de digestión (I) y la otra en el mismo amortiguador pero complementado con cisteína 50 mM, pH 4 (II).



**Figura 7.** Efecto del valor de pH sobre la actividad de las proteasas. Muestras del medio de cultivo condicionado con epimastigotes de la cepa NINOA fueron analizadas en gel con gelatina copolimerizada; después el gel fue cortado en 3 partes para incubarlo en el amortiguador de digestión a diferentes valores de pH; el amortiguador fue complementado con cisteína 50 mM, pH4 y se ajustó el pH con NaOH 5N.

a pH 4, su actividad disminuye a pH 8 y desaparece a pH 11. Mientras que la actividad de la proteasa de 60-70 kDa casi no es afectada en los diferentes valores de pH.

#### **IV.5. Presencia de la cruzipaina en el medio de cultivo de diferentes cepas de *T. cruzi***

La cruzipaina ya ha sido detectada en extractos celulares de epimastigotes así que era de interés determinar su presencia en el medio de cultivo para ayudar a establecer su posible función en este estadio del parásito.

Se tomaron muestras del medio de cultivo de diferentes cepas del parásito, y se analizaron por inmunorreplicas tipo Western en SDS-PAGE con anticuerpos policlonales producidos contra la cruzipaina. En la figura 8 se observa que en todas las cepas se presentó una banda de 40 kDa que es el peso aproximado de la cruzipaina. Con este hallazgo se establece que la cruzipaina también puede ser secretada por los epimastigotes.

Por otro lado, en algunos carriles aparece una banda de mayor peso molecular que probablemente sea producto de una reacción inespecífica; este fenómeno es común que se presente al trabajar con anticuerpos policlonales.

#### **IV.6. Elusión de las proteasas del gel nativo**

La proteasa de 40 kDa presentó características similares a la cruzipaina así que era necesario establecer si se trataba de la misma enzima, por lo que era conveniente tratar de purificar a la proteasa de 40 kDa.

Por otro lado, para clarificar la función de las proteasas halladas en el medio de cultivo también era conveniente purificarlas y así poder realizar estudios más finos.

Se utilizó la técnica de elusión de proteínas por difusión del gel de acrilamida para purificar a las proteasas encontradas en el medio. En la figura 9 se observa una banda de aproximadamente 60 kDa que probablemente sea la proteasa de 60-70 kDa; sin embargo, tanto esta proteína como la de 40 kDa (que no se logra ver en el gel) no tenían actividad

**al correrías en un gel de detección de proteasas por lo que no se puede asegurar que se trate de las mismas proteínas.**

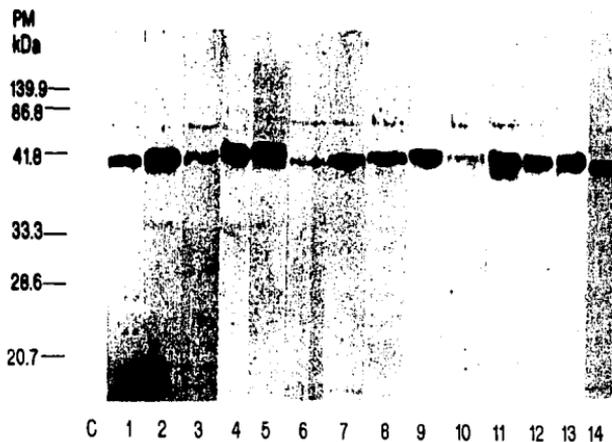
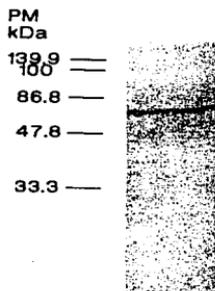


Figura 8. Detección de la cruzipaina en el medio de cultivo de varias cepas de *T. cruzi*. 2µg de proteína total de los medios de cultivo de cepas de *T. cruzi* fueron analizadas en SDS-PAGE y después transferidas a membranas de nitrocelulosa para incubarlas con anticuerpos policlonales anti-cruzipaina. C: control negativo (suero preinmune); 1: C4; 2: EA; 3: Zac; 4: CID; 5: Ninoa; 6: H1; 7: H3; 8: H5; 9: H9; 10: H10; 11: HG; 12: Z21; 13: Querétaro; 14: Y.



**Figura 9.** Proteasa de 60-70 kDa semipurificada por difusión del gel. Muestras de medio de cultivo de epimastigotes de la cepa NINOA fueron separadas por electroforesis en gel nativo. Se cortaron varias bandas horizontales para después triturarlas en trozos muy pequeños que se incubaron con Tris 200 mM pH8 a 8°C durante la noche. Se colectó el sobrenadante y se analizó en SDS-PAGE. Las proteínas se visualizaron con azul de Coomassie.

## V. DISCUSION

Las proteasas intervienen en varios procesos celulares tales como: digestión, corte de péptidos señal, formación de moléculas biológicamente activas y participación en los mecanismos patogénicos entre otros. Su presencia en prácticamente todas las actividades celulares les otorga el carácter de indispensables para el desarrollo de los seres vivos.

Particularmente en el parásito *T. cruzi* este tipo de enzimas parecen ser de gran importancia ya que se expresan en todos los estadios de su ciclo de vida (Itow y Camargo, 1977; Grieg y Ashall, 1990; Bonaldo y col., 1991). No se conoce con precisión las funciones de las proteasas de *T. cruzi*, pero algunas de ellas pueden intervenir en los mecanismos de transformación del parásito (cambio de un estadio a otro), contribuir en la infección de células hospederas, o bien, participar en los procesos de degradación de nutrientes de tal manera que la secreción de proteasas al medio facilitarfa la ingestión de las moléculas peptídicas (protefnas parcialmente degradadas o incluso aminoácidos libres).

Debido a que aún no se puede precisar cuál o cuáles son las funciones de las proteasas en cada estadio de *T. cruzi* es necesario realizar más estudios que ayuden a establecer cuál es la importancia de este tipo de enzimas en este parásito.

Como se aprecia en la figura 3 se detectó actividad proteolítica en los medios de cultivo en donde crecían los epimastigotes sin importar de qué cepa se tratase. Sin embargo, hay variación en la cantidad de actividad proteolítica detectada; la diferencia es enorme entre la actividad observada de la proteasa de 40 kDa en la cepa NINOA, con las actividades detectadas en las cepas EA, ZAC, CID, HI y SILVIO; aunque existe la posibilidad de que parte de la actividad proteolítica se haya perdido durante el procesamiento de los medios de cultivo y que cierta cantidad de las enzimas secretadas se hayan inactivado o

desnaturalizado, existe la posibilidad que tales diferencias en la actividad proteolítica sea el reflejo de la heterogeneidad que existe entre las cepas de *T. cruzi* y que, por lo tanto, la secreción de proteasas sea un proceso que varíe entre las cepas, ya sea que haya diferencias en el mecanismo de secreción, en la maduración o síntesis de las enzimas, o que se trate de isoformas de esta enzima. Lima y colaboradores reportan en 1994 la existencia de isoformas génicas de la cruzipaina en el genoma de *T. cruzi*; así que las diferencias observadas con la proteasa de 40 kDa podría estar reflejando un fenómeno similar.

Por otro lado, la aparición de la enzima de 40 kDa en todas las cepas analizadas parece indicar que su función es esencial para el desarrollo del parásito; además, estas proteasas forman parte de toda una batería de proteínas que son liberadas al medio (Figura 4) en cantidades muy pequeñas que sólo son detectadas con la técnica de tinción con plata (comparar la tinción con azul de Coomassie con la tinción con plata). Aunque es probable que parte de las bandas detectadas con esta técnica sean producto de degradación de proteínas y que no formen parte de un proceso secretorio, también es posible que la mayor parte de las bandas si sean producto de la secreción de los epimastigotes ya que durante los experimentos se tuvo el cuidado de no maltratar demasiado o lisar a los parásitos (se trabajó con una viabilidad mayor al 90 %).

Existen algunos reportes sobre la secreción de proteínas en *T. cruzi* que han destacado la importancia inmunogénica de este fenómeno (Affranchino y col., 1989; Davis y Kuhn, 1990; Goncalves y col., 1991). Recientemente se reportó la secreción de una proteasa de cisteína de 55/60 kDa por tripomastigotes (Yokoyama-Yasunaka y col., 1994) pero aún no se establece cual podría ser su función; se desconoce si esta enzima sea la misma a la encontrada en el presente trabajo. Estas evidencias indican que la secreción no es un proceso raro en *T. cruzi* y que probablemente en el futuro aparezcan más reportes sobre la secreción de proteínas, su función e importancia biológica o médica de este proceso celular.

Es interesante señalar que la proteasa de 60-70 kDa sólo apareció en la cepa NINOA y la proteasa de 40 kDa se presentó en todas las cepas. Así que era muy importante establecer si tal actividad era algún derivado de la proteasa de 40 kDa (producto de degradación o por diferencias en la cantidad de glicosilación).

La proteasa de 40 kDa es afectada por E64, TLCK y Leupeptina y aunque también es inhibida por O-Fenantrolina que afecta a metaloproteasas, la inhibición por los agentes químicos señalados indica que se trata de una proteasa de cisteína (Figura 5 y Tabla II); además, la actividad de esta enzima es estimulada por la cisteína (Figura 6); así que puede afirmarse que esta enzima es una proteasa de cisteína y que posiblemente la O-Fenantrolina esté afectando a la enzima de manera inespecífica; Coombs reportó que una proteasa de cisteína de *Leishmania* también era afectada por O-Fenantrolina (1982).

El análisis de la proteasa de 60-70 kDa no fue tan claro ya que como se observa en la Tabla III la actividad fue afectada por O-Fenantrolina, EDTA y TLCK principalmente. Sin embargo, debido a que es afectada por 2 inhibidores que actúan sobre metaloproteasas y que su actividad no es estimulada por cisteína (Figura 6) es muy probable que esta proteasa de 60-70 kDa sea una metaloproteasa o al menos se trata de una enzima distinta a la proteasa de 40 kDa y, por lo tanto, no es un derivado de esta enzima.

La secreción de la proteasa de 60-70 kDa sólo por los epimastigotes de la cepa NINOA nuevamente puede estar reflejando la heterogeneidad que existe entre las cepas y que ha sido abordada en varios trabajos demostrando diferencias biológicas entre ellas (Giovanni de Simone y col., 1987; López, 1994; González y col., 1995); asimismo, ya se han reportado diferencias en la expresión de metaloproteasas observándose una gran variabilidad entre las cepas y estadios del parásito (Lowndes y col., 1996). Así que esta proteasa secretada exclusivamente por los epimastigotes de la cepa NINOA puede no ser esencial para el desarrollo del parásito y que probablemente intervenga de manera auxiliar en los procesos de crecimiento o metaciclógenésis; otra alternativa sería que la función

principal de esta enzima sea a nivel intracelular y que su secreción forme parte de un proceso metabólico secundario.

Las proteasas secretadas por la cepa NINOA parecen responder de manera distinta al efecto del pH. Como se observa en la figura 7 la proteasa de 40 kDa es más activa a valores de pH ácidos (pH4) mientras que a pH totalmente alcalino (pH11) se inactiva; posiblemente esta enzima sea de origen lisosomal, y su función digestiva se facilite al ser secretada; sin embargo, esta explicación tiene que ser explorada y se requiere un estudio más exhaustivo de esta proteasa. La proteasa de 60-70 kDa parece ser activa sin gran diferencia bajo los valores de pH utilizados: 4, 8 y 11, ya que se observan diferencias mínimas en su actividad. Por sus características observadas al analizar su actividad a diferentes valores de pH y por su peso molecular esta proteasa parece ser la misma a la reportada por Grieg y Ashall (1990). Sin embargo, la proteasa encontrada en el presente trabajo es también afectada por TLCK a diferencia de la enzima reportada anteriormente. Cabe mencionar que en el presente trabajo el inhibidor TLCK se utilizó en una concentración 10 veces mayor a la usada por Grieg y Ashall lo que podría explicar esta discrepancia en ambos trabajos.

De acuerdo a las características analizadas en este trabajo parece ser que la proteasa de 40 kDa hallada en el medio de cultivo de epimastigotes es la cruzipafna: mismo patrón de inhibición catalítica (a excepción de O-Fenantrolina), mismo pH óptimo de actividad y peso molecular similar. Sin embargo, la cruzipafna ha aparecido en varios trabajos con diferente peso molecular; situación que se explica por la diferente glicosilación de la enzima y por las condiciones experimentales en que se le maneja (Martínez y Cazzulo, 1992). Por otro lado, Aslund y colaboradores (1991) presentaron evidencia de que el dominio C-terminal de la cruzipafna puede ser removido por la misma enzima y que la ausencia de tal dominio no afecta su actividad o su plegamiento (Eakin y cols., 1992) lo que explicaría la aparición de la banda de ~25 kDa en la figura 5 como resultado de tal

degradación en el caso de que se trate de la misma enzima. La banda de 25 kDa pudiese ser, no obstante, una enzima independiente debido a que sólo apareció una vez y no se analizó con mayor profundidad este hallazgo.

Con estos antecedentes era necesario investigar la posibilidad de que la cruzipafna y la proteasa hallada en este trabajo sean la misma. Anticuerpos policlonales anticruzipafna reconocen una protefna de ~40 kDa que aparece en todas las muestras de medio de cultivo de diferentes cepas de epimastigotes (Figura 8). Por lo tanto, se puede asegurar que la cruzipafna también es secretada al medio; así que, esta enzima o alguna muy semejante a ella debe desempeñar alguna función a nivel extracelular; es muy probable que la proteasa encontrada en este trabajo sea la cruzipafna, pero se requiere analizar a la proteasa de 40 kDa en condiciones de pureza.

Bonaldo y colaboradores (1991) proponen que la cruzipafna es regulada durante el desarrollo del parásito ya que aparece en todos los estadios de *T. cruzi* pero en distintas cantidades. Así que puede sugerirse que esta enzima desempeña un papel fundamental para el parásito. Se han realizado estudios que indican que la cruzipafna parece estar involucrada en la nutrición del parásito o en la invasión de células hospederas (Souto-Padrón y cols., 1990). Sin embargo, la secreción de esta enzima por los epimastigotes crea nuevas expectativas sobre su función ya que al parecer es activa en todos los estadios, como lo demuestra Bonaldo y cols. en su trabajo, y por consiguiente es activa en ambientes muy diferentes (dentro de la célula y extracelularmente) por lo que la función o funciones de la cruzipafna están aún por establecerse.

Aunque al tratar de purificar proteasas del sobrenadante se obtuvo una protefna de 60 kDa (Figura 9) extrafda por difusión del gel de acrilamida, no se puede asegurar que sea la misma a la hallada en el medio de cultivo de los epimastigotes debido a que se perdía su actividad durante el proceso de purificación. Se eligió esta técnica para purificar a la proteasa porque se creía que era una de las más inofensivas para la enzima; así que es

necesario estandarizar las condiciones óptimas para la purificación o buscar alguna otra técnica que logre mejores resultados.

Para continuar con una caracterización más fina de las proteasas es necesario purificarlas. Además, para realizar estudios más exhaustivos con estas enzimas y establecer su función y la importancia de su secreción, es prioritario purificarlas y hacer análisis encaminados en la búsqueda del probable papel que desempeñan en la interacción con las células del insecto.

## VI. CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas en este trabajo son las siguientes:

- Las diferentes cepas analizadas de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* secretan proteasas al medio de cultivo.
- Las proteasas encontradas son dos enzimas diferentes que pertenecen a distintas familias de proteasas. La proteasa de 40 kDa es una proteasa de cisteína. La proteasa de 60-70 kDa muy probablemente sea una metaloproteasa.
- La proteasa de 40 kDa es activada por cisteína y es más activa a pH ácido (pH4).
- La proteasa de 40 kDa presenta características semejantes a las de la cruzipaina.
- La proteasa de 60-70 kDa no es activada por cisteína (resultado esperado ya que se trata de una metaloproteasa). Esta enzima es activa a pH ácido o básico sin diferencias significativas en sus niveles de actividad.
- La proteasa de 60-70 kDa aparentemente sólo es secretada por la cepa NINOA.
- Una proteína que es reconocida por anticuerpos anticruzipaina es secretada por los epimastigotes de todas las cepas analizadas.

## VII. PERSPECTIVAS

Debido a la enorme importancia de las proteasas para el desarrollo de un organismo era de esperarse que este tipo de enzimas aparezca en todas las cepas de una especie estudiada. Sin embargo, como ocurre en varios organismos, también existe la heterogeneidad dentro de las especies; al parecer este es el caso de la cepa NINOA que de acuerdo a la estrategia utilizada es la única que secreta la proteasa de 60-70 kDa. Debido a esta peculiaridad esta enzima adquiere especial interés; además, el hecho de que su capacidad catalítica no sea afectada por el pH plantea interrogantes respecto a su función y su regulación que muy probablemente ayudaran a entender un poco más la biología del parásito. Aunque no se conoce alguna diferencia biológica entre la cepa NINOA y el resto de las cepas de *T. cruzi*, es evidente que la presencia de la proteasa de 60-70 kDa debe conferirle algún beneficio que el resto de las cepas no lo requieren. Así que, se puede cultivar a la cepa NINOA impidiendo la actividad de esta enzima ya sea con el uso de inhibidores químicos específicos o con anticuerpos dirigidos contra esta proteína y observar el efecto de esta estrategia en el crecimiento o metaciclogénesis de los epimastigotes; además, se puede observar el efecto de la presencia de esta proteasa en otras cepas que no la secretan.

La función o funciones de la cruzipafina aún no pueden precisarse pero se podría plantear una estrategia que ayude a establecer cuál es el papel que desempeña esta enzima en cada estadio. Por ejemplo, se puede interrumpir el gen de la cruzipafina y observar que efecto tiene la ausencia de esta proteasa en cada etapa del ciclo de vida del parásito. Además, se pueden hacer estudios sobre la sobreexpresión de esta enzima ya sea con la proteína normal o con mutantes de la misma. Se podrían observar efectos muy interesantes: el retardamiento o la aceleración del proceso de transformación de un estadio a otro o bien, que al parásito le resulte imposible transformarse; alteración en la capacidad infectiva

**(menor o mayor patogenicidad); mayor susceptibilidad al sistema inmune del hospedero, etc. Los resultados de tales estudios ayudarían en la búsqueda de mecanismos de control de la enfermedad de Chagas.**

## APENDICE I

### GEL PARA SDS-PAGE

Reactivo	% respecto al volumen total
Acrilamida/ Bis	33.2
Tris pH 8.8	25
Agua desionizada	41.5
Persulfato de amonio	0.3
TEMED	0.7

### GEL SEPARADOR

### GEL CONCENTRADOR

Reactivo	% respecto al volumen total
Acrilamida/Bis	12.7
Tris pH 6.8	25.2
Agua desionizada	61.5
Persulfato de amonio	0.5
TEMED	0.1

Solución "Stock" de acrilamida: Acrilamida 30%/ BIS 0.8%

Las muestras de proteínas se mezclan con un volumen determinado de amortiguador de muestras de Laemmli de manera que queden en proporción 1:1; después se ponen en baño maría (100°C) durante 5 min.

Amortiguador de electroforesis: 0.125 M de Tris base, 0.96 M de Glicina, 0.0175 M de SDS.

## APENDICE II

### TINCION DE PLATA†

Reactivo	* Tiempo (min)
1)Fijador 1	30
2)Fijador 2	15
3)Fijador 2	15
4)Oxidante	5
5)Agua desionizada	5
6)Agua desionizada	5
7)Agua desionizada	5
8)Reactivo de plata	20
9)Agua desionizada	1
10)Revelador	0.5
11)Revelador	5
12)Revelador	3
13)Stop (ácido acético)	5

Oxidante 10% v/v

Reactivo de Plata 10% v/v

Revelador 3.2% p/v

Acido acético 5% v/v

\* sólo para geles de 0.5-1.0 mm de grosor

† técnica y reactivos de Bio-Rad

### APENDICE III

#### GEL PARA MEDIR ACTIVIDAD DE PROTEASAS

##### GEL SEPARADOR

Reactivo	% respecto al volumen total
Acrilamida/Bis	36.5
Tris pH 8.8	25
PBS	1
Gelatina	10
Agua desionizada	27
Persulfato de amonio	0.2
TEMED	0.1

##### GEL CONCENTRADOR

Reactivo	% respecto al volumen total
Acrilamida/Bis	12.7
Tris pH 6.8	25.2
Agua desionizada	61.5
Persulfato de amonio	0.5
TEMED	0.1

Solución "Stock" de acrilamida: Acrilamida 30%/ Bis 0.8%

La gelatina se prepara al 1% calentando la solución.

PBS 1X: 0.34g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1.1g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 9g de NaCl en 1lde agua desionizada

## REFERENCIAS

- Affranchino, J.L., Ibañez, C.F., Luquetti, A.O., Rassi, A., Reyes, M.B., Macina, R.A., Aslund, L., Peterson, U. y Frasch, A.C.C. 1989. Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* **34**: 221-228.
- Aguirre- Pequeño, E. 1947. Presencia de *Trypanosoma cruzi* en mamíferos y triatomídeos de Nuevo León. *Arch. Med. Mex.* **5**:350-358.
- Andrews, N.W., Abrans, S., Slatin, L. y Griffiths, G. 1990. A *Trypanosoma cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: Evidence for membrane pore forming activity at low pH. *Cell.* **61**:1277-1287.
- Ashall, F. 1990. Characterization of an alkaline peptidase of *Trypanosoma cruzi* and other Trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.* **38**:77-88.
- Aslund, L., Henriksson, J., Campetella, O., Frasch, A.C.C., Peterson, U., Cazzulo, J.J. 1991. The C-terminal extension of the major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **45**: 345-348.
- Avila, J.L., Casanova, M.A., Avila, A. y Bretaña, A. 1979. Acid and neutral hydrolases in *Trypanosoma cruzi*. Characterization and assay. *J. Protozool.* **26**:304-311.
- Barret, A. 1986. The classes of proteolytic enzymes. In Plant Proteolytic Enzymes. Vol. I, M.J.Dalling, Ed. CRC Press. Florida.
- Barret, A. J. y Rawlings, N.D. 1991. Types and families of endopeptidases. *Biochem. Soc. Trans.* **19**: 707-715.
- Bonaldo, M.C., D'Escoffier, L.N., Salles, J.M. y Goldenberg, S. 1991. Characterization and expression of proteases during *Trypanosoma cruzi* Metacyclogenesis. *Exp. Parasitol.* **73**:44-51.
- Bongertz, V. y Hungerer, K.D. 1978. *Trypanosoma cruzi*: Isolation and Characterization of a protease. *Exp. Parasitol.* **45**:8-18
- Bontempi, E., Franke de Cazzulo, B.M., Ruiz, A.M. y Cazzulo, J.J. 1984. Purification and some properties of an acidic protease from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol.* **77**:599-604.

- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Branden, C. y Tooze, J. 1991. Introduction to protein structure. Garland Publishing Inc. New York. 302 pp.
- Brocklehurst, K. 1987. Acyl group transfer- Cysteine proteinases. In: Enzyme Mechanisms. Ed. Page, M.I. y Williams, A. Royal Society of Chemistry. Londres. 140-158 pp.
- Compelletta, O., Martínez, J. y Cazzulo, J.J. 1990. A major cysteine proteinase is developmentally regulated in *Trypanosoma cruzi*. *FEMS. Microbiol. Lett.* **67**:145-150.
- Cazzulo, J.J., Franke de Cazzulo, B.M., Engel, J.C. y Cannata, J.J.B. 1985. End products and enzyme levels of aerobic glucose fermentation in Trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.* **16**:329-343
- Cazzulo, J.J., Couso, R., Raimondi, A., Wernstedt, C. y Hellman, U. 1989. Further Characterization and partial aminoacid sequence of a cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **33**:33-41.
- Cazzulo, J.J., Cazzulo-Franke, M.C., Martínez, J. y Franke de Cazzulo, B.M. 1990a. Some kinetic properties of a cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Biophys. Acta.* **1037**:186-191.
- Cazzulo, J.J., Hellman, U., Couso, R. y Parodi, A.J.A. 1990b. Aminoacid and carbohydrate composition of a lysosomal cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. Absence of phosphorylated mannose residues. *Mol. Biochem. Parasitol.* **38**:41-48.
- Cazzulo, J.J. 1992. Energy Metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *Subcell Biochemistry.* **18**:235-257.
- Coombs, G.H. 1982. Proteinases of *Leishmania mexicana* and other flagellate protozoa. *Parasitology.* **84**: 149-155
- Davis, C.D. y Kuhn, R.E. 1990. Detection of antigens with affinity for host cell membrane polypeptides in culture supernatants of *Trypanosoma cruzi*. *Infect. and Immunity.* **58**: 1812-1816.
- Eakin, A.E., Bouvier, J., Sakanari, J.A., Craik, C.S. y McKerrow, J.H. 1990. Amplification and sequencing of genomic DNA fragments encoding cysteine proteinases from protozoan parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.* **39**:1-8.

Engel, J.C., Franke de Cazzulo, B.M., Stoppani, A.O.M., Cannata, J.J.B. y Cazzulo, J.J. 1987. Aerobic glucose fermentation by *Trypanosoma cruzi* axenic culture amastigote-like forms during growth and differentiation to epimastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **25**:1-10.

Fernández, M.A., Muñoz-Fernández, M.A. y Fresno, M. 1993. Involvement of integrins in the binding and entry of *Trypanosoma cruzi* into human macrophages. *Eur. J. Immunol.* **23**:552-557.

Fersht, A. 1985. Enzyme structure and mechanism. W. H. Freeman and Company. New York. 416-422 pp

Fraidenraich, D., Peña, C., Isola, E.L., Lammel, E.M., Coso, O., Dfaz-Afel, A., Pongor, S., Baralle, F., Torres, H.N. y Flawia, M.M. 1993. Stimulation of *Trypanosoma cruzi* adenylyl cyclase by an D-globin fragment from *Triatoma* hind gut: Effect on differentiation of epimastigote to trypomastigote forms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**:10140-10144.

García, E.S. y Azambuja, P. 1991. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol. Today.* **7**:240-244.

Giovanni de Simone, S., Pontes, C.L.C., Oliva, O.I.P., Andrade, S.G. y Galvao-Castro, B. 1987. *Trypanosoma cruzi* strain specific monoclonal: Identification of colombian strains flagellates in the insect vector. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **81**:750-754.

Goldsmith, R.S., Zárate, R.J., Kagan, I., Cedeño-Ferreira, J., Galindo- Vasconcelos, M.G. y Paz, A.E. 1978. El potencial de la transmisión en la Enfermedad de Chagas por transfusión sanguínea: Hallazgo serológico entre donadores en el Estado de Oaxaca. *Sal. Pub. Mex.* **22**: 439-444.

Goldsmith, R.S., Ortega, M., Zárate, R.J., Zárate, L.G. y Beltrán, F. 1983. Encuesta seroepidemiológica de la Enfermedad de Chagas en Chiapas, México. *Arch. Invest. Med.* **14**:43-50.

Goldsmith, R.S., Zárate, R.J., Zárate, L.G., Kagan, I. y Jacobson, B. 1985. Clinical and epidemiological studies of Chagas Disease in rural communities in Oaxaca State, Mexico and a seven year follow-up: I Cerro del Aire. *Bull. Pan. Am. Health Organ.* **19**:120-138.

Goncalves, M.F., Umezawa, E.S., Katzin, A.M., De Souza, W., Alves, M.J.M., Zingales, B. y Colli, W. 1991. *Trypanosoma cruzi*: Shedding of surface antigens as membrane vesicles. *Exp. Parasitol.* **72**: 43-53.

González, J., Muñoz, S., Ortiz, S., Anaconda, D., Salgado, S., Galleguillos, M., Nera, I., Sagua, H. y Solari, A. 1995. Biochemical, Immunological and Biological Characterization of *Trypanosoma cruzi* populations of the Andean North of Chile. *Exp. Parasitol.* **81**:125-135.

Grieg, S. y Ashall, F. 1990. Electrophoretic detection of *Trypanosoma cruzi* peptidases. *Mol. Biochem. Parasitol.* **39**:31-38.

Hall, B.F. y Joiner, K.A. 1993. Developmentally-regulated virulence factors of *Trypanosoma cruzi* and their relationship to evasion of host defences. *J. Euk. Microbiol.* **40**:207-213.

Harth, G., Andrews, N., Mills, A., Engel, J., Smith, R. y Mckerrow, J. 1993. Peptide-fluoromethyl ketones arrest intracellular replication and intercellular transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **58**:17-24.

Heussen, C. y Dowdle, E.B. 1980. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Analyt. Biochem.* **102**:196-202.

Itow, S. y Camargo, E.P. 1977. Proteolytic activities in cell extracts of *Trypanosoma cruzi*. *J. Protozool.* **26**:304-311.

Joiner, K.A., Sher, T., Gaither y Hammer, C. 1986. Evasion of alternative complement pathway by *Trypanosoma cruzi* results from inefficient binding of factor B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**: 6593-6597.

Kraut, J. 1988. Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. *Annu. Rev. Biochem.* **46**: 331-358.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680-685.

Lima, A. P. C. de A., Tessier, D.C., Thomas, D.Y., Scharfstein, J., Storer, A.C. y Vernet, T. 1994. Identification of new cysteine protease gene isoforms in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **67**: 333-338.

López, M.V. 1994. Caracterización biológica *in vitro* de 17 cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi*. Tesis Prof. Fac. de Ciencias UNAM. 96 pp.

Lowndes, C.M., Bonaldo, M.C., Thomaz, N. y Goldenberg, S. 1996. Heterogeneity of metalloprotease expression in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology.* **112**: 393-399.

Martínez, J. y Cazzulo, J.J. 1992. Anomalous electrophoretic behaviour of the major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* in relation to its apparent molecular mass. *FEMS Microbiol. Lett.* **95**: 225-230.

Mazzotti, L. 1936. Investigación sobre la existencia de la Enfermedad de Chagas en el país. Demostración de tripanosomas en los reduvidos transmisores. *Med. Rev. Mex.* **16**:584-585.

Mazzotti, L. 1937. Infección natural de *Trypanosoma cruzi* en *Triatoma dimidiata* (Latreille) de los Estados de Yucatán, Campeche, Chiapas, Veracruz y Jalisco. *Med. Rev. Mex.* **17**:283-286.

Mazzotti, L. 1940. Dos casos de Enfermedad de Chagas en el Estado de Oaxaca. *Gac. Med. Mex.* **70**:417-420.

Mazzotti, L. 1962. Comentarios sobre la distribución geográfica de algunas de las especies de triatómicos que existen en México. *Ref. Inst. Salub. Enf. Trop.* **22**: 75-78.

McKerrow, J.K. 1989. Parasite proteases. *Exp. Parasitol.* **68**:111-115.

Mckerrow, J.H., McGrath, M. E. y Engel, J. C. 1995. The cysteine protease of *Trypanosoma cruzi* as a model for antiparasite drug design. *Parasitol. Today.* **11**: 279-282.

Meirelles, M.N.L., Juliano, L., Carmona, E., Silva, S.G., Costa, E.M., Murta, A.C.M. y Scharfstein, J. 1992. Inhibitors of the major cysteine proteinase (GP 57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* *in vitro*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **52**:175-184.

Morris, S.A., Tanowitz, H.B., Bilezikian, J.P. y Wittner, M. 1991. Modulation of host cell metabolism by *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Today.* **7**:82-87.

Murta, A.C.M., Persechini, P.M., Souto-Padrón, T., de Souza, W., Guimaraes, J.A. y Scharfstein, J. 1990. Structural and functional identification of GP 57/51 antigen of *Trypanosoma cruzi* as a cysteine proteinase. *Mol. Biochem. Parasitol.* **43**: 27-38.

North, M.J. 1982. Comparative Biochemistry of the proteinases of Eucaryotic microorganisms. *Microbiol. Rev.* **46**: 308-340.

North, M.J., Mottram, J.C. y Coombs, G.H. 1990. Cysteine proteinases of parasitic protozoa. *Parasitol. Today.* **6**:270-275.

OPS. 1990. Las condiciones de salud en las Américas. *OPS.* **1**:171-174.

- Ortega-Barria, E. y Pereira, E.A. 1991. A novel *Trypanosoma cruzi* heparin binding protein promotes fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomes into mammalian cells. *Cell*. **67**:411-421.
- Pereira, M. E. A. 1990. Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. In: Modern Parasite Biology. Ed. Wyler, D.J. Freeman. New York. 64-78 pp
- Piras, M.M., Henriquez, D., Piras, R. y Nigri, S. 1985. The effect of proteolytic enzymes and protease inhibitors on the interaction *Trypanosoma cruzi*-fibroblast. *Mol. Biochem. Parasitol.* **14**:151-163.
- Pólgar, L. 1989. Mechanisms of protease action. CRC Press Inc. Florida, 223 pp.
- Rangel, H.A., Araújo, P.M.F., Repka, D. y Costa, M.G. 1981. *Trypanosoma cruzi*: Isolation and characterization of a proteinase. *Exp. Parasitol.* **52**:199-209.
- Rimoldi, M.T., Sher, A., Hieny, S., Lituchy, A., Hammer, C.H. y Joiner, K. 1988. Developmentally regulated expression by *Trypanosoma cruzi* of molecules which accelerate the decay of complement C3 convertases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**:193-197.
- Rimoldi, M.T., Tenner, A.J., Bobak, D.A. y Joiner, K.A. 1989. Complement component C1q enhances Invasion of human mononuclear phagocytes and fibroblasts by *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *J. Clin. Invest.* **84**:1982-1989.
- Sakanari, J.A., Staunton, C.E., Eakin, A.E., Craik, C.S. y McKerrow, J.H. 1989. Serine proteases from nematode and protozoan parasites: Isolation of sequence homologs using generic molecular probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**:4863-4867.
- Salazar, S.P.M., De Haro, A.I. y Uribarren, B.T: 1988. Chagas Disease in Mexico. *Parasitol. Today.* **4**:348-351.
- Sánchez, B.E.H. 1996. Uso de ELISA, Western Blot y Hemocultivo para el estudio de la enfermedad de Chagas en el estado de Morelos. Tesis Prof. Esc. de Ciencias Químicas. Univ. Benito Juárez de Oaxaca. 66 pp.
- Scharfstein, J., Schechter, M., Senna, M., Peralta, J.M., Mendonca-Previato, L. y Miles, M.A. 1986. *Trypanosoma cruzi*: Characterization and isolation of a 57/51,000 m.w. surface glycoprotein (GP 57/51). Expressed by epimastigotes and bloodstream trypomastigotes. *J. Immunol.* **137**:1336-1341.
- Shahabuddin, M., Toyoshima, T., Aikawa, M. y Kaslow, D.C. 1993. Transmission-blocking activity of a chitinase inhibitor and activation of malarial parasite chitinase by mosquito protease. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* **90**: 4266-4270

- Souto-Padrón, T., Campetella, O.E., Cazzulo, J.J. y de Souza, W. 1990. Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: Immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction. *J. Cell. Sci.* **96**:485-490.
- Takle, G.B. y Snary, D. 1993. South American trypanosomiasis (Chagas' disease). In: Immunology and Molecular Biology of Parasite Infections. Ed. Warren, K.S. Blackwell Scientific Publications. USA. 213-236 pp
- Tay, J. Gutiérrez, M., Salazar, S.P.M. 1973. Estudios sobre 6 cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Invest. Sal. Pub.* **33**:67-76.
- Tay, J., Salazar, S.P.M. 1979. Estudio epidemiológico de la Enfermedad de Chagas en Jalisco. *Rep. Mex. Rev. Sal. Pub. Mex.* **20**: 145-149.
- Tay, J. y Biagi A.M. 1984. Localidades nuevas de triatóminos mexicanos y su infección natural por *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Fac. Med.* **6**:305-311.
- Tybayrec, M. y Ayala, F.J. 1988. Chagas Disease: Genetical, Taxonomical and Epidemiological Significance. *Evolution.* **42**:277-292.
- Velasco-Castrejón, O., Romero, R.L. Mendiola, J.G. 1970. Contribución de la Enfermedad de Chagas en México. Observaciones epidemiológicas en Tepechitlán, Zacatecas. *Rev. Inv. Sal. Pub.* **30**:197-204.
- Velasco-Castrejón, O. y Guzmán-Bracho, C. 1986. Importancia de la Enfermedad de Chagas en México. *Rev. Latinoamer. Microbiol.* **28**:275-283.
- Velasco-Castrejón, O., Guzmán, B.C., Cruz, R.J., López, O.O. y Domínguez, G.F. 1991. La Enfermedad de Chagas. INDRE. 56 pp.
- Velasco-Castrejón, O. 1992. La enfermedad de Chagas en México. *Infectología.* **12**: 783-791.
- Velasco-Castrejón, O., Valdespino, J.L. Tapia-Conyer, R., Salvatierra, B., Guzmán-Bracho, C., Magos, C., Llausas, A., Gutiérrez, G. y Sepúlveda, J. 1992. Seroepidemiología de la Enfermedad de Chagas en México. *Sal. Pub. Mex.* **34**:186-196.
- Vermelho, A.B. y Meirelles, M.N. 1994. Sialoglycoconjugates in *Trypanosoma cruzi*-host cell interaction: Possible biological model-a Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **89**:69-79
- Yokoyama-Yasunaka, J.K.U., Pral, E.M.F., Oliveira, O.C., Alfieri, S.C. y Stolf, A.M.S. 1994. *Trypanosoma cruzi*: Identification of proteinases in shed components of trypomastigote forms. *Acta Tropica.* **57**: 307-315.

Zavala-Castro, J.E., Velasco-Castrejón, O. y Hernández, R. 1992. Molecular Characterization of Mexican stocks of *Trypanosoma cruzi*. Using total DNA. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **47**:201-209.