



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

## **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

EFECTO DE LA CRUZIPAÍNA Y OTRAS  
CISTEÍNA-PROTEASAS SOBRE LINFOCITOS T

# **T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

P R E S E N T A

ROSINA OLIVIA VILLANUEVA HERRERA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. PATRICIA MARGARITA TATO ZALDIVAR

MEXICO, D.F.

JUNIO, 2006.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **RECONOCIMIENTOS**

A los apoyos recibidos por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca crédito otorgada para la obtención de grado de Maestra en Ciencias Biológicas (Biología Experimental).

A los apoyos recibidos por la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) por la beca otorgada para la obtención de grado de Maestra en Ciencias Biológicas (Biología Experimental).

A los miembros del comité Tutorial:

Dra. Patricia Margarita Tato Zaldivar.

Dra. Ingeborg Dorotea Becker Fauser.

Y un agradecimiento muy especial al Dr. José Luis Molinari Soriano por su invaluable apoyo para la realización del proyecto.

## **AGRADECIMIENTOS**

A las personas que me apoyaron y que me enseñaron: José Antonio e Isabel.

A la Dras. Ana María Fernández, Sandra G. Solano, por su gran apoyo y paciencia.

A mi familia: Oscar, Alan, Alex y Beto por su paciencia.

A mi madre Rosina por su gran ayuda.

A mis hermanos: Luis, Héctor, Eduardo, Gabriela, y Rodrigo.

Y muy especialmente a ti querido padre Luis Villanueva por tu ejemplo, apoyo, por haber recibido lo mejor de ti.

## INDICE

<b>RESUMEN</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	3
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
1.- Tripanosomiasis americana	4
2.- Morfología de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	4
3.- Ciclo de vida.	5
4.- Respuesta inmune en la tripanosomiasis.	7
4.1 Respuesta inmune humoral.	8
4.2 Respuesta inmune celular.	8
4.3 Respuesta Th1 y Th2.	10
4.4 Inmunidad y apoptosis.	10
5.- Regulación de la respuesta inmune por parásitos.	12
5.1 Mecanismos físicos	12
5.2 Moléculas del parásito que alteran la respuesta inmune.	
5.2.1 Variación antigénica.	13
5.2.2 Moléculas inhibidoras del sistema inmune	14
5.2.3 moléculas del parásito que afectan la producción de citocinas.	15
5.2.4 Antígenos del parásito que alteran la respuesta humoral.	16
5.2.5 Moléculas del parásito que alteran la función del complemento .	16
5.2.6 Factores de los parásitos que alteran moléculas del MHC y funciones fagocíticas.	17
5.2.7 Producción de enzimas.	18

6.- Proteasas	
6.1 Funciones biológicas de las proteasas en parásitos.	19
6.1.1 Invasión tisular.	19
6.1.2 Nutrición.	19
6.1.3 Enquistamiento y desenquistamiento.	19
6.1.4 Participación de las proteasas en la evasión del sistema inmune.	20
6.1.5 Mecanismos de patogénesis.	20
6.2 Cisteína-proteasas.	21
6.3 proteasas de <i>T. cruzi</i> .	
6.3.1 Serina-proteasas.	22
6.3.2 Metaloproteasas.	22
6.3.3 Cisteína-proteasas.	22
7.- Cruzipaína.	23
<b>OBJETIVO GENERAL .</b>	26
<b>HIPOTESIS.</b>	26
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.</b>	27
<b>RESULTADOS</b>	
▪ Curvas de crecimiento de los 4 aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	34
▪ Infectividad de los diferentes aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i> en ratones Balb/c y CD-1.	35
▪ Actividad enzimática del extracto de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> .	36
▪ Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS del extracto de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	37
▪ Determinación de las actividades enzimáticas de l extracto de epimastigotes en geles de poliacrilamida en presencia de SDS y gelatina.	39

▪ Efecto del cocultivo de linfocitos de ratón CD-1 con epimastigotes <i>Trypanosoma cruzi</i> sobre las poblaciones de CD4 y CD8.	40
▪ Actividad del extracto semi-purificado de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> en los co-receptores CD4 y CD8 de linfocitos T.	41
▪ Inducción de apoptosis por el extracto semi-purificado de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> .	44
<b>DISCUSION</b>	46
<b>CONCLUSIONES</b>	51
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	52

## RESUMEN

Las cisteína-proteasas son enzimas que se encuentran en la mayoría de los organismos desde virus hasta vertebrados. Estas enzimas tienen diversas funciones, tales como: nutrición, penetración celular, enquistamiento y desenquistamiento, cambio de fase y evasión de la respuesta inmune, entre otras. Las cisteína-proteasas han sido identificadas en muchos casos como factores de virulencia. *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas, produce varias cisteína-proteasas, siendo la cruzipaína la más importante por las diversas funciones biológicas en que participa. Las funciones, que hasta ahora se han descrito para la cruzipaína son: promover la penetración celular, aumentar la metacicloogénesis, polarizar la respuesta inmune hacia un tipo Th2, promover la activación clonal de células B, digerir inmunoglobulinas e inducir apoptosis en células neuronales NT2. Con estos antecedentes, el objetivo de nuestro trabajo fue estudiar el efecto de la cruzipaína y otras actividades de cisteína proteasa sobre moléculas de superficie de linfocitos T que pertenecen a la superfamilia de la inmunoglobulinas, como CD4 y CD8 e investigar si estas actividades enzimáticas eran capaces de inducir apoptosis en estos tipos celulares. Para conseguir este objetivo, se obtuvieron 2 sobrenadantes a partir de un extracto de epimastigotes de *T. cruzi* del aislado Querétaro. Los experimentos se realizaron con la mezcla de los sobrenadantes o con el segundo sobrenadante. Se les determinó su actividad de cisteína-proteasas utilizando Z-Phe-Arg-AFC que es un sustrato fluorogénico para serina y cisteína-proteasas y E-64 que es un inhibidor específico de cisteína-proteasas. Se realizaron zimogramas en geles de poliacrilamida con gelatina y se observó que los sobrenadantes contenían 6 actividades que correspondían a cisteína proteasas ya que fueron inhibidas con E-64 y una actividad de serina-proteasa que fue inhibida con Pefabloc SC (inhibidor específico de serina-proteasa). Mediante citometría de flujo se estudió el efecto del segundo sobrenadante del extracto de epimastigotes en linfocitos de bazo de ratón CD-1 y se observó que se produjo una disminución de la cantidad de linfocitos TCD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> y que este efecto en gran parte fue debido a las cisteína-

proteasas presentes en el extracto, ya que la incubación del sobrenadante con E-64 antes de su contacto con los linfocitos revirtió parcial o totalmente el efecto . La mezcla de sobrenadantes del extracto indujo apoptosis en linfocitos, sin embargo con el uso de E-64 no se observó reversión del efecto por lo que no podemos concluir que ésta se deba a las cisteína -proteasas presentes en el extracto.

## ABSTRACT

Cysteine-proteases are enzymes found in most of the organisms. These enzymes have been identified in many cases as virulence factors since they participate in several functions such as: nutrition, cellular penetration, formation of cysts and excystation, change of stage, and evasion of the immune response, among others. *Trypanosoma cruzi* contains several cysteine-proteases. Cruzipain is the major cysteine-proteases; it promotes cellular penetration, increases metacyclogenesis, polarizes the immune response to Th2 type, promotes B cell polyclonal activation, digests immunoglobulins and induces apoptosis in neuronal cells. The effect of these enzymes on the surface molecules of immune cells that belong to the immunoglobulin superfamily has not been studied. The aim of this work was to determine the effect of *T. cruzi* cysteine-proteases on molecules of T cells like CD4 and CD8 and investigate if these enzymes are able to induce apoptosis in these cells. Semi-purified material (2 different supernatants) from an extract of *T. cruzi* epimastigotes (Queretaro isolate) was obtained. Experiments were performed with the mixture of supernatants and/or with the second supernatant alone. Cysteine-protease activities were estimated *in vitro* using a fluorogenic substrate and a cysteine-protease inhibitor (E-64). Characterization of these activities was achieved using zymograms. The effect of cysteine-protease activities on mouse spleen T-cells (CD4 and CD8) was estimated by flow cytometry and their ability to induce apoptosis was evaluated using the TUNEL test. Results showed that the supernatants contained at least 6 cysteine-protease activities (inhibited with E-64), but the mixture of supernatants contained also a serine-protease activity (inhibited with Pefabloc SC). A diminution of the amount of TCD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocytes were observed when supernatants were incubated with CD-1 mouse spleen T cells. This effect was avoided with E-64 so the diminution must be due to cysteine-proteases activities. The extract induces apoptosis in lymphocytes, nevertheless the use of E-64 did not revert the effect, so it can not be concluded that the cysteine-proteases activities contained in the supernatants are the responsible of inducing apoptosis.



## INTRODUCCION

### 1. Tripanosomiasis americana

La tripanosomiasis americana fue descrita por primera vez en el año de 1909 por el Dr. Carlos Chagas y desde entonces se conoce como Enfermedad de Chagas. Esta enfermedad es producida por un parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*, que tiene un ciclo biológico complejo que alterna entre un huésped invertebrado (triatóminos) y uno vertebrado entre ellos el hombre. La enfermedad de Chagas se extiende desde México hasta el sur de Argentina, actualmente entre 18 y 20 millones de personas se encuentran afectadas con esta enfermedad y aproximadamente 40 millones de personas están en riesgo de adquirirla. (OMS 2002)

La transmisión de la enfermedad de Chagas se da principalmente por la contaminación fecal del insecto vector hematófago infectado con *T. cruzi* en el sitio de la picadura o en membranas expuestas. Además existen otros mecanismos de transmisión como la transfusión sanguínea, manejo de material contaminado, por la transmisión transplacentaria (Prata 2001), otro mecanismo de transmisión menos frecuentes es la oral por la ingestión de carne mal cocida (Camandaroba *et al.* 2002).

La importancia de la enfermedad de Chagas radica en que causa lesiones crónicas en el tejido muscular principalmente en el tejido cardiaco, además de que en menos del 1% de los casos puede producir una miocarditis aguda.

En la actualidad solo se cuentan con tratamientos farmacológicos para la fase aguda de la enfermedad. Para la fase crónica, no se cuentan con fármacos efectivos y mucho menos, con vacunas que provean una inmunidad efectiva para prevenir el desarrollo de esta infección.

### 2. Morfología de *Trypanosoma cruzi*

La morfología de *T. cruzi* comprende cuatro estadios biológicos que son: Epimastigotes: son las formas reproductivas de aspecto fusiforme (20 a 25µm de

longitud) en los que, el cinetoplasto está situado en la porción anterior del parásito y cercano al núcleo y el flagelo forma una pequeña membrana ondulante. El cinetoplasto es una mitocondria que ocupa gran parte del citoplasma. Los epimastigotes se encuentran en el intestino del transmisor y dan lugar a los tripomastigotes metacíclicos. También se pueden observar en los medios de cultivo.

Tripomastigotes: son formas no replicativas que presentan un cuerpo flagelado y alargado (20 a 25  $\mu\text{m}$  de longitud). Presentan un gran núcleo vesiculoso, cinetoplasto subterminal posterior al núcleo. Del cinetoplasto emerge la membrana ondulante que recorre el cuerpo del parásito a lo largo saliendo libre en la porción anterior. A este estadio se le encuentra en la sangre de los mamíferos y en el intestino posterior del vector donde se le conoce como tripomastigote metacíclico que es la forma infectante para los mamíferos como el hombre y otros animales.

Promastigotes: son formas flageladas y alargadas (20 a 25  $\mu\text{m}$  de longitud) en las que el cinetoplasto se localiza en la porción anterior y lejano al núcleo del cual emerge el flagelo sin formar membrana ondulante sale libre por la porción anterior del cuerpo y es de duración fugaz.

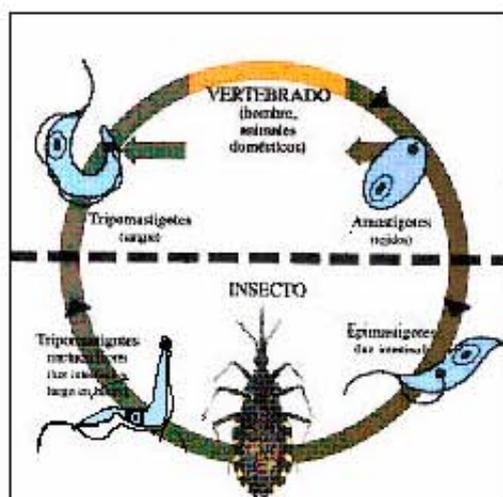
Amastigotes: son formas redondeadas (2 a 2.5  $\mu\text{m}$ ) sin flagelo libre pero al microscopio electrónico se ve el flagelo dentro de una bolsa, además presenta un gran núcleo y cinetoplasto. Esta fase morfológica se encuentra dentro de las células del huésped mamífero y son formas replicativas (Beaver *et al.* 1994).

Otras estructuras internas que componen a *T. cruzi* son: el retículo endoplásmico y las vacuolas como los acidocalcisomas, donde se almacenan fósforo,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^{-}$ , y  $\text{K}^{+}$  (47); los glicosomas que almacenan catalasa y otras enzimas; y los reservosomas donde también se almacenan enzimas como la cruzipaina (Soares *et al.* 1987).

### **3. Ciclo de vida**

El ciclo de vida de *T. cruzi* lo iniciamos cuando el insecto vector ingiere sangre de un hospedero infectado con tripomastigotes sanguíneos. Al llegar éstos

al intestino medio del insecto se multiplican por fisión binaria longitudinal (Taylor *et al.* 2001). Tres o cuatro semanas después, aparecen los tripomastigotes metacíclicos en el intestino posterior del triatomino. Cuando un insecto infectado se alimenta de un huésped no infectado ingiere sangre en volumen varias veces mayor que su peso corporal por lo que el contenido intestinal es desplazado y obliga al insecto a defecar en la piel o mucosas cercanas al sitio de la picadura. Esto induce prurito intenso, favoreciendo el rascado del huésped y promoviendo la penetración de los tripomastigotes en la piel (Fig. 1).



Tomado de Asociación Ciencia Hoy

**Figura 1.** Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*.

Los tripomastigotes pueden ser fagocitados o penetrar activamente en las células del sistema reticuloendotelial, donde se transforman en amastigotes intracelulares y se multiplican por fisión binaria, hasta llenar la célula. Cuando ésta se lisa se liberan tripomastigotes que infectan células vecinas o pasan a la circulación sanguínea diseminándose por todo el organismo y estableciéndose en los tejidos u órgano blanco, dependiendo del tropismo de la cepa (Beaver *et al.* 1994).

#### 4. Respuesta inmune en la tripanosomiasis americana

La resistencia del huésped a la enfermedad de Chagas experimental depende tanto de la inmunidad innata como de la adquirida. La persistencia del parásito probablemente depende de una combinación de factores que incluyen la liberación de moléculas que inducen supresión de células T, activación policlonal de linfocitos y apoptosis de las células del huésped (Dos Reis 2005).

El papel de los receptores Toll-like (TLRs) en la infección por *T. cruzi* ha sido investigado. Los tripanosomas expresan diferentes moléculas que pueden funcionar como ligandos para TLRs así, mucinas unidas a glicofosfatidil-inositol (GPI) activan macrófagos a través de TLR2, y los glicoinositol fosfolípidos unidos a GPI interactúan con los TLR4 (Campos *et al.* 2001; Oliveira *et al.* 2004). Ratones deficientes en TLR-2 montan respuestas inflamatorias reducidas hacia mucinas ancladas a GPI, aunque las respuestas hacia los parásitos completos permanecen intactas al igual que la resistencia a la infección *in vivo*. Sin embargo, los ratones que carecen de proteínas adaptadoras como MyD88 de la familia de los TLR, montan respuestas inflamatorias deficientes hacia los parásitos completos y presentan parasitemias más altas y mortalidad acelerada. Estos hallazgos confieren un papel crucial a TLRs no identificados en las respuestas pro-inflamatorias y en la resistencia a la infección por *T.cruzi* (Campos *et al.* 2004).

Por otro lado, el DNA de *T. cruzi* induce la proliferación de células B y la secreción de IL-12, TNF $\alpha$  y óxido nítrico de macrófagos (Shoda *et al.* 2001).

Los cardiomiocitos también participan de manera importante en la inmunidad hacia *T.cruzi* ya que, cuando son infectados *in vitro* secretan citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas, que atraen a más células leucocitarias para controlar la replicación del parásito junto con la producción de óxido nítrico, lo cual podría explicar, entre otros factores, el importante daño inflamatorio que se observa en esta enfermedad (Machado *et al.* 2000).

#### **4.1 Respuesta inmune humoral**

Los anticuerpos son muy importantes en el curso de la infección por *T. cruzi* (Tarleton 1997). Los anticuerpos colectados durante la fase crónica inducen lisis del parásito en presencia en complemento *in vitro* y disminuyen la parasitemia cuando son inyectados junto con tripomastigotes en ratones normales por lisis y/o opsonización (Brenner *et al.* 1990; Umekita *et al.* 1998; 2000). Los anticuerpos con actividad lítica aparecen tempranamente en la fase aguda de la infección mientras que los anticuerpos opsonizantes son detectados tardíamente en la fase aguda y en la fase crónica (Kretti *et al.* 1979). La opsonización puede ser sólo con anticuerpos o también con fragmentos del factor C3 del sistema del complemento (Mota *et al.* 1989; Umekita *et al.* 1988).

La infección por *T. cruzi* induce una activación policlonal de linfocitos B con hipergamaglobulinemia hacia antígenos no relacionados (Sajid *et al.* 2002; McKerrow *et al.* 1993). Los anticuerpos inducidos durante la infección participan en fenómenos autoinmunes que se han relacionado con los daños que se producen en el tejido cardíaco como la miocarditis aguda que está acompañada de auto-anticuerpos contra la miosina (Roitt *et al.* 1998). También se han detectado anticuerpos inducidos contra proteínas P ribosomales que estimulan los adrenoreceptores  $\beta_1$  produciendo arritmias cardíacas en ausencia de reacciones inflamatorias (Lopez-Bergamik *et al.* 2001).

#### **4.2 Respuesta inmune celular**

La respuesta inmune mediada por células participa de manera importante en la infección por *T. cruzi* tanto en la fase aguda, como en la crónica. Durante la fase aguda de la infección, las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> han sido descritas como importantes mediadores de la inmunidad adquirida (Tarleton 1995), durante la fase crónica de la enfermedad también es importante la respuesta inmune mediada por células ya que favorece que las parasitemias se encuentren en niveles muy bajos (Morato *et al.* 1986).

La activación y diferenciación de linfocitos TCD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> son requeridas para el control de la infección (Dos Reis 1997) Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> juegan un papel importante en la resistencia a *T. cruzi* ya que la disminución de estas células aumenta la susceptibilidad en ratones. Algunos antígenos del parásito que son liberados dentro de la célula son presentados a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> a través de moléculas del MHC clase I (Rodríguez 2003). Un estudio reciente muestra que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> provenientes de músculo y tejido cardiaco de ratón infectado con *T. cruzi* expresan un fenotipo de células de memoria activadas que son disfuncionales comparadas con los linfocitos T CD8<sup>+</sup> esplénicos. Este defecto es una posible explicación para la persistencia del parásito que se observa en tejidos no linfoides (Levey *et al.* 2003). Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> Th1 que se producen son efectivos para activar macrófagos y así eliminar formas intracelulares de parásito (Rodríguez *et al.* 2000).

Las células dendríticas tienen una función importante en la inmunidad hacia *T. cruzi* ya que, capturan y presentan antígenos a los linfocitos T durante el curso de la infección y liberan señales coestimuladoras para prevenir la muerte de linfocitos T y dirigir su expansión clonal (Kelsall *et al.* 2002). Se ha observado que durante la fase aguda de la infección, las células dendríticas se encuentran inmaduras, aumentadas en número y expresando bajos niveles de CD86 (Chaussabel *et al.* 2003); la infección también bloquea la maduración de células dendríticas inducida por LPS, disminuyendo la expresión de HLA-DR y CD40 (van Overtvelt *et al.* 1999). La disminución de moléculas coestimuladoras en células dendríticas y en macrófagos ha sido considerada como un factor de susceptibilidad ya que, macrófagos provenientes de cepas susceptibles de ratones tienen una menor expresión de CD40 y de CD86 y macrófagos provenientes de ratones resistentes producen IL-12, TNFa y óxido nítrico (Planelles *et al.* 2003). Más aun, ratones deficientes de moléculas coestimuladoras como CD28 son marcadamente más susceptibles incrementándose la parasitemia y la mortalidad (Miyahira *et al.* 2003). Se ha descrito que en células fagocíticas infectadas con *T. cruzi* está inhibida la secreción de citocinas como IL-12, TNFa e IL-6 (van Overtvelt *et al.* 1999).

### 4.3 Respuestas Th1 y Th2

Se ha reportado una mezcla de citocinas Th1 y Th2 en los compartimentos linfoides y en los órganos blanco en infecciones experimentales con *T. cruzi* (Zhang *et al.* 1996, de Diego 1997). Aunque la infección con *T. cruzi* produce respuestas mixtas Th1/Th2, el balance de estas respuestas determina la resistencia o susceptibilidad. Los neutrófilos parecen ser importantes en la modulación de estas subpoblaciones, ya que la eliminación de estas células en ratones susceptibles exacerba la infección por la disminución de los niveles de citocinas Th1 (Chen *et al.* 2001).

El papel central del IFN $\gamma$  en el control de la infección por *T. cruzi* ha sido ampliamente documentado (Hoft *et al.* 2000). Esta citocina activa a los macrófagos para la producción de óxido nítrico y de citocinas como IL-12 y TNF $\alpha$  e induce la expresión de moléculas clase II y coestimuladoras. La respuesta tipo Th2 no es requerida para el control de la infección mas aún, su presencia contribuye a incrementar la persistencia del parásito y aumentar la severidad de la enfermedad en la fase crónica de la infección (Tarleton *et al.* 2000).

### 4.4 Inmunidad y Apoptosis

En la infección por *T. cruzi* se ha detectado la presencia de células apoptóticas. Así, el bazo de ratón infectado con *T. cruzi* contiene gran cantidad de células que están sufriendo apoptosis, indicando que la muerte celular programada (PCD) es un proceso que se lleva a cabo *in vivo* (López *et al.* 1995).

La apoptosis inducida por la infección de *T. cruzi* afecta tanto células de la respuesta inmune como otros tipos celulares (Dos Reis *et al.* 2001). Se ha descrito que en la fase aguda de la infección, la apoptosis de linfocitos B se encuentra aumentada (Zuñiga *et al.* 2000). Esta se induce mediante la interacción de Fas-FasL y se produce preferentemente en células B productoras de IgG específicas en contra del parásito y no en contra de antígenos propios (Zuñiga *et al.* 2002). Esto sugiere que el bloqueo de FasL podría favorecer la inmunidad humoral en contra del parásito.

La apoptosis de las células T ocurre en mayor proporción también durante la fase aguda, tal vez como resultado de la activación policlonal de linfocitos, y se ha reportado que ocurre por la interacción Fas-LFas (Nunes *et al.* 1998). Se ha encontrado que una enzima de *T. cruzi* llamada transialidasa (TS) produce apoptosis de timocitos *in vivo*, lo que probablemente explica la atrofia tímica que se produce durante la infección (Mucci *et al.* 2002). En la infección experimental por *T. cruzi*, los linfocitos T CD4+ sufren de apoptosis (Van Parijs *et al.* 1996). Los efectos del bloqueo de la apoptosis en linfocitos T CD8+ han sido investigados debido a la importancia de estas células en la inmunidad contra *T. cruzi*. Así, el tratamiento de ratones infectados con una sustancia que bloquea la apoptosis de los linfocitos T CD8+, permite la acumulación de estas células con un fenotipo de memoria, reduce la carga parasitaria y produce un efecto protector durante la reinfección (Oliveri *et al.* 2002).

Por otro lado, la eliminación de células apoptóticas por los fagocitos libera mediadores anti-inflamatorios e inmunosupresores (Savill *et al.* 2002) y exagera la replicación de los parásitos en los macrófagos a través de vías bioquímicas que involucran integrinas, PGE2, la producción de TGF $\beta$ 1, la inducción de ornitina descarboxilasa y la producción de poliamina. De tal forma que, el tratamiento con aspirina e indometacina, que son inhibidores de la ciclooxigenasa, reducen marcadamente la parasitemia. La producción de TGF- $\beta$  también inhibe la producción de óxido nítrico en macrófagos infectados que fagocitan células apoptóticas (Freire-de-Lima *et al.* 2000, Nunes *et al.* 1998). La activación del macrófago inducida por las células apoptóticas es similar a la activación alterna inducida por las citocinas Th2 y cruzipaína (Stempin *et al.* 2002). Estos resultados sugieren que la eliminación de células apoptóticas inactiva a los macrófagos y favorece la persistencia del parásito. En contraste con lo anterior, se ha reportado que la eliminación de las células apoptóticas puede promover la liberación de citocinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$  siempre y cuando, las células fagociten simultáneamente células apoptóticas y ligandos para TLR (Lucas *et al.* 2003).

Por otro lado, la infección por *T. cruzi* inhibe la apoptosis en fibroblastos y los parásitos o la cruzipaína inhiben o retrasan la apoptosis de cardiomiocitos

fetales en condiciones experimentales (Heussler *et al.* 2002, Aoki *et al.* 2004). Sin embargo, otro estudio ha demostrado que aunque los fibroblastos infectados resisten la apoptosis, los cardiomiocitos y macrófagos la sufren; de hecho, la apoptosis en cardiomiocitos ha sido detectada *in vivo* en ratones (De Souza *et al.* 2003) y en perros infectados (Zhang *et al.* 1999).

Los antígenos propios que se derivan de células apoptóticas son presentados por los fagocitos a las células T, lo que da como resultado la producción de clonas auto reactivas (Savill *et al.* 2002). Con la información anterior, se ha propuesto un modelo para explicar el daño cardiaco producido por *T.cruzi*, donde los cardiomiocitos infectados que sufren apoptosis son fagocitados por células dendríticas, las cuales procesan y presentan antígenos del parásito y propios a los linfocitos T efectoras. Estos linfocitos CD4+ y CD8+ que reaccionan en contra de epítopes parasitarios y propios (cardiacos), sufren expansión clonal y se diferencian en células T activadas que posteriormente, circulan al corazón donde producen inflamación y daño tisular (Zhang *et al.* 1999; Hoffman *et al.* 2001; Meier *et al.* 2002; de Souza *et al.* 2003).

## **5. Regulación de la respuesta inmune por parásitos.**

Los parásitos han desarrollado mecanismos para evadir la respuesta inmune del huésped de una manera efectiva. Dependiendo del parásito, los mecanismos pueden ser físicos o bioquímicos (moléculas que alteran la respuesta inmune).

### **5.1 Mecanismos físicos.**

Los nemátodos por ejemplo, tienen una cutícula extracelular gruesa o sufren de la pérdida de la membrana externa evitando el ataque celular tóxico producido por los neutrófilos. Algunas especies de protozoarios como *Entamoeba histolytica* y algunos helmintos como *Trichinella spiralis* forman quistes protectores mientras que, otros gusanos adultos como *Onchocerca volvulus* inducen la acumulación de colágena formando nódulos alrededor de ellos. Aún

más, algunos nemátodos y gusanos intestinales son protegidos de la respuesta inmune del huésped simplemente por permanecer en el intestino (Roitt *et al.* 1998).

La adaptación a una vida intracelular que algunos protozoarios como *Leishmania mexicana*, *T. cruzi*, *Toxoplasma gondii* y algunas especies de *Plasmodium* han adquirido, es otro de los mecanismos más simples de evasión de la respuesta inmune humoral y celular (Sacs *et al.* 2002).

Otros parásitos como *Taenia taeniaeformis* y *Taenia crassiceps* tienen receptores Fc para la IgG que pudieran estar involucrados en la endocitosis de inmunoglobulinas observada en estos parásitos (Hayunga *et al.* 1989; Kalinna *et al.* 1993; Ambrosio *et al.* 1994).

## **5.2 Moléculas del parásito que alteran la respuesta inmune**

### **5.2.1 Variación antigénica**

La variación antigénica se refiere a los cambios que sufren las proteínas de superficie de algunos parásitos cuando éstos pasan de un estadio a otro durante su ciclo biológico, por lo tanto, la respuesta que se establece ante uno o varios antígenos no será efectiva cuando el parásito pase a la siguiente fase del ciclo biológico. *P. falciparum*, por ejemplo, cambia sus antígenos de superficie cuando pasa de una fase a otra en el ciclo biológico además, un antígeno que se encuentra en la superficie del esporozoito (CSP) que contiene varias repeticiones en tandem promueve una respuesta humoral no específica (Ramasamy 1998). Además tiene otra proteína de superficie PfEMP-1 que sufre variaciones clonales con alta frecuencia (Reeder *et al.* 1996). El antígeno VSG de *Trypanosoma brucei* es una glicoproteína variante de superficie que tiene un amplio repertorio de genes que la codifican (más de 1000). Los individuos infectados con este parásito muestran picos de parasitemia expresando diferentes antígenos de superficie a diferentes tiempos. Para cuando el huésped produce anticuerpos en contra del primer tipo antigénico (VSG1) una nueva generación de parásitos antigénicamente

distintos se está reproduciendo (VSG2), y así sucesivamente (Van der Ploeg 1987).

### 5.2.2 Moléculas inhibidoras del sistema inmune

La inmunosupresión que se observa en algunas parasitosis puede ser inducida por factores que causan daño directo a las células o tejidos linfoides, en este sentido podemos mencionar al factor linfotóxico de *T. spiralis*. Además, gusanos cilíndricos y planos son capaces de secretar prostaglandinas que también actúan como supresores de las reacciones inflamatorias (Roitt *et al.* 1998).

Durante la infección por *P. falciparum* se ha observado disminución de células T circulantes. Esto puede deberse a que en esta infección hay disminución en la respuesta linfoproliferativa y en la producción de citocinas por las células mononucleares cuando son estimuladas con antígenos del parásito (Riley *et al.* 1988). Este efecto puede ser revertido con la adición de indometacina, lo que sugiere que los macrófagos pudieran estar secretando prostaglandinas (Riley *et al.* 1989) o que las proteínas de fase aguda, al unirse a las células linfoides, inhiban la proliferación de linfocitos (Cheres *et al.* 1984).

La liberación de enzimas como moléculas inhibidoras es otro mecanismo para evadir la respuesta inmune del huésped. Algunos gusanos planos previenen el ataque celular mediante la secreción de un inhibidor de la elastasa o por medio de la liberación de enzimas que interfieren con los mecanismos microbicidas. *O. volvulus*, por ejemplo, libera superóxido dismutasa, enzima que interfiere con el estallido respiratorio (Brophy *et al.* 1992). Así mismo, proteínas de superficie de *Leishmania donovani* (LPG y gp63) inhiben el estallido respiratorio a través de una activación anormal de la protein cinasa C y reducción de la traslocación a la membrana, más aún también están involucrados en la eliminación de intermediarios del oxígeno (Giorgone *et al.* 1996).

Trofozoitos de *E. histolytica*, también inhiben el estallido respiratorio de los monocitos, a través de un factor inhibidor de la locomoción (Rico *et al.* 1995).

*Taenia taeniaeformis* produce un inhibidor de serina-proteasa llamado teniastatina, que, entre otras funciones, disminuye la proliferación de linfocitos (Leid *et al.* 1987).

### 5.2.3 Moléculas del parásito que afectan la producción de citocinas.

La permanencia de los parásitos en el huésped también es favorecida por la polarización de la respuesta de los linfocitos T hacia subpoblaciones Th1 o Th2 debida a la producción de citocinas específicas inducida por ellos mismos (Talamas-Rohana *et al.* 1995; Darji *et al.* 1996).

Se ha reportado, en modelos experimentales, que macrófagos infectados con *E. histolytica* liberan prostaglandina E2 (PGE2) que inhibe la liberación de citocinas Th1 como IL-2 e IFN $\gamma$  por las células T (Betz *et al.* 1991). Así mismo, las prostaglandinas liberadas por los metacéstodos de *Taenia taeniaeformis* disminuyen la inflamación y la secreción de IL-1 e IL-2 polarizando la respuesta hacia la producción de citocinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL10 e IL-13) (Leid *et al.* 1983; Maizels *et al.* 1993)

El factor de metacéstodo de *Taenia solium* (FM), ribonucleopéptido de bajo peso molecular que tiene características inmunoregulatoras, inhibe la producción de citocinas como IL-2, IFN $\gamma$  e IL-4 en células esplénicas de ratón y de TNF $\alpha$  por macrófagos estimulados con LPS e IFN $\gamma$  (Archavaleta *et al.* 1998). Más aún, se ha reportado que ratones implantados con metacéstodos de *T. solium* tienen disminuida la producción de IL-2 e IL-4 de células CD8 $^{+}$  y que, ratones expuestos al factor de metacéstodo de *T. solium*, presentan disminuida la producción de IL-2 en CD4 $^{+}$  y de IFN $\gamma$ , IL-2 e IL-4 en CD8 $^{+}$  (Hernández *et al.* 2005).

*Trypanosoma cruzi* evade la respuesta inmune mediante la modulación de citocinas a nivel transcripcional ya que, como ha sido descrito, presenta una mucina de superficie (AgC10) que puede unirse a los macrófagos e inducir la secreción de IL-1 pero no la de IL-12 o TNF $\alpha$ , que son consideradas citocinas protectoras en la enfermedad de Chagas (de Diego 1997). Este parásito también promueve la secreción de IL-10 y TGF $\beta$  en macrófagos infectados que inhiben la

producción y los efectos de la IL-12 (Silva *et al.* 1998). Así mismo, promastigotes metacíclicos de *Leishmania major* suprimen activamente la expresión de IL-12 en monolitos, a nivel transcripcional (Carrera *et al.* 1996).

En modelos murinos, un antígeno de superficie de *P. falciparum* mimetiza los efectos de la hormona insulina reduciendo los niveles de glucosa e incrementando la síntesis de TNF $\alpha$  e IL-1 en macrófagos, lo que promueve el aumento de proteínas de fase aguda. También se han identificado homólogos de la timocina 1 (hormona tímica que modula la diferenciación de células T) en proteínas de *P. falciparum* lo que sugiere que puede interferir con el desarrollo de una efectiva inmunidad celular (Shofield *et al.* 1993)

#### 5.2.4 Antígenos del parásito que alteran la respuesta humoral

Algunos parásitos utilizan mecanismos que interfieren con la respuesta humoral por ejemplo, proteínas de superficie, como la MSP-1 que presenta *P. falciparum* en la fase de merozoito, induce síntesis de “anticuerpos bloqueadores” que evitan la unión de los anticuerpos con capacidad inhibitoria real (Holder *et al.* 1999). Se ha descrito en ratones infectados con *T. cruzi*, activación policlonal de células B con la producción de IgM principalmente (García *et al.* 1997) y la presencia de grandes cantidades de células B productoras de inmunoglobulinas que no reconocen antígenos parasitarios pero que si se unen a antígenos del huésped (Minoprio *et al.* 1988, Spinella *et al.* 1990).

Otros parásitos como *E. histolytica*, liberan proteasas capaces de digerir IgA e IgG. (Que *et al.* 1997), *T. cruzi* y *T. solium* que también producen proteasas que degradan IgG (Botempi *et al.* 1990; White *et al.* 1992).

Algunos parásitos presentan antígenos en su superficie que al unir anticuerpos los endocitan como en el caso de *T. taeniaeformis* y *T. crassiceps* (Hayunga *et al.* 1989; Ambrosio *et al.* 1994).

#### 5.2.5 Moléculas de parásitos que alteran la función del complemento

Otro mecanismo de evasión de la respuesta inmune es la regulación de los componentes del complemento evitando así el efecto lítico del mismo. *E. histolytica* contiene moléculas reguladoras que inactivan mediadores del C3a y C5a (Gutierrez *et al.* 1997) y además tiene una sofisticada estrategia para evadir anticuerpos y el efecto lítico del mismo por el complemento a través de permitir que los anticuerpos depositados en su superficie se acumulen en una región y sean eliminados como agregados moleculares (Capping) (Calderon *et al.* 1986)

*Taenia taeniaeformis* tiene una moléculas de superficie como la teniastatina que inhibe la activación del complemento (Leid *et al.*1987), y polisacáridos sulfatados que, al ser secretados, activan y consumen el complemento a distancia (Letonja *et al.* 1983). *T. cruzi*, también posee moléculas como T-DAF, gp58/68 y gp160 con propiedades anti-complementarias (Fisher *et al.* 1988).

#### 5.2.6 Factores de los parásitos que alteran moléculas de MHC y funciones fagocíticas.

Algunos parásitos intervienen con las funciones intracelulares de las células fagocíticas con la finalidad de evitar el ataque enzimático y prolongar su estancia dentro de las células, y alteran las moléculas del MHC evitando que se establezca una respuesta inmune específica. Por ejemplo, *Leishmania* inhibe la formación del fagolisosoma en las células fagocíticas (Sorensen *et al.* 1994; Desjardins *et al.* 1997) además de que en macrófagos infectados previene la apoptosis (Letonja *et al.* 1983; Reiner *et al.* 1987; Locksley *et al.* 1993).

. *Trypanosoma cruzi* también escapa de la acción proteolítica de los fagolisosomas inhibiendo la formación del mismo en las células fagocíticas (de Diego 1997)

En macrófagos murinos tratados con antígenos de *E. histolytica* se reduce la producción de moléculas asociadas a la región I del MHC (moléculas Ia) inducidas por IFN- $\gamma$ , (Wang *et al.* 1995) igualmente componentes de superficie de *Leishmania*, como los glicoinositolfosfolípidos, inhiben la expresión de moléculas

clase I y II del MHC (Reiner *et al.* 1987). También se ha reportado que algunos esquistosomas absorben moléculas del MHC del huésped (McKerrow 1989).

#### 5.2.7 Producción de enzimas

La producción de enzimas por los parásitos es un mecanismo que utilizan para evadir la respuesta inmune del huésped ya que como se ha mencionado anteriormente estas enzimas participan en la degradación de inmunoglobulinas y otras moléculas similares, la inducción de citocinas reguladoras a favor del parásito, la activación policlonal inespecífica de células B y en la inhibición de intermediarios de oxígeno así como de mediadores químicos.

### 6. Proteasas

Las proteasas o péptido hidrolasas son enzimas que hidrolizan enlaces amida en proteínas y péptidos oligoméricos. Las proteasas se han identificado en prácticamente todos los sistemas biológicos desde virus hasta vertebrados y se ha reportado que son excelentes catalizadores ya que pueden degradar más de un millón de enlaces peptídicos por segundo. Las proteasas pueden ser clasificadas basándose en su habilidad para hidrolizar los grupos amino o carboxilo terminales (exopeptidasas) o internos (endopeptidasas) del sustrato. También se les ha clasificado según su mecanismo catalítico utilizado durante el proceso hidrolítico. Los principales tipos catalíticos son serina, treonina, aspartato, metalo y cisteína (McKerrow 1989; Barret 1994).

En los parásitos, las proteasas han sido estudiadas ampliamente ya que participan en funciones biológicas muy específicas tales como la invasión celular, la salida del parásito de la célula, el enquistamiento y desenquistamiento, la citoadherencia, el catabolismo de las proteínas del huésped (nutrición), la diferenciación y progresión del ciclo celular, y en la evasión de la respuesta inmune.

Más aún, debido a su importancia, actualmente se producen fármacos inhibidores de proteasas como tratamiento para algunas de estas parasitosis y las

proteasas también se han utilizado para la elaboración de vacunas (McKerrow 1999; McKerrow *et al.* 1999; Selzer *et al.* 1999).

### **6.1 Funciones biológicas de las proteasas en parásitos.**

Como ya hemos establecido, las funciones biológicas de las cisteína-proteasas son muy diversas y algunas de ellas son indispensables para la supervivencia del parásito.

#### **6.1.1 Invasión celular.**

La invasión es una función que realizan algunos parásitos que tienen uno o más estadios intracelulares durante su ciclo de vida así, se ha documentado que *P. chabaudi* contiene entre varias serina-proteasas, una llamada P68 que se encuentran en la superficie de esquizontes y merozoitos, esta enzima probablemente participa en el proceso de invasión (Breton *et al.* 1992). Se ha reportado que serina-proteasas de *T. gondii* están implicadas en los procesos de invasión (Conseil *et al.* 1999). También, proteasas de cisteína de *E. histolytica* han sido implicadas en la invasión y en la destrucción celular (Que *et al.* 2000) y las de *T. vaginalis* invaden el epitelio vaginal mediante la degradación de mucinas (Lehker *et al.* 1999).

#### **6.1.2 Nutrición.**

La degradación de proteínas exógenas es otra función que requiere la utilización de proteasas. Las dos proteasas mejor caracterizadas por su actividad enzimática y capaces de digerir la hemoglobina son la catepsina B-1 de *S. mansoni* y la falcipaina 2 de *P. falciparum* (Ghoneim *et al.* 1995).

Por otro lado, catepsinas Ls provenientes de *Fasciola hepatica* intervienen en la degradación de proteínas del huésped y los productos de esta degradación después son utilizados para su metabolismo y producción de huevos (Tort *et al.* 1999).

#### **6.1.3 Enquistamiento y Desenquistamiento .**

Estas estrategias las utilizan algunos parásitos para la supervivencia fuera de su huésped. Los quistes son transmisibles y son adquiridos por vía oral. Para comenzar su ciclo de vida y replicación en el nuevo huésped, los parásitos tienen que salir del quiste, proceso llamado desenquistamiento. Las proteasas son requeridas para la formación de los quistes y para la salida de protozoarios y helmintos que emergen de quistes protectores, cutículas o huevos. Por ejemplo, *Cryptosporidium parvum* contiene un aminopeptidasa que es requerida para la salida de los esporozoitos del ooquiste (Okhuysen *et al.* 1996). *Giardia lamblia* requiere de una cisteína-proteasa de para la formación y ruptura de sus quistes (Ward *et al.* 1997) y *Onchocerca volvulus* para el proceso de muda en los estadios de L3 (Lustigman *et al.* 1996).

#### 6.1.4 Participación de las proteasas en la Evasión del Sistema Inmune .

La evasión es otra función que ha sido descrita para las proteasas en parásitos. Por ejemplo, se ha propuesto que una catepsina L de *Fasciola hepatica* pudiera estar implicada en la inducción de citocinas tipo Th2 en células esplénicas de ratón (O'Neill *et al.* 2000) y que pueden hidrolizar inmunoglobulinas previniendo la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y eosinófilos (Carmona *et al.* 1993). También se ha reportado que las cisteína-proteasas producidas por el metacéstodo de *T. solium* tienen la capacidad de degradar moléculas de superficie como CD4 (Molinari *et al.* 2000) e inducir apoptosis en linfocitos (Tato *et al.* 2004) y que la cruzipaina de *T. cruzi* (cisteína-proteasa) degrada las IgG evitando la activación del complemento en su superficie y la opsonización (Botempi *et al.* 1990).

#### 6.1.5 Mecanismos de Patogénesis.

Las cisteína-proteasas se han relacionado con la patogénesis de algunas infecciones parasitarias. Por ejemplo, los tripanosomas africanos liberan estas enzimas al torrente circulatorio causando agregación plaquetaria que es una complicación de la infección por este parásito (Troeberg *et al.* 1996) y en infecciones murinas por *Leishmania mexicana* mutantes para cisteína-proteasas

se ha observado que presentan lesiones menos severas que las producidas por las cepas silvestres (Mottram *et al.* 196)

## 6.2. Cisteína-proteasas

Las cisteína-proteasas son enzimas que requieren esencialmente de un residuo de cisteína en el sitio activo para la hidrólisis. Estas proteasas pueden presentarse desde monómeros de 10 kDa hasta complejos multiméricos de cientos de kDa (Sajid *et al.* 2002).

Las cisteína-proteasas en los parásitos han sido ampliamente estudiadas por su participación en importantes funciones biológicas como las mencionadas anteriormente. Por ejemplo, las cisteína-proteasas de *T. brucei*, *T. vaginalis*, *P. falciparum*, *E. histolytica*, *S. mansoni*, y *T. solium* entre otros degradan proteínas exógenas como hemoglobina y colágena (McKerrow *et al.* 1993).

En infecciones con *P. knowlesi*, inhibidores de cisteína-proteasas reducen el procesamiento de las proteínas antes de la lisis de los eritrocitos y causan acumulación de esquizontes tardíos (Hadley *et al.* 1983). También cisteína-proteasas de *Strongyloides stercoralis* en estadio L3 han sido implicadas en la invasión tisular (Sajid *et al.* 2002) y las de *Taenia crassiceps* han sido asociadas con la penetración tisular (White *et al.* 1997).

Las cisteína-proteasas de *G. liambliia* son requeridas para la formación y ruptura de quistes (Ward *et al.* 1997) y en *Paragonimus. westermani* son requeridas para el desenquistamiento de las metacercarias en el lumen intestinal del huésped (Cheng *et al.* 1995), también cisteína-proteasas de *Necator americanus* están involucradas en la muda de las larvas L3. (Kumar *et al.* 1992).

Las cisteína-proteasa de muchos parásitos como *T. vaginalis*, *T. foetus*, *E. histolytica*, *G. liambliia*, *T. cruzi*, *F. hepatica*, *T. solium*, *T. crassiceps* y *Spirometra* entre otros, hidrolizan inmunoglobulinas (Sajid *et al.* 2002). Las cisteína-proteasas de *Leishmania* degradan moléculas del MHC clase II en los macrófagos, alterando la presentación de antígenos (De Souza *et al.* 1995), regulan la producción de la óxido nítrico sintasa (iNOS) en los macrófagos infectados, alterando sus funciones microbicidas (Barral *et al.* 1993) e inducen la expresión de citocinas como IL-4 e

IL-1, polarizando la respuesta hacia Th2 (Finkelman *et al.* 1992). Las cisteína-proteasas de *T. solium* reducen moléculas de superficie como CD4 y CD8 en linfocitos humanos (Molinari *et al.* 2000).

### **6.3 Proteasas de *Trypanosoma cruzi*.**

En *T. cruzi* se han caracterizado distintas actividades proteolíticas, entre ellas podemos mencionar a las cisteína, serina, treonina y metalo-proteasas.

#### **6.3.1 Serina -proteasas**

Se han descrito tres serina-proteasas en *T. cruzi*. La oligopeptidasa B con peso molecular entre 150 y 200 kDa que participa en la penetración de los tripomastigotes en las células, activando mecanismos de señalización dependientes de  $Ca^{2+}$  (Ashall 1990, burleigh *et al.* 1995). La prolyl endopeptidasa con peso de 80 kDa (Tc80) tiene actividad sobre la colágena tipo I, IV y la fibronectina por lo que su función biológica es la degradación de matriz extracelular para la penetración del parásito a los tejidos y la invasión celular (Santana *et al.* 1997). Finalmente, la carboxipeptidasa (63 kDa), glicoproteína rica en manosa, de la cual se desconoce su función biológica (Parussini *et al.* 2001).

#### **6.3.2 Metaloproteasas**

Se ha reportado, en estos parásitos, la expresión de dos metaloproteasas unidas a la membrana que muestran variaciones en peso molecular desde 52Kda hasta 62Kd y diferencias cualitativas en diferentes aislados y estadios del ciclo biológico; Hasta ahora se desconocen sus funciones biológicas (Lowndes *et al.* 1996).

#### **6.3.3 Cisteína-proteasas**

Las cisteína-proteasas son las enzimas que han sido mejor estudiadas por su importancia biológica. La cruzipaína es la cisteína-proteasa más abundante y de mayor importancia biológica que se encuentra en este parásito, se expresa en

todas las fases del ciclo biológico y puede expresar varias isoformas (Campetella *et al.* 1990; Franke de Cazzulo *et al.* 1994).

Otra cisteína-proteasa que produce *T. cruzi* es una enzima del tipo catepsina B, la cual tiene un peso molecular aproximado de 30 kDa y es expresada en todos los estadios del parásito y hasta la fecha no se conoce su función biológica (García *et al.* 1998).

## **7. Cruzipaína**

La cruzipaína pertenece a la familia de las papaínas y también es conocida como cruzaina o gp 57/51. Esta enzima tiene un peso molecular que puede variar entre 35 y 60kDa dependiendo de las condiciones electroforéticas que se utilicen para su estudio (Martinez *et al.* 1992). La cruzipaína es una glicoproteína (10% de carbohidratos) con alto contenido de manosa, es estable a pH alcalino y es capaz de autodegradarse produciendo complejos mixtos de pequeños péptidos y fragmentos glicosilados (Cazzulo 1991; Hellman *et al.* 1991). También, contiene un dominio C-terminal que sufre varias modificaciones postraduccionales y que le confiere características inmunodominantes (Cazzulo *et al.* 1997). Esta enzima es codificada por una serie de genes dispuestos en tandem y es sintetizada como una pre-pro-enzima que es procesada posteriormente (Campetella *et al.* 1992).

El sitio catalítico de la cruzipaína está compuesto de una sola cadena polipeptídica de 215 aminoácidos plegada en dos dominios distintos que interactúan uno con el otro (Mc Grath *et al.* 1995). La cruzipaína, como otras cisteína-proteasas es inhibida por compuestos órgano-mercuriales (66) y por péptidos inhibidores como E-64 (Cazzulo *et al.* 1990), leupeptina, quimostatina y antipaína (Botempi *et al.* 1984) y por inhibidores proteicos de la superfamilia de las cistatinas. También las estefinas A y B, cistatina C humana, cistatinas de pollo y L kininógeno son fuertes inhibidores de esta enzima (Stoka *et al.* 1995).

La expresión de cruzipaína es más abundante en epimastigotes (Campetella *et al.* 1990). Esta enzima se encuentra almacenada en los

compartimentos lisosomales incluyendo un organelo prelisosomal específico de los epimastigotes llamado reservosoma (Soares *et al.* 1992)

Son funciones de la cruzipaína:

- A) Ser una enzima esencial para el crecimiento y transformación de los parásitos, ya que se ha descrito que, inhibidores específicos de cruzipaína bloquean la multiplicación intracelular de los amastigotes (Meirelles *et al.* 1992) y disminuyen la metacicloogénesis (Bonaldo *et al.* 1991).
- B) La cruzipaína también interviene en los procesos de invasión de los tripomastigotes a las células del huésped mamífero (Souto-Padron *et al.* 1990).
- C) La cruzipaína es capaz de inducir la producción de péptidos proinflamatorios como la Lys-bradiquinina por proteólisis directa del quininógeno o indirectamente por activación de precalicreína plasmática (Delneri *et al.* 1997) La degradación del kininógeno produce kininas de vida corta que se unen a los receptores de bradiquinina en las células fagocíticas y que favorecen la endocitosis de los parásitos.
- D) La cruzipaína interviene en la patogénesis de la cardiomiopatía Chagásica, complicación tardía de la enfermedad de Chagas, induciendo la producción de anticuerpos del tipo IgG2a anti-miosina (Giordanengo *et al.* 2000). Más aún, se ha reportado que la respuesta inmune humoral en contra de epítopes expresados en la cruzipaína se relaciona con la severidad de la enfermedad chagásica crónica (Duschak *et al.* 2001). Se ha sugerido la participación de la cruzipaína en los fenómenos autoimunes que están presentes durante el curso de la infección.
- E) La cruzipaína participa en la evasión de la respuesta inmune ya que, se ha descrito que induce activación alterna de macrófagos J774 con la producción final de L-ornitina y urea bajo la regulación de citocinas Th2, lo que permite un aumento en la actividad fagocítica con una actividad microbicida disminuida (Freire de Lima *et al.* 2000).

- F) Como lo descrito para otras proteasas, la cruzipaina produce la degradación completa de las inmunoglobulinas humanas, principalmente degradando el fragmento Fc (Botempi *et al.* 1990). Esta enzima es capaz de degradar moléculas de anticuerpos unidas a la superficie del parásito dejando los fragmentos Fab que, por un lado son incapaces de activar la cascada del complemento, y por el otro, enmascaran antígenos para evitar su destrucción por opsonización (Krettli *et al.* 1990).
- G) Finalmente se ha descrito que la cruzipaina es capaz de activar las procaspasas 3 y 7 en una línea celular neuronal progenitora NT2 (Stoka *et al.* 2001), lo cual sugiere que esta enzima puede inducir apoptosis.

## **OBJETIVO GENERAL**

Con todos estos antecedentes, el objetivo de nuestro trabajo fue estudiar el efecto de la cruzipaina sobre la expresión de moléculas de superficie de los linfocitos T como CD4 y CD8 y en la inducción de apoptosis en estas células.

## **HIPOTESIS**

Si la cruzipaina es capaz de degradar inmunoglobulinas humanas e induce apoptosis en células neuronales entonces es posible que esta enzima pueda degradar moléculas que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas como CD4 y CD8 y que pueda inducir apoptosis en estos tipos celulares favoreciendo la permanencia del parásito en el huésped.

## MATERIAL Y METODOS

### **Cultivo de epimastigotes de *T. cruzi*.**

Se cultivaron epimastigotes de *T. cruzi* de los aislados Querétaro (amablemente donado por el Dr. Jorge Tay), Veracruz, Ninoa y Brener (amablemente donados por la Dra. Ingeborg Becker) en medio *RPMI* (Gibco, Grand Island, New York) suplementado con 5 ml de solución de antibióticos (100 U/ml de penicilina y 25 mg de estreptomina), 10ml de una solución 200 mM de L-glutamina (Sigma, St. Louis MO) y 10% de suero fetal bovino de complementado (Gibco) (*RPMI* completo) o en medio LIT (caldo de hígado y triptosa) complementado con 5 ml de solución de antibióticos y 10% de suero fetal bovino. Los cultivos se mantuvieron a 28°C hasta que la población de parásitos alcanzó la fase logarítmica de crecimiento. Para determinar la fase logarítmica, se realizaron curvas de crecimiento de cada uno de los aislados de *T. cruzi* a partir de una población de epimastigotes de  $5 \times 10^6$  parásitos/ml, midiendo la población cada 24 h.

### **Determinación de la infectividad de los diferentes aislados de *Trypanosoma cruzi* en ratones CD1 y Balb/c.**

Se infectaron por vía intraperitoneal a grupos de 2 ratones hembras, de 5-6 semanas de edad, de cada una de las cepas CD-1 y Balb/c con  $5 \times 10^7$  epimastigotes resuspendidos en 0.1 ml de solución salina isotónica de los aislados Querétaro, Veracruz, Ninoa y Brener. Se determinaron las parasitemias cada 24 h en cada uno de los ratones de la siguiente manera: los ratones se sangraron por la vena de la cola (10  $\mu$ l) y la sangre se mezcló con cloruro de amonio 0.85% a una dilución 1:20 y se contaron los parásitos utilizando una cámara de Neubauer. Con los datos obtenidos en las lecturas se realizaron curvas de parasitemia de cada uno de los animales de todos los aislados.

### **Obtención de extracto semi-purificado de epimastigotes de *T. cruzi***

Se obtuvo un extracto semi-purificado a partir de epimastigotes cosechados en la fase logarítmica de crecimiento según la metodología descrita por Cazzullo et al. (154). Antes de cosechar los parásitos, se determinó la densidad de la población a partir de una alícuota de 10  $\mu$ l que se mezcló con 190  $\mu$ l de *RPMI* completo y se contó en un hemocitómetro. Los epimastigotes se separaron del medio de cultivo por centrifugación a 3,500 rpm/20 min/4°C, se lavaron con una solución de sacarosa 0.25 M que contenía 0.005 M de cloruro de potasio por centrifugación en las mismas condiciones y los epimastigotes se resuspendieron en la misma solución de sacarosa en una proporción 1:3. Con el fin de romper las células, se realizaron tres ciclos de congelación a -20°C y descongelación y posteriormente se centrifugaron a 14,000 rpm/15 min/4°C. El primer sobrenadante se guardó y el sedimento se resuspendió con 150 o 200  $\mu$ l de la misma solución de sacarosa y se centrifugó a 96,000 rpm/30 min/4°C. El sobrenadante se guardó y el sedimento se desechó. Se realizaron experimentos con la mezcla de los dos sobrenadantes y con el segundo sobrenadante solamente.

La mezcla de sobrenadantes y se centrifugó una vez más a 96,000 rpm/30 min/4°C. El extracto se dializó contra una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) durante 48 h utilizando una membrana de diálisis Spectra Por que permite el paso de moléculas con peso menor a 14000 kDa.

### **Determinación de la actividad enzimática del extracto semi-purificado de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.**

Primeramente se determinó la concentración de proteína del extracto utilizando el método de Bradford (131) y se ajustó a una concentración de 10  $\mu$ g de proteína/ 20  $\mu$ l de PBS. Para detectar la actividad enzimática del extracto de epimastigote, se utilizó un sustrato peptídico acoplado a 7-amino 4 trifluorometilcumarina (AFC) (Enzyme System Products, Livermore, CA, USA.). El sustrato contenía Z-Phe-Arg-AFC que permite detectar actividades de cisteína y serina proteasas. Se incubaron 10  $\mu$ g del Z-Phe-Arg-AFC (resuspendidos en 1  $\mu$ l de PBS) con 10  $\mu$ g del extracto de epimastigotes y se ajustó el volumen a 200  $\mu$ l

con amortiguador de citratos 0.1 M, pH 4.9 suplementado con L-cisteína 15 mM y la reacción se incubó a 37°C en una atmósfera que contenía 5% de CO<sub>2</sub>. El AFC libre fue detectado fluorométricamente utilizando un Fluoroskan FL (Labsystems, Finland) con una onda de excitación de 405 nm y de emisión de 505 nm y convertido a nanomoles. Las mediciones se realizaron cada 45 min. durante 5 h. La actividad de serina proteasa en la mezcla de los sobrenadantes, se detectó mediante la incubación del extracto (1 µg) con Z-Phe-Arg-AFC en Tris-HCl pH 8.9 y utilizando como inhibidor Pefabloc SC (4-2-aminoethyl-benzenesulfonyl fluoride,hydrochloride) a una concentración de 2 mM en el buffer de incubación.

### **Ensayos de inhibición.**

Con la finalidad de corroborar la actividad específica de cistíena proteasas se realizaron ensayos de inhibición tanto con la mezcla de sobrenadantes como con el segundo sobrenadante. Se utilizó el inhibidor L-transepoxisuccinyl-L-leucylamido (4-guanidino) butano (E-64) para determinar si la actividad enzimática contenida en el extracto correspondía a este tipo de proteasas. Se incubaron 20 µl de extracto de epimastigotes (10 µg) con 1.5 µl E-64 ( $1 \times 10^{-5}$  M) a 37°C durante 45 min. Posteriormente, se agregó 1 µl del Z-Phe-Arg-AFC y se ajustó el volumen a 200 µl con amortiguador de citratos 0.1 M, pH 5.5 suplementado con L-cisteína 15 mM y se incubó durante 3 h a 37°C tomando lecturas cada 45 min. Para inhibir la actividad de serina-proteasas se utilizó Pefabloc SC (2mM) en el buffer de incubación óptimo para serina-proteasas. Los resultados fueron expresados como porcentaje de inhibición.

### **Estudio por electroforesis en geles de poliacrilamida del extracto de *T. cruzi*.**

Con el fin de determinar los pesos moleculares de las proteínas que contenía n la mezcla de sobrenadantes y el segundo sobrenadante del extracto de epimastigotes de *T. cruzi*, se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS (Laemmli 1970). Se depositaron en los pozos diferentes concentraciones de los sobrenadantes de epimastigotes y la

electroforesis se llevó a cabo a 100 V durante 1 h. Los geles se tiñeron con nitrato de plata (Pharmacia), se destiñeron y se secaron para su análisis.

### **Determinación de actividades enzimáticas presentes en el extracto de epimastigotes de *T. cruzi* utilizando geles de poliacrilamida con gelatina.**

Las actividades enzimáticas de los sobrenadantes del extracto de epimastigotes se determinaron en geles de poliacrilamida al 10% con gelatina al 0.1% y en presencia de SDS sin 2-mercaptoetanol (Dowd 1984). Las muestras (3 µg/5 µl) se corrieron en las mismas condiciones de la electroforesis anterior (100 V, 1 h). Los geles se lavaron durante 30 min con amortiguador de citratos 0.1 M, pH 5.5 que contenía 10 mM de 2-mercaptoetanol y 2% de Triton X-100 y posteriormente en amortiguador de citratos 0.1 M, pH 5.5 con 10 mM de 2-mercaptoetanol y 0.05% de Tritón X-100 durante 30 min. Finalmente, los geles fueron incubados toda la noche en el mismo amortiguador de citratos pero sin Tritón X-100 (amortiguador de incubación) (Bonaldo *et al.*1991). Para inhibir la actividad de cisteína-proteasa se agregó E-64 hasta tener una concentración 5 µM en el amortiguador de incubación. Los geles fueron teñidos con azul de Coomasie (10 min) y se destiñeron con una solución que contenía Isopropanol al 25% y ácido acético 10% (solución desteñidora). Los geles se analizaron utilizando un transiluminador donde las zonas de actividad proteolítica se observaron sin teñir. Con la finalidad de investigar si el extracto contenía serina-proteasas se obtuvo un segundo extracto de epimastigotes siguiendo la metodología anteriormente descrita modificando el ultimo paso mezclando los dos sobrenadantes residuales, y se corrieron geles de gelatina en las condiciones anteriormente descritas, se realizó el corrimiento de 3.8 µg de extracto semipurificado modificado, después los geles fueron lavados con una solución de Triton X-100 al 2.5% durante 30 minutos y se incubaron en un buffer que contenía 50 mM de Tris HCl pH 7.4, 40mM de HCl, 200 mM de Na Cl, 5 mM de CaCl<sub>2</sub> y Tritón X-100 al 0.2% durante toda la noche. Posteriormente, los geles fueron teñidos con azul de Coomasie.

### **Obtención de células de bazo de ratón.**

Linfocitos de bazo de ratón CD-1 fueron obtenidos mediante perfusión en medio RPMI sin suero fetal (*RPMI* incompleto). Los linfocitos se lavaron por centrifugación a 1,500 rpm/10 min, con *RPMI* incompleto, y se resuspendieron en 1 ml de RPMI completo. Las células se depositaron sobre 3 ml de Histopaque 1077 (Sigma Diagnostics INC.) y se centrifugaron a 1,800 rpm/30 min. Se recuperó la interfase y las células se lavaron con *RPMI* incompleto a 1,500 rpm/10 min resuspendiéndose en 1 ml de medio *RPMI* incompleto, posteriormente se contaron y se les determinó la viabilidad.

### **Efecto de epimastigotes de *T. cruzi* sobre linfocitos T en cocultivos.**

Con la finalidad de observar el efecto de los epimastigotes sobre linfocitos T, se realizaron cocultivos de  $1 \times 10^6$  linfocitos purificados de bazo de ratón con  $3 \times 10^5$  epimastigotes provenientes de cultivo viables de *T. cruzi* en medio *RPMI* incompleto y cocultivos de la misma cantidad de células y parásitos inhibidos con E-64 a una concentración de  $5\mu\text{M}$  durante 3 h. Para comprobar la viabilidad de los parásitos se realizaron pruebas con azul de Trypano (Boyse *et al.* 1964) y se introdujeron a los experimentos controles libres de parásitos. Posteriormente las células y parásitos fueron lavados por centrifugación a 1500rpm y marcadas con Anti-CD4 PE y Anti-CD8 FITC El efecto se midió por el porcentaje de linfocitos CD4+ y CD8+ marcados por citometría de flujo en un equipo FASComp. Los resultados fueron medidos como porcentajes de células marcadas CD4+ con PE y CD8+ con FITC.

### **Efecto del extracto de epimastigotes en co-receptores de superficie de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>.**

La expresión de CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en los linfocitos tratados y testigos fue determinada por citometría de flujo en un FACS (Becton Dickinson). Alícuotas de  $1 \times 10^6$  células en RPMI incompleto que contenía 15 mM de L-cisteína fueron colocadas en cada uno de los pozos de placas de 24 (Costar). A un pozo se le

agregó el segundo sobrenadante del extracto de epimastigotes resuspendido en 1 ml de PBS (3000 UFR), a otro pozo se le agregó la misma cantidad de sobrenadante pero inhibido con 5  $\mu$ M de E-64, a un tercer pozo se le agregó solo E-64 (5  $\mu$ M), y al último pozo no se le agregó nada (testigo). El volumen de los pozos se ajustó con RPMI incompleto en cada experimento para tener volúmenes iguales. Las placas se incubaron durante 3 h a 37°C en una atmósfera que contenía 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente, las células se colocaron en tubos y lavaron con PBS por centrifugación a 1800 rpm para eliminar los productos residuales y se resuspendieron en 100  $\mu$ l de PBS. Las células fueron teñidas con anticuerpos monoclonales anti-CD4 marcados con FITC y anticuerpos monoclonales anti-CD8 marcados con ficoeritrina (Becton Dickinson Immunocytometry Systems BDIS). Las células testigo (incubadas solo en RPMI) se colocaron con anticuerpos monoclonales irrelevantes anti-IgG2a. Las células CD4<sup>+</sup> se observaron en el canal de fluorescencia FL1 y las CD8<sup>+</sup> en el canal FL2.

Para la calibración del citómetro, se utilizó un kit de perlas de calibración para programa FACSComp de dos colores que permite ajustar la sensibilidad del instrumento y la fluorescencia de compensación. Los detectores para FSC, SSC, FL1 y FL2 fueron ajustados con los tubos que contenían los diferentes tipos de testigo y la compensación se realizó con los tubos testigo que contenían células teñidas con los anticuerpos FITC anti-CD4/ Pe anti-CD8. Las muestras fueron adquiridas por triplicado (10,000 eventos/plot) y los resultados se expresaron como porcentajes de células CD4<sup>+</sup> marcadas con FITC y CD8<sup>+</sup> marcadas con Ficoeritrina (PE).

### **Detección de Apoptosis por el método del TUNEL en linfocitos de ratón mediante citometría de flujo.**

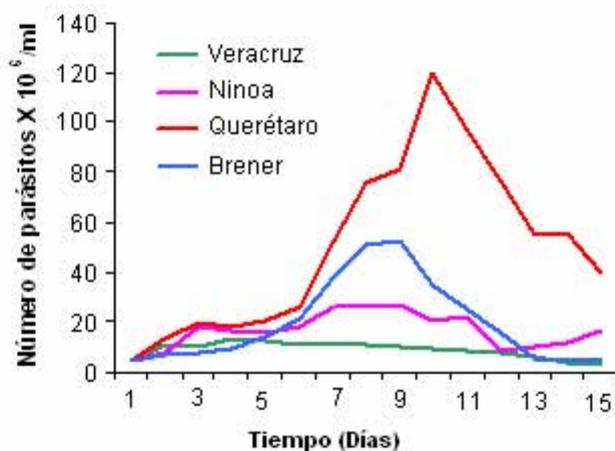
Se realizaron experimentos utilizando células de bazo de ratones CD-1 hembras de 5 semanas obtenidas por perfusión y purificadas con histopaque. Se incluyeron como controles células en RPMI incompleto con 15 mM de L-cisteína y células en RPMI incompleto y E-64 5  $\mu$ M. Se incubaron 1x10<sup>6</sup> células con la mezcla de los sobrenadantes del extracto de epimastigotes (3000 UFR), en otro

tubo experimental se incubaron la misma cantidad de células con la mezcla de los sobrenadantes de epimastigotes inhibida con E-64 (5  $\mu$ M). Para determinar la apoptosis se utilizó un estuche comercial de muerte celular in situ TUNEL (Roche). Brevemente, las células se lavaron con PBS y se fijaron con 500  $\mu$ l de paraformaldehído al 2% durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación, posteriormente las células fueron lavadas por centrifugación con PBS a 1800 rpm/10 min. Las células se resuspendieron en 50  $\mu$ l de solución permeabilizante que contenía 0.1% de Tritón X-100 en 0.1% de citrato de sodio durante 2 min en hielo. Nuevamente se realizaron 2 ciclos de lavado por centrifugación a 1800 rpm/10 min, luego se añadieron a todas las muestras una mezcla de 2 componentes del estuche que son: la solución de marcaje (mezcla de nucleótidos) y solución de enzimas (deoxinucleotidil-transferasa de timo de cabra), ambas se incorporaron de la siguiente manera: 50  $\mu$ l de la solución de enzimas se añadieron a 450  $\mu$ l de solución de marcaje según el instructivo del fabricante. Controles positivos y negativos fueron incluidos para cada experimento. Los controles negativos se realizaron con una suspensión celular de linfocitos ( $1 \times 10^6$ ) fijadas y permeabilizadas previamente y con 50  $\mu$ l de solución de marcaje únicamente. Los controles positivos se realizaron con la misma cantidad de células fijadas y permeabilizadas con DNasa I, 1500 U/ml, en 50 mM de Tris-HCl, pH 7.5, 1 mg/ml de BSA durante 10 min a temperatura ambiente para inducir la ruptura de las hebras de DNA antes de los procedimientos de marcaje. Una vez realizado lo anterior se lavaron todos los tubos experimentales por centrifugación con PBS (1800 rpm/10 min). Las células fueron analizadas por citometría de flujo.

## RESULTADOS

### Curvas de crecimiento de los 4 aislados de *T. cruzi*

Se realizaron curvas de crecimiento de los 4 aislados de *T. cruzi* con la finalidad de determinar los tiempos en que se alcanzaba la fase logarítmica de crecimiento de cada uno de los aislados. Se encontró que el aislado Querétaro fue el que mejor creció en el medio de cultivo, seguido por el Brener. Los aislados Ninoa y Veracruz mostraron pobre crecimiento en las condiciones de cultivo utilizadas. La mayor densidad de parásitos del aislado Querétaro se alcanzó en el día 10 y del Brener entre los días 8 y 9 (Fig. 2).



**Figura 2.** Curvas de crecimiento de 4 aislados de *Trypanosoma cruzi*. Se determinaron las curvas de crecimiento durante 15 días en RPMI completo y a partir de un inóculo de  $5 \times 10^6$  epimastigotes de cada aislado. Se determinó la cantidad de parásitos cada 24 h. La línea roja muestra el crecimiento del aislado Querétaro, la línea azul del Brener, la rosa del Ninoa y la verde del aislado Veracruz.

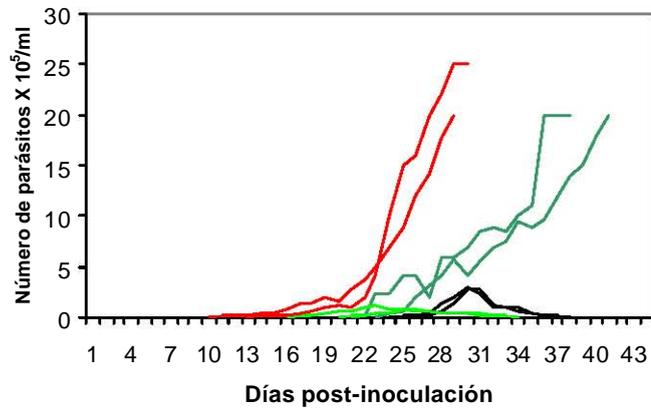
### **Infectividad de los diferentes aislados de *Trypanosoma cruzi* en ratones Balb/c y CD-1.**

Una vez que se determinó la fase logarítmica de crecimiento de los aislados Querétaro, Veracruz, Ninoa y Brener, procedimos a evaluar la infectividad de cada uno de ellos en 2 cepas de ratones, Balb/c y CD-1, que son consideradas como cepas susceptibles. Se inocularon intraperitonealmente 2 ratones de cada cepa con  $5 \times 10^6$  epimastigotes de cada uno de los aislados de *T. cruzi* (Querétaro y Veracruz). Los aislados Ninoa y Brener también se probaron en las mismas condiciones experimentales sin embargo, ninguno de ellos produjo infección en los ratones.

En los ratones Balb/c, el aislado Querétaro produjo una parasitemia ligeramente menor que en los ratones CD-1 (Fig. 3). La muerte de los ratones Balb/c ocurrió entre los días 38 y 40 con una parasitemia de  $2 \times 10^6$ , en comparación con los ratones CD-1 cuya muerte se produjo entre los días 28 y 30 con una parasitemia similar ( $2.5 \times 10^6$ ).

El aislado Veracruz produjo parasitemias considerablemente menores en ambas cepas de ratones comparados con es aislado Querétaro. En los ratones CD-1, la parasitemia producida por el aislado Veracruz fue de  $28 \times 10^3$  parásitos/ml, y para los Balb/c fue de  $10 \times 10^3$ , en ambas cepas de ratón y los animales sobrevivieron a la infección.

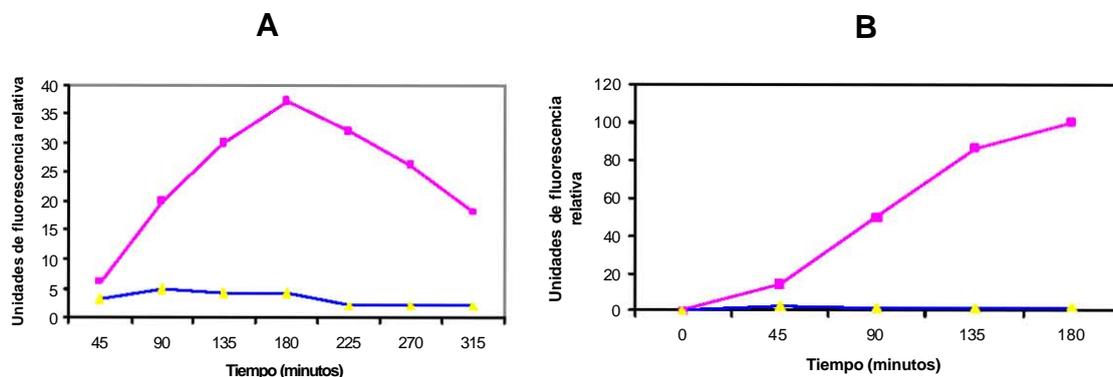
### Curvas de parasitemia en ratones Balb/c y CD-1 con diferentes aislados de *Trypanosoma cruzi*



**Figura 3.** Parasitemia en ratones Balb/c y CD-1 de los aislados Querétaro y Veracruz de *Trypanosoma cruzi*. Grupos de 2 ratones Balb/c y 2 CD-1 hembras de 5 semanas de edad fueron inoculados con  $5 \times 10^6$  epimastigotes de uno u otro aislado. La parasitemia se midió cada 24 h. Las líneas rojas muestran la parasitemia inducida por el aislado Querétaro en ratones CD-1, las líneas en color verde claro muestran la parasitemia en ratones Balb/c con el aislado Querétaro, las líneas negras muestran la parasitemia producida por el aislado Veracruz en ratones CD-1 mientras que, la línea verde intenso, la inducida por el mismo aislado en ratones Balb/c.

### Actividad enzimática del extracto de epimastigotes de *T. cruzi*

Basándonos en los resultados anteriores, se seleccionó el aislado Querétaro de *T. cruzi* para realizar los experimentos posteriores. Se cultivaron los epimastigotes en RPMI completo hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento y se obtuvo un extracto de los parásitos. La actividad enzimática de los sobrenadantes del extracto se determinó mediante fluorometría utilizando un sustrato fluorogénico específico para serina-proteasas y cisteína-proteasas (Z-Phe-Arg-AFC). Los resultados se obtuvieron al cuantificar, mediante un Fluoroskan, la cantidad de AFC libre dada por la hidrólisis de la enzima, para corroborar la actividad de cisteína-proteasas se utilizó el inhibidor E-64. El 89% de la actividad enzimática observada en el segundo sobrenadante correspondió a cisteína-proteasas ya que con E-64 esta actividad enzimática disminuye su actividad hasta un 11% (Fig. 4). Mientras que, la actividad enzimática de la mezcla de los sobrenadantes fue de 98% y al ser inhibida con E-64 la actividad se redujo hasta 2%.



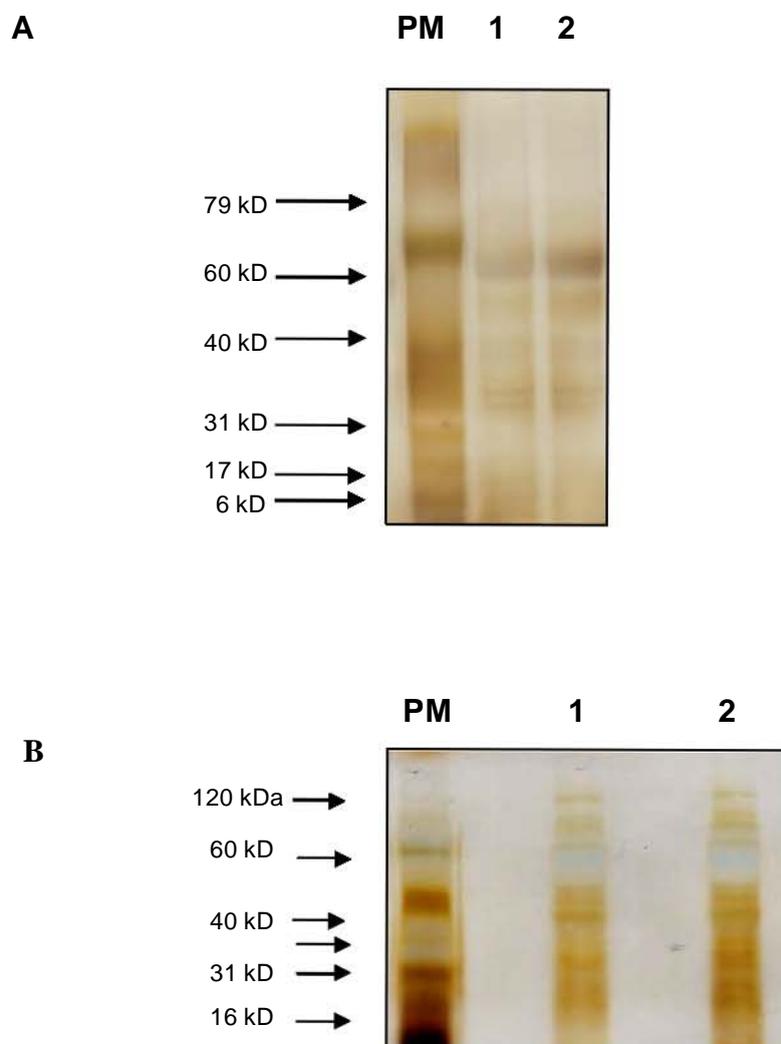
**Figura 4.** Cinética de la actividad enzimática del extracto de epimastigotes del aislado Querétaro de *Trypanosoma cruzi*. **A.** Actividad del segundo sobrenadante (10 µg) incubado con 1 µg de Z-Phe-Arg-AFC en un amortiguador de citratos (0.1 M) suplementado con 15 mM de L-cisteína a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. **B** Actividad de la mezcla de los sobrenadantes (1µg) con 1 µg de Z-Phe-Arg-AFC en las mismas condiciones que el anterior. El AFC libre fue detectado por fluorimetría usando como longitud de onda de excitación 405 nm y de emisión 505 nm. Las lecturas se realizaron cada 45 min. Las líneas rosa muestran la fluorescencia relativa que produjeron 10 y 1 µg de proteína respectivamente del extracto de epimastigotes. Las líneas azules muestran la fluorescencia relativa de la misma cantidad de enzima incubada con E-64 a una concentración de 5 µM.

El resto de la actividad enzimática probablemente corresponda a otras proteasas. La curva de la cinética enzimática mostró que 10 µg del extracto aumenta la actividad enzimática respecto al tiempo de incubación, y que alcanza su pico máximo a los 180 min, disminuyendo posteriormente la actividad enzimática.

### **Electroforesis en geles de poliacrilamida y SDS del extracto de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.**

Se hicieron geles de poliacrilamida al 10% y se tiñeron con azul de Coomasie y plata, para determinar el número de proteínas contenidas en el extracto semi-purificado de epimastigotes. Se observaron al menos 7 bandas con pesos moleculares desde 6 y hasta 200 kDa. Una de las bandas, la más abundante, tuvo un peso molecular de alrededor de 60 kDa, lo que sugiere que podía ser la

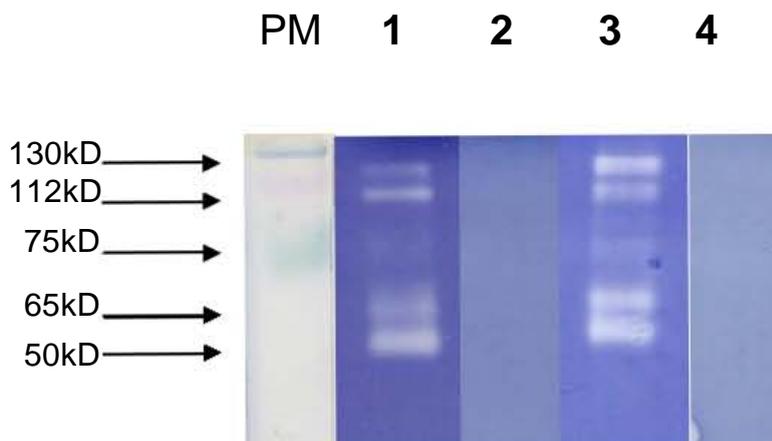
cruzipaína tomando en cuenta los antecedentes en la literatura del peso y abundancia de esta proteína.



**Figura 6** Electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS, teñidos con azul de Coomasie y plata. **A)** Mezcla de sobrenadantes del extracto de epimastigotes, en el carril 1, 1.8  $\mu\text{g}$  de proteína; y carril 2, 2.7  $\mu\text{g}$  de proteína. **B)** Segundo sobrenadante del extracto de epimastigotes carril 1, 5  $\mu\text{g}$  de proteína; carril 2 10  $\mu\text{g}$  de proteína.

### **Determinación de las actividades enzimáticas del extracto de epimastigotes en geles de poliacrilamida en presencia de SDS y gelatina.**

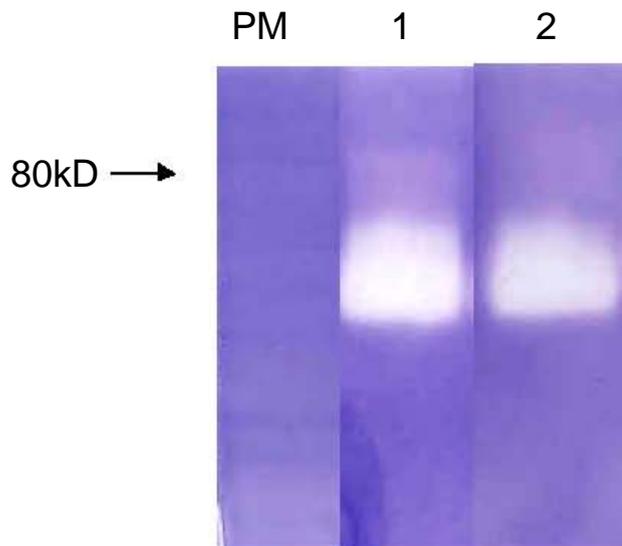
Se determinaron las actividades proteolíticas presentes en los extractos de epimastigotes usando geles de poliacrilamida en presencia de SDS y gelatina. En condiciones de pH = 4.9, se identificaron 6 bandas de actividad enzimática con diferentes pesos moleculares, una de ellas (50 kDa) mostró un patrón de hidrólisis muy marcado (Fig. 6, carril 1). Las otras bandas correspondían a enzimas con pesos moleculares mayores (65-130 kDa). Estas actividades corresponden a cisteína proteasas ya que fueron inhibidas E-64 como se pudo observar en los ensayos de inhibición (Fig.6, carril 2) y no por EDTA (Fig. 6, carril 3).



**Figura 6.** Actividades proteolíticas del segundo sobrenadante del extracto de *Trypanosoma cruzi* aislado Querétaro detectadas en geles de poliacrilamida con SDS y gelatina en condiciones de pH 5.5. En el carril 1 se muestra la actividad del extracto (3 µg); en el carril 2, el efecto de la incubación con el inhibidor E-64 (inhibidor de cisterna-proteasas); en el carril 3, el efecto de la incubación con EDTA (inhibidor de metaloproteasas); y en el carril 4, el efecto de la incubación con ambos inhibidores.(E-64, EDTA).

Cuando se realizaron las cinéticas de los sobrenadantes tuvimos un remanente de actividad enzimática que no fue inhibida por el E-64 y por lo tanto no es cisteína-proteasa, por lo que buscamos actividades de serina proteasa

que digieren el mismo sustrato (Z-Phe-Arg-AFC) con condiciones óptimas para estas enzimas (pH 8.5). En estas condiciones, se observaron 2 bandas de digestión enzimática (Fig. 7, carril 1), una de ellas fue inhibida con Pefabloc SC, lo que indica que debe corresponder a una serina-proteasa (Fig. 7, carril 2). La banda que muestra mayor actividad enzimática debe corresponder a cisteína-proteasa ya que en los otros geles fue inhibida por E-64 (Fig. 6, carril 2).

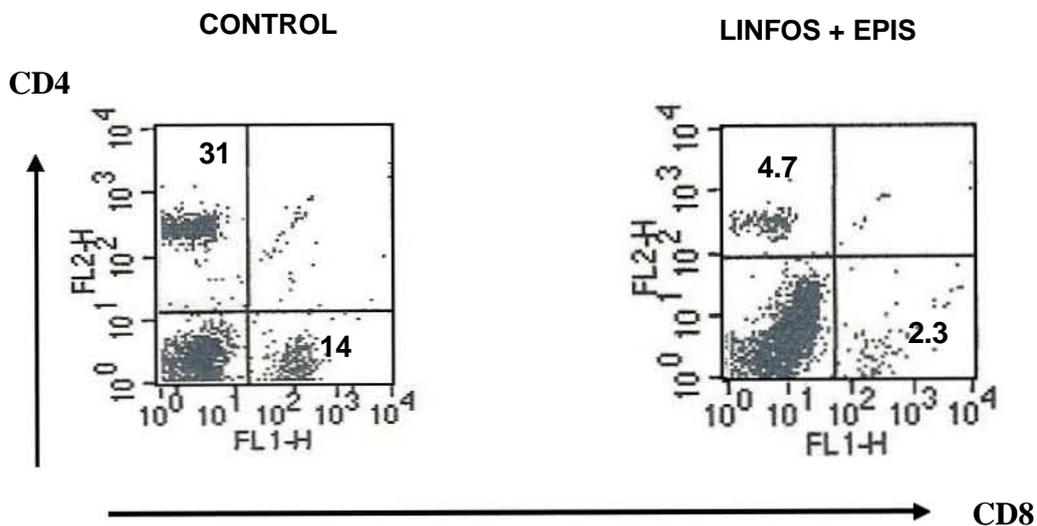


**Figura 7.** Actividades proteolíticas del extracto de *Trypanosoma cruzi* aislado Querétaro detectadas en geles de poliacrilamida con SDS y gelatina en condiciones de pH 8.5 En el carril 1, se muestra la actividad del extracto (3 µg); en el carril 2, el efecto de la incubación con Pefabloc SC (inhibidor de serina-proteasas 2mM). La flecha muestra en el carril 1 la banda de digestión correspondiente a serina proteasa.

### **Efecto del $\infty$ -cultivo de linfocitos de ratón CD1 con epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* sobre las poblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>.**

Se incubaron linfocitos de ratón CD-1 ( $1 \times 10^6$ ) con 300,000 epimastigotes viables en RPMI incompleto durante 3 h. El efecto sobre CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> se midió por citometría de flujo. Los resultados mostraron que ambas poblaciones de linfocitos disminuyeron de manera importante por la presencia de los epimastigotes. Tanto los linfocitos CD4<sup>+</sup> marcados con PE como los CD8<sup>+</sup>

marcados con FITC mostraron una disminución del 84% al ser expuestos a los epimastigotes (Fig. 8), lo que nos sugirió que moléculas producidas por los parásitos estaban afectando a los linfocitos. Con el antecedente de que cisteína proteasas de *Taenia solium* producían este efecto en linfocitos CD4<sup>+</sup> humanos (Molinari *et al.* 2000), decidimos obtener un extracto de epimastigotes con la finalidad de determinar si el efecto que observamos se debía a las actividades enzimáticas presentes en el parásito.

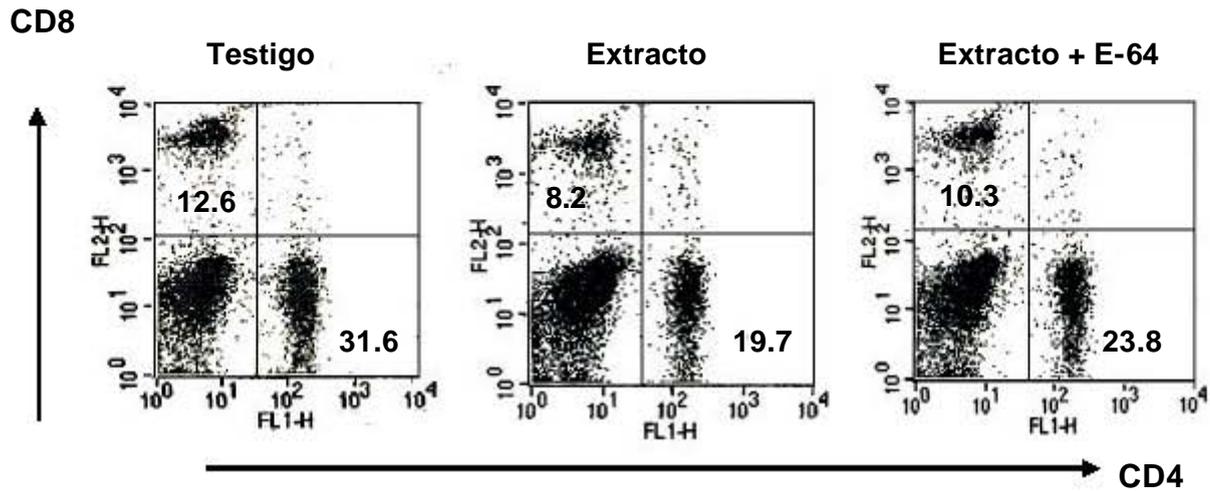


**Figura 18.** Análisis por citometría de flujo que muestra efecto de epimastigotes de *T. cruzi* sobre poblaciones de linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de ratón CD1. Se cultivaron  $1 \times 10^6$  linfocitos de bazo de ratón con  $3 \times 10^5$  epimastigotes viables durante 3 h. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> marcados con PE se muestran en el cuadrante superior izquierdo, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> marcados con FITC se muestran en los cuadrantes inferiores derechos. Los resultados se muestran como porcentajes de células marcadas de 10,000 eventos adquiridos.

#### **Actividad del extracto semi-purificado de epimastigotes en los co-receptores CD4 y CD8 de linfocitos T.**

Se realizaron experimentos preliminares con la finalidad de observar si el extracto de epimastigotes ejercía algún efecto sobre los co-receptores CD4 y CD8 de linfocitos T de ratón. Los primeros resultados de citometría mostraron que la incubación de linfocitos purificados de bazo con el extracto semi-

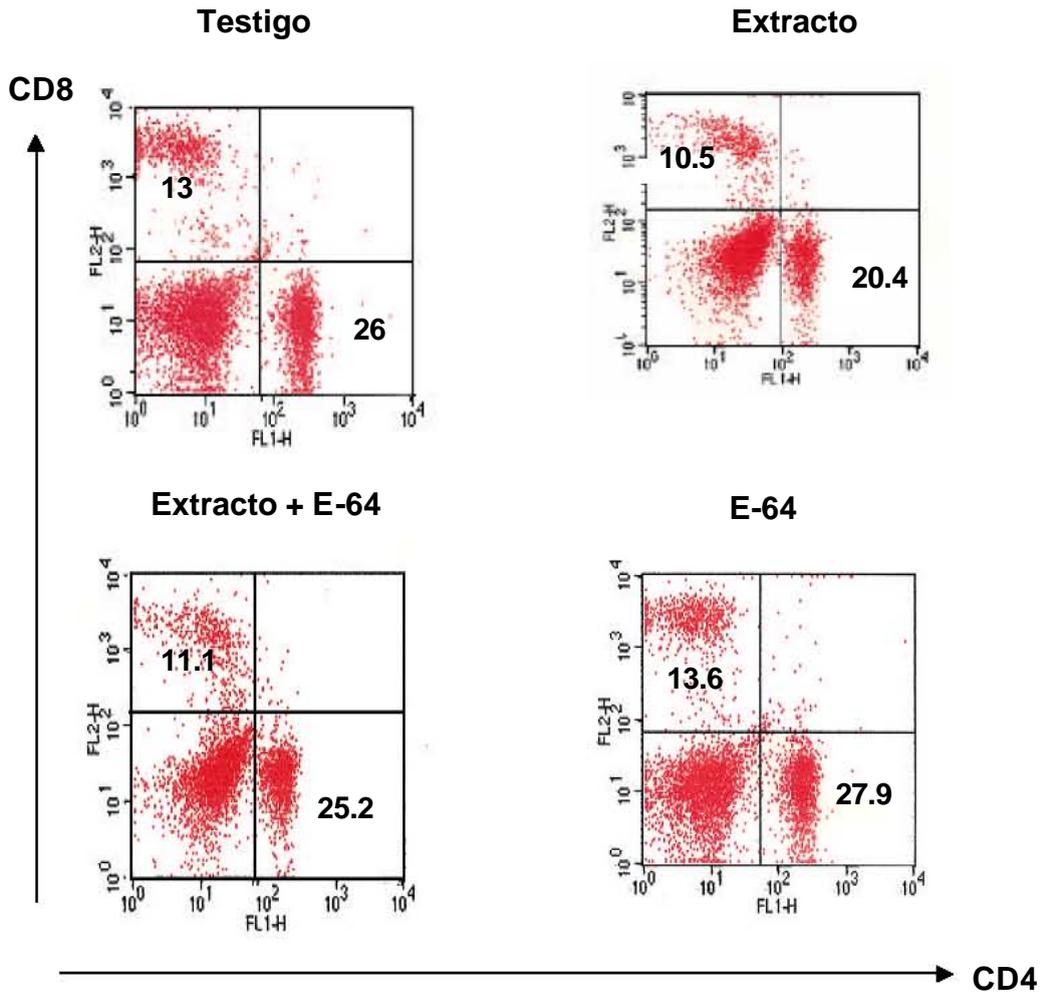
purificado produjo una disminución de células T CD4<sup>+</sup> (37%) y CD8<sup>+</sup> (34%). La inhibición de la actividad de cisteína proteasa con E-64 mostró una reversión parcial del efecto observado, ya que se recuperó el número de linfocitos CD4 en un 24% (de 19.7 a 23.8%) y el de CD8<sup>+</sup> en un 18% (de 8.2 a 10.3%) (Fig. 9).



**Figura 9.** Efecto del segundo sobrenadante del extracto de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* sobre linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Análisis por citometría de flujo de 10000 eventos adquiridos en donde se muestran los porcentajes de células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> marcados con FITC se encuentran en los cuadrantes inferiores derechos y los linfocitos T CD8<sup>+</sup> marcados con PE, en los cuadrantes superiores izquierdos. Testigo: linfocitos de bazo de ratón ( $1 \times 10^7$ ) con medio RPMI incompleto; Extracto: linfocitos ( $1 \times 10^7$ ) incubados con 100  $\mu$ g de extracto de epimastigotes (3000 UFR); y Extracto + E-64: linfocitos ( $1 \times 10^7$ ) incubados con 100  $\mu$ g de extracto/E-64 (5  $\mu$ M).

Ya que no se observó la reversión total del efecto al incubarse el extracto con E-64 y que se ha descrito en la literatura que el E-64 es tóxico, se investigó la posibilidad de que este inhibidor tuviera algún efecto tóxico sobre las células de bazo. Con la finalidad de determinar si la concentración de E-64 que se estaba usando era tóxica para las células, se realizaron experimentos similares incluyendo un testigo adicional que consistió en la incubación de los linfocitos sólo con E-64 (5  $\mu$ M). Los resultados mostraron una disminución del 23% para ambas subpoblaciones, con una recuperación del 96% para los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y de 85% para los linfocitos T CD8<sup>+</sup>. El testigo con E-64 mostró valores

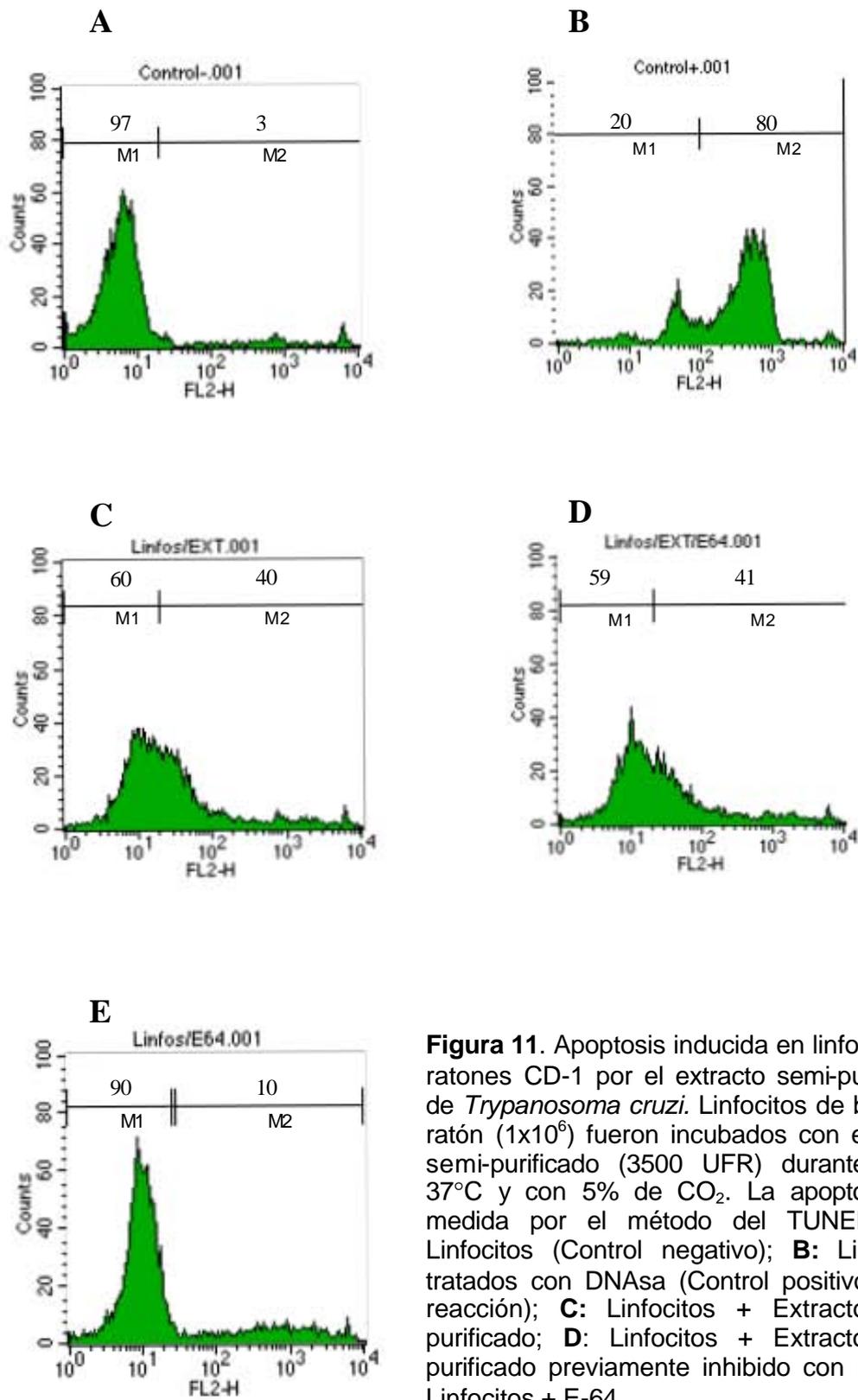
similares a los observados en el testigo con linfocitos solos, por lo que concluimos que a la dosis en que se está usando el E-64 en estos experimentos, no es tóxico (Fig. 10) y que la disminución de los linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> se debe en gran parte a la actividad de cisteína proteasas.



**Figura 10.** Efecto del segundo sobrenadante del extracto de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* y del E-64 sobre linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Análisis por citometría de flujo de 10000 eventos adquiridos en donde se muestran los porcentajes de células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> marcados con FITC se encuentran en los cuadrantes inferiores derechos y los linfocitos T CD8<sup>+</sup> marcados con ficoeritrina en los cuadrantes superiores izquierdos. Testigo: linfocitos de bazo de ratón ( $1 \times 10^7$ ) con medio RPMI incompleto; Extracto: linfocitos ( $1 \times 10^7$ ) incubados con 100  $\mu$ g de extracto de epimastigotes (3000 UFR); Extracto + E-64: linfocitos ( $1 \times 10^7$ ) incubados con 100  $\mu$ g de extracto/E-64 (5  $\mu$ M); y E-64: linfocitos ( $1 \times 10^7$ ) incubados con E-64 (5  $\mu$ M).

### **Inducción de apoptosis de linfocitos por el extracto semi-purificado de epimastigotes de *T. cruzi***

Se determinó la apoptosis inducida por la mezcla de sobrenadantes del extracto de epimastigotes utilizando la técnica del TUNEL y se observó que la incubación de los linfocitos con el extracto indujo 40% de apoptosis (Fig. 11C), en comparación con el grupo testigo (Fig. 11A). Cuando la mezcla de sobrenadantes fue inhibida con E-64 antes de la incubación con los linfocitos se observó que la apoptosis no disminuyó (Fig. 11D). Se incluyó un testigo en el que, los linfocitos se incubaron solo con E-64 con el fin de excluir la posibilidad de que la apoptosis observada se debiera a la toxicidad del inhibidor. El inhibidor fue ligeramente tóxico a la concentración usada en estos experimentos como se puede observar en la figura 11E. Debido a que el E-64 es un inhibidor de cisteína proteasas y a que la concentración del inhibidor usada es suficiente para inhibir la actividad de esta enzima utilizada en los experimentos, es posible que la apoptosis sea inducida por otro componente presente en los sobrenadantes como la actividad de serina proteasa.



**Figura 11.** Apoptosis inducida en linfocitos de ratones CD-1 por el extracto semi-purificado de *Trypanosoma cruzi*. Linfocitos de bazo de ratón ( $1 \times 10^6$ ) fueron incubados con extracto semi-purificado (3500 UFR) durante 3h a 37°C y con 5% de CO<sub>2</sub>. La apoptosis fue medida por el método del TUNEL. **A:** Linfocitos (Control negativo); **B:** Linfocitos tratados con DNAsa (Control positivo de la reacción); **C:** Linfocitos + Extracto semi-purificado; **D:** Linfocitos + Extracto semi-purificado previamente inhibido con E-64; **E:** Linfocitos + E-64.



## DISCUSION

Las cisteína-proteasas han sido descritas en gran cantidad de parásitos tanto protozoarios como helmintos y se han relacionado con diferentes funciones en sus ciclos de vida (McKerrow, 1989). Recientemente, se ha sugerido la participación de estas enzimas en la regulación de la respuesta inmune del huésped (Botempi y Cazzulo 1990; White *et al.* 1992; Molinari *et al.* 2000; Tato *et al.* 2004; Baig *et al.* 2005). A nivel experimental, se ha encontrado que las cisteína-proteasas inducen apoptosis en células de una línea neuronal tumoral (NT2) (Stoka *et al.* 2001) y en linfocitos humanos (Tato *et al.* 2004). En este trabajo, reportamos el efecto de las actividades de cisteína- y serina- proteasas de sobrenadantes de un extracto de *Trypanosoma cruzi* sobre poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> *in vitro*.

Se probaron 4 aislados de *T. cruzi* (Veracruz, Querétaro, Ninoa y Brener) en 2 cepas de ratones (Balb/c y CD1) para determinar su infectividad. Se escogieron estas cepas porque se ha descrito en la literatura que son susceptibles a la infección experimental con este parásito. Solo 2 de los aislados (Querétaro y Veracruz) produjeron parasitemias importantes en ambas cepas de ratones en los 40 días de observación, siendo más susceptibles los ratones CD-1. Los aislados Veracruz y Ninoa no crecieron abundantemente en el medio RPMI. Por estas razones, elegimos al aislado Querétaro para llevar a cabo nuestros experimentos y la cepa de ratones CD-1 porque mostró ser la de mayor susceptibilidad.

La cruzipaina es producida por todas las formas de *T. cruzi* (Campetella *et al.* 1990) sin embargo, su mayor producción se observa en la fase de epimastigote, que además son fácilmente cultivados *in vitro* en medio de RPMI, por lo que se usó esta fase del parásito para obtener el extracto (Stempin *et al.* 2002). El extracto fue centrifugado y se obtuvo el primer sobrenadante y el precipitado fue lavado una vez con una solución de sacarosa y cloruro de potasio por centrifugación y se obtuvo el segundo sobrenadante. Los experimentos se realizaron con la mezcla de sobrenadantes o con el segundo sobrenadante.

En los ensayos *in vitro* para medir la actividad enzimática del extracto, utilizando el substrato sintético Z-phe-Arg-AFC que es específico para cisteína y serina proteasas, se encontró una importante actividad de cisteína-proteasas en el segundo sobrenadante ya que, el 90% de esta actividad se inhibió con E-64, que es un inhibidor específico para este tipo de enzimas. En la mezcla de los sobrenadantes encontramos el 98% de actividad de cisteína-proteasa. La actividad que no se inhibió con el E-64, pensamos que pudiera corresponder a serina-proteasas que también se han descrito en estos parásitos (Santana *et al.* 1997). Con la finalidad de determinar cuantas actividades de cisteína proteasas teníamos en los sobrenadantes, se realizaron geles de poliacrilamida con gelatina de ambos sobrenadantes del extracto y los resultados mostraron que, el segundo sobrenadante presentaba, al menos, seis actividades enzimáticas que correspondían a cisteína-proteasas, ya que se inhibieron con E-64, una de ellas, la mas abundante y con peso molecular aproximado de 60 kDa debe corresponder a la cruzipaína, la principal cisteína-proteasa de *T. cruzi* (Cazzulo *et al.* 1989). Esta enzima pertenece a la familia de la papaína y como otras cisteína proteasas de tripanosómidos muestra una extensión en el COOH terminal poco usual que contiene una serie de modificaciones post-traduccionales y que es responsable de sus características antigénicas inmunodominantes en infecciones humanas naturales (Cazzulo *et al.* 1997). La cruzipaína natural es un complejo de isoformas (Cazzulo *et al.* 1995) y esta heterogeneidad es probablemente debida a la expresión simultánea de varios genes que codifican sustituciones de aminoácidos y a la presencia de diferentes tipos de carbohidratos en las diferentes cadenas (Parodi *et al.* 1995). La cruzipaína es altamente inmunogénica en pacientes con enfermedad de Chagas crónica y en modelos experimentales (Laderach *et al.* 1996) e inactivada enzimáticamente induce respuestas humorales y celulares autoinmunes contra la miosina de músculo esquelético y de corazón (Giordanengo *et al.* 2000). Al llevar a cabo geles de poliacrilamida con gelatina con la mezcla de los sobrenadantes y en condiciones óptimas para la actividad de serina-proteasas, se encontró una banda de 80 kDa que se inhibía con Pefabloc SC (inhibidor

específico de serina-proteasas). Esta enzima tiene el mismo peso molecular que la prolil endopeptidasa (serina-proteasa) descrita por Santana *et al.* (1997)

En el presente trabajo, estudiamos la influencia de las actividades de cisteína proteasas del extracto semi-purificado de *T. cruzi* sobre la proporción de linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de bazo de ratón. En este sistema, encontramos que la incubación de linfocitos T con el segundo sobrenadante produjo la disminución tanto de linfocitos CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>. Estos resultados son consistentes con lo reportado con una actividad de cisteína-proteasa de *Taenia solium* que disminuye los linfocitos CD4<sup>+</sup> humanos *in vitro* (Molinari *et al.* 2000). Este efecto se revirtió totalmente en algunos experimentos y en otros disminuyó pero no se revirtió completamente cuando el sobrenadante fue incubado con E-64 antes de ponerse en contacto con los linfocitos, lo que pudiera sugerir que la disminución no solo se debe a las actividades de cisteína -proteasas contenidas en el extracto.

Los tripanosomas americanos (*T. cruzi*), aunque son intracelulares, circulan en el torrente sanguíneo inmediatamente después de la infección del huésped por el redúvido y durante su diseminación en el cuerpo cuando se internan en las células se multiplican como amastigotes y son liberados de las células infectadas. Durante este período, los parásitos están en contacto con las proteínas del plasma y los linfocitos de la sangre y para persistir deben evadir los mecanismos mediados por suero y por las células que ahí se encuentran. Respecto a las proteínas del plasma, se ha reportado que los tripomastigotes son resistentes a la lisis mediada por complemento. En este sentido, se ha descrito que varias glicoproteínas de membrana poseen actividad reguladora sobre el complemento ya que inhiben el ensamble y/o aceleran el decaimiento de la C3 convertasa de la vía alterna (Rimoldi *et al.* 1988; Norris *et al.* 1991; Norris *et al.* 1994). También, el ácido siálico presente en la superficie de los tripomastigotes contribuye a la resistencia del parásito al complemento ya que se une al factor H e incrementa su afinidad por C3b promoviendo su rompimiento y evitando la formación de la C3 convertasa de la vía alterna (Meri y Pangburn, 1990).

En lo que se refiere a las células, la interacción de linfocitos con productos liberados por *T. cruzi* como las proteasas pudiera ser relevante en el control o

persistencia de la infección ya que, estas células pueden ser afectadas en su función y no producir citocinas. Las citocinas juegan un papel importante en la regulación de la respuesta inmune en los huéspedes infectados. La resistencia en ratones se ha relacionado con la producción de IL-12 (Alberti *et al.* 1996) que dispara la producción de IFN $\gamma$  por células NK y linfocitos T. El IFN $\gamma$  activa a los macrófagos para la liberación de NO debido a que regula la sobre expresión de la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS) y esto capacita a los macrófagos para matar a los amastigotes intracelulares (respuesta Th1) (Vespa *et al.* 1994). La alteración en la producción de citocinas pudiera estar afectando estos mecanismos y favoreciendo la permanencia del parásito en el huésped. Recientemente, se ha reportado que la cruzipaina: induce la expresión de B7-2 relacionada con la producción de IL-4 en las células T, regula negativamente la expresión de IL-12 y de NO en macrófagos estimulados con LPS, e induce la producción de IL-10, lo que pudiera estimular una respuesta de tipo Th2 que favorece el establecimiento del parásito y la cronicidad de la enfermedad (Freeman *et al.* 1995). Por lo tanto, la disminución en la cantidad de linfocitos CD4<sup>+</sup> debida a las actividades de cisteína proteasas pudiera estar favoreciendo la instalación de los parásitos en el huésped.

La inducción de apoptosis por los parásitos ha sido ampliamente estudiada, se ha sugerido que productos excretados o secretados por *Taenia crassiceps* puede inducir apoptosis de células Jurkat, que es una línea de células T de leucemia humana (Connell y Rogan, 2000). En lo que se refiere a tripanosomas, se ha reportado que linfocitos de bazo de ratón infectado con *T. cruzi* contienen gran cantidad de células que están sufriendo apoptosis, indicando que la muerte celular programada es un proceso que se lleva a cabo *in vivo* (Lopes *et al.* 1995). En este trabajo, la incubación de linfocitos con la mezcla de los sobrenadantes del extracto que tienen actividad de cisteína-proteasas indujo apoptosis en un 40% de las células de bazo de ratón, efecto similar al reportado para una cisteína proteasa de *Taenia solium*. Sin embargo, el efecto producido por el extracto de *T. cruzi* no fue revertido por el E-64 como en lo reportado para *T. solium* (Tato *et al.* 2004). Estos resultados sugieren que la apoptosis no es solamente inducida por las

actividades de cisteína proteasa sino por algo más presente en el extracto probablemente otras actividades enzimáticas (serina-proteasas).

Los resultados del efecto de los sobrenadantes del extracto sobre las poblaciones de linfocitos T mostraron que la disminución de los linfocitos no puede ser debida solamente a la actividad de cisteína proteasa porque la inhibición de estas enzimas no revierte totalmente el efecto y, aunados a los resultados de apoptosis sugieren que existen otros factores que pueden estar interviniendo en estos fenómenos y que no están relacionados con las cisteína-proteasas por lo que es conveniente realizar más experimentos para determinar la naturaleza de esos otros factores. En los geles de gelatina se encontró otra actividad enzimática que corresponde a serina-proteasas, estas enzimas no han sido implicadas en la regulación de la respuesta inmune pero sería importante estudiar su posible participación en los efectos que en este trabajo se reportan.

Finalmente, es importante señalar que la inducción de apoptosis en los linfocitos por productos del parásito pudiera ser un mecanismo de evasión de la respuesta inmune que favoreciera la permanencia del parásito en el huésped.

## CONCLUSIONES

1. Los sobrenadantes del extracto de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* que se obtuvieron del aislado Querétaro mostraron al menos 6 actividades de cisteína-proteasa y una actividad de serina-proteasa.
2. El segundo sobrenadantes produjo una disminución en los co-receptores de linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Este efecto se revirtió parcial o totalmente con el uso de E-64, lo que nos sugiere que las cisteína-proteasas contenidas en el mismo están afectando estas moléculas, sin embargo, en el extracto se encuentran otras moléculas que también pudieran estar participando en este efecto, una de estas moléculas es la serina-proteasa, actividad que fue detectada en los geles de poliacrilamida con gelatina.
3. Se observó que la mezcla de sobrenadantes del extracto indujo apoptosis en linfocitos y que este efecto no se revirtió con el uso de E-64.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Ambrosio J, Landa A, Merchant MT, Laclette JP (1994). Protein uptake by cysticerci of *Taenia crassiceps*. Arch. Med. Res. 25: 325-330.
- 2.- Aoki MP, Guinazu NL, Pellegrini AV, Gotoh T, Masih DT, Gea S. (2004) Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* antigen promotes arginase-2 expression and survival of neonatal mouse cardiomyocytes. Am.J.Physiol. 286: C206-C212.
- 3.- Archavaleta F., Molinari JL., Tato P. (1998) A *Taenia solium* metacestode factor nonspecifically inhibits cytokine production. Parasitol Res 84:117-122
- 4.- Ashall, F. Characterization of an Alkaline Peptidase of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 1990. 38, 77-88.
- 5.- Baig S, Damian RT, Molinari JL, Tato P, Morales-Montor J, Welch M, Talhouk J, Hashmeys R, White AC Jr. (2005) Purification and characterization of a metacestode cysteine proteinase from *Taenia solium* involved in the breakdown of human IgG. Parasitology 131:Pt3, 411-6.
- 5.- Barral A, Barral-Neto M, Yong EC, Brownell CE, Twardzik DR, Reed SG: Transforming growth factor  $\beta$  as a virulence mechanism for *Leishmania Braziliensis* . proc Natl Acad Sci USA 1993, 90:3442-3446.
- 6.- Barret AJ. 1994. Clasification of peptidases. Methods Enzimol 244:1 -15.
- 7.- Beaver PC, Jung RC, Cuppo EW. ( 1994). Parasitología Clínica. Ed Salvat 2a Edición Barcelona España pp. 65-66.
- 8.- Betz M and Fox (1991). Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but no of Th2 lymphokines. J.Immunol.146, 108-113.
- 9.- Bonaldo MC, D'Escoffier LN, Salles JM & Goldenberg S 1991<sup>a</sup>. Characterization and expression of proteases during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis, Exp. Parasitol. 73:44-51.
- 10.- Botempi, E., Franke de Cazzulo, B.M., Ruiz, A.M. and Cazzulo JJ (1984). Purification and some properties of an acidic protease from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Comp. Biochem.Physiol. 77B, 599-604
- 11.- Botempi E, Cazulo JJ. (1990) Digestion of human immunoglobulin G by the major cysteine proteinase ( cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. FEMS Microbiol Lett 70: 337-342

- 12.- Boyse EA, Old LJ, Chourdinkou I. 1964. Cytotoxic test for demonstration of mouse antibody. *Methods Med Res* 10:39
- 13.- Brener Z & Krettli AU. 1990. Immunology of Chagas disease in: David & Wyler WH ( Editors), *Modern Parasite Biology. Cellular, Immunological and molecular Aspects.* Freeman and Company., New York, 247-261.
- 14.- Breton CB, Blisnick T, Jouin H, Barale JC, Rabilloud T, Langsley G, Perreira da Silva LH 1992. *Plasmodium chabaudi* p68 serine protease activity required for merozoite entry into mouse erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 15;89:9647-51
- 15.- Brophy PM, Pritchard DI.(1992) Immunity to helminths: ready to tip the biochemical balance. *Parasitol Today* 8, 419.
- 16.- Burleigh, B.; Andrews, N. W.A 120-kDa Alkaline Peptidase from *Trypanosoma cruzi* is involved in the Generation of a Novel  $Ca^{2+}$  signaling Factor for Mammalian Cells. *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 5172-5180.
- 17.- Calderon. J. and Avila, E.E.(1986) Antibody-induced caps in *Entamoeba histolytica*: isolation and electrophoretic analysis. *J. Infect. Dis.* 153, 927-932.
- 18.- Camandaroba EL, Pinheiro Lima CM, Andrade SG (2002). Oral transmission of Chagas disease important of *Trypanosoma cruzi* biotome in the intragastric experimental infection. *Rev Ins Med Trop Sao Paulo* 44:2, 97-103.
- 19.- Campell, D. et. Al (1999). Serum from *Entamoeba histolytica* infected-gerbils selectively suppresses T cell proliferation by inhibiting interleukin-2 production.*J.Infect. Dis.* 179,1495-1501
- 20.- Campetella,O; Martínez J.; Cazzulo J:J: A major Cysteine Proteinase is Developmentally regulated in *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1990,67,145-150.
- 21.- Campetella, O., Henriksson, J., Aslund, L., Frash, A.C.C., Peterson, U., and Cazzulo J.J. (1992). The major cyteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* is encoded by multiple polymorphic tandemly organized genes located on different chromosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 50, 225-234.
- 22.- Campos MA, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente EP, Procopio DO, Travassos (2001) Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J. Immunol.*167, 416-423
- 23.- Campos MO, Closel M, Valente EP, Cardoso JE, Akira S, Alvarez –Leite JI, Ropert C, Gazzinelli RT (2004) Impaired production of proinflammatory and host

resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice lacking functional myeloid differentiation factor-88. *J. Immunol* 172:1711-1718.

24.- Carmona C, Dowd AJ, Smith AM, Dalton JP 1993 Cathepsin L proteinase secreted by *Fasciola hepatica* in vitro prevents antibody mediated eosinophil attachment to newly excysted juveniles. *Mol. Biochem Parasitol* 62, 9-18.

25.- Carrera L et al. (1996). Leishmania promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. *J. Exp. Med.* 183, 515-526.

26.- Cazzulo, J.J., Cazzulo Franke, M.C., Martinez, J., and Franke de Cazzulo, B.M. (1990). Some Kinetic properties of a cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. *Biochim. Biophys. Acta* 1037, 186-191

27.- Cazzulo J.J. (1991) Proteinases of *Trypanosoma cruzi*. In: *Biochemistry of Parasitic protozoa*, G. H. Coombs and M.J. North, eds. ( London , Washington D.C.: Taylor & Francis Ltd.)pp.191-199.

28.- Cazzulo JJ, Stoka V and Turk V (1997). Cruzipain, the major cysteine proteinase from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Biological Chemistry* 378: 1-10.

29.- Chaussabel D, Pajak B, Vercruysse V, Bisseye C, Garce V, Habib M, Goldman M, Moser M, Vray B (2003) Alteration of migration and maturation of dendritic cells and T-cell depletion in the course of the experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Lab Invest.* 83:1373-1382.

30.- Chen L, Watanabe T, Watanabe H and Sendo F (2001). Neutrophil depletion exacerbates experimental Chagas disease in BALB/c, but protects C57BL/6 mice through modulating the Th1/Th2 dichotomy in different directions. *Eur. J. Immunol.* 31:265-275

31.- Cheres DA, Haynes DH, Distasio JA. (1984) Interaction of an acute phase reactant, alpha-acid glycoprotein (orosmuroid), with the lymphoid cell surface. A model for nonspecific immune suppression. *Immunology* 51, 541-548.

32.- Chung YB, Kong Y, Joo IJ, Cho SY, Kang SY. 1995 Excystment of *Paragonimus westermani* metacercariae by endogenous cysteine protease. *J Parasitol* 81:137-42.

33.- Conseil V, Soete M, Dubremetz JF 1999. Serine protease inhibitors block invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 43, 1358-1361

34.- Darji A, Beschin A, Sileghem M, Heremens H, Brys L, De Baetselier P. (1996). In vitro stimulation of immunosuppression caused by *Trypanosoma brucei*.

active involvement of gamma interferon and tumor necrosis factor in the pathway of suppression. *Infect. Immune.* 64,1937-1943

35.- de Diego J. (1997). Alteration of macrophage function by a trypanosome membrane mucin. *J. Immunol.* 159,4983-4989.

36.- de Souza EM, Araujo-Jorge TC, Bailly C, Lansiaux A, Batista MM, Oliveira GM Soeiro MN. (2003) Host and parasite apoptosis following *Trypanosoma cruzi* infection in in vitro and in vivo models. *Cell. Tissue Res.* 314:223-235.

De Souza Leao S, Lang, Prina E, Helio R, Antoine J-C (1995). Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. *J.Cell. Sci* 108:3219-3231

37.- Del neri E, Juliano MA, Lima APCA, Scharfstein J, Juliano L. (1997). Kininogenase Activity by the major cysteinyl proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* 272:25713-25718.

38.- Desjardins M. and Desconteaux, A. (1997). Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *J.Exp.Med.* 185,2061-2068

39.- DosReis GA (1997). Cell-mediated immunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol Today* 13,335-342.

Dos Reis GA and Barcinski MA (2001). Apoptosis and parasitism: from the parasite to the host immune response. *Adv. Parasitol.* 49 : 133-161

40.- DosReis GA, Freire-de-Lima CG, Nunes MP and Lopez MF( 2005). The importance of aberrant T-cell responses in Chagas Disease. *Trends in Parasitology* 21: 237-243.

41.- Duschak VG, Riarte A, Segura EL, Laucella SA (2001). Humoral immune response to cruzipain and cardiac dysfunction in chronic Chagas Disease. *Immunology Letters* 78: 135-142.

42.- Finkelman FD, Urban JF: Cytokines make the right choice. *Parasitol Today* 1992, 8:311-314.

43.- Fisher E, Ouaiissi MA, Velge P, Cornette J, Kazatchkine MD. (1988) gp58/68 a parasite component that contributes to the escape of the trypomastigote form of *T. cruzi* from damage by the human alternative complement pathway. *Immunology* 65, 299-303

44.- Franke de Cazzulo, B.M.; Martínez M.; North, M.J.; Coombs, G.H.; Cazzulo, J.J. Effect of proteinase Inhibitors on Growth and Differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol Lett.* 1994,121, 81-86.

- 45.- Freire-de-Lima CG, Nascimeinto DO, Soares MB, Bozza PT, Castro-Faria-Neto HC, de Mello FG, Dos Reis GA, Lopes MF. (2000) Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature* 403:199-203.
- 46.- García IE, Lima MR, Marinho CR, Kipnis CL, Furtado GC, Alvarez JM. (1997) Role of membrane-bound IgM in *Trypanosoma cruzi* evasion from immune clearance. *J. Parasitol.* 83, 230-233.
- 47.- García MP, Nóbrega, O.T.; Teixeira, A.R.L.; Sousa MV, Santana JM (1998). Characterization of a *Trypanosoma cruzi* Acidic 30KDa Cysteine protease. *Mol. Biochem. Parasitol*, 91,263-272.
- 48.- Ghoneim H, Klinkert MQ. Biochemical properties of purified cathepsin B from *Shistosoma mansoni*. *Int. J Parasitol* 1995;25 (12):1515-9
- 49.- Giordanengo L, Maldonado C, Rivarola HW, Losa D, Girones N, Fresno M and Gea S (2000). Induction of antibodies reactive to cardiac myosin and development of Herat alterations in cruzipain-immunized mice and their offspring. *Eur. J.Immunol* 30: 3181-3189
- 50.- Giorgone, JR, Turko SJ, Epanand RM.(1996). Transbilayer inhibition of protein Kinase C by the lipophosphoglycan from *Leishmania donovani*. *Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 11634-11639.
- 51.- Gutierrez-Kobeh L, Cabrera N, Perez-Montfort R. (1997) A mechanism of acquired resistance to complement mediated lysis by *Entamoeba histolytica*. *J. Parasitol.* 83, 243-241
- 52.- Hadley T, Aikawa M, Miller LH. (1983). *Plasmodium knowlesi*: studies on invasion of rhesus erythrocytes by merozoites in the presence of protease inhibitors. *Exp.Parasitol* 55:306-311.
- 53.- Hayunga EG, Summer MP, Letonja T (1989). Evidence of selective incorporation of host immunoglobulin by strobilocerci of *Taenia taeniaeformis*. *J Parasitol.* 75: 638-642
- 54.- Hellman U, Wernstedt C, and Cazzulo JJ (1991). Self proteolysis of the cysteine proteinase, cruzipain from *Trypanosoma cruzi*, cruzipain gives a major fragment corresponding to its C-terminal domain. *Mol Biochem Parasitol* 44, 15-22.
- 55.- Hernández L, Molinari JL, Garrido E, Cortés I, Solano S, Miranda E, Tato P (2005) The implantation of *Taenia solium* metacestodes in mice induces down-modulation of T-cell proliferation and cytokine production. *Parasitol. Res.* 95: 256-265.

- 56.- Heussler VT, Kuenzi P, Rottenberg S. (2001) Inhibition of apoptosis by intracellular parasites. *Int. J. Parasitol* 31: 1166-1176
- 57.- Hoffman PR, de Cathelineau AM, Ogden CA, Leverrier Y, Bratton DL, Daleke DL, Ridley AJ, Fadok VA, Henson PM. (2001) Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor-mediated micropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells. *J. Cell. Biol.* 155:649-659.
- 58.- Hoft DF, Schnapp AR, Eichhoff CS, Roodman ST (2000). Involvement of CD4+ Th1 cells in systemic immunity protective against primary and secondary challenges with *Trypanosoma cruzi*. *Infect.Immunity* 68: 197-204
- 59.- Holder AA, Guevera Patino JA, Uthaipibull C, Syed SE, Ling IT, Scott-Finnigan T, Blackman MJ. (1999) Merozoite surface protein1, immune evasion, and vaccines against asexual blood stage malaria. *Parassitologia* 41 409-41
- 60.- Kalinna B, Mc Mannus (1993) An IgG Fc gamma-binding protein of *Taenia crassiceps* (cestoda) exhibits sequence homology and antigenic similarity with schistosome paramyosin. *Parasitology* 106:289-296
- 61.- Kelsall BL, Biron CA, Sharma O, Kaye PM (2002). Dendritic cells at the host pathogen interface. *Nat. Immunol* 3:699-702
- 62.- Kumar S, Pitchard DI. 1992 The partial characterization of proteases present in the excretory/secretory products and exsheathing fluid of infective (L3) larva of *Necator americanus*. *Int. J. Parasitol.* 22:563-572.
- 63.- Krettli A, Thomas N, and Eisen H. 1980. Escape mechanisms of *Trypanosoma cruzi* from the host immune system. In: *Les colloques de l'INSREM. Cancer immunology and Parasite immunology*, Vol 97, L Israel P. Lagrange and J.C. Salomon, edes (Paris:INSERM), pp553-558.
- 64.- Kretti AU, Weiss CP & Nussenzweig RS (1979). Membrane bound antibodies of bloodstream *trypanosoma* in mice. Strain difference in susceptibility to complement mediated lysis. *Clinical and experimental Immunology* 37:416-126.
- 65.- Laderach D, Cerban F, Motran C, Vottero de Cima E, Gea S. (1996) *Trypanosoma cruzi*: the major cysteinyl proteinase (cruzipain) is a relevant immunogen of parasitic acidic antigens (FIII) *Int. J. Parasitol.* 26:11, 1249-54.
- 66.- Leid RW, McConnell LA (1983) PGE2 generation and release by the larval stage of the cestode, *Taenia taeniaeformis*. *Prostaglandins Leukotrienes.Med.* 11: 317-323.
- 67.- Leid RW, Grant FR, Suquet CM (1987). Inhibition of neutrophil aggregation by teniastatin a cestode proteinase inhibitor. *Int. J. Parasitol* 17:1349-1353

- 68.- Lehker MW Sweeney D. Trichomonad invasion of the mucous layer requires adhesions, mucinases, and motility. *Sex Transm Infect* 1999; 75 (4): 231-8
- 69.- Letonja T, Hammemberg B (1983) Third component of complement, immunoglobulin deposition, and leucocyte attachment related to the surface sulfate of larval *Taenia taeniaeformis*. *J. Parasitol.* 69:637-644
- 70.- Levey, JT and Tarleton RL (2003). Cutting edge: dysfunctional CD8+ T cells reside in nonlymphoid tissues during chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.* 170:2264-2268.
- 71.- Lopez-Bergamik P, Scaglione J, Levin MJ (2001). Antibodies against the carboxyl-terminal end of the *Trypanosoma cruzi* ribosomal P proteins are pathogenic. *FASEB J.* 15:2602-2612.
- 72.- Lopes MF, da Veiga VF, Santos AR, Fonseca MEF, Dos Reis GA (1995). Activation-induced CD4+ T cell death by apoptosis in experimental Chagas disease. *J. Immunol* 154:744-752
- 73.- Locksley RM, Reiner SL, Hatam F , Littman DR, Killeen N. (1993). Helper T cells without CD4: control of leishmaniasis in CD4-deficient mice. *Science* 261,1448-1451.
- 74.- Lowndes CM, Bonaldo MC, Thomaz N, Goldemberg S 1996. Heterogeneity of metalloproteinase Expression in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* 112, 393-399
- 75.- Lucas M, Stuart LM, Savill J, Lacy-Hulbert A. (2003) Apoptotic cells and innate immune stimuli combine to regulate macrophage cytokine secretion. *J. Immunol* 171, 2610-2615.
- 76.- Lustigman S, McKerrow JH, Shah K, Lui J, Huima T, Hough M, Brotman B. Cloning of a cysteine protease require for the molting of *Onchocerca volvulus* third stage larvae. *J Biol Chem* 1996; 271 (47): 30181-9.
- 77.- Machado FS, Martinis GA, Alberti J, Mestriner F, Cunha F, Silva JS. (2000) *Trypanosoma cruzi*-Infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation* 102:3003-3008.
- 78.- Maizels RM, Bundy DAP, Selkik ME, Smith DF, Anderson RM (1993) Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. *Nature* 365:797-805

- 79.- Martinez, J., and Cazzulo JJ (1992). Anomalous electrophoretic behavior of the major cysteine proteinase ( cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* in relation to its apparent molecular weight. FEMS Microbiol. Lett. 95:225-230
- 80.- Mc Grath ME Eakin AE, Engel JC, McKerrow JH, Craik CS and Fletterick RJ. (1995). The crystal structure of cruzain: a therapeutic target for Chagas disease. J. Mol. Biol. 247: 251-259
- 81.- McKerrow Angel JC, Cafrey CR. 1999 Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infection. Bioorg Med Chem 7;4:639-44
- 82.- McKerrow JH, Sun E, Rosenthal PJ, Bouvier J (1993)The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. Annu. Rev. Microbiol 47:821-53.
- 83.- McKerrow JH. 1989 Parasite proteases. Experimental parasitology 68;1,111-5
- 84.- McKerrow JH, Sun E, Rosenthal PJ, Bouvier J. (1993)The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa Annu Rev Microbiol 47:821-53.
- 85.- McKerrow JH 1999 Development of cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic disease: insights on safety, target, validation and mechanism of action. Int. J. Parasitol 29:833-7
- 86.- Meier O, Boucket K, Hammer SV, Keller S, Stidwill RP, Hemmi S, Greber UF. (2002) Adenovirus triggers micropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake. J. Cell. Biol. 158:1119-1131.
- 87.- Meri S, Paangburn MK (1990). A mechanism of activation of the alternative complement pathway by the classical pathway: protection of C3b from inactivation by covalent attachment to C4b. Eur. J. Immunol. 20:12, 2555-61.
- 88.- Minoprio P, O. Burlen, P. Pereira, B.Guilbert. L. Andrade, M. Hontebeyrie-Joskowicz. And A. Coutinho (1988). Most B cells in acute *Trypanosoma cruzi* infection lack parasite specificity. Scand J.Immunol 28: 553.
- 89.- Miyahira Y, Katae M, Kobayashi S, Takeuchi T, Fukuchi Y, Abe R, Okumura K, Yahita H, Aoki T.(2003) Critical contribution of CD28-CD80/CD86 coestimulatory pathway to protection to *Trypanosoma cruzi* infection. Infect. Immun. 71:3131-3137
- 90.- Molinari JL., Mejia H., White AC., Garrido E., Borgonio VM., Baig S., and Tato P. (2000) *Taenia solium*: a cysteine protease secreted by metacestodes depletes human CD4 lymphocytes in vitro. Exp. Parasitol. 94: 133-142

- 91.- Morato MJ., Brener Z., Cancado JR., Nuñez RM., Chiari E., Gazzinelli G (1986) Cellular immune responses of chagasic patients to antigens derived from different *Trypanosoma cruzi* strains and clones. Am.J.Med.Hyg. 35: 505-511.
- 92.- Mota I, Umekita LF (1989) The effect of C3 depletion of the clearance of *Trypanosoma cruzi* induced by IgG antibodies bloodstream trypomastigotes. Immunol. Let. Jun 1:21(3)223-5
- 93.- Mottram JC, Souza AE, Hutcison JE, Carter R, Frame MJ, Coombs GH: Evidence of disruption of the imcpb gene array of *Leishmania mexicana* that cysteine proteinases are virulence factors. Proc Natl Acad Sci USA 1996, 93:6008-6013.
- 94.- Mucci J, Hidalgo A, Mocetti E, Argibay PF, Leguizamon MS, Campetella O. (2002) Thymocyte depletion in *Trypanosoma cruzi* infection is mediated by trans-sialidase-induced apoptosis on nurse cells complex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:3896-3901.
- 95.- Norris KA, Bradt B, Cooper NR, So M (1991). Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 binding protein with functional and genetic similarities to the human complement. J.Immunol. 147:7,2240-7
- 96.- Norris KA, Galvao LM, Schrimpf JE, Cancado JR, Krettli AU (1994). Humoral immune response to the *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein as an indicator of parasitologic clearance in human Chagas Disease. Infect. Immun. 62:9, 4072-4
- 97.- Nunes MP, Andrade RM, Lopez MF, Dos Reis GA (1998). Activation-induced T cell death exacerbates *Trypanosoma cruzi* replication in macrophages cocultured with CD4 T lymphocytes from infected host. J. Immunol 160:1313-1319.
- 98.- Okhuysen PC, Chapell CL, Kettner C, Sterling CR 1996. *Cryptosporidium parvum* metalloaminopeptidase inhibitors prevent in vitro excystation. Antimicrob. Agents. Chemother 40: 2781-84
- 99.- O'Neill SM, Brady MT, Callaman JJ, Mills KHG, Dalton JP 2000 *Fasciola hepatica* infection down-regulated Th1 response in mice. Parasite Immunol 22, 147
- 100.- Oliveira AC, Peixoto JR, de Arruda LB, Campos MA, Gazzinelli RT, Golenbock DT, Akira S, Previato JO, Mendonca-Previato L, Nobrega A, Bollio M (2004). Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. J. Immunol. 173 5688-5696.

- 101.- Oliveri BP, Cotta-De-Almeida V, Araujo-Jorge T. (2002) Benznidazole treatment following acute *Trypanosoma cruzi* infection triggers CD8 T cell expansion and promotes resistance to reinfección. *Antimicrob Agents Chemother* 46:3790-3796.
- 102.- Parodi AJ, Labriola C, Cazzulo JJ. (1995). The presence of complex-type oligosaccharides at the C-terminal domain glycosylation site of some molecules of cruzipain. *Mol. Biochem. Parasitol* 69:2, 247-55.
- 103.- Parussini, F., García, M., Mucchi, J., Sanchez D., Hellman, U., Aslund, L. and Cazzulo J.J. A serine Carboxipeptidase from *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Biochem.* 2001, 268, suppl. 1, 181
- 104.- Planelles L, Thomas MC, Maranon C, Morell M, López MC (2003) Differential CD86 and CD40 coestimulatory molecules and cytokine expression pattern induced by *Trypanosoma cruzi* in APCs from resistant and susceptible mice. *Clin. Exp. Immunol* 131:41-47.
- 105.- Prata A. 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis.*1:92-100.
- 106.- Que, X and Reed, S.L. (1997). The role of extracellular cysteine proteinases in pathogenesis of *Entamoeba histolytica* invasion. *Parasitol Today* 13, 190-194.
- 107.- Que X, Reed SL(2000). Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev*; 13 (2): 196-206
- 108.- Ramasamy,R (1998) Molecular basis for evasion de host immunity and pathogenesis in malaria.*Biochem Biophys.Acta* 1406,10-27.
- 109.- Reeder JC, and Brown GV (1996). Antigenic variation and immune evasion in *Plasmodium falciparum* malaria. *Immunol. Cell Biol.* 74, 546-554.
- 110.- Reiner NE, Ng W, McMaster WR. (1987) Parasite accessory cell interactions in murine leishmaniasis.II. *Leishmania donovani* suppresses macrophage expression of class I and class II major histocompatibility complex gene products. *J. Immunol*, 138, 1926-1932.
- 111.- Rico G, Diaz-Guerra O, Kretsmer RR. (1995). Cyclic nucleotide changes induced in human leucocytes by a product of axenically grown *Entamoeba histolytica* that inhibits human monocyte locomotion. *Parasitol. Res.* 81, 158-162
- 112.- Rimoldi MT, Tenner AJ, Bobak DA, Joiner KA (1988). Enhanced invasion of mononuclear phagocytes by serum-treated *Trypanosoma cruzi* is due to C1q. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 83:supp 1, 456-8.

- 113.- Riley EM, Andersson G, Otoo LN, Jepsen S, Greenwood BM. (1988). Cellular responses to *Plasmodium falciparum* antigens in Gambian children during and after an attack of acute falciparum malaria. Clin. Exp. Immunol. 73, 17-22.
- 114.- Riley EM, McLennan C, Wiatkowski DK, Greenwood BM. (1989) Suppression of in vitro lymphoproliferative responses in acute malaria patients can be partially reversed by indomethacin. Parasite Immunol. 11, 509-517
- 115.- Rodriguez MM, Riberao M, Boscardin SB (2000). CD4 Th1 but not Th2 clones efficiently activate macrophages to eliminate *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide dependent mechanism. Immunology Letters 73: 43-50.
- 116.- Rodriguez MM. (2003). Importance of CD8 T cell-mediated immune response during intracellular parasitic infections and its implication for the development of effective vaccines. An. Acad. Bras. Cienc. 75:443-468.
- 117.- Roitt I, Brostoff J, Male D (1988). Immunology. Fourth edition. Pp.18.16
- 118.- Santana JM, Grellier P, Schrevel J, and Texeira AR 1997. A *Trypanosoma cruzi*-secreted 80kDa proteinase with specificity for human collagen type I y IV. Biochem J 325 (1) 129-137.
- 119.- Sacs David & Sher Alan, (2002) Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. Nature Immunology 3 (11) 1041-1047.
- 120.- Sajid M, McKerrow (2002). Cysteine proteases of parasitic organism. Mol.Bio.Parasitology 120: 1-21
- 121.- Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C. (2002). A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune response. Nat. Rev.Immunol. 2:965-975.
- 122.- Selzer PM, Pingel S, Hsieh I, Ugele B, Chan BJ, Engel JC, Bogyo M, Rusell DG, Sakanari JA, Mckerrow JH 1999. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy lessons from a parasite target. Proct. Natl. Acad. Sci USA 96; 20:11015-22.
- 123.- Shofield, L. and Hackett, F.(1993) Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites J. Exp. Med.177,145-153.
- 124.- Shoda LK, Kegerreis KA, Suarez CE, Roditi I, Corral RS, Bertoto GM, Norimine J, Brawn WC (2001). DNA from protozoan parasites *Babesia bovis*, *Trypanosoma cruzi*, and *T. brucei* is mitogenic for B lymphocytes and stimulates macrophage expression of interleukin-12, tumor necrosis factor a and nitric oxide. Infect. Immun. 69:2162-2171.

- 125.- Silva JS, Alberti JC, Martins GA, Souza MA, Souto JT, Padua MA. (1998). The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Braz. J. Med Biol. Res 31, 111-115
- 126.- SoaresMJ, de Souza MF., de Souza W (1987). Ultrastructural visualization of Lipids in Trypanosomatides. J. Parasitology 34 (2):199-203.
- 127.- Soares MJ, Souto-Padrón T, De Souza W. 1992. Identification of a large Pre- Lysosomal compartment in the pathogenic Protozoon *Trypanosoma cruzi* Cell Mol Biol 1998 44: 513-519.
- 128.- Sorensen, AL, Hey AS, Kharazmi A.I (1994). *Leishmania major* surface protease gp63 interferes with the function of human monocytes and neutrophils in vitro. Acta Pathol. Microbiol.Immunol. Scand.102, 265-271.
- 129.- Souto-Padron T, Campetella O, Cazzulo JJ, De Souza W (1990). Cysteine Proteinase in *Trypanosoma cruzi*: Immunocytochemical Localization and involvement in parasite-host cell interaction. J.Cell.Sci 96 485-490.
- 130.- Spinella S, G. Milon and M. Hontebeyrie-Joskowicz. 1990 A CD4+ TH2 cell line isolated from mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi* induces IgG2 polyclonal response in vivo. Eur J.Immunol 20:1045.
- 131.- Stempin C, Giordanengo L, Gea S and Cerban F. (2002) Alternative activation and increase of *Trypanosoma cruzi* survival in murine macrophages stimulated by cruzipain a parasite antigen. Journal of Leukocyte Biology 72: 727-734.
- 132.- Sterin-Borda L, et al. 2003. Cruzipain induces autoantibodies against cardiac muscarinic acetylcholine receptors. Functional and pathological implications. Eur. J. Immunol.33:2459-2468
- 133.- Stoka V., Nycander, M., Lenarcic, B., Labriola,C., Cazzulo, J.J., Björk, I., and Turk, V. (1995). Inhibition of cruzipain, the major cysteine proteinase of the protozoan parasite,
- 134.- Stoka V, Turk B, Schendel LS, Kim TH, Cirman T, Snipas SJ, Ellerby LM, Bredesen D, Freeze H, Abrahamson M, Brömme D, Krajewski S, Reed JC, Yin XM, Turk V, and Salvesen GS (2001). Lysosomal protease pathways to apoptosis. J. Bio. Chem.276:3149-3157.
- 135.- Talamas-Rohana P, Schile-Guzman MA, Hernández-Ramirez VI, Rosales-Encina JL. (1995) T-cell suppression and selective in vivo activation of Th2 subpopulation by *Entamoeba histolytica* 220-Kilodalton lectin. Infect. Immun. 63, 3953-3958.

- 136.- Tarleton RL (1995). The role of T cells in *Trypanosoma cruzi* infections. *Parasitol Today* 11 7-9.
- 137.- Tarleton RL (1997). Immunity to *Trypanosoma cruzi*. In: Haufman SHE ( Editor). *Host response To Intracellular Pathogens*. Landes Company, Austin Texas 227-247.
- 138.- Tarleton RI, Grusby MJ, Zhang L (2000). Increased susceptibility of Stat4-deficient and enhanced resistance in Stat6-deficient mice to infection with *Trypanosoma cruzi*. *J.Immunol* 165: 1520-5.
- 139.- Tato P, Fernandez AM, Solano S, Borgonio V, Garrido E, Sepúlveda J, Molinari JL (2004) A cysteine protease of *Taenia solium* metacestodes induce apoptosis in human CD4+ T-cells. *Parasitol Res*. Feb 92:3 197-204 Epub 2003 Dec 3.
- 140.- Tayler KM., Engman DM.(2001). The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal of Parasitology*. 31:472-481.
- 141.- Tort J, Brindley PJ, Knox D, Wolfe KH, Dalton JP (1999) Helminth proteinases and their associated genes. *Adv. Parasitol.* 43, 161-266.
- 142.- Troeberg L, Pike RN, Monty RE, Berry MK, Coetzer THT, Lonsdale-Eccles JD: Proteases from *Trypanosoma brucei* purification characterization and interactions with host regulatory molecules. *Eur. J. Biochem* 1996, 238:728-736
- 143.- Umekita LF., Takehara HA & Mota I (1988). Role of antibody Fc in the immune clearance of *Trypanosoma cruzi*. *Immunology Letters* 17: 85-89.
- 144.- Umekita FI and Mota I (2000). How are antibodies involved in the protective mechanism of susceptible mice infected with T.cruzi.
- 145.- Vespa GN, Cunha FQ, Silva JS (1994). Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemias and directly kills the parasite in vitro. *Infect. Immun.* 62:11, 5177-82
- 146.- van der Ploeg L; HT (1987) Control of variant surface antigens switching in trypanosomes. *Cell* 51, 159-161.
- 147.- Van overvelt L, Vanderheyde N, Verhasselt V, Ismaili J, De Vos L, Goldman M, Willems F, Vray B (1999) *Trypanosoma cruzi* infects human dendritic cells and prevents their maturation: inhibition of cytokines HLA-DR and costimulatory molecules. *Infect. Immun.* 67: 4033-4040.

- 148.- Van Parijs L, Abbas AK (1996) Role of Fas-mediated cell death in the regulation of immune responses. *Curr. Opin Immunol.* 8:355-361.
- 149.- Venturini G, Salvati L, Muolo M, Colasanti M, Gradoni L and Ascenzi P. 2000 Nitric oxide inhibits cruzipain, the major papain-like cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 270: 437-441.
- 150.- Wang W, and Chadee K (1995) *Entamoeba histolytica* suppresses gamma interferon-induced macrophage class II major histocompatibility complex la molecule and I-Ab m RNA expression by a prostaglandin E2-dependent mechanism. *Infect. Immun.* 63: 1089-1094
- 151.- Ward W, Alvarado L, Rawlings ND, Engel JC, Franklin C, McKerrow JH. A primitive enzyme for a primitive cell: the protease required for excystation of *Giardia*. *Cell* 1997;89(3):437-44.
- 152.- White AC, Molinari JL, Pillai AV, Rege AA (1992). Detection and preliminary characterization of *Taenia solium* metacéstodo proteases. *J. Parasitol* 78: 281-287.craas
- 153.- White AC, Baig S, Chapell CL. (1997) Characterization of a cysteine proteinase from *Taenia crassiceps* cysts. *Mol BiochemParasitol.*85:243-53
- 154.- World Health Organization 2002 Control of Chagas disease. Tech. Rep. Ser. 905, 1-109.
- 155.- Zhang and Tarleton (1996) Persistent production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines and associated MCH and adhesion molecule expression at the site of infection and disease in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Exp. Parasitology* 1996,84:203-13
- 156.- Zhang J, Andrade ZA, Yu ZX, Andrade SG, Takeda K, Sadirgusky M, Ferrans VJ. (1999) Apoptosis en canine model of acute chagasic myocarditis. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 31: 581-596
- 157.- Zuñiga E, Motran C, Montes CL, Díaz FL, Bocco JL, Gruppi A (2000). *Trypanosoma cruzi*-induced immunosuppression: B cells undergo spontaneous apoptosis and lipopolysaccharide arrests their proliferation during acute infection. *Clin. Exp. Immunol* 119:507-515.
- 158.- Zuniga E, Motran CC, Montes CL, Yahita H, Gruppi A (2002). *Trypanosoma cruzi* infection selectively renders parasite-specific IgG+ B lymphocytes susceptible to Fas/Fas ligand-mediated fratricida. *J.Immunol.*168: 3965-3973