



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO **UNAM**
POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PROTEÍNAS DE SUPERFICIE DE
TRIPOMASTIGOTES DE *Trypanosoma*
cruzi QUE INTERACCIONAN CON
CÉLULAS DEL HOSPEDERO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUIMICAS)

P R E S E N T A :

MARÍA LUISA MARTÍNEZ VELASCO



Tutor: DRA. BERTHA ESPINOZA GUTIÉRREZ

MÉXICO, D.F.

Febrero 2007



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.

PROTEÍNAS DE SUPERFICIE DE TRIPOMASTIGOTES DE *Trypanosoma cruzi* QUE INTERACCIONAN CON CÉLULAS DEL HOSPEDERO.

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez en el laboratorio de Tripanosomiasis, en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dra. Clara Inés Espitia Pinzón	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dr. Armando Gómez Puyou	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Se reconoce la colaboración del Dr. Humberto Lanz Mendoza y del Q. Gerardo Hurtado, de la Dirección de Enfermedades Transmitidas por Vector del Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas en el Instituto de Nacional de Salud Pública, en cuyo laboratorio se realizó los experimentos de MALDI-TOF.

Se reconoce la asesoría técnica de la Dra. Lilián Yépez Mulia y de Beatriz Rodríguez, del Laboratorio de Parasitología del Hospital Infantil del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, por su ayuda en la estandarización del ensayo de ligandos.

Se agradece el apoyo otorgado por el Dr. Javier Ambrosio y la Biol. Olivia Reynoso de la Facultad de Medicina, UNAM en la adquisición de las imágenes digitales de las membranas bidimensionales.

Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT y del apoyo recibido para la realización de la presente tesis del convenio DGAJ-SJPI-7525-074-6-11-98 con Laboratorios Silanes.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día de febrero de 2007.

El Jurado de Examen de Grado estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Armando Gómez Puyou	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dr. Guillermo Mendoza Hdz.	Facultad de Medicina, UNAM
Secretario	Dr. Ruy Pérez Monfort	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Suplente	Dra. Clara Inés Espitia Pinzón	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Suplente	Dra. Yolanda López Vidal	Facultad de Medicina, UNAM

DEDICATORIAS

A mi mamá, María Luisa por todo el apoyo y cariño que siempre me has brindado, y ser un ejemplo de superación.

A mi hermano Luis Tomás por estar a mi lado y acompañarme siempre.

A Juan Carlos por ser mi gran compañero en la vida, tu amor es mi apoyo en todo momento.

A mis abuelitos, tíos y primos por sus consejos, apoyo y cariño que me han brindado.

A todos mis compañeros de laboratorio: Andrea, Andrea Cristina, Nacho, Rodrigo, Guiehdani, Fer, Cenia, Noemí, Elsa y Deyanira.

AGRADECIMIENTOS

Bertha: Este es un paso más que he dado en mi crecimiento profesional y no lo podría haber realizado sin ti. Todas tus enseñanzas y consejos me han ayudado a ser mejor persona. Muchas gracias.

Al comité de sinodales, por sus sugerencias a este trabajo.

Se agradece a la Bióloga Andrea Jiménez por sus enseñanzas en el cultivo celular.

A mí Alma Mater: la Universidad Nacional Autónoma de México.

INDICE

I. Resumen	1
II. Introducción	3
II.1 Taxonomía	3
II.2 Ciclo de vida	5
II.3 Morfología del parásito	6
II.4 Tripanosomiasis americana o Enfermedad de Chagas	7
II.5 Genética del parásito	9
II.6 La superficie de tripanosoma.	10
II.7 Cepas mexicanas de <i>T. cruzi</i>	23
III. Justificación	25
IV. Hipótesis	26
V. Objetivos	27
V.1 Objetivo general	27
V.2 Objetivos particulares	27
VI. Metodología	28
VI.1 Cepas de <i>T. cruzi</i> analizadas	28
VI.2 Cultivo de tripomastigotes en monocapas de células Vero	28
VI.3 Purificación de tripomastigotes	28
VI.4 Biotinilación de proteínas de superficie	29
VI.5 Obtención de extracto proteico	29
VI.6 Obtención de proteínas de superficie de tripomastigotes	29
VI.7 Cuantificación de proteínas	30
VI.8 Ensayo de ligandos	31
VI.9 Electroforesis unidimensional	32
VI.10 Electroforesis bidimensional	32
VI.11 Detección de proteínas	33
VI.12 Tinción de proteínas con SilverSNAP stain for mass spectrometry	33
VI.13 Análisis de imágenes	34
VI.13 Identificación de las proteínas por huella peptídica	34
VII. Resultados	35
VII.1 Análisis de proteínas de superficie mediante electroforesis unidimensional	35
VII.2 Determinación de proteínas totales de superficie mediante electroforesis bidimensional	36
VII. 3 Análisis de proteínas de superficie de tripomastigotes que interaccionan con células Vero por electroforesis unidimensional	48
VII. 4 Análisis de proteínas de superficie de tripomastigotes que interaccionan con células Vero por electroforesis bidimensional	49
VII. 5 Análisis de proteínas purificadas de superficie de tripomastigotes.	54
VII. 6 Análisis de proteínas purificadas de superficie de tripomastigotes por electroforesis bidimensional	56

VIII. Discusión	60
IX. Conclusiones	70
X. Bibliografía	71
XI. Anexos	80
Anexo 1 Siliconización de material	80
Anexo 2 Interacción <i>T. cruzi</i> -hospedero	81
Anexo 3 Grafica para cálculo de punto isoeléctrico en función de distancia recorrida en tiras IPG de 3-10 NL.	83

I. RESUMEN

Trypanosoma cruzi es un parásito hemoflagelado causante de la enfermedad de Chagas, este parásito presenta heterogeneidad genética que se ve reflejada en una gran variabilidad en sus propiedades biológicas. Las cepas de *T. cruzi* que se han caracterizado en México han sido clasificadas como pertenecientes al genotipo I. Sin embargo, se ha observado que pese a pertenecer a un solo grupo genético, pueden presentar características biológicas contrastantes. Estudios previos realizados con 2 cepas mexicanas llamadas Ninoa y Querétaro, concluyeron que estas presentan entre otras características diferentes grados de infectividad "in vitro" y virulencia "in vivo" en modelo murino, por lo que el objetivo de este trabajo fue el de estudiar las proteínas de superficie de tripomastigotes de estas cepas e identificar aquellas que pudieran estar participando en el fenómeno de unión a células hospederas. Para el estudio de este grupo de proteínas se empleó el marcaje de éstas con biotina y su separación por medio de electroforesis bidimensional, además para realizar la identificación de las proteínas que se unen a células del hospedero se realizaron ensayos de ligandos. Las proteínas de superficie biotiniladas se purificaron por cromatografía de afinidad y la identificación final se llevó a cabo por medio de MALDI-TOF. Durante la primera parte de este trabajo se lograron resolver 721 proteínas de superficie de la cepa Ninoa y 648 de la cepa Querétaro. Destacó la abundancia de proteínas con pI ácidos menores a pH 6, así como su organización en grupos con pesos moleculares muy similares y pI muy cercanos de tal manera que parecieran isoformas o familias de proteínas. Para realizar un análisis detallado de las proteínas se formaron grupos de proteínas de peso molecular semejante; de esta manera se analizaron 27 grupos con 200 proteínas de superficie de la cepa Ninoa y 28 grupos con 188 proteínas de la cepa Querétaro. Al comparar estos grupos de proteínas se encontró que al menos los grupos más abundantes o conformados por numerosas proteínas que parecen isoformas son diferentes en estas dos cepas. Posteriormente se realizó la identificación de las proteínas de superficie que se

unen a células del hospedero, se encontró que las principales proteínas del parásito que interaccionan con células Vero tienen pI ácidos, siendo las más abundantes un grupo de 5 proteínas de 92-93 kDa y pI de 4.8-5.5, el grupo de 8 proteínas de 76-80 kDa con pI de 4.85-5.7, el de 6 proteínas de 69-70 kDa con pI de 5.2-5.6 y el de 50-60 kDa y pI 4.8-5.4 con 5 proteínas; además se identificaron proteínas que se unen a las células hospederas específicamente cuando la cepa Querétaro se usó en el ensayo de ligandos, de estas se encontró un total de 8 grupos con 29 proteínas la mayoría de ellos con pI superior a 5.7, también se encontraron 5 proteínas agrupadas en 3 grupos que se expresan con mayor intensidad en la cepa Querétaro en comparación con la cepa Ninoa. Finalmente, se realizó la identificación por MALDI-TOF de proteínas de superficie purificadas de ambas cepas, se analizaron 37 proteínas habiendo identificado 1 MASP y 1 gp63 que son proteínas de reciente descubrimiento en este parásito y que posiblemente sean factores de virulencia, además de otras proteínas de superficie como transalidasas, gp82 y HSP. Por otro lado, se identificaron 9 enzimas: sintetasa diacilglicerol-CDP, histona deacetilasa, glutatión sintetasa entre otras, de las que no existen reportes previos que se pudieran encontrar en la superficie celular. Estos resultados contribuyen a conocer con más detalle las proteínas de superficie de este parásito y cuáles de ellas interaccionan con la superficie de la célula hospedera.

II. INTRODUCCIÓN

Trypanosoma cruzi es un parásito protozoario hemoflagelado que se caracteriza entre otras cosas, por la presencia de un cinetoplasto y por ser un organismo digenético, esto es que presenta transformaciones tanto en el vector como en el hospedero así como por infectar un gran número de organismos y células. Además, es importante epidemiológicamente debido a que es el agente causal de la enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana, enfermedad ampliamente distribuida en el Continente Americano (OMS, 2002).

II.1 TAXONOMÍA

T. cruzi pertenece al subphylum Mastigophora del phylum Sarcomastigophora, orden Kinetoplastida, que comprende organismos flagelados con cinetoplasto, el cual es un organelo localizado en la mitocondria que contiene una red fibrosa de DNA. Se incluye a *T. cruzi* en la sección estercolaria, junto con otros tripanosomas, cuyos estadios infectivos se desarrollan en el tracto digestivo del vector y contamina a los hospederos mamíferos a través de las heces de éstos. El subgénero *Schizotrypanum* comprende tripanosomas que se multiplican en vertebrados vía estadios intracelulares. El nombre taxonómico completo es *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* y en la Figura 1 se señala la taxonomía completa de este parásito (OMS, 2002).

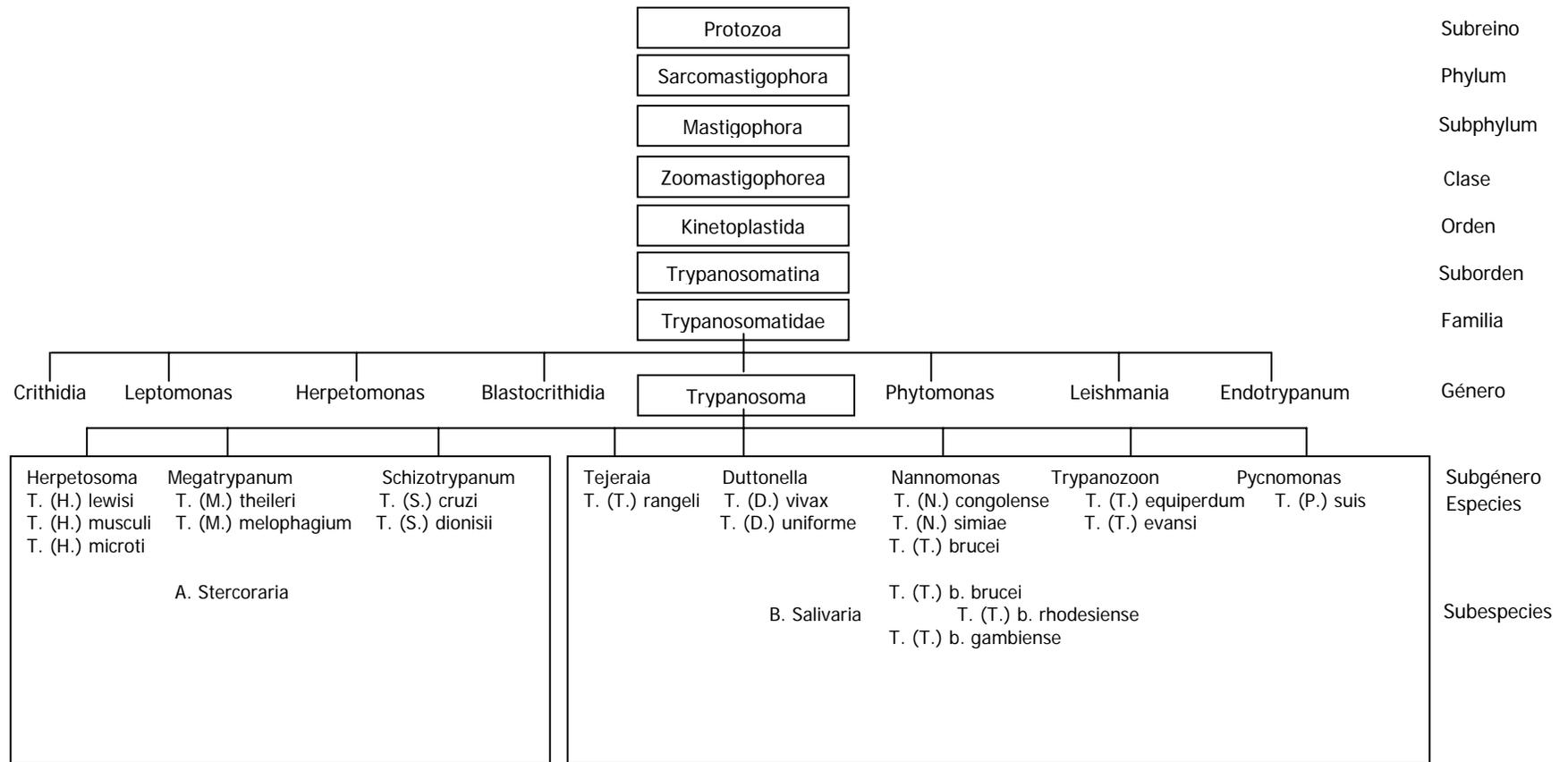


Figura 1. Clasificación taxonómica de los tripanosomatidos, incluido *Trypanosoma cruzi*. Se señalan las secciones A. Estercolaria y B. Salivaria. Tomado de OMS, 2002.

II.2 CICLO DE VIDA

El ciclo de vida del parásito incluye estadios tanto en los vectores como en los mamíferos que pueden ser reservorios u hospederos definitivos. En el intestino del vector proliferan epimastigotes replicativos que se diferencian en tripomastigotes metacíclicos que representan las formas infectivas no replicativas, estas son excretados en las heces u orina y pueden entrar al hospedero mamífero a través de las mucosas o la piel y llegar al torrente sanguíneo. Una vez en el torrente sanguíneo, los tripomastigotes pueden infectar una gran variedad de células nucleadas, como macrófagos y células cardíacas, donde intracelularmente se diferencian en amastigotes proliferativos, los cuales posteriormente causan la lisis de la célula infectada liberando tripomastigotes sanguíneos que pueden invadir otras células o bien ser tomados por el vector al alimentarse y de esta manera cerrar el ciclo de vida del parásito (Brenner, 1973). En la Figura 2, se presenta el ciclo de vida de *T. cruzi* y se ilustran las diversas transformaciones morfológicas de este parásito.

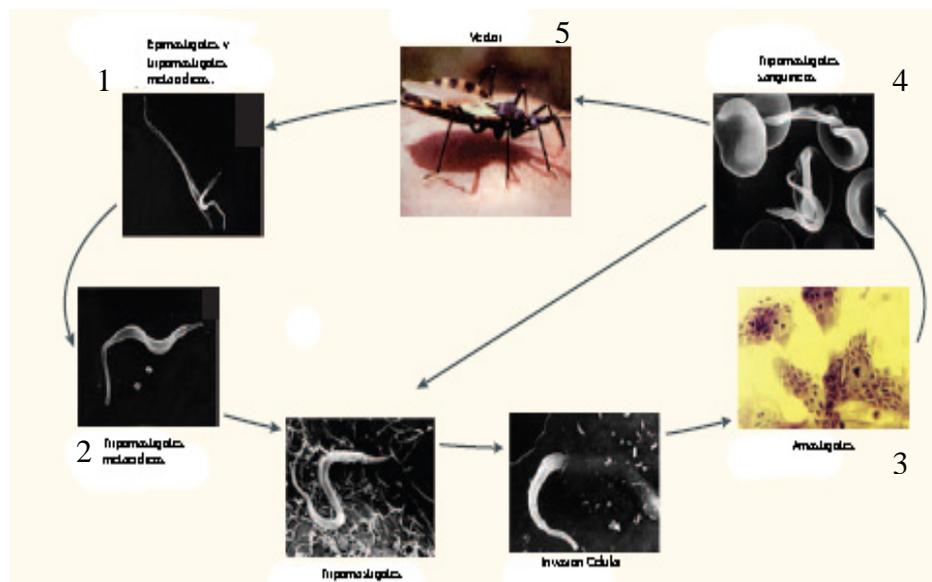


Figura 2. Ciclo de vida de *T. cruzi*. El ciclo de vida inicia cuando el vector generalmente del género *Triatoma* (5) deposita las heces y orina que contienen al tripomastigote metacíclico (2) sobre la piel o mucosa del hospedero, una vez que ha entrado el tripomastigote invade células donde se transformara en amastigote (3) que posteriormente se transformara en tripomastigote que lisa la célula liberando a los tripomastigotes sanguíneos (4), el ciclo de vida se cierra al momento que el vector se alimenta de este hospedero e ingiere a los tripomastigotes sanguíneos. Tomado de Andrade y Andrews, 2005.

II.3 MORFOLOGIA DEL PARÁSITO

Los diferentes estadios de desarrollo de *T. cruzi* durante su ciclo de vida pueden identificarse mediante la posición relativa del cinetoplasto respecto al núcleo y por la presencia del flagelo y la membrana ondulante. El amastigote es la forma esférica intracelular, casi inmóvil y con una alta capacidad de dividirse binariamente, carece de flagelo y membrana ondulante, posee un núcleo central y un cinetoplasto pequeño de entre 1 a 4 μm . (De Souza, 1999). El epimastigote tiene un tamaño entre 20 a 40 μm , tiene forma de huso con el cinetoplasto localizado anterior al núcleo. Es capaz de dividirse, pero no es infectivo y es la forma que se localiza en el intestino de los vectores o se puede cultivar en medios axénicos (De Souza, 2002). El tripomastigote mide alrededor de 25 μm de longitud y tiene un diámetro aproximado de 2 μm . El cinetoplasto se localiza posterior al núcleo y este estadio presenta membrana ondulante. Esta forma se puede observar en el intestino posterior, heces u orina de los vectores donde se denomina tripomastigote metacíclico, también en la fase estacionaria de cultivos axénicos y en la fase líquida de cultivos celulares; además se encuentra en el torrente sanguíneo de los hospederos durante la fase aguda de la infección donde se denominan tripomastigotes sanguíneos. Este estadio es infectivo, pero carece de capacidad de replicación (De Souza, 2002). En la Figura 3, se observan imágenes microscópicas de los diferentes estadios del parásito.

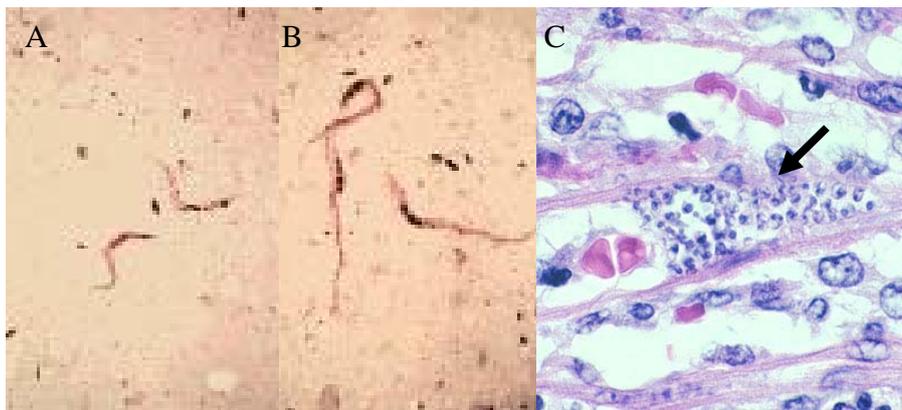


Figura 3 Microfotografías de *T. cruzi* en sus diferentes estadios. A) Tripomastigote metacíclico en heces de triatómino, B) Epimastigote en el intestino medio del triatómino y C) nido de amastigotes en tejido cardíaco (flecha negra). Tomadas de www.who.int/tdr/diseases/chagas.

II.4 TRIPANOSOMIASIS AMERICANA O ENFERMEDAD DE CHAGAS

La existencia de una enfermedad en humanos causada por *T. cruzi* fue descubierta por el médico Carlos Chagas en la región de Minas Gerais, Brasil a principios del siglo pasado, este investigador primero detectó un parásito flagelado en el intestino de los insectos conocidos como "chinchas besuconas" insectos del género *Triatoma*, al buscar al posible hospedero vertebrado para este parásito encontró a Berenice, una niña de dos años que se convirtió en el primer caso agudo de infección por *T. cruzi* (Andrade y Andrews, 2005).

Esta enfermedad es endémica en México, Centro y Sudamérica; principalmente en zonas rurales aunque actualmente debido a la migración y al crecimiento urbano es común encontrar personas infectadas en las grandes ciudades. De acuerdo a una estimación por parte de la OMS se calculaba que existían 17.4 millones de personas infectadas y que aproximadamente 100 millones más habitan en zonas de riesgo de infección (OMS, 2002). Sin embargo, se cree que debido al control de los vectores y a un control mayor en los bancos de sangre podría descender el número de personas infectadas a 11 millones (Schmunis, 1999).

La enfermedad de Chagas es una zoonosis capaz de permanecer en focos enzoóticos sin involucrar la enfermedad en los humanos, geográficamente se distribuye desde la latitud 42°N (norte de California) hasta la latitud 46° S (sudeste de Argentina y Chile); sin embargo la distribución de la infección en humanos se extiende un poco más allá de esos límites, debido principalmente a la migración humana (OMS, 2002).

El cuadro clínico de la enfermedad se ha dividido en tres etapas: la fase aguda que generalmente es corta, la fase crónica que se presenta a largo plazo, a su vez estas fases están separadas por una tercera fase clínicamente asintomática denominada fase indeterminada.

La fase aguda se caracteriza por una alta parasitemia, malestar general y una gran variedad de manifestaciones clínicas cuyos síntomas pueden pasar inadvertidos; esta fase se presenta después de la entrada del parásito en el organismo lo que puede ocasionar una inflamación local llamada chagoma. Por otro lado, también en esta fase se observan algunas alteraciones

electrocardiográficas como la taquicardia, prolongación del intervalo P-R, cambios en la onda T y bajo voltaje QRS y mediante rayos X se puede observar cardiomegalia ligera. El diagnóstico se puede realizar a través de pruebas parasitológicas directas. Generalmente el cuadro resuelve en 4 a 8 semanas (OMS, 2002).

La fase indeterminada inicia de 8 a 10 semanas después de la fase aguda y no presenta manifestaciones clínicas. Esta fase puede prolongarse por varios años. Los sujetos presentan electrocardiogramas normales y solamente se puede establecer un diagnóstico mediante pruebas serológicas ya que los individuos infectados presentan anticuerpos específicos o en algunos casos por xenodiagnosis.

Se calcula que aproximadamente el 30 % de las personas que presentan la fase indeterminada evolucionarán hacia la fase crónica sintomática, que se caracteriza por daños cardiacos, digestivos o neurológicos. Esta etapa se manifiesta por la presencia de anticuerpos y una mínima presencia de parásitos circulantes (OMS, 2002). Los síntomas que se presentan en esta fase de la enfermedad son variables, ya que van a depender de la patología que se desarrolle. En México la principal patología es la cardiomiopatía dilatada y el cuadro clínico varía considerablemente de acuerdo al grado de insuficiencia cardiaca o al tipo de alteración del ritmo. En los casos más graves es necesaria la colocación de un marcapasos definitivo o incluso el transplante del corazón.

Como se ha mencionado, el principal medio de infección es por la picadura del vector sin embargo, existen otros mecanismos de infección tales como: la infección congénita, el contagio por transfusiones sanguíneas y transplantes de órganos.

II.5 GENÉTICA DEL PARÁSITO

En 1966, Coura y colaboradores propusieron el establecimiento del complejo "*cruzi*" para englobar a las distintas cepas que hay del parásito, ya que se sabía que éste presentaba una gran diversidad genética y variación morfológica, que era capaz de inducir variados fenómenos inmunológicos,

además de presentar distintos grados de virulencia, así como producir patologías individuales y regionales diferentes.

La diversidad genética de este parásito ha sido revelada por estudios con marcadores enzimáticos (Miles *et al.*, 1978), con técnicas moleculares como los polimorfismos de los fragmentos de digestión con enzimas de restricción (RFLP por sus siglas en inglés) de ADN del cinetoplasto (Morel *et al.*, 1980), usando cariotipos moleculares (Henrikson *et al.* 1993), huella genética de ADN mediante análisis de minisatélites (Macedo *et al.*, 1992), y análisis de polimorfismos de amplificadores al azar de ADN (RAPD por sus siglas en inglés) (Tybayrenc *et al.*, 1993). Estos análisis han permitido dividir en dos grupos genéticos bien definidos a las poblaciones de *T. cruzi*: *T. cruzi* genotipo I y *T. cruzi* genotipo II, esta taxonomía fue acordada durante el simposio internacional celebrado para conmemorar el 90 aniversario del descubrimiento de la enfermedad de Chagas en 1999 (Referencia Internacional Symposium..., 1999).

En Sudamérica el grupo genético *T. cruzi* I es observado principalmente en mamíferos y triatóminos silvestres, en tanto que *T. cruzi* II pertenece al ciclo doméstico y se encuentra generalmente en humanos. Aunque, Fernandes y colaboradores encontraron la presencia de ambos grupos en el ciclo selvático (Fernandes *et al.*, 1999). La asociación preferencial de los diferentes linajes con distintos hospederos ilustra la complejidad del parásito (Devera *et al.*, 2003).

Las cepas de *T. cruzi* mexicanas pertenecen al grupo genético I de acuerdo a estudios isoenzimáticos y con RAPD (López-Olmos *et al.*, 1998 y Bosseno *et al.*, 2002). De 56 aislados analizados solo dos aislados mexicanos mostraron ser genotipo II. Cabe mencionar que dichos aislados provienen de mamíferos silvestres (López-Olmos *et al.*, 1998). Espinoza y colaboradores en 1998, realizaron el aislamiento y caracterización biológica de 5 aislados obtenidos de pacientes mexicanos, encontrando mediante un análisis de RFLPs que los parásitos se podían dividir en dos grupos, con propiedades biológicas distintas y patologías diferentes en el modelo murino; con lo que se demostró

que podría haber una relación entre la genética, la virulencia y los síntomas producidos, al menos en el modelo murino.

II.6 LA SUPERFICIE DE TRIPANOSOMA

La superficie celular de los tripanosomatidos puede considerarse compuesta por: la membrana plasmática y una capa formada por microtúbulos subpeliculares. La gran mayoría de proteínas que se encuentran asociadas a la superficie del parásito se encuentran unidas a la membrana mediante anclajes de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Las moléculas más abundantes en los epimastigotes y tripomastigotes son una familia de glicoinositol-fosfolípidos (GIPLs) Tipo I (Figura 4), también presentan una familia de glicoproteínas tipo mucinas altamente O-glicosilada ancladas por GPI (Ferguson, 1997).

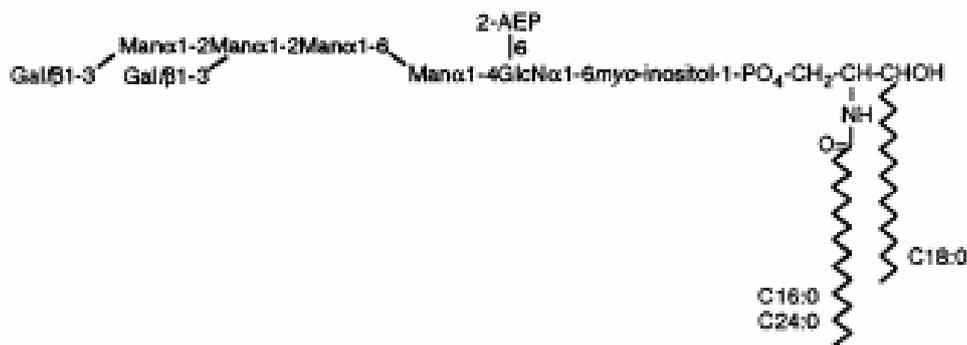


Figura 4. Estructura de GIPLs tipo I de *T. cruzi*. Esquema que representa la estructura general de los GIPL en *T. cruzi*, se observa la base de glicerol que esta unida a las ceramidas y a diferentes grupos glicosilados.

Los GIPLs forman una densa capa inmediatamente adyacente a la membrana, con las mucinas proyectadas hacia arriba de esta capa (Figura 5). Los anclajes GPI de las mucinas son relativamente simples, pero con cambios interesantes en los lípidos en los epimastigotes que se diferencian a tripomastigotes metacíclicos (Figura 6). Los GPI de epimastigotes contienen exclusivamente acilgliceroles en tanto que el 70% de los anclajes de los GPI de tripomastigotes contienen ceramidas. Estos cambios pudieran ser la explicación de porque las mucinas de los tripomastigotes presentan la habilidad de insertarse en la membrana celular del hospedero durante la invasión, en tanto

que otras glicoproteínas ancladas por GPI de los tripomastigotes que contienen predominantemente acilglicerol permanecen unidas al parásito (Ferguson, 1997).

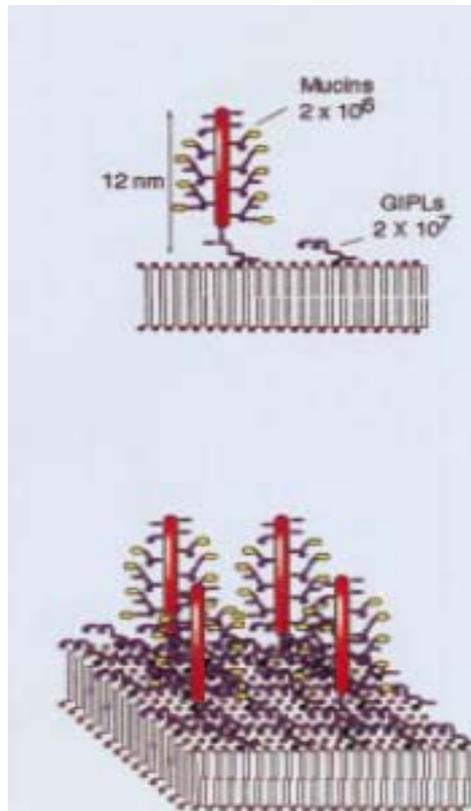


Figura 5. Representación de la superficie celular de *T. cruzi*. Se observa en la parte superior dos de las moléculas más abundantes en la superficie celular: las mucinas y los GPI libres, en la imagen inferior se observa la abundancia relativa de estas.

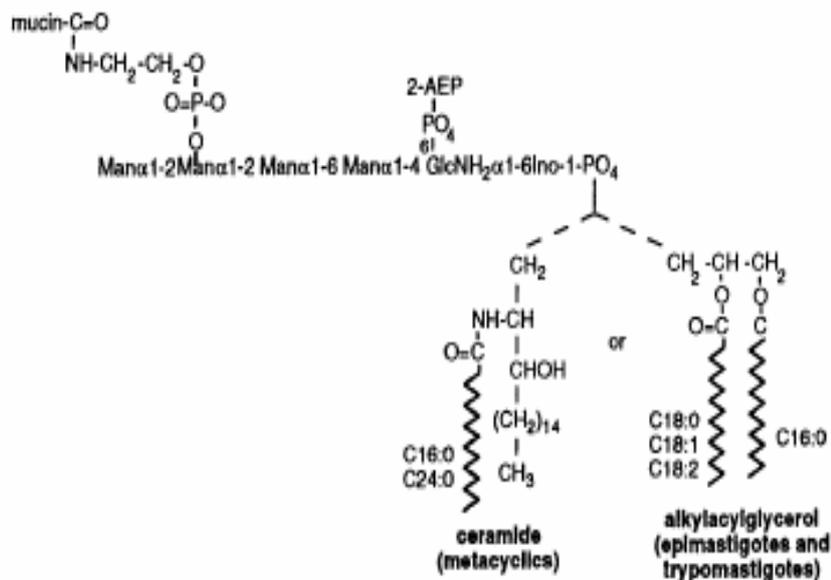


Figura 6. Estructuras de los anclajes GPI de mucinas de *T. cruzi*. Estructuras de los anclajes GPI de epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi*, estructuralmente se consideran simples, y sólo cambian en la porción lipídica de la molécula.

Existen una gran cantidad de reportes acerca del proceso de invasión del parásito a la célula del hospedero, en algunos de ellos se ha demostrado que glicoconjugados del parásito y de la célula hospedera, como los glicolípidos y glicoproteínas participan en el proceso de invasión y que son los motivos de carbohidratos los principales candidatos que al parecer están participando en esta interacción (Villalta et al., 1990; Vermelho y Meirelles 1994; Yoshida 2006 y Buscaglia et al., 2006).

T. cruzi presenta en su superficie celular varios glicoconjugados que están involucrados en el reconocimiento e invasión de las células hospederas y que permiten el establecimiento de la fase crónica. Estos glicoconjugados tienen un alto contenido de aminoácidos hidrofílicos (treonina, serina, lisina y glicina) (Almeida et al., 1999).

En el parásito, las mucinas son las principalesceptoras de ácido siálico, vía la acción de transialidasas. Algunas mucinas de *T. cruzi* migran en una electroforesis como un doblete o triplete de bandas con pesos moleculares de 35-43 kDa en epimastigotes y de 35-50 en tripomastigotes metacíclicos. Debido a su estructura, son altamente reconocidas por anticuerpos líticos anti-β-galactosil de pacientes con enfermedad de Chagas crónica, además de que los

tripomastigotes son reconocidos y destruidos por estos anticuerpos (Travassos et al., 1993). Algunos estudios muestran que las mucinas de los tripomastigotes sanguíneos pueden inducir la síntesis de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-12) y de óxido nítrico por medio de IFN- γ (Almeida *et al.*, 1999).

Con base a estudios realizados sobre las mucinas éstas se han clasificado en dos grupos principales dependiendo en que estadio del ciclo de vida del parásito se expresan: las TcMUC que son las que se expresan en los estadios presentes en los mamíferos (amastigotes y tripomastigotes) de manera diferencial y que son codificadas por un gran número de genes (785); la familia más pequeña es la TcSMUG y esta es característica del estadio de epimastigote, esta familia solo es codificada por 19 genes, se han clasificado en dos grupos dependiendo del tamaño de su ARNm, el S (por small) y el L (de large) (El-Sayed *et al.*, 2005; Campo *et al.*, 2006). Al estudiar la secuencia de las mucinas se ha encontrado que las TcMUC están formadas por el anclaje GPI, el núcleo proteico y una región variable; también se observó que el núcleo proteico puede o no tener secuencias repetidas por lo que se formaron tres subgrupos: el I que presenta de 2 a 10 repeticiones de la secuencia T₈KP₂, el II que presenta 1 a 2 repeticiones de la secuencia T₈KAP/T₈QAP y el subgrupo III que no presenta estas secuencias repetidas. De acuerdo a diferentes estudios se han establecido las funciones de las diferentes regiones de las mucinas, la región variable participa en la evasión del sistema inmune y adhesión, la región central es el sitio principal para la O-glicosilación e inmunogenicidad; los glicanos se encargan de la protección, adhesión e inmunogenicidad; el anclaje GPI es el responsable del anclaje de la proteína a la superficie y de la inmunomodulación (Buscaglia et al., 2006). En la Figura 7 se resumen los diferentes tipos de mucinas presentes en los estadios del parásito. En la tabla 1 se resumen las características generales de las mucinas, grupos, estadios en que se expresan, estructuras y número de genes de cada uno de ellos (El-Sayed et al., 2005).

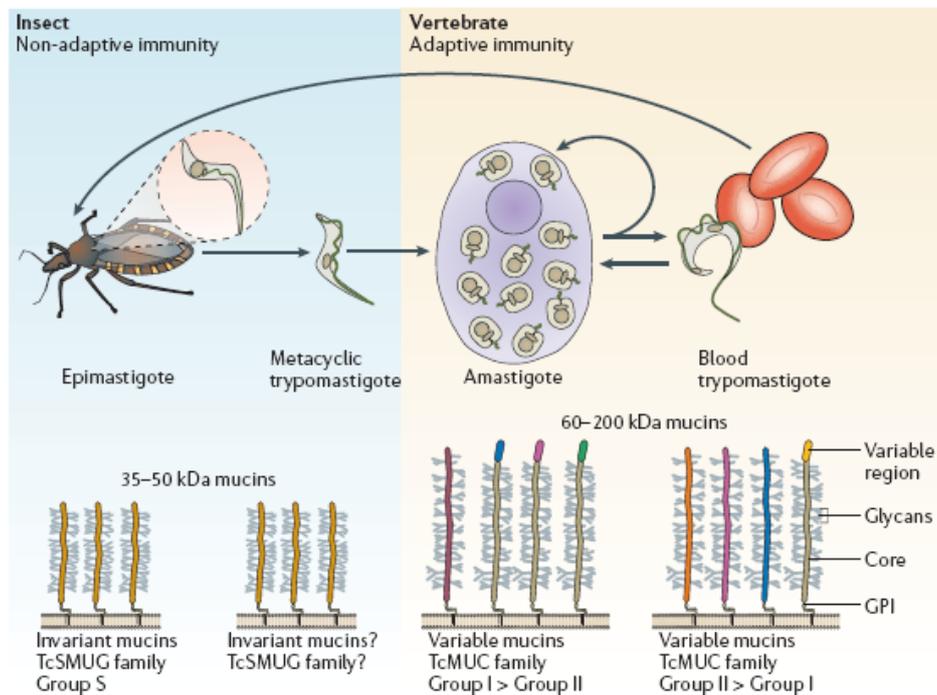


Figura 7. Variación en las mucinas de superficie de *Trypanosoma cruzi* en sus diferentes estadios. En este esquema se representan los diferentes tipos de mucinas que se expresan en los diferentes estadios del parásito, así como los segmentos que las componen. (Tomado de Buscaglia et al., 2006).

Tabla 1. Características generales de las mucinas en *T. cruzi*.

Familia	Grupo	Huésped	Estadio	Datos estructurales	#Genes
TcMUC	TcMUC I	Mamífero	A>T	2-10 repeticiones T ₈ KP ₂ O-glicosiladas, región HV N-terminal corta, C Terminal maduro rico en Thr, 60-200kDa.	55
	TcMUC II	Mamífero	T>A	1-2 repeticiones T ₈ KAP/T ₈ QAP, región variable N terminal larga, C Terminal maduro rico en Thr, 60-200kDa.	728
	TSSA	Mamífero	T/T*	No repeticiones, 20kDa.	2
TcSMUG	TcSMUG S	Insecto	E	No repeticiones, Thr O-glicosiladas, no regiones variables, 35-50 kDa.	11
	TcSMUG L	¿	¿	1-3 repeticiones KNT ₇ ST ₃ S(K/S)AP, no regiones variables.	8

Estadios principales del parásito se indican como amastigote (A), tripomastigote (T), estadios intermedios en el mamífero (T*) y epimastigote (E). Tomada de Buscaglia et al., 2006.

En particular, en los tripomastigotes metacíclicos se han identificado las glicoproteínas tipo mucinas gp83 y la gp35/50 las cuales se ha demostrado que

participan en la invasión a las células del hospedero y quizá lo más destacado es su expresión diferenciada en cepas distintas, aunque no se ha podido relacionar con la infectividad de estas cepas (Ruiz *et al.*, 1998).

La gp82 es un miembro de una familia de multigenes que presentan un alto grado de homología con otros miembros de la superfamilia gp85 transialidasa, que en lo único en que difieren es en sus propiedades adhesivas, ya que la gp82 no se une a los componentes de la matriz extracelular (Manque *et al.*, 2000). También se sabe que la gp82 interactúa con la célula hospedera mediante su cadena de azúcar, aunque se ha observado que la parte del péptido es la fracción más importante ya que tripomastigotes tratados con un inhibidor específico de la N-glicosilación infectan en mayor proporción células en comparación con los no tratados (Santori *et al.*, 1996). Esta proteína se identificó mediante el anticuerpo monoclonal 3F6. Y de acuerdo con el grupo que la descubrió, es específica de los tripomastigotes metacíclicos y no se expresa en los sanguíneos, amastigotes y epimastigotes. Esta proteína sería esencial para infecciones que involucren a la mucosa, ya que al tratar a los parásitos con el anticuerpo 3F6 reduce significativamente la infección resultante de un reto oral además de que inhibió la entrada en células epiteliales HeLa en presencia de mucinas gástricas, lo que sugiere su participación en la invasión de la mucosa (Neira *et al.*, 2003). Otros estudios indican que la gp82 induce la activación de la cinasa de tirosina de tripomastigotes y un incremento en la concentración del calcio intracelular del parásito, esta señalización ha sido reportada extensivamente (Ramírez *et al.*, 1993).

Otra glicoproteína, de 85 kDa y pI 6.3-7.5 fue una de las primeras estudiadas, se describió que sirve como ligando mediando el reconocimiento parásito-célula "in vitro" (Marroquin-Quelopana *et al.*, 2004). Estos mismos autores proponen que las glicoproteínas de superficie con peso molecular de 85 kDa conforman una familia heterogénea no enzimática ancladas por GPI denominada Tc-85.

También se ha estudiado la gp83, pI 8.1-8.6, que se une a la superficie del fibroblasto in vitro y es expresada en tripomastigotes de cultivo. La gp83 está implicada en la adhesión-invasión de las células, a través de la activación

de la proteína de cinasa que regula la entrada en macrófagos (Vermelho y Meirelles, 1994).

Ortega-Barria y Pereira reportaron una proteína de 60 kDa, llamada penetrina, proteína que se une a la heparina y que promueve la adhesión y penetración de tripomastigotes. Estos autores sugirieron que las moléculas como la heparina y el colágeno pudieran ser los receptores para la penetrina, que tiene gran habilidad de unirse a los componentes de la matriz extracelular, además observaron que la heparina, el colágeno y el sulfato de heparán inhiben la penetración de los tripomastigotes in vitro, al bloquear la asociación de la penetrina con los receptores de la célula (Ortega-Barria y Pereira, 1992).

Una de las primeras moléculas relacionadas con la capacidad infectiva del parásito fue el polipéptido de 90 kDa (pI 4.6) específica de tripomastigotes metacíclicos identificada mediante el anticuerpo monoclonal 1G7 que es capaz de reducir la infectividad en ratones al inhibir la adhesión y penetración de los tripomastigotes metacíclicos en células Vero (Yoshida *et al.*, 1990). La gp90 se une a las células de una manera receptor-ligando sin necesitar la señalización de calcio, en contraste con la gp82 (Málaga y Yoshida, 2001). La gp90 es la principal molécula de membrana que se ancla mediante un GPI, y es sintetizada a partir de un precursor de 75 kDa que es glicosilado rápidamente generando la gp90. Como se mencionó participa en la adhesión e internalización de los tripomastigotes, aunque el mecanismo no está claro, se mencionan dos posibilidades: que la célula hospedero reconozca y se una a la fracción de la molécula que tiene el epítipo 1G7 (que lo más probable se trate de un polipéptido ya que el tratamiento con periodato no altera la reactividad de la gp90 con el anticuerpo 1G7); el segundo mecanismo es que la fracción de oligosacáridos de la cadena del gp90 se una a algún receptor tipo lectina del hospedero (Yoshida *et al.*, 1990). La propiedad de la gp90 como regulador negativo de la entrada del parásito a la célula hospedera se ha demostrado por experimentos empleando oligonucleótidos antisentido para el gen de la gp90, el tratamiento de tripomastigotes con oligonucleótidos antisentido reduce la expresión de la gp90 e incrementa la habilidad del parásito para entrar en células hospederas (Yoshida, 2006).

Se sabe que el monosacárido, ácido siálico, de las mucinas participa en los procesos de interacción e invasión de las células, sin embargo *T. cruzi* es incapaz de sintetizarlo de novo, pero expresa la enzima transialidasa que transfiere el ácido de las moléculas que lo tienen a los aceptores que contienen residuos β -galactosil de la superficie del parásito (Di Noia *et al.*, 1996). La transialidasa se localiza en la superficie de los tripomastigotes anclada mediante GPI, por lo que se puede encontrar en el sobrenadante de cultivos, en el citoplasma de células infectadas o en circulación de pacientes infectados. Se ha postulado que participa en el escape del tripomastigote del fagolisosoma hacia el citoplasma, y en la resistencia del tripomastigote al complemento (Chuenkova y Pereira, 1995). Evidencias recientes muestran que en células deficientes de ácido siálico el parásito sale más rápidamente de la vacuola parasitofora en comparación a células wild-type, al parecer la transialidasa remueve el ácido siálico de la membrana lisosomal después de la invasión parasitaria lo que facilita la ruptura de la membrana del fagosoma por acción de TcTOX/LYT1 (Rubin-de-Celis *et al.*, 2006). Algunas de las funciones de la transialidasa se resumen en el esquema de la Figura 8.

La transialidasa de tripomastigotes purificados por cromatografía de afinidad usando anticuerpos monoclonales y policlonales forma agregados con masas moleculares mayores a 400kDa que después de ser desnaturalizados migran en SDS-PAGE como múltiples bandas que van de 100 a 220 kDa. El número de bandas y pesos varía entre diferentes cepas. Al digerir a la molécula con papaína se obtiene un fragmento monomérico enzimáticamente activo de 70 kDa y pI de 6.5, lo que indica que la agregación no es esencial para la catálisis (Schenkman, 1994). En la Figura 9 se ejemplifica la estructura general de la transialidasa.

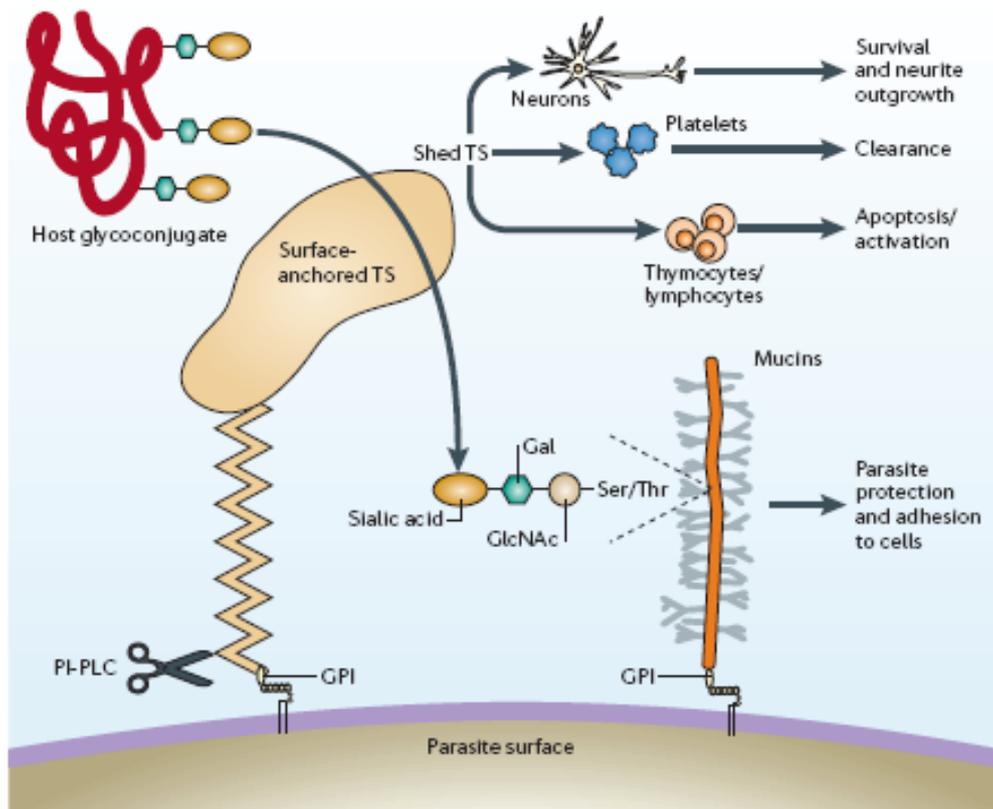


Figura 8. Efectos biológicos de la transialidasa. Diagrama esquemático de la transferencia del ácido siálico de los glicoconjugados del hospedero hacia las mucinas del tripomastigotes mediado por la TS, esta se puede encontrar en la superficie celular o ser liberada al torrente sanguíneo donde tiene diversas funciones biológicas. (Tomada de Buscaglia et al., 2006).

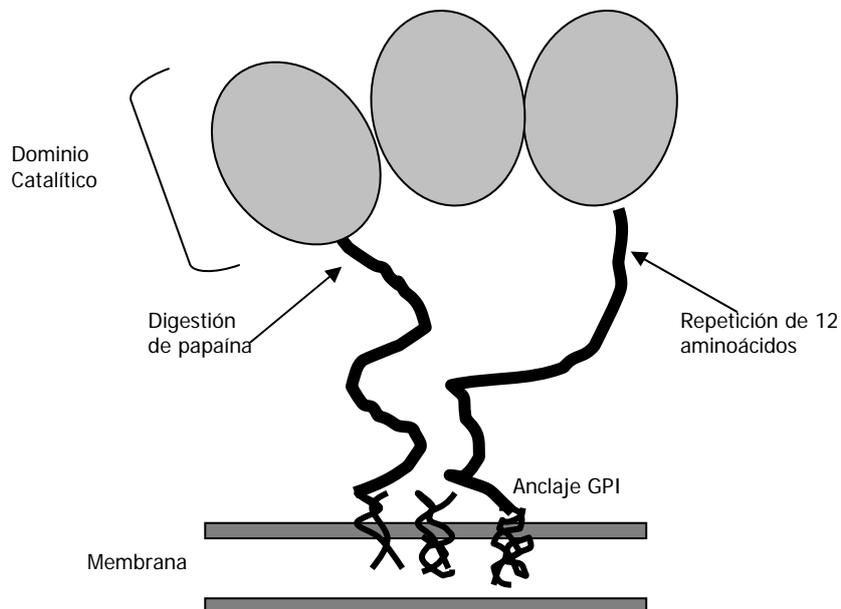


Figura 9. Modelo de la trans-sialidasa de tripomastigotes de *T. cruzi*. Esquema general de la estructura de la transialidasa donde se observa el sitio de anclaje tipo GPI, la secuencia con repeticiones que contienen el sitio de digestión susceptible a papaína y el dominio catalítico. (Tomada de Schenkman et al., 1994).

El número de genes para las transialidasa es muy alto, sin embargo el número de genes que codifican a la molécula enzimáticamente activa es bajo, esto pudiera explicarse como resultado de la presión evolutiva a la que ha estado sujeto el parásito, ya que esta molécula es un blanco del sistema inmune del hospedero, por lo que ha sido necesario expandir esta familia de proteínas de tal manera que tengan un porcentaje alto de transialidasas que sigan teniendo la actividad de sialotransferasa, pero también estén presentes una gran cantidad de transialidasa enzimáticamente inactivas que les ayuden en el proceso de invasión (El-Sayed *et al.*, 2005b). El número de genes que codifican para la enzima activa es de 12, y son los que van a codificar para la transialidasa que transferirá el ácido siálico, mientras que el número de genes que codifican para moléculas que presentan alta homología con la transialidasa pero que no tienen actividad enzimáticamente es de 725 y de la gran mayoría de estas moléculas se ha demostrado que participan en otros procesos como la unión a células hospederas y presentan un papel en la respuesta inmune, entre otras propiedades; lo anterior se resume en la tabla 2.

Tabla 2. Genes de transialidasas presentes en el genoma de *T. cruzi*.

Subfamilia	Dominios presentes	Genes	Función
TS activa	SAPA	12	Actividad TS
	Sitio catalítico		Unión a ácido siálico/galactosa
	Tipo lectina		Unión a CD43
Tipo TS	Tipo lectina	725	Adhesión celular
			Regulación de complemento
			Interacción con receptor adrenérgico 1
			Unión a ácido siálico/galactosa
Pseudogenes		693	
TS			

Tomado de El-Sayed *et al.*, 2005b.

Como se ha mencionado anteriormente para *T. cruzi* es muy importante adquirir ácido siálico, por lo que existen una gran cantidad de reportes del uso que le da el parásito a este carbohidrato. Existen evidencias de que numerosas

moléculas involucradas en la invasión como la glicoproteína Tc-85 y el antígeno Ssp-3 (antígeno de superficie específico de tripomastigote) están sialidados. Este antígeno Ssp-3 de tripomastigotes que tiene un peso de 160 kDa, participa en la invasión a células del hospedero, esto se observó al incubar los tripomastigotes con fragmentos Fab del anticuerpo monoclonal que reconoce al epitopo Ssp-3, ya que estos tripomastigotes muestran una disminución de 70% en la adhesión y la invasión a fibroblastos 3T3 (Schenkman *et al.*, 1992).

Por medio del uso de el anticuerpo monoclonal WIC29.26, que reconoce específicamente carbohidratos se detectó en epimastigotes una glicoproteína de 72 kDa, que posteriormente se localizó en tripomastigotes sanguíneos, pero que no ha podido encontrarse en tripomastigotes derivados de cultivos celulares y en amastigotes; al eliminar estas glicoproteínas mediante el reemplazo dirigido de genes, se observó que el flagelo se desprende del cuerpo celular después de haber emergido del bolsillo flagelar, además de que la célula se muestra muy alterada. Estudios de complementación de células mutantes sugieren que la glicosilación de la proteína madura es un paso limitante en la expresión funcional de gp72 en epimastigotes. Al elucidarse las estructuras de los glicanos que reaccionan con WIC29.26 se encontró que eran sumamente inusuales: galactofuranosa, ramnosa, mucosa y xilosa que aparentemente se enlazan mediante enlaces fosfodiéster a residuos de treonina en el polipéptido. La función precisa de gp72 no es muy clara, sin embargo se cree que juega un rol importante en mantener la morfología normal del parásito. Por otro lado mediante estudios por microscopia no se ha podido detectar el esqueleto peptídico lo que sugiere que la cadena polipeptídica es poco expuesta en la superficie celular (Haynes *et al.*, 1996); además de que se sugiere que participa en la diferenciación, puesto que WIC29.26 puede inhibir la metacicloogénesis (Sher y Snary, 1982). Por otro lado se demostró que funciona como aceptor del factor del complemento C3, lo que dispara la lisis de epimastigotes por suero de mamíferos mediante la vía alternativa del complemento (Joiner *et al.*, 1985). La localización de gp72 en la región proximal del flagelo, que es donde se une el flagelo al cuerpo celular, sugiere que la gp72 pudiera interactuar con alguna otra molécula que se encuentre en esa región, lo que indicaría que

son dos mecanismos distintos los responsables de la unión del flagelo en *T. cruzi* (Haynes *et al.*, 1996).

La gp72 por estar poco expresada en tripomastigotes derivados de cultivo, tuvo que ser sobreexpresada en bacterias para poder estudiar sus posibles funciones. Además al encontrarse un homólogo a esta proteína en *T. brucei*, que se expresa en mayor cantidad, fue posible conocer que en su secuencia se encuentra presente la secuencia tripeptídica RGD en el amino terminal y en la misma posición que en gp72 de *T. cruzi*. Este péptido presente en fibronectina, lamininas, tenascina y vitronectina está involucrado en las interacciones de adhesión celular e interacciones con componentes de la matriz extracelular; por lo que la presencia de este péptido en la gp72 es un indicio más de su participación en la adhesión a las células hospederas (Nozaki *et al.*, 1996).

Como se ha mencionado las glicoproteínas en la superficie celular del parásito son un punto clave para el proceso de reconocimiento e invasión de las células hospederas; se ha demostrado que la incubación del parásito con cicloheximida o tunicamicina inhiben drásticamente la infección a cultivos celulares, además de que la presencia de lectinas o monosacáridos específicos, durante el periodo de infección ocasiona que falle el proceso de penetración (Imaz *et al.*, 1997).

Una nueva familia de proteínas denominadas "Proteínas de superficie asociadas a mucinas" (MASP por sus siglas en inglés) fueron identificadas al encontrar los genes que las codifican dentro de grandes bloques de genes de TS y mucinas, estos genes de MASP se caracterizan por tener muy conservados los residuos N- y C- terminales que codifican para un péptido señal y un anclaje tipo GPI lo que sugiere que se trata de proteínas con una localización en la superficie celular. La región central de estas proteínas es altamente variable y contiene secuencias repetidas. Debido a que estos genes se localizan río arriba de los genes de mucinas TcMUC II, se les nombró proteínas de superficie asociadas a mucinas (El-Sayed *et al.*, 2005). Existen datos de análisis proteómicos de diferentes estadios de *T. cruzi* que revelaron al menos 4 péptidos que corresponden a MASP distintas, el bajo número de

péptidos de MASP identificados por aproximaciones proteómicas sugiere la existencia de modificaciones postraduccionales, además de que pudieran expresarse en estadios intermedios y por ello no se detecten, sin embargo aquellas que fueron detectadas lo fueron en el proteoma de tripomastigotes. El bajo número de MASP identificadas hace sospechar que no se expresan tan abundantemente como la transialidasa o mucinas pese a la gran cantidad de genes encontrados para estas moléculas (Atwood et al., 2005).

Como hemos podido ver las proteínas de superficie han sido muy estudiadas y esto ha permitido avanzar en el conocimiento del parásito y de cómo interacciona con las células hospederas, sin embargo muy recientemente se ha publicado el genoma completo de este parásito lo que ha arrojado que lo que sabemos de las proteínas de superficie es muy poco, en ese trabajo se reporta que el parásito tiene en total 22570 genes, de los cuales 3590 son pseudogenes, lo que nos lleva a que casi 20000 genes son codificantes para proteínas, sin tomar en cuenta que este parásito presenta un mecanismo de splicing alternativo, lo que aumenta de manera significativa el número de proteínas que se pudieran estar expresando en un momento dado en el ciclo de vida del parásito. De entre el número total de genes codificantes destacan por su abundancia las proteínas de superficie, que entre la transialidasa, mucinas, proteínas tipo mucinas, proteasas de superficie, las MASP y las relacionadas a las MASP suman en total 2678 genes, además de 1578 pseudogenes (El-Sayed *et al.*, 2005).

Como se ha mencionado algunas de las proteínas de superficie del parásito se unen a las células hospederas y de algunas otras se ha demostrado que su presencia u ausencia afectan la capacidad infectiva de los tripomastigotes, por lo que se considera que el contacto de estas proteínas con la célula hospedera es el primer paso para el proceso de invasión celular, este proceso se detalla en el anexo 2.

II. 7 CEPAS MEXICANAS DE *T. cruzi*

Como se mencionó en una sección anterior existe heterogeneidad genética en las cepas de *T. cruzi*, dicha variabilidad se ve reflejada en las

características biológicas, desde su crecimiento "in vitro" hasta sus capacidades infectivas. Las dos cepas que se emplearon en este trabajo pertenecen al genotipo I determinado por análisis de isoenzimas y de RAPD (Bosseno et al., 2002 y López-Olmos et al., 1998), pero presentan características biológicas diferentes, como son su crecimiento "in vitro", su capacidad de transformación de epimastigotes a tripomastigotes (López-Olmos et al., 1998), sensibilidad a fármacos (Martínez-Martínez, 2006 y Ruiz-Ávila, 2006), diferencias en su capacidad infectiva en macrófagos de la línea celular J774 e inducción diferencial de la producción de mediadores de la respuesta inmune como citocinas y óxido nítrico (Jiménez-Marín, 2005), además de que el hospedero presenta diferencias en la cinética de producción de anticuerpos contra el parásito así como los isotipos de estos (Caballero-García, 1996 y Rico-Ramírez, 2004). También en infecciones "in vivo" se ha demostrado la producción diferencial de quimiocinas de la familia CC en diferentes órganos ante la infección con estas cepas mexicanas de *T. cruzi* (Oaxaca-Hernández, 2005).

En un estudio "in vivo" con ratones BALB/c con estas dos cepas se encontró que el pico de parasitemia con la cepa Ninoa fue de alrededor de 1.2 millones de parásitos mientras que con la cepa Querétaro la parasitemia máxima fue mayor, de entre 3.3 y 4.4 millones de parásitos por lo que se observaron diferencias significativas en la cantidad de parásitos circulantes (Sosa-Aguilar, 2003). Posteriormente, al realizar ensayos "in vitro" con estas mismas cepas en células J774 se observó que la cepa Querétaro es significativamente más infectiva que la cepa Ninoa, esto independientemente del tiempo posinfección, además de que existe una relación de porcentaje de infección con respecto al tiempo, aunque siempre manteniendo la misma capacidad infectiva diferencial. Por otro lado, el número de amastigotes por células también fue dependiente del tiempo y de la cepa de que se tratara, ya que a mayor tiempo posinfección mayor cantidad de amastigotes; también se observó que las células infectadas con la cepa Querétaro eran más las que se infectaban que con la cepa Ninoa (Jiménez-Marín A., 2005).

En un estudio preliminar del proteoma en general de epimastigotes de estas mismas cepas se encontró que existía una expresión diferencial de

proteínas; estas diferencias se veían reflejadas desde el número de proteínas resueltas, siendo muy semejantes para las cepas Ninoa (468) y Querétaro (436) que pertenecen al mismo genotipo I, mientras que en la cepa Ver-6 de genotipo II se resolvieron un número mayor de proteínas (550). En un primer análisis donde se compararon las proteínas más abundantes en estas cepas se encontró que dichas proteínas eran diferentes en todos los casos, posteriormente algunas proteínas fueron analizadas por MALDI-TOF de donde se identificaron 5 MASP, tripanotión reductasa y oxidoreductasa entre otras proteínas, la mayoría de ellas hipotéticas (Martínez-Velasco, 2004).

III. JUSTIFICACIÓN

Pese a que hay varios estudios sobre las moléculas de superficie de *T. cruzi* y que se ha podido establecer, mediante el uso de diferentes anticuerpos contra estas moléculas, que tienen alguna participación en el proceso de invasión, no hay reportes que evidencien de manera directa que moléculas del parásito se unen a células hospederas. Además, la variabilidad existente respecto a su capacidad infectiva y virulencia entre las cepas mexicanas de *T. cruzi*, y la posible expresión diferencial de proteínas hacen necesario un estudio más detallado de las proteínas de superficie de tripomastigotes de cepas mexicanas que interaccionan con células hospederas.

IV. HIPOTESIS

Sí las cepas de *T. cruzi* presentan diferencias biológicas y genéticas, así como expresión diferencial de proteínas, entonces es posible también encontrar expresión diferencial de proteínas de superficie que pudieran interactuar con la superficie de las células hospederas.

V. OBJETIVOS

V.1 OBJETIVO GENERAL

Realizar un estudio de las proteínas de superficie de tripomastigotes de dos cepas de *T. cruzi* que infectan de manera diferencial a células Vero mediante electroforesis bidimensional, e identificar aquellas que participen en el fenómeno de unión a células hospederas.

V. 2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar y comparar las proteínas de superficie de tripomastigotes de dos cepas diferentes por electroforesis bidimensional.
- Identificar las proteínas de superficie involucradas en la adhesión a las células hospederas de dos cepas de *T. cruzi* que exhiben diferentes grados de infectividad "in vitro" y virulencia "in vivo".

VI. METODOLOGÍA

VI.1 CEPAS DE *T. cruzi* ANALIZADAS

Se emplearon dos cepas de *T. cruzi* aisladas en México, ambas pertenecen al genotipo I pero que presentan características biológicas distintas. La cepa Ninoa se aisló a partir de un caso humano agudo en el estado de Oaxaca (Monteón et al., 1996), esta cepa es poco infectiva "in vitro" y poco virulenta "in vivo" en comparación a la cepa Querétaro (Bosseno et al., 2002), esta última se aisló a partir del contenido intestinal de un vector en el estado de Querétaro.

VI. 2 CULTIVO DE TRIPOMASTIGOTES EN MONOCAPAS DE CÉLULAS VERO

Se mantuvieron cultivos de células Vero (fibroblastos de riñón de mono verde), en medio D-MEM suplementado con SFB al 10%, a 37°C y 5% de CO₂. Esos cultivos se infectaron con tripomastigotes sanguíneos provenientes de sangre de ratones infectados con tripomastigotes de cada cepa. Los cultivos se mantuvieron resemebrando las células cada tercer día, esto se realizó agregando medio fresco, para ello se retiró el sobrenadante de los cultivos y se añadió a la caja de cultivo, 4 mL de EDTA 5 mM por 12 minutos y posteriormente 2 mL de tripsina 1 mg/mL por 6 minutos para despegar las células, de esta suspensión se resemebraron 0.5 mL en una caja nueva a la que se añade 25 mL de medio fresco (López-Olmos, 1999).

VI. 3.PURIFICACIÓN DE TRIPOMASTIGOTES

Cien mL de sobrenadante de un cultivo celular de 96 horas (en ese momento las células llegaban a confluencia) se centrifugaron por 10 minutos a 1200 g, y el botón fue resuspendido en 1 mL de medio, de este se realizó una observación microscópica, si se observaban células Vero, entonces se centrifugaba por 2 minutos a 175 g para eliminar las células Vero y se colectaba el

sobrenadante de donde se recuperan los tripomastigotes al centrifugar nuevamente a 1200 g por 10 minutos. Posteriormente se lavaban los parásitos dos veces con PBS y se contaba el número de parásitos en cámara de Neubauer (Nieto-Castañeda, 1997).

VI.4 BIOTINILACIÓN DE PROTEÍNAS DE SUPERFICIE

Veinticinco millones de tripomastigotes fueron lavados 3 veces con PBS pH 8.0 frío, para ser resuspendidos en 1 mL de PBS, entonces se le añadió 1.0 mg de Sulfa-NHS-LC-Biotina (Pierce, Cat. 21335) por mL de suspensión celular (2 mM) y se incubaron a 4°C por 30 minutos, para posteriormente lavar las células con PBS que contenían 100 mM de glicina (Jang y Hanash, 2003). Finalmente, los parásitos fueron lisados como se describe más adelante.

VI.5 OBTENCIÓN DE EXTRACTO PROTEICO

Los parásitos biotinilados, se resuspendieron en el buffer de lisis (Urea 7 M, tiourea 2 M, Tris 10 mM y CHAPS 4%) recién preparado y se agregaron los inhibidores de proteasas (EDTA 12 mM, PMSF 1 mM, Leupeptin 0.1 mM y Pepstatin 0.001 mM) para ser agitados vigorosamente en el vortex por 2 minutos, después se mantuvieron en hielo por 10 minutos. Finalmente, se centrifugaron a 12800 g durante 15 minutos a 4°C, el sobrenadante se colectó y se almacenó en alícuotas pequeñas a -70°C hasta su uso. Una alícuota se almacenó a 0°C para realizar la determinación de proteínas y realizar una electroforesis unidimensional para observar el patrón de bandeo (Westermeier y Naven, 2002).

VI.6 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE SUPERFICIE DE TRIPOMASTIGOTES

Para purificar las proteínas de superficie de tripomastigotes se empleo el kit Pinpoint Cell Surface Protein Isolation Kit (Pierce, Cat. 89881) siguiendo las instrucciones proporcionas por el proveedor. Brevemente, 10×10^6 tripomastigotes obtenidos de sobrenadantes de cultivos de células Vero previamente lavados con PBS se incubaron en 1mL de Sulfo-NHS-SS-Biotina por 30

minutos a 4°C, parando la reacción adicionando 50 µL de solución Quenching/mL de biotina (contenido en el kit) y realizando un lavado con buffer salino de Tris 0.025 M Tris, 0.15 M NaCl pH 7.2 (TBS). Los parásitos se lisaron añadiendo 500 µL de buffer de lisis con inhibidores de proteasas (ver sección anterior), con 5 ciclos de congelación-descongelación. Posteriormente, se retiraron los restos celulares centrifugando por 10 minutos a 12800 g; el sobrenadante se colocó en la parte superior de la columna de NeutrAvidina inmovilizada incluida en el kit y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente, posteriormente se realizó la elución de las proteínas con buffer de Laemmli con 50 mM de DTT, incubando la columna una hora a temperatura ambiente. Las proteínas eluidas son de superficie, ya que fueron las marcadas con la Sulfo-NHS-SS-Biotina que se une específicamente a la columna de NeutrAvidina. Posteriormente, estas proteínas fueron analizadas por electroforesis uni y bidimensional como se menciona más adelante. Para realizar la separación bidimensional de estas proteínas se concentró la muestra (en un equipo Savant), lo que ocasionó que el SDS presente en la muestra se concentrara y no permitiera el isoelectroenfoque por lo que se debió remover las sustancias que interferían, esto se realizó precipitando las proteínas de la muestra con los reactivos del kit de cuantificación de proteínas y disolviendo las proteínas directamente en el volumen adecuado de buffer de rehidratación.

VI. 7 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Se empleó el Kit 2-D Quant Kit (Amersham, Cat. 80-6483-56) según indicaciones del proveedor, que permite realizar la determinación de las proteínas presentes en presencia de tiourea y detergentes. Se realizó la precipitación de las proteínas para posteriormente detectarlas mediante una reacción con cobre en medio alcalino y midiendo el cobre libre que quede en la solución de manera colorimétrica. Se preparó una curva estándar con albúmina sérica bovina con concentraciones de 0, 10, 20, 30, 40 y 50 µg de proteína, con las lecturas generadas se construyó una gráfica patrón y se interpoló la lectura obtenida para

la muestra, de la que se añadieron 1, 3 y 5 μL por duplicado (Westermeier y Naven, 2002).

VI. 8 ENSAYO DE LIGANDOS

Para realizar el análisis de las proteínas de superficie de tripomastigotes que interaccionaban con células hospederas se realizaron ensayos de ligandos, para ello se necesitaron proteínas de superficie marcadas con biotina y células Vero fijadas.

Para la preparación de las células Vero fijadas se emplearon cultivos en monocapas de células Vero que se encontraban en confluencia, para despegarlas se agregaron 12 mL de EDTA 5mM a 37°C por aproximadamente 1 hora, estas células se lavaron 3 veces con PBS pH 7.0 a 2500 g por 5 minutos, posteriormente se agregó glutaraldehído a una concentración de 2.5% en PBS (las células deben de estar en una densidad de $5 \times 10^6/\text{mL}$) y se mantuvieron por 1 hora a 4°C con agitación manual cada 10 minutos, después se lavaron como se menciona arriba 5 veces con PBS y se realizó un bloqueo con glicina 0.2M por 1 hora a temperatura ambiente, en la proporción de 5×10^6 de células/mL, finalmente se lavaron 5 veces con PBS y 3 veces con TDSET (10 mM Tris-HCl pH 7.0, 10 mM EDTA, 0.2% deoxicolato, 0.1% SDS y 1% Tritón X-100). Se almacenaron en alícuotas de 1×10^6 en 200 μL de TDSET; todo el procedimiento se realizó en material siliconizado, ver anexo 1 (Arroyo y Alderete, 1995).

Posteriormente se pusieron a interaccionar células Vero fijadas previamente (párrafo anterior), con proteínas de superficie marcadas con biotina por 18 horas a 4°C en agitación, se lavaron 3 veces las células con TDSET y posteriormente se eluyen las proteínas unidas a la superficie de las células Vero con buffer de rehidratación (7M urea, 2M tiourea, 4% CHAPS y 2.8 mg/mL DTT) por 30 minutos a 37°C o bien con buffer de Laemmli 1X (Stock 4X. 0.25 M Tris, 4% SDS, 40% glicerol y 4% β -mercaptoetanol) por 3 minutos a ebullición. Finalmente, se centrifugan las células a 12800 g por 5 minutos en microcentrifuga, el

sobrenadante que contenía las proteínas unidas a la superficie celular fue analizado por electroforesis unidimensional y bidimensional, las proteínas de superficie marcadas con biotina fueron detectadas con estreptoavidina como se describe más adelante (Arroyo y Alderete, 1995).

VI. 9 ELECTROFORESIS UNIDIMENSIONAL

Todas las electroforesis unidimensionales se realizaron en condiciones reductoras, en geles de poliacrilamida al 12% según a sido descrito anteriormente (Laemmli, 1970).

VI.10 ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

Al extracto proteico preparado como se mencionó en la sección VI.5 se le adicionó urea, tiourea y CHAPS para tener 7 M, 2M y 4% final respectivamente, añadiendo el buffer de rehidratación (Urea 7 M, tiourea 2M y CHAPS 4%, IPG buffer 3-10 NL 2% y DTT 2.8 mg/mL) para completar el volumen adecuado para cada tira IPG (geles de acrilamida con gradientes de pH inmovilizados en un soporte plástico); 125 y 350 μ L para tiras IPG de 7 y 17 cm (Bio-Rad, Cat. 163-2002 y 163-163-2009) respectivamente. Con esta solución se rehidrataron las tiras IPG por 12 horas mínimo. Posteriormente se realizó el isoelectroenfoco en la cámara Protean IEF Cell, Bio-Rad, a 20°C con el programa adecuado para cada tira IPG:

Paso	Modo	mA	V	Tiempo	V	Tiempo
				Tiras 7 cm.		Tiras 17 cm.
1	Lineal	50	250	0:20 min.	250	0:20 min.
2	Lineal	50	4000	2:00 hr.	10000	2:30 hr.
3	Rápido	50	4000	10000 VH	10000	40000 VH

Una vez realizado el isoelectroenfoco, la tira IPG se equilibró en solución de equilibrio (50 mM Tris-Cl pH 8.8, 6 M urea, 30% glicerol, 2% SDS y trazas de

azul de bromofenol) en dos periodos de 15 minutos, el primero con un agente reductor, DTT (100 mg/10 mL) y el segundo con el mismo buffer que contenía iodoacetamida (250 mg/10mL) para prevenir la oxidación de los puentes disulfuro. El volumen de la solución de equilibrio fue de 5 mL para tiras IPG de 7 cm. y 12.5 mL para tiras IPG de 17 cm. Entonces, se realizó la separación de las proteínas de acuerdo a su peso molecular mediante una electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% de 7 x 6 cm para tiras IPG de 7 cm y para las tiras IPG de 17 cm se emplearon geles de 18 x 18 cm (Martínez-Velasco, 2004).

VI. 11 DETECCIÓN DE PROTEÍNAS

Las proteínas marcadas con biotina con Sulfa-NHS-LC-biotina y separadas por electroforesis uni o bidimensional se transfirieron a membranas de nitrocelulosa por 1 hora a 100 V en cámaras de transferencia húmeda Mini-Trans blot, Bio-Rad, para posteriormente revelarse mediante el uso de un conjugado estreptoavidina-HRP (Amersham, Cat. RPN 1231) diluido 1:2000 y fueron detectadas con el sustrato 3,3-diaminobenzidina (0.5 mg/mL) (Sigma, Cat. D-5637) y 0.02% de H₂O₂ (Riedel-de Haën, Cat. 31642) (López-Olmos, 1999).

VI.12 TINCIÓN DE PROTEÍNAS CON SILVERSNAP STAIN FOR MASS SPECTROMETRY

Los geles seleccionados para la identificación de proteínas por MALDI-TOF fueron teñidos con el SilverSNAP Stain for Mass Spectrometry (Pierce, Cat. 24600) siguiendo las instrucciones proporcionadas. Brevemente, se lavaron los geles en agua milliQ dos veces por 5 minutos antes de fijar los geles en una solución agua:etanol:ácido acético 6:3:1 por 30 minutos, cambiando la solución a los 15 minutos, posteriormente se lavó el gel en una solución de etanol al 10% en dos pasos de 5 minutos cada uno, después se realizaron dos cambios de agua por otros 5 minutos antes de adicionar la solución sensibilizadora por 1 minuto, para después lavar dos veces con agua por 1 minuto, después de incubó por 5 minutos en la solución de plata, antes de revelar se realizaron dos lavados rápidos con

agua, para el revelado se dejó el gel en la solución reveladora por 2-3 minutos hasta que las proteínas se observaron claramente, sin demasiado fondo, parando la reacción con una solución de ácido acético al 5% por 10 minutos, finalmente se realizaron varios lavados con agua milliQ. Inmediatamente se realizó la localización y extracción de las proteínas de interés destiñéndolas con la solución desteñidora (incluida en el kit). Finalmente, se lavaron los pedazos del gel con proteínas con una solución de 25mM de bicarbonato de amonio (NH_4CO_3) y 50% de acetonitrilo.

VI.13 ANÁLISIS DE IMAGENES

Para la adquisición de las imágenes de las membranas y geles se utilizó el equipo Chemi-Doc XRS de Bio-Rad. Posteriormente las imágenes fueron analizadas con el programa PD-Quest de Bio-Rad.

VI.14 IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEINAS POR HUELLA PEPTÍDICA

Los spots proteicos una vez desteñidos se enjuagaron varias veces con agua, para posteriormente realizar la digestión con tripsina (50 mM NH_4CO_3 , 5 mM cloruro de calcio (CaCl_2) conteniendo 12.5 ng/mL de tripsina porcina grado secuenciación) se incubó a 37°C toda la noche. Los péptidos generados fueron extraídos dos veces con acetonitrilo:agua:TFA (66:33:0.1) en un sonicador por 10 minutos. Los extractos fueron secados bajo vacío y solubilizados en TFA 0.1% (Paba et al., 2004).

Los péptidos fueron analizados en un espectrómetro de masas MALDI-TOF; cada muestra fue depositada en una charola de muestras seguido de la solución de matriz, se dejó secar la muestra antes de analizar por MS MALDI-TOF. La identificación de la proteína fue realizada usando los software MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) y PROSPECTOR (<http://prospector.ucsf.edu/>).

VII. RESULTADOS

VII. 1 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS DE SUPERFICIE MEDIANTE ELECTROFORESIS UNIDIMENSIONAL

Con la finalidad de reducir las variables que pudieran afectar los patrones de expresión de proteínas, se establecieron condiciones estándar para el cultivo celular y la obtención de tripomastigotes, de esta manera se obtuvieron los tripomastigotes del sobrenadante celular a las 96 horas de cultivo con un mínimo de 90% de movilidad de los parásitos, obteniendo entre 75 y 100 millones de parásitos a partir de 100 mL de sobrenadante, estos cultivos se encontraban en confluencia y en buenas condiciones.

A partir de al menos 5 experimentos independientes se identificaron las proteínas de superficie marcadas con biotina más abundantes y que aparecían de manera constante, es decir que aparecían en al menos 3 de los experimentos. El número de proteínas de superficie marcadas con biotina detectadas en electroforesis unidimensional fue de 12 en ambas cepas, siendo las más abundantes las de 82-83, 70, 63-64 y 45 kDa en ambas cepas. A este nivel de análisis se encontraron diferencias en la expresión de las proteínas de superficie de 90, 50-52 y 37 kDa que son exclusivas de la cepa Querétaro y las de 40, 30 y 25-26 kDa para la cepa Ninoa, las cuales se pueden ver en la Figura 10.

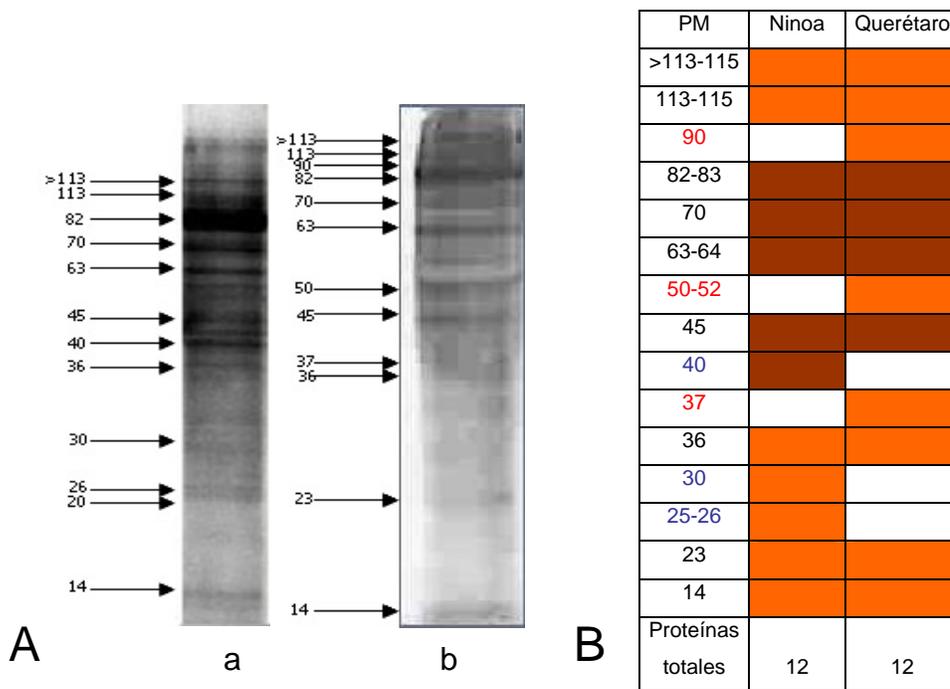


Figura 10. Proteínas de superficie de tripomastigotes marcadas con biotina. A) electrotransferencia de proteínas de superficie marcadas con biotina a. cepa Ninoa b. cepa Querétaro, imagen representativa de al menos 5 experimentos independientes; y B) Tabla resumen de los pesos moleculares de las proteínas de superficie. La primera columna corresponde al peso molecular aproximado. Los colores indican la presencia de la banda, siendo el color guinda indicativo de banda abundante. Los números rojos indican presencia exclusiva en Querétaro y azul en Ninoa.

VII. 2 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES DE SUPERFICIE MEDIANTE ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

Para la separación bidimensional de las proteínas de superficie en un intervalo de pH de 3-10 No Lineal (NL) en tiras IPG de 7 cm de longitud, inicialmente se empleó la concentración de proteínas de 50 μg por gel, sin embargo no se logró una buena resolución, sobre todo en la zona ácida de pH de 3-6, por lo que se decidió bajar la concentración de proteína a la mitad, así los siguientes geles realizados se cargaron con 25 μg de proteína por gel, de esta manera se mejoró la resolución de las proteínas. Al emplear esta concentración se resolvieron adecuadamente las proteínas de la cepa Ninoa (Figura 11) y de la cepa Querétaro (Figura 12).

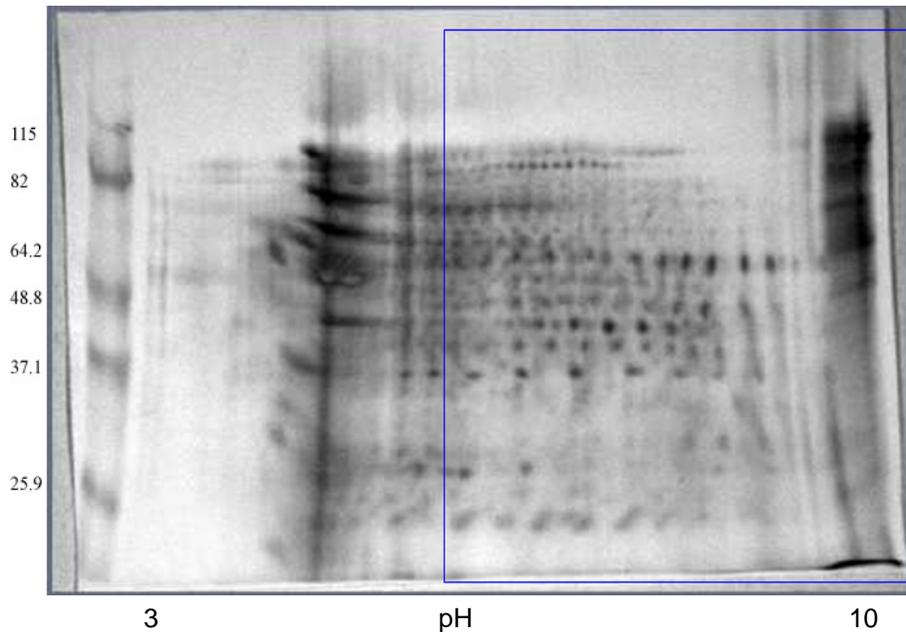


Figura 11. Proteínas de superficie de tripomastigotes de la cepa Ninoa. Veinticinco μg de proteínas de tripomastigotes de la cepa Ninoa se separaron por 2D-PAGE en un gradiente de pH de 3-10 NL de 7 cm y en geles de 7 x 8 cm de acrilamida al 10%, posteriormente se transfirió a una membrana de nitrocelulosa donde se realizó la detección de la proteínas de superficie marcadas con biotina empleando un conjugado estreptoavidina-HRP diluido 1:2000 y revelando con 3,3-diaminobenzidina y peróxido de hidrogeno. Las membranas ya reveladas se digitalizaron en un equipo Chemi-Doc XRS de Bio-Rad. La imagen es representativa de al menos 4 experimentos independientes. El recuadro azul muestra la zona de pH de 6 a 10.

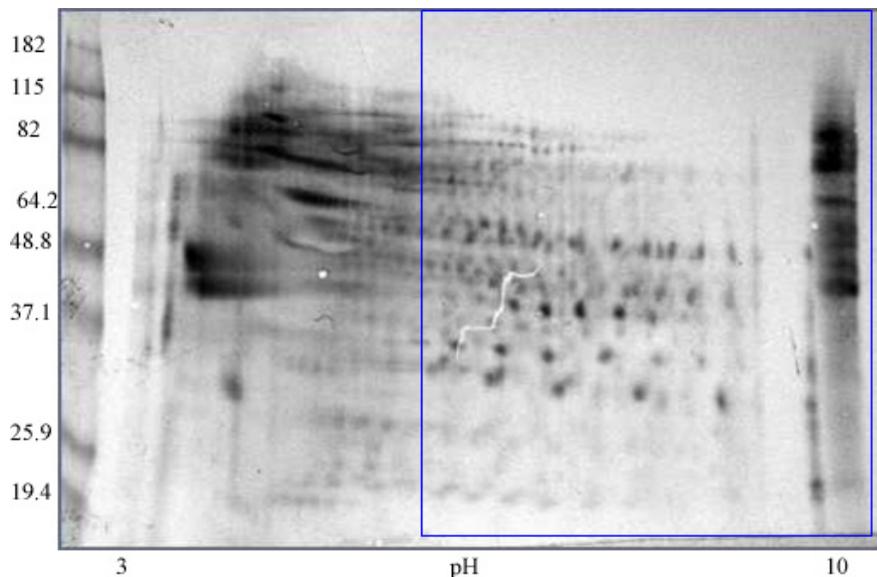


Figura 12. Proteínas de superficie de la cepa Querétaro. Imagen representativa de 4 experimentos independientes. Se siguió el mismo procedimiento descrito en la Figura 11. El recuadro azul muestra la zona de pH de 6 a 10.

En todos los geles realizados se pudo observar la presencia de numerosos grupos de proteínas con pesos moleculares muy semejantes pero que diferían ligeramente lo que sugiere que pudiera tratarse de isoformas de la misma proteína ó miembros de una familia proteica. Algunos de estos grupos destacaron por su abundancia, mientras que otros presentaron proteínas con señales muy tenues, llamando la atención por tratarse algunas veces de grupos con al menos 10 proteínas con spots muy pequeños.

Como se puede ver en las Figuras 11 y 12, se observó una zona que comprendía los pH más ácidos donde había una gran cantidad de proteínas que no se resolvían de manera adecuada, por lo que se emplearon tiras IPG con un gradiente de pH de 3-6, cepa Ninoa (Figura 13) y cepa Querétaro (Figura 14). Al emplear este último gradiente de pH se pudo mejorar la resolución de las proteínas con puntos isoeléctricos de entre 4 a 6 de pH, quedando aún proteínas sin resolver en el pI entre 3 y 3.8 para la cepa Querétaro, lo que no se observó en la cepa Ninoa.

Con la finalidad de realizar el análisis de las proteínas de superficie los geles se dividieron en dos zonas: la de 3 a 6, que se analizó en los geles con este gradiente (Figuras 13 y 14) y la de 6 a 10 que se analizó a partir de los geles con gradientes de 3 a 10 NL (recuadros en color azul), Figuras 11 y 12. Al combinar los dos geles se obtuvieron un total de 721 proteínas para la cepa Ninoa y 648 para la cepa Querétaro.

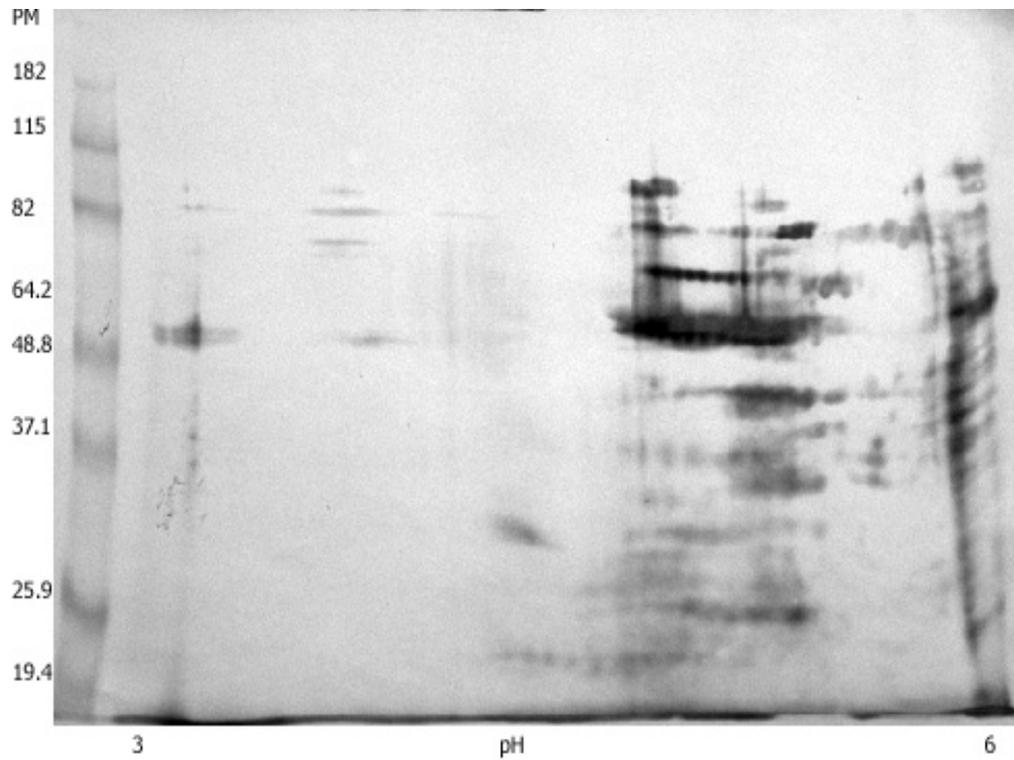


Figura 13. Proteínas de superficie de tripomastigotes de la cepa Ninoa. Imagen representativa de 4 experimentos independientes. Se llevó a cabo el mismo procedimiento descrito en la Figura 11, salvo que el gradiente de pH fue de 3 a 6.

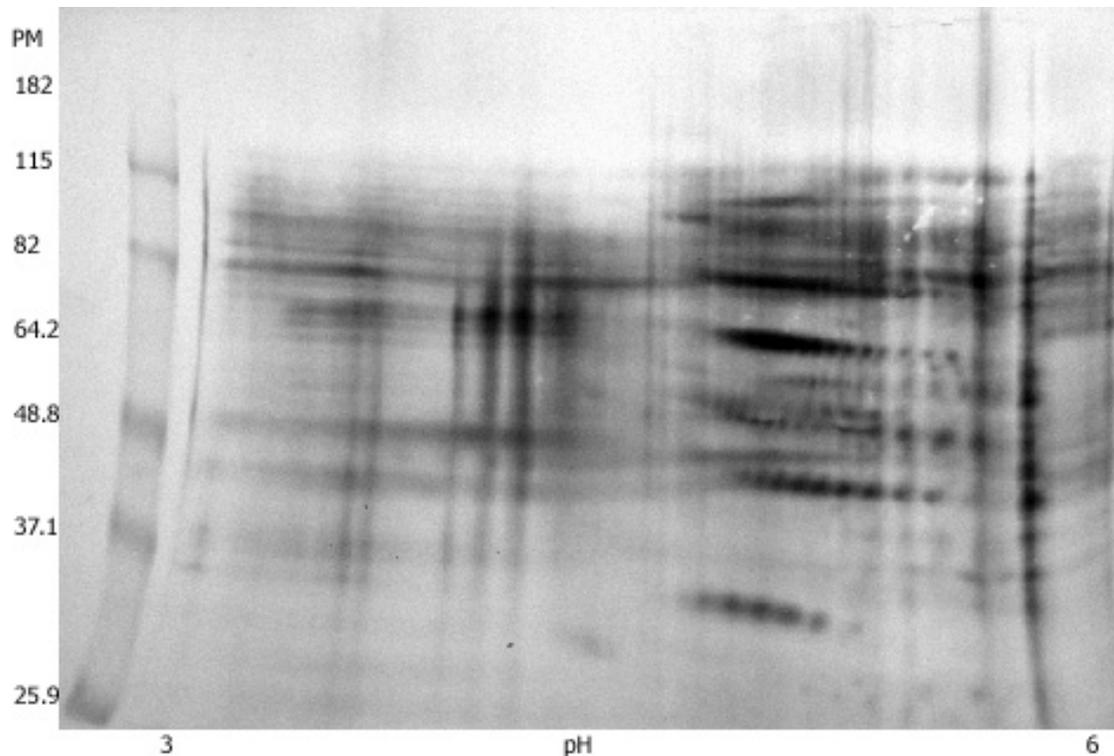


Figura 14. Proteínas de superficie de tripomastigotes de la cepa Querétaro. Imagen representativa de 3 experimentos independientes. Se llevó a cabo el mismo procedimiento descrito en la Figura 11, salvo que el gradiente de pH fue de 3 a 6.

A continuación se realizó un análisis detallado de los principales grupos de proteínas de superficie, para ello se empleó el software PD-Quest realizando ampliaciones de los grupos de proteínas con pesos moleculares semejantes, para determinar el número de proteínas en dichos grupos así como su peso molecular y punto isoeléctrico; para el cálculo del punto isoeléctrico primero se calcularon manualmente algunos de ellos, esto se realizó midiendo el porcentaje de gel que hubieran recorrido y calculando a que pI correspondía este porcentaje en las gráficas que relacionan estos parámetros (Ver anexo XI.3). Una vez que se conoció el punto isoeléctrico de al menos 10 proteínas (que siempre fueron las mismas en todos los experimentos) se introdujeron esos datos y los pesos moleculares de los marcadores de pesos moleculares separados en el mismo gel y de esta manera se asignan estos dos parámetros al resto de las proteínas de ese gel. Para conocer el número de proteínas que formaban a un grupo se empleó la herramienta "3D

Viewer” del mismo software, lo que nos permitió determinar de una manera precisa el número de proteínas agrupadas, aún en grupos complejos como por ejemplo el “aaq” que se observa en la Figura 19, esto se puede observar en la Figura 15.

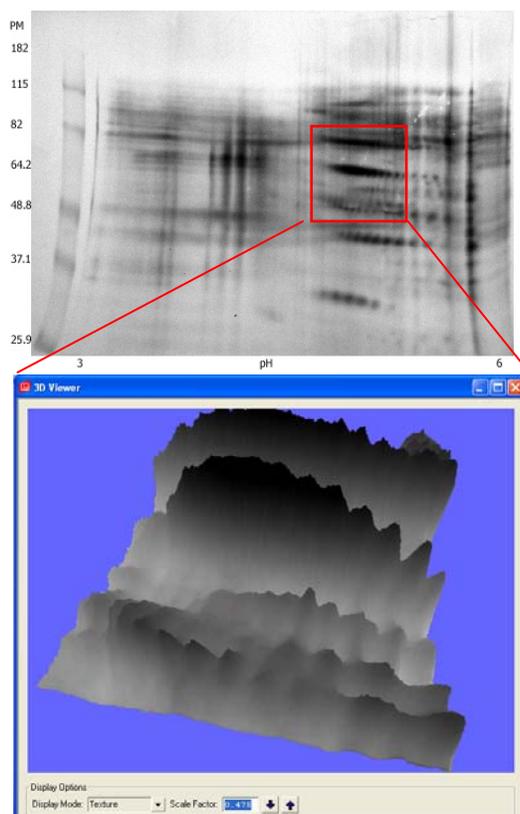


Figura 15. Análisis tridimensional de los grupos de proteínas. Empleando la herramienta “3D Viewer” del software PD Quest se puede determinar el número de proteínas presentes en los grupos formados para el análisis; en la Figura se muestra el gel de las proteínas de superficie de la cepa Querétaro de pl de 3-6 y en el recuadro rojo la zona analizada que se observa en la parte inferior de la imagen donde cada sombra corresponde a cada proteína, el grupo “aaq” se observa en la fila inferior de la imagen, cada pico se consideró una proteína diferente.

Los grupos de proteínas analizados se muestran en recuadros de color rojo en los geles de las Figuras 16 y 17 que corresponden a las proteínas de superficie de la cepa Ninoa, además en la tabla 3 se detallan los pesos moleculares y puntos isoeléctricos de estos grupos proteicos así como el número de proteínas que los conforman. Estos grupos se formaron con proteínas de pesos moleculares que diferían por máximo 3 kDa en sus pesos moleculares; por ejemplo los grupos “bn”,

“zn” y “aan” que están conformados por al menos 4 proteínas y un máximo de 11 proteínas. Otros grupos se formaron seleccionando proteínas con pesos similares pero además abundantes como el grupo “in” conformado por 7 proteínas, el grupo “kn” formado por 9; sin embargo hubo grupos más complejos de elucidar dado su abundancia como el “tn” formado por 11 proteínas muy abundantes y que sólo mediante el 3D Viewer fue posible determinar el número de proteínas ahí agrupadas. Durante el análisis de las proteínas de superficie marcadas con biotina separadas en los dos gradientes de pH se formaron 27 grupos que contenían 200 proteínas. El resto de las proteínas no se analizaron a detalle dado que se trata de proteínas que están en muy baja concentración o bien no se resolvieron con nitidez suficiente para este tipo de análisis.

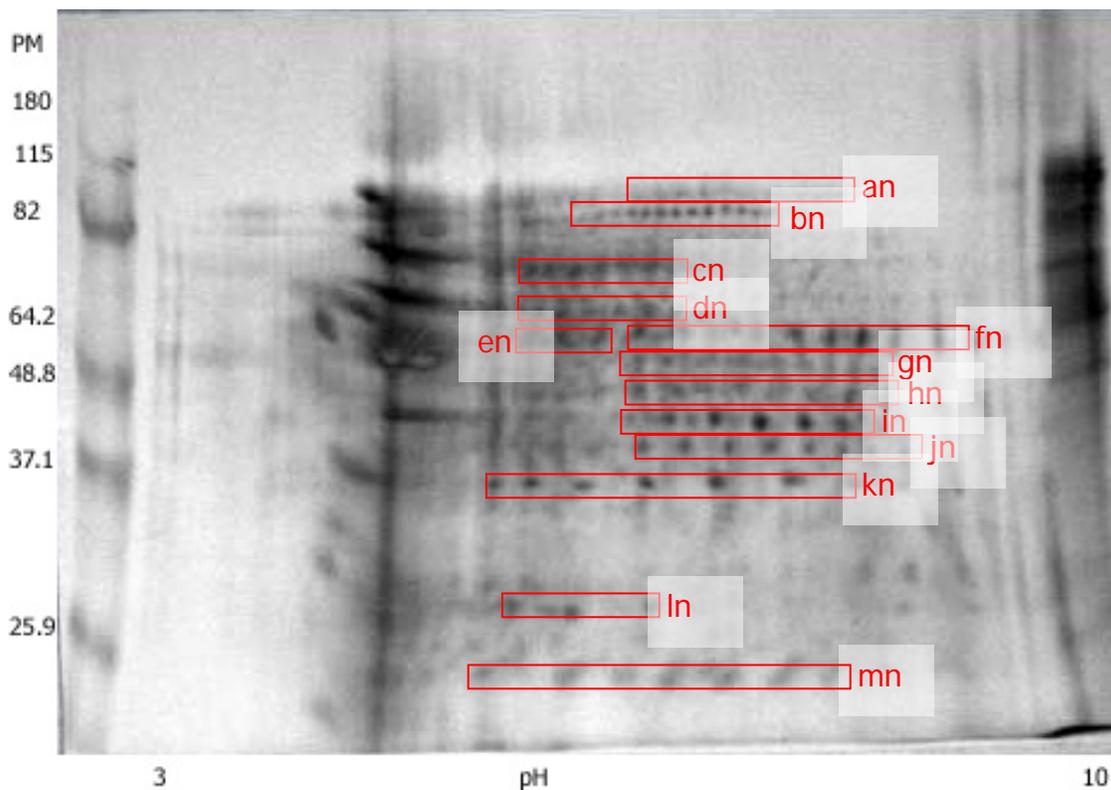


Figura 16. Principales grupos de proteínas de superficie marcadas con biotina de pI de 3 a 10 de tripomastigotes de la cepa Ninoa. Se muestran en recuadros los principales grupos proteicos de la superficie separados en gradientes de 3-10 NL.

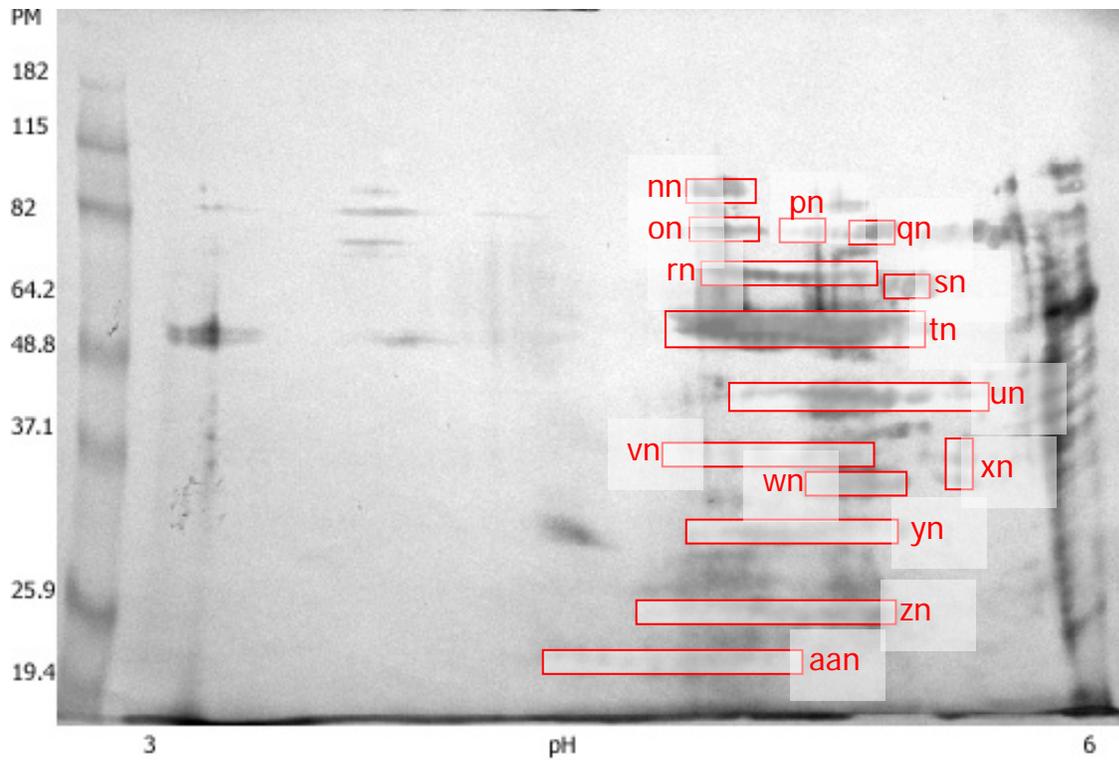


Figura 17. Principales grupos de proteínas de superficie marcadas con biotina de pI de 3-6 de tripomastigotes de la cepa Ninoa. Se muestran en recuadros los principales grupos proteicos de la superficie separados en gradientes de 3-6.

Tabla 3. Principales grupos de proteínas de superficie marcadas con biotina de tripomastigotes de la cepa Ninoa.

Clave*	# de proteínas	Peso Molecular	Punto Isoeléctrico
an	9	96.0-97.1	5.99-7.24
bn	11	88.6-89	5.92-6.66
cn	9	66.1-69	5.61-6.09
dn	8	57.7-58.0	5.58-6.05
en	6	52.3-53.4	5.60-5.90
fn	14	53.4-52.7	5.9-8.51
gn	11	49.2-47.8	5.96-7.42
hn	10	45.4-44.3	5.96-7.52
in	7	42.2-41.6	6-7.11
jn	8	39.1-38.1	5.96-7.69
kn	9	35.6-35.7	5.47-7.22
Ln	5	26.4-26.8	5.54- 5.98
mn	8	23-22.7	5.41-6.99
Nn	6	93.6-94	4.79-4.9
On	3	80	4.78-4.93
Pn	2	80.3	5.11-5.28
Qn	6	80.3-82	5.36-5.64
Rn	9	71.8	4.86-5.54
Sn	6	71.1-70.2	5.65-5.72
tn	11	59.5-58.3	4.69-5.62
Un	5	47.1	4.94-5.71
Vn	7	39.5-39.3	4.7-5.34
wn	5	38.3-37.9	5.42-5.64
Xn	4	39.9-37.7	5.73-5.77
Yn	8	31	4.79-5.64
Zn	4	27.7-27.1	4.52-5.6
aan	9	23.4-22.3	4.46-5.14

*Claves utilizadas en las Figuras 16 y 17.

Se realizó el mismo tipo de análisis, es decir los principales grupos proteicos de la superficie de los tripomastigotes de la cepa Querétaro, definiéndose el número de proteínas que conforman cada grupo así como sus pesos moleculares y puntos isoeléctricos (Figuras 18, 19 y Tabla 4). En esta cepa

también encontramos grupos como el "aq" en donde se agruparon 7 proteínas con pesos muy cercanos pero aparentemente con baja concentración, mientras que otros grupos contenían proteínas más abundantes como el "iq", "sq", "tq", "vq", "xq", "ccq" o "ddq"; pero en esta cepa encontramos grupos algo más complejos como el "gq" y el "aaq" por la cantidad de proteínas y por su cercanía pero que si pudieron analizarse gracias al software utilizado. Además, de los grupos de proteínas ya mencionados se analizaron 8 proteínas con pesos entre 31 y 32 kDa, 2 de ellas se separaron bien: "nq" y "oq" mientras que las 6 restantes se incluyen en grupos de 2 proteínas muy cercanas, el "kq" con pI de 6.09, el "lq" con pI de 6.61 y el "mq" con pI de 7.08. En resumen se analizaron a detalle 188 proteínas agrupadas en 28 grupos.

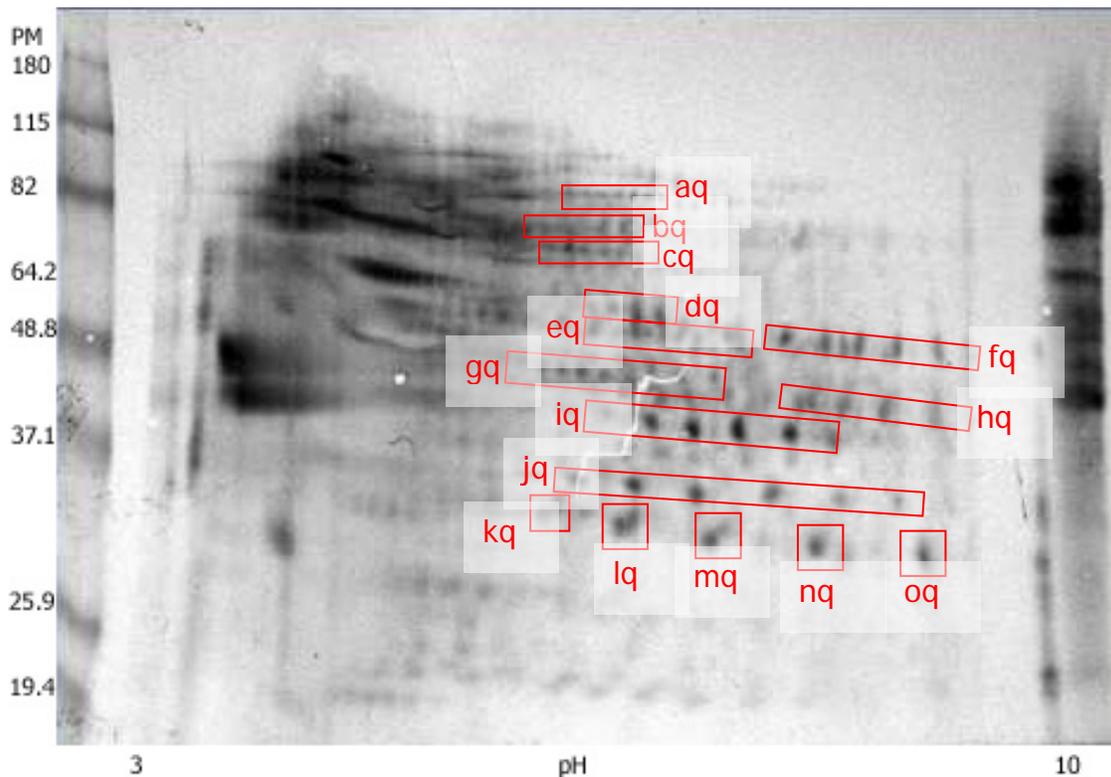


Figura 18. Principales grupos de proteínas de superficie marcadas con biotina de pI de 3-10 de tripomastigotes de la cepa Querétaro. Se muestran en recuadros los principales grupos proteicos de la superficie separados en gradientes de 3-10 NL.

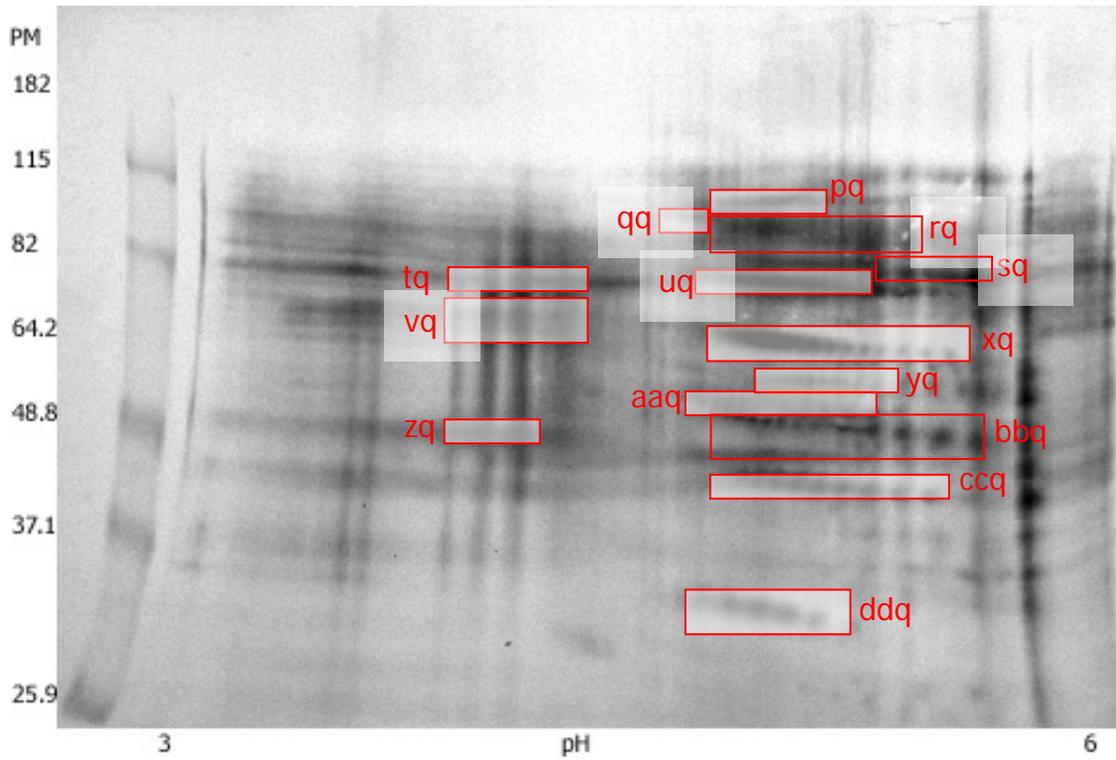


Figura 19. Principales grupos de proteínas de superficie marcadas con biotina de pI de 3-6 de tripomastigotes de la cepa Querétaro. Se muestran en recuadros los principales grupos proteicos de la superficie separados en gradientes de 3-6.

Tabla 4. Principales grupos de proteínas de superficie marcadas con biotina de tripomastigotes de la cepa Querétaro.

Clave*	# de proteínas	Peso Molecular	Punto Isoeléctrico
Aq	12	80	5.41-6.11
Bq	5	72.3	5.45-5.70
Cq	7	71	5.5-5.74
Dq	5	64	5.64-5.8
Eq	7	63.6	5.64-6.11
Fq	8	63.6-64	6.15-8.9
Gq	16	48-45	5.7-6.25
Hq	5	42-38	6.7-8.8
Iq	6	37-36.4	5.78-7.03
Jq	7	34-31.6	5.58-8.1
Kq	2	32.7	6.09
Lq	2	32.3	6.61
Mq	1	31.2	7.08
Nq	1	31.6	7.68
Oq	1	31.6	8.40
Pq	8	105	4.7-5.1
Qq	2	90.5	4.47-4.68
Rq	8	88-89	4.7-5.4
Sq	5	83	5.28-5.58
Tq	5	76	3.85-4-15
Uq	13	75.9-72.7	4.67-5.3
Vq	9	69.9-67.6	3.85-4-15
Xq	14	68.8-65.2	4.64-5.25
Yq	3	60.2	4.8-5.2
Zq	4	43.9-43.1	3.84-4.01
Aaq	8	49.4-47	4.67-5.1
Bbq	12	48-44.1	4.7-5.39
Ccq	9	39.6-37.1	4.88-5.4
Ddq	5	31.4-30.5	4.61-5.01

* Claves utilizadas en las Figuras 18 y 19.

Como se ha mencionado en los párrafos anteriores se analizaron con detalle un total de de 55 grupos de proteínas de superficie marcadas con biotina que agruparon a 388 proteínas de las dos cepas; encontrando que 53 de estos grupos, entre ellos los grupos de proteínas más abundantes y aquellos conformados por numerosas proteínas que parecen isoformas son diferentes en estas dos cepas.

Los pesos moleculares y puntos isoeléctricos se pueden comparar en las Tablas 3 y 4. Por otro lado los grupos "rn" con peso molecular de 71.8 kDa y pI de 4.86 a 5.54 conformado por 9 proteínas y el grupo "uq" con peso de 75.9 a 72.7 kDa y pI de 4.67-5.3 formado por 13 proteínas son los que presentan mayor semejanza en estos parámetros, por lo que tal vez algunas de estas proteínas sean las mismas en ambas cepas. Las proteínas de superficie marcadas con biotina de ambas cepas separadas en el gradiente de pH de 3-6 se observaron similares, sin embargo nuevamente el peso molecular y punto isoeléctrico contradicen esto. En este gradiente se separaron 18 proteínas, con puntos isoeléctricos desde 3.84, siendo las proteínas más ácidas en ser resueltas; el grupo "tq" con 5 proteínas de 76 kDa y pI entre 3.85 y 4.15, el grupo "vq" con 9 proteínas de 67.6 a 69.9 kDa y pI de 3.85 a 4.15 y el grupo de 43 kDa y pI de 3.84 a 4 formado por 4 proteínas.

VII. 3 ANALISIS DE PROTEÍNAS DE SUPERFICIE DE TRIPOMASTIGOTES QUE INTERACCIONAN CON CÉLULAS VERO POR ELECTROFORESIS UNIDIMENSIONAL

Las proteínas de superficie marcadas con biotina de los tripomastigotes que se unieron a la superficie de las células Vero se eluyeron con buffer de Laemmli y se analizaron por electroforesis unidimensional en al menos 4 experimentos independientes. Se detectaron 9 proteínas de superficie de tripomastigotes que interaccionan con células Vero cuando se utilizó la cepa Querétaro y 10 con la cepa Ninoa. Siendo la proteína más abundante en ambas cepas las proteínas de 90 y 70 kDa, además la de 80 kDa que se observaron en la cepa Querétaro y una proteína abundante de 20 kDa, otras proteínas también detectadas fueron las de 48, 45, 40, 37, 25, 16 y dos con pesos menores a 14 kDa. Una imagen representativa de la separación de las proteínas eluidas se observa en la Figura 20.

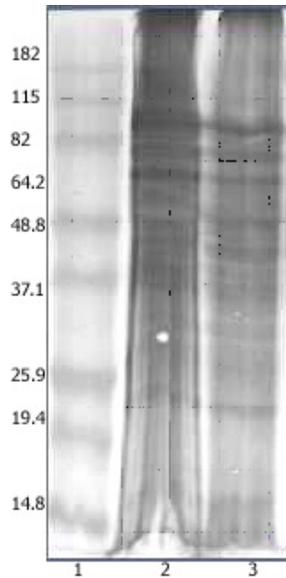


Figura 20. Proteínas de superficie de tripomastigotes marcadas con biotina que interactúan con células Vero. Las proteínas de superficie marcadas con biotina de tripomastigotes se hizo interactuar con células Vero previamente fijadas por 18 horas a 4°C, posteriormente las proteínas que hubieran interactuado se eluyeron con buffer de Laemmli por 3 minutos a ebullición, estas proteínas se separaron por electroforesis en condiciones reductoras y para su detección se siguió el mismo protocolo descrito en la Figura 12. Imagen representativa de al menos 4 experimentos independientes. 1) Marcadores de Peso Molecular, 2) Ninoa y 3) Querétaro.

VII. 4 ANALISIS DE PROTEÍNAS DE SUPERFICIE DE TRIPOMASTIGOTES QUE INTERACCIONAN CON CÉLULAS VERO POR ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL.

Las condiciones empleadas para la elución de las proteínas de superficie que interactúan con células Vero y que permitió realizar el análisis por electroforesis unidimensional resultó incompatible con el isoelectroenfoco, ya que la composición del buffer de Laemmli interfería con esta técnica por contener SDS. Por lo que se decidió cambiar el buffer de elución por buffer de rehidratación que contiene 2.8 mg/mL de DTT, para ello el proceso de elución se realizó a 37°C por 30 minutos para evitar la carbamilación de la urea presente en este buffer y que puede afectar a las proteínas de interés al alterar sus cargas netas. Sin embargo, aún con este buffer se tuvo que incrementar la concentración de proteínas de superficie marcadas con biotina en el ensayo de ligandos a 300µg, en comparación con los 100µg que se emplearon durante el análisis unidimensional. Los resultados

mostraron que en ambas cepas había grupos de proteínas que se habían unido a las células Vero, con estas condiciones se resolvieron un total de 68 proteínas de unión a membrana para la cepa Ninoa y 86 proteínas en la cepa Querétaro, las más abundantes se localizaron en el área de pH ácido con pesos de 92.5, 82, 70.4, 68.8, 67, 65, 44.5 y 37.2 kDa (Figura 21). Además, en el caso particular de la cepa Querétaro se detectaron 8 proteínas que se agruparon en 2 grupos de proteínas que sólo aparecen cuando se ocupa este extracto, estos grupos tienen pesos moleculares de 25 y de 28 kDa con pI de 5.2 a 5.7 (grupos 10 y 11, Figura 22), además se observaron 13 proteínas en los pI mayores a 5.7 con pesos de 47 y 35 kDa (grupos 5 al 9, Figura 22). Por otro lado, se detectó una proteína de 32 kDa y pI 4.55 que sí bien, también se une a la superficie de las células hospederas cuando interacciona con la cepa Ninoa, cuando se trata de la cepa Querétaro, aparece con una mayor expresión (proteína 3, Figura 22). En resumen, el grupo de proteínas de superficie marcadas con biotina de la cepa Querétaro que interaccionan con células Vero de manera específica fueron en total 29 y se muestran en los recuadros rojos de la Figura 22. Además, en los círculos azules de la misma Figura se indican cinco proteínas que se observan con más intensidad en las proteínas eluidas de la cepa Querétaro en comparación con las proteínas de la cepa Ninoa, tres de estas proteínas se agrupan en el grupo 1 de la Figura 22, dando un total de 34 proteínas que interaccionan con las células hospederas de manera diferente en las dos cepas; en la Tabla 5 se detallan los pesos moleculares y puntos isoeléctricos de los grupos de proteínas de superficie marcadas con biotina de tripomastigotes de la cepa Querétaro que interaccionan con células Vero y que no se encontraron en la cepa Ninoa.

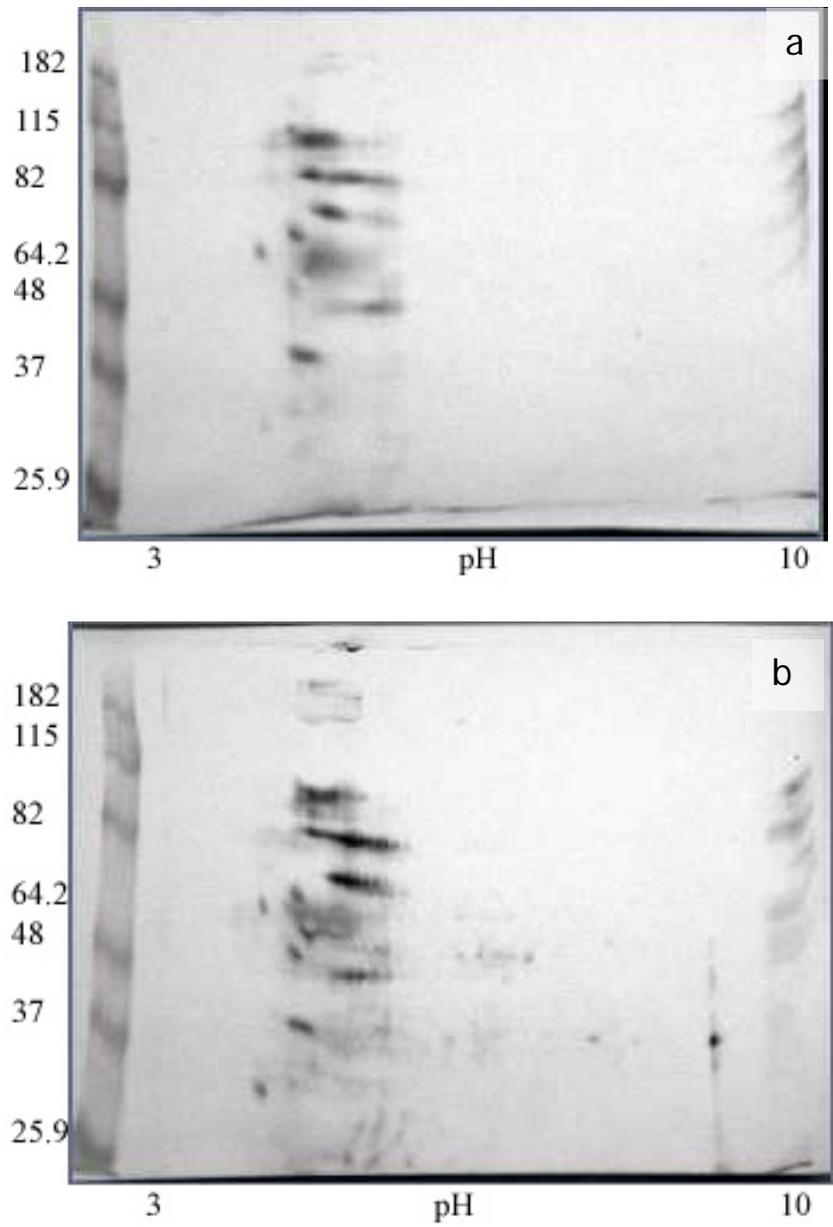


Figura 21. Patrones bidimensionales de proteínas de superficie marcadas con biotina de *T. cruzi* que interaccionan con células Vero. Proteínas eluidas con buffer de rehidratación que fueron separadas por electroforesis bidimensional en un gradiente de pH de 3-10 No Lineal siguiendo el método descrito en la Figura 12. Cepa Ninoa (a) y cepa Querétaro (b). Imágenes representativas de 3 experimentos.

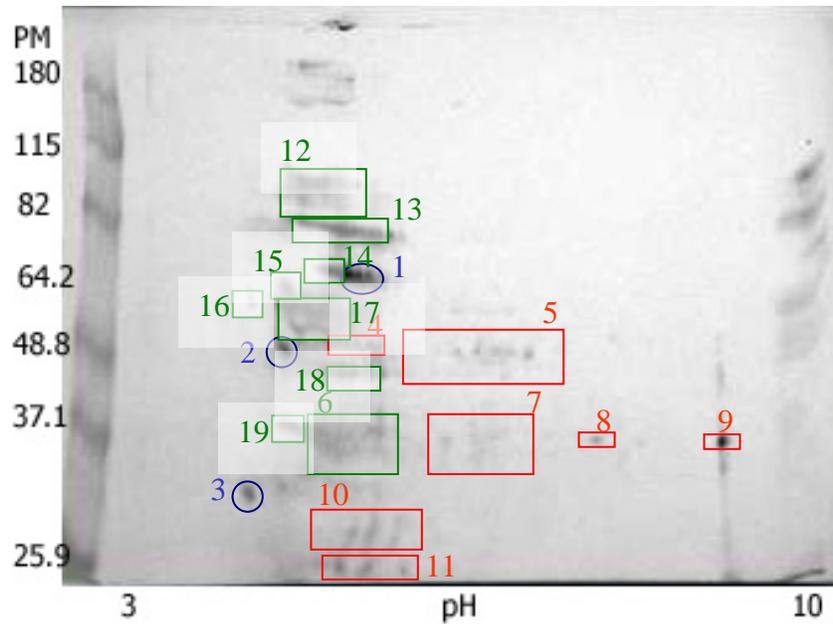


Figura 22. Patrón bidimensional de proteínas de superficie de tripomastigotes de la cepa Querétaro que interaccionan con células Vero. En los recuadros verdes se señalan las proteínas de la cepa Querétaro también presentes en la cepa Ninoa que interaccionan con las células Vero, en los recuadros rojos se muestran las proteínas específicas de lo eluido de interacción cuando se utilizó la cepa Querétaro y en los círculos azules son proteínas con una mayor expresión en la cepa Querétaro que en la cepa Ninoa. En la Figura 21 se describe a detalle el procedimiento experimental.

Tabla 5. Proteínas de superficie marcadas con biotina de tripomastigotes de las cepas Ninoa y Querétaro que interaccionan con células Vero.

Número de grupo*	Proteínas por grupo	Peso Molecular	Punto Isoeléctrico	Expresión**	
				Ninoa	Querétaro
1	3	68.8	5.4-5.7	√	√√
2	1	49	4.8	√	√√
3	1	32	4.55	√	√√
4	4	48.8	5.4-5.65	—	√
5	5	47.3-47.7	5.75-6	—	√
6	4	33-39	5.2-5.67	√	√
7	6	33-38	5.7-5.95	—	√
8	1	35.7	6.7	—	√
9	1	35.6	8.6	—	√
10	5	28-29.2	5.3-5.6	—	√
11	3	26	5.2-5.7	—	√
12	5	92-93	4.8-5.5	√	√
13	8	76-80	4.85-5.7	√	√
14	6	69-70	5.2-5.6	√	√
15	1	67.1	4.8	√	√
16	1	65.1	4.6	√	√
17	5	50-60	4.8-5.4	√	√
18	5	44.5	5.35-5.45	√	√
19	1	37.2	4.84	√	√

*El número corresponde a la Figura 22 y 23.

** √ indica interacción de la proteína en esta cepa con las células Vero, √√ indica una mayor intensidad de esta proteína en esta cepa.

Nuevamente se observaron proteínas con puntos isoeléctricos menores a 6 que no se separaron bien, por lo que también se realizó la separación en gradiente de pH de 3 a 6. En la zona de pH entre 3 y 4.9 no se resolvieron proteínas con claridad, solo se observan bandas pero no proteínas definidas, sin embargo a partir de pH 4.9 se resolvieron mejor las proteínas. En este gradiente se resolvieron 120 proteínas para cada cepa. Dos grupos de proteínas destacaron por su abundancia,

los de 82 kDa y pI de 4.91 a 5.72 y el de 66 a 68 kDa con puntos isoeléctricos de 5.02 a 5.62, estos grupos están conformados por 10 proteínas en la cepa Querétaro y 11 en la cepa Ninoa, por sus puntos isoeléctricos tan cercanos probablemente se trate de isoformas. Otros grupos de proteínas menos abundantes fueron los de de 60 kDa y pI 5.14-5.32, el de 46 kDa y pI de 5.36 a 5.71, el de 38 kDa y pI de 4.9-4.5 y el de 34 kDa con pI de 5.11 a 5.4. Además, en ambas cepas también se resolvió un grupo de proteínas que pesa 56 a 57.7 kDa y pI de 4.87 a 5.08. Interesantemente, se identificaron 3 proteínas en la cepa Querétaro que no se encuentran presentes en la cepa Ninoa, estas proteínas pesan 51.7-52.2 kDa con puntos isoeléctricos entre 5.5 y 5.7 y se pueden observar en el recuadro rojo en la Figura 23.

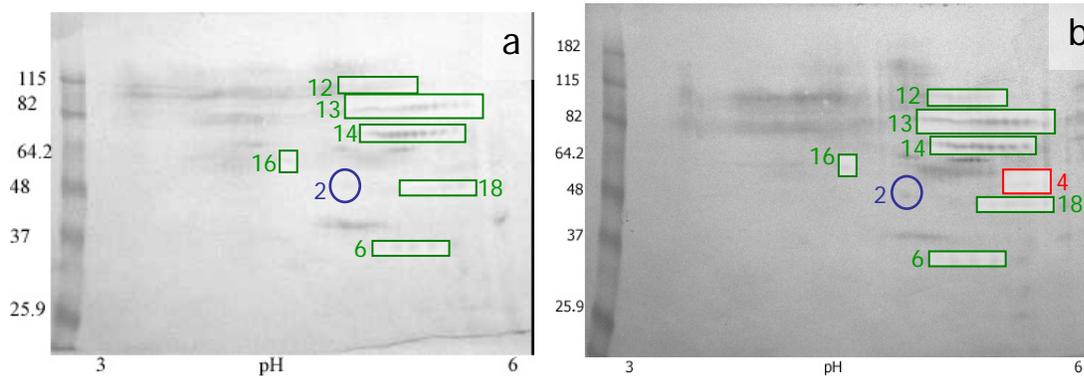


Figura 23. Patrón bidimensional de proteínas de tripomastigotes que interaccionan con células Vero separadas en un gradiente de pH de 3 a 6, como se describe en la Figura 12. Cepa Ninoa (a) y cepa Querétaro (b). Imágenes representativas.

VII. 5 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS PURIFICADAS DE SUPERFICIE DE TRIPOMASTIGOTES.

Pese a que el empleo de la sulfa-NHS-LC-biotina permitió el análisis de las proteínas de superficie marcadas con biotina que se unían a la superficie de la célula hospedera de una manera eficaz, para el análisis detallado quedaba pendiente la identificación de las proteínas mediante técnicas espectroscópicas. Sin embargo, la metodología empleada era un inconveniente debido a la baja

concentración de algunas proteínas, la biotina utilizada para marcarlas que interfiere en la secuenciación y al soporte de nitrocelulosa en el que se encontraban éstas, ya que no es posible realizar la extracción de las proteínas a partir de la membrana, por lo que se procedió a buscar una alternativa. Se decidió purificar las proteínas de superficie de ambas cepas y tratar de identificar de entre las proteínas purificadas a aquellas previamente identificadas en los ensayos de ligandos, para ello se empleó biotina con una modificación diferente, en esta ocasión se empleó sulfa-NHS-SS-biotina, que presenta en su estructura un enlace disulfuro en el brazo largo que queda entre la proteína susceptible a ser biotinilada y la biotina; este enlace es susceptible a una reducción con diferentes agentes reductores, entre ellos el DTT. Basándose en esta característica y en el empleo de una columna de afinidad con NeutrAvidina se pudo realizar la purificación de las proteínas de superficie, obteniéndolas sin biotina por lo que la detección se pudo realizar directamente en el gel de acrilamida con tinciones de plata o con azul de Coomassie.

Con esta metodología se detectaron 16 proteínas en geles unidimensionales para la cepa Querétaro y 17 proteínas para la cepa Ninoa, siendo las más intensas las de pesos aproximados de 95, 63, 52, 45 y 16 kDa, las 11 proteínas restantes de menor concentración fueron las de 180, 120, 115, 82, 70, 40, 35, 30 y 26, además dos con pesos moleculares superiores a 180 kDa, una de éstas solo aparece en la cepa Ninoa (Figura 24).

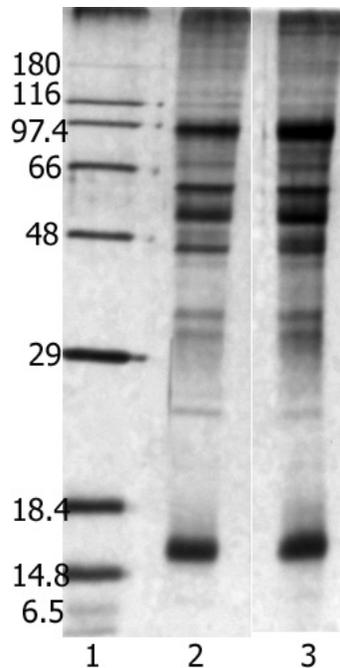


Figura 24. Electroforesis de proteínas purificadas de superficie de tripomastigotes. A partir de las proteínas de superficie de tripomastigotes purificadas por cromatografía de afinidad se realizó una separación electroforética en acrilamida al 12% y detectando las proteínas con nitrato de plata. 1) Marcadores de Peso Molecular, 2) Cepas Ninoa y 3) Cepa Querétaro.

VII. 6 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS PURIFICADAS DE SUPERFICIE DE TRIPOMASTIGOTES POR ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL.

Con el material que se obtuvo de las purificaciones de proteínas de superficie se hizo un pool de tres experimentos independientes, este material se separó por electroforesis bidimensional en gradiente de pH amplio, 3-10 NL. realizando la detección de las proteínas con nitrato de plata.

Se emplearon geles de 7x6 cm. con tiras de 7 cm. se observó que los grupos de proteínas más intensas fueron los de 95, 82, 70, 63, 52, 45, 32, 30, 26 y la de 16 kDa y que corresponden con las vistas en geles de una dimensión. Estos grupos de proteínas presentan numerosas proteínas con puntos isoeléctricos diferentes, algunos de ellos como las de 70, 63 y 50 muy cercanos, que van de pH 4.8 a 5.5, mientras en el grupo de 16 kDa se observan 4 proteínas más abundantes en pH de 4.8 a 6 y dos más en pH de entre 7 y 8 (Figura 25). Se realizó la separación de las proteínas de superficie purificadas de las dos cepas, encontrando que las

proteínas más intensas son las mismas en las dos cepas, aunque en el caso de la cepa Ninoa mostró un menor número de proteínas resueltas en la zona de pH mayor a 6 y con pesos moleculares entre 18 y 45 kDa, esto pudiera deberse a una menor concentración de proteínas en esta muestra (Figura no mostrada).

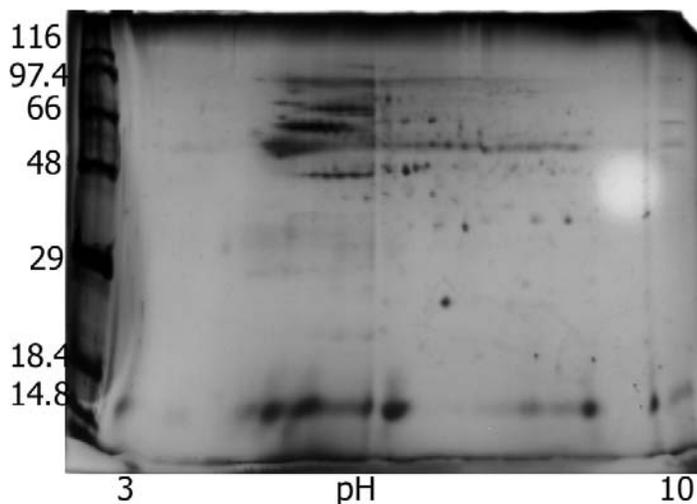


Figura 25. Patrón bidimensional de proteínas purificadas de superficie de tripomastigotes. Proteínas purificadas de las cepas Querétaro por cromatografía de afinidad separadas por electroforesis bidimensional en un gradiente de pH de 3-10 No Lineal, en geles de 7x6 cm. Los geles fueron teñidos por tinción con nitrato de plata.

Es importante mencionar que no se puede hablar de proteínas abundantes en estos geles que se tiñeron con nitrato de plata, ya que esta tinción no refleja la abundancia de una proteína.

A partir de estas proteínas purificadas que se separaron por electroforesis bidimensional se identificaron algunas de ellas que también aparecen en los ensayos de ligandos con el mismo peso molecular y punto isoeléctrico; encontrando que los grupos con pesos moleculares de 95-97, 70, 63, 50-52 y pH de 4.8 a 5.5 son similares a los que aparecen en los geles con las proteínas de superficie puras.

Con estas proteínas purificadas, aproximadamente 150 μ g de proteínas totales, se realizaron separaciones bidimensionales en geles preparativos de 18 x 18 cm con tiras IPG de 17 cm para obtener las proteínas que iban a ser analizadas por MALDI-TOF, realizando la detección de las proteínas empleando el kit de

tinción de plata compatible con esta técnica. Se seleccionaron 27 proteínas de la cepa Querétaro y 10 de la cepa Ninoa que fueran abundantes y se separaron apropiadamente, estas proteínas fueron analizadas mediante MALDI-TOF. A partir de las 37 proteínas identificadas se encontraron 14 proteínas hipotéticas, 4 transialidasas, 1 MASP, 1 proteína de superficie, 2 precursores de HSP, 1 gp82, 1 gp63 y 1 HSP 60 mitocondrial. Además de encontraron 8 proteínas que presentan actividad enzimática como por ejemplo: sintetasa diacilglicerol-CDP, histona deacetilasa, ATPasa y una cinasa. En la Tabla 6 se resumen los datos de las proteínas identificadas por MALDI-TOF, donde se puede observar el peso molecular y punto isoeléctrico obtenido de manera experimental pero además se muestran estos mismos parámetros teóricos y el porcentaje de secuencia teórica que cubren los péptidos identificados. De estas proteínas identificadas 17 están en los intervalos de pesos moleculares y puntos isoeléctricos de proteínas que se unen a células hospederas, entre ellas 4 transialidasas, 1 MASP, 6 hipotéticas, 1 gp63 entre otras.

Tabla 6. Proteínas de superficie de tripomastigotes identificadas por MALDI-TOF.

Muestra*	DATOS EXPERIMENTALES		DATOS TEORICOS		Proteína	% secuencia**
	PM (kDa)	pI	PM (kDa)	pI		
QS1	24.5	6	24.3	5.8	Hipotética	24.1
QS2	25.4	8.9	25.5	9.1	sintetasa diacilglicerol-CDP	32.5
QS3	38.5	8.8	38.3	8.5	Transialidasa	22.4
QS4	75.1	5.3	75.4	5.1	Proteína de superficie	26.8
QS5	76.1	5.2	76	5.3	Hipotética	22.7
QS6	80.9	5.25	80.86	5.4	Transialidasa	26.7
QS7	70.6	5.4	70.8	5.4	Sintetasa tRNAfenilalanil	27.8
QS8	71.3	5.4	71.26	5.5	Histona deacetilasa	26.8
			71.25	5.4	HSP70	23.1
QS9	50.2	5.4	50.2	5.2	MASP	28.8
QS10	49	5.35	49	5.2	Protein cinasa	38
QS11	61.1	5.2	61.1	5.3	Hipotética	23
			60.8	5.4	Protein cinasa	22.5
QS12	59	5.3	59.1	5.4	HSP60 mitocondrial	24.3
QS13	58.8	5.3	58.6	5.3	Glutation sintetasa	38.1
QS14	57.1	5.2	57.4	5	Acil-CoA-deshidrogenasa	41.3
			56.9	5.1	GP63	15.3
QS15	65.1	5.3	65.09	5.4	Hipotética	20.5
QS16	65	5.35	64.2	5.3	gp82	14.3
QS17	64.9	5.4	65.2	5.3	Hipotética	17
QS18	66.3	5.2	66.2	5.3	Transialidasa	8.9
QS19	66.2	5.25	66.1	5.3	GP63	13
QS20	65.8	5.3	65.2	5.3	Hipotética	9.3
QS21	65.7	5.35	65.7	5.4	Fosfatidilinositol-4-cinasa	9.2
QS22	65.6	5.4	65.7	5.4	Aminoacid permeasa	13.4
QS23	88.6	5.25	88.6	4.9	Asociada citoesqueleto	24.1
			88.9	5.3	Transialidasa	7.2
QS24	56.7	8.95	56.7	8.9	Hipotética	14.4
QS25	64.6	8.7	65.	8.8	Hipotética	15
QS26	50.1	5.5	49.8	5.4	Hipotética	18.8
QS27	48.7	5.8	48.7	5.4	Hipotética	11.3
NS1	65.7	5	65.9	4.9	Hipotética	7.5
NS2	65.6	5.05	65.9	4.9	Hipotética	7.3
NS3	71.5	5.2	71.5	5.1	Precursor HSP	8.3
NS4	71.7	5.4	71.6	5.6	Histona deacetilasa	10.3
NS5	70.5	5.2	70.4	5.1	Componente ribonucleoproteína nuclear pequeña U5	19.4
NS6	54.3	5.25	54.7	5.3	Hipotética	24.2
NS7	53.7	5.3	53.8	5.3	Hipotética	20.7
NS8	76.8	5.4	76.4	5.2	Transilidasa	14.2
NS9	71.6	5.25	71.5	5.1	Precursor HSP	9.5
NS10	70.6	5.2	70.8	5.3	ATPasa H+ tipo P	16.7

*Las claves de las muestras se refieren QS son proteínas de superficie de la cepa Querétaro y NS a las de la cepa Ninoa, el número consecutivo es el asignado al momento de realizar la secuenciación.

** %Secuencia coincidente con los péptidos identificados.

VIII. DISCUSIÓN

Una de las áreas de interés en el estudio de la biología de *T. cruzi* es la interacción que se da entre el tripomastigote y las células del hospedero. Se sabe que ciertas moléculas que se encuentran en la superficie del tripomastigote interaccionan con la célula hospedera y que de alguna manera ayudan o facilitan la entrada del parásito a esta célula, pero aún no se conoce con exactitud como se da este fenómeno y cuales se unen a la superficie de la célula hospedera.

En el presente trabajo se analizaron las proteínas de superficie de tripomastigotes de dos cepas mexicanas de *T. cruzi* que muestran diferentes grados de infectividad y virulencia, también se utilizó el ensayo de ligandos para encontrar las proteínas que se unen a la superficie de la célula hospedera y en un intento de caracterizarlas se purificaron proteínas de superficie por cromatografía de afinidad con una columna de avidina, después éstas se caracterizaron por electroforesis en doble dimensión y por huella peptídica (MALDI-TOF).

Para el estudio de estos grupos de proteínas se realizó un marcaje de la superficie del parásito con biotina. Se empleó una biotina modificada, la Sulfo-NHS-LC-Biotina, la cual ha sido ampliamente utilizada en estudios del proteoma de proteínas de superficie en diversos organismos como mamíferos y bacterias, (Shetty et al., 2001, Sabarth et al., 2002 y Jang y Hanash, 2003). Esta biotina tiene acoplado un grupo *N*-Hidroxisulfosuccinimida que es un grupo químico cuyo tamaño evita que esta biotina se interiorice a las células que se van a marcar, en este caso los tripomastigotes. Un punto fundamental para que se pueda realizar este tipo de marcaje es la presencia de proteínas con grupos aminos libres que son los susceptibles a reaccionar con la biotina, en particular el éster de Sulfo-NHS-LC-Biotina reacciona con los ϵ -amino de las lisinas libres, esta biotina es hidrosoluble y no es permeable a la bicapa lipídica de la membrana. Este tipo de biotina es lo que va a permitir la detección de las proteínas de superficie que presenten las características arriba mencionadas mediante el uso de un conjugado

estreptoavidina-peroxidasa. Al emplear esta metodología se obtuvieron patrones proteicos complejos, en promedio de al menos 3 geles, se resolvieron 721 proteínas de superficie marcadas con biotina en la cepa Ninoa y 648 en la cepa Querétaro.

En el presente trabajo se encontraron los siguientes resultados: 1) una mayor sensibilidad al utilizar la técnica de electroforesis bidimensional; 2) la presencia de proteínas de superficie marcadas con biotina que presentan pesos moleculares muy semejantes y puntos isoeléctricos muy cercanos que posiblemente sean isoformas o miembros de una familia génica; 3) una gran cantidad de proteínas de superficie marcadas con biotina con aparente alta concentración con pI ácidos menores a pH 6; 4) la identificación de un número grande de proteínas de superficie marcadas con biotina que se unen a la superficie de la célula hospedera; 5) la identificación por MALDI-TOF de algunas de ellas y 6) la expresión diferencial de proteínas de superficie marcadas con biotina así como en las proteínas que se unen a la célula hospedera entre las dos cepas mexicanas analizadas.

El primer aspecto mencionado arriba era algo que ya se esperaba, puesto que se ha reportado que la técnica de electroforesis bidimensional es mucho más sensible que la unidimensional (O'Farrell, 1975). Al resolver estos extractos de tripomastigotes por electroforesis unidimensional se resolvieron 12 proteínas en cada uno de ellos, pero al ser separados bidimensionalmente mostraron patrones mucho más complejos como ya se mencionó, detectándose más de 500 proteínas de superficie. Estudios anteriores del proteoma general de epimastigotes de este parásito resolvieron entre 300 y 500 proteínas empleando gradientes de pH de 3 a 10, sin embargo los autores consideraron que aunque este número era bajo en comparación a los proteomas de otros organismos y al número de ORFs en el parásito, podría aumentar considerablemente sí se realizaba el enriquecimiento de ciertos organelos y se empleaban gradientes de pH más cerrados (Paba et al., 2004 y Hueté-Pérez et al., 2005). Del total de proteínas de superficie marcadas con biotina se analizaron con detalle 388 proteínas agrupadas en 55 grupos entre

las dos cepas, siendo más de la mitad de estas muy abundantes y el resto pertenecen a grupos de proteínas no abundantes.

El segundo de los aspectos que más destacan es la presencia de posibles isoformas de proteínas, ya que se observó que algunas de las proteínas de superficie que se biotinizaron se comportaron como grupos de proteínas con pesos moleculares muy similares y con pI muy cercanos. Este es el primer reporte que muestra que varias de las proteínas de superficie de *T. cruzi* se están expresando como posibles isoformas, como por ejemplo el grupo "bn" cuyas proteínas pesan 89 kDa y que presenta 11 proteínas en ese peso molecular y cuyos pI van de 5.9 a 6.66.

La posibilidad de que grupos de proteínas que se observan muy cercanas en peso molecular y punto isoeléctrico correspondan a una sola proteína con ligeras modificaciones que alteran su pI ha sido ya reportado (Sabarth et al., 2002), de acuerdo a estos autores cuando un número variable de grupos amino reaccionan con la biotina se da la pérdida de residuos protonables lo que ocasionará un decremento en los valores de pI. La diferencia en los pI entre los spots miembros consecutivos del grupo sería muy constante y en el intervalo de un grupo protonable por molécula, alrededor de 0.05. Estos mismos autores encontraron que algunas proteínas que en geles teñidos con plata se veían como un spot, al realizar la detección con un conjugado avidina-peroxidasa se observaban 3 con el mismo peso pero con puntos isoeléctricos diferentes, al realizar la secuenciación de estos tres spots se encontró que correspondían a la misma proteína.

En general se observaron grupos de proteínas de superficie biotinilados en la zona de pH mayor a 6, en algunos casos se trató de proteínas con señales muy intensas como los de 53.4-52.7 kDa pI 5.9-8.5 conformado por 14 proteínas (fn), el de 42.2-41.6 kDa y pI 6-7.11 conformado por 7 proteínas (in) y el de 35.6 kDa con pI de 5.47-7.22 (kn) en la cepa Ninoa, mientras que en la cepa Querétaro los grupos más abundantes fueron los de 36-37 kDa y pI de 5.78-7 (iq) y el de 31.6-34 pI de 5.58-8.1 (jq) conformados por 6 y 7 proteínas respectivamente. Es de destacar en el presente trabajo la identificación de proteínas de superficie no

reportadas con anterioridad por ejemplo, las proteínas de pesos moleculares entre 22 y 28 kDa, que abarcan 4 grupos (mn, ln, zn y aan) con 26 proteínas en total, todas ellas con pI mayores a 4 en la cepa Ninoa. Otro grupo de 8 proteínas cuyos pesos moleculares son de 38-39 kDa y pI de 5.96 a 7.69 (jn). Por otro lado, en la cepa Querétaro el grupo "pq" con peso molecular de 105 kDa y 4.7 a 5.1 de pI conformado por 8 proteínas y el grupo "ddq" formado por 5 proteínas con pesos moleculares de 30.5 a 31.4 y pI de 4.6 a 5.

También es en esta zona donde aparecen grupos de proteínas que nuevamente muestran pesos moleculares muy cercanos con puntos isoeléctricos muy variados pero que en contraste a los grupos antes mencionados se trata de proteínas poco expresadas como lo son las 9 proteínas con pesos de 96-97 kDa y pI de 5.99-7.24 (an) y las 11 proteínas de 88.6-89 kDa y pI de 5.92-6.66 (bn) en la cepa Ninoa y en las 12 proteínas de la cepa Querétaro con peso de 80 kDa y pI de 5.4-6.11(aq). Para confirmar si lo que veíamos eran isoformas de una sola proteína era necesario realizar la identificación de éstas, sin embargo para realizar este paso era necesario resolver varios problemas, surgidos a partir de la metodología empleada, que eran el de extraer las proteínas del soporte y la remoción de la biotina. Si bien existe al menos un reporte (Sabarth et al., 2002) donde se parte de proteínas marcadas con biotina que se extraen de membranas, en nuestro caso fue necesario emplear otra metodología que permitiera la identificación espectroscópica de estas proteínas. Por lo anterior, se decidió realizar una purificación de proteínas de superficie a partir de la biotilación de estas, por medio de una cromatografía de afinidad.

Las proteínas de superficie purificadas al ser separadas por electroforesis bidimensional mostraron patrones similares a los obtenidos al emplear las proteínas marcadas con biotina, es decir grupos de proteínas con pesos moleculares muy similares pero con puntos isoeléctricos diferentes, lo que nos lleva a pensar que efectivamente estos grupos de proteínas sí son isoformas de una sola, por ejemplo los grupos de proteínas de 82, 70, 63 y 52 kDa con pI entre 4.8 a 5.5 y que cada grupo esta formado por al menos 9 proteínas (Figura 25), a

partir de éstas proteínas purificadas se realizó la identificación por MALDI-TOF que se detalla más adelante.

Otro resultado interesante fue la abundancia de proteínas de superficie con pI ácidos en los tripomastigotes, fenómeno previamente reportado en epimastigotes de *T. cruzi* al analizar extractos proteicos totales (Parodi-Talice et al., 2004). En el presente trabajo también se encontró una gran cantidad de proteínas de superficie marcadas con biotina abundantes en esta zona por lo que se debió de emplear tiras IPG con gradientes de pH de 3-6, en este intervalo de pH fue posible realizar la separación de estos grupos de proteínas que aparentemente son muy abundantes. Al emplear este gradiente de pH se resolvieron en promedio 322 y 292 proteínas para las cepas Ninoa y Querétaro respectivamente (Figuras 14 y 15). Nuevamente se observó el fenómeno de proteínas con pesos moleculares semejantes pero con pI diferentes al igual que en las zonas de pH mayor a 6 entre estos grupos se encuentran; aan, nn, pq, vq, uq y yq. Entre los grupos más abundantes en la cepa Ninoa están los de 58-59 kDa y pI 4.6-5.6 (tn), los de 71.8 kDa pI 4.86-5.54 (rn), los de 80 kDa pI 4.78-4.93 (on), los de 80.3 kDa pI 5.11-5.28 (pn) y los de 80.3-82 kDa y pI desde 5.36-5.64 (qn). Mientras que en la cepa Querétaro los más abundantes son los de 31 kDa y pI de 4.6-5 (ddq), 37-39 kDa pI 4.88-5.4 (ccq), 72-75 kDa pI 4.67-5.3 (uq) y los de 68.8-65.2 kDa y pI de 4.6-5.2 (xq). De estos grupos de proteínas abundantes algunos no habían sido reportados con anterioridad por ejemplo el grupo ddq en la cepa Querétaro; mientras que los otros grupos abundantes pudieran incluir a la gp82 y a la gp72 que ya han sido ampliamente estudiadas (Haynes y Cross, 1996; Manque et al., 2000).

El objetivo principal de este trabajo fue el de identificar que proteínas de superficie interaccionan con células del hospedero. Para ello se empleó una técnica que había sido previamente reportada, que permite identificar ligandos que interaccionan con la superficie de células del hospedero (Arroyo y Alderete, 1995). A partir de los extractos de proteínas obtenidos de los parásitos biotinilados que se hacen interaccionar con células Vero previamente fijadas. Se emplearon células

Vero para estos ensayos teniendo como antecedente que este tipo celular es susceptible a la infección por el parásito además de que se sabía de las diferencias en cuanto a infectividad de estas dos cepas del parásito en esta línea celular (datos no publicados). De acuerdo al protocolo descrito por los autores antes mencionados la elución de las proteínas de interés que hubieran interactuado con las células se realizó con buffer de Laemmli, este tipo de muestra fue separada por electroforesis unidimensional para ser detectada por medio del conjugado estreptoavidina-peroxidasa.

Los grupos de proteínas de superficie marcadas con biotina más abundantes que se unieron a las células Vero y que se lograron eluir fueron los que presentaban pesos moleculares de 92, 80-76, 70-69, 68.8 y 60-50 kDa con pI entre 4.8 y 5.7. Además, en el caso de la cepa Querétaro se observaron 13 proteínas en los pI mayores a 5.7 con pesos de 47 y 33 a 38 kDa y 8 proteínas entre 26-29 kDa y pI de 5.2 a 5.7. En total se resolvieron 68 y 86 proteínas para las cepas Ninoa y Querétaro respectivamente (Figura 21). Debido a que las proteínas de superficie marcadas con biotina que interactuaron con las células Vero con pI menores a 6 eran muy abundantes se debió de emplear nuevamente el gradiente de pH de 3 a 6 (Figura 23), en este intervalo de pH fue posible analizar el número de proteínas que conformaban cada grupo descrito en la Tabla 5.

A partir de los datos bibliográficos (Burleight y Andrews, 1995; Buscaglia et al., 2006; Malaga y Yoshida, 2001 y Manque et al., 2000) se sabe que algunas glicoproteínas participan en el proceso de invasión y que interactúan por medio de los azúcares que contienen uniéndose a receptores en las células hospedadoras, algunas de estas son la gp82, la gp90 que corresponden a pesos moleculares de proteínas de superficie que fueron identificadas en este estudio como los grupos 12 y 13 de la Tabla 5, que interactuaban con células Vero y que incluso son de las más abundantes, por lo que quizá podría tratarse de estas moléculas.

Se analizaron 37 proteínas de superficie de tripomastigotes mediante un análisis de huella peptídica por MALDI-TOF, de esta manera se identificaron 4

transialidasas, 1 MASP, 1 gp82, 1 gp63, 2 precursores de HSP, 1 HSP mitocondrial y 14 proteínas hipotéticas. En el caso de la gp82 identificada experimentalmente en este trabajo esta tenía un peso molecular de 65 kDa de la misma manera las transialidasas identificadas en la cepa Querétaro mostraron pesos moleculares muy diferentes que varían desde 38.5 hasta 80 kDa. Estos pesos moleculares no corresponden a los previamente reportados para estas moléculas, sin embargo se sabe por análisis del proteoma del parásito que pueden existir casos de variabilidad parecidos como con la HSP70 que mostró pesos moleculares distintos obtenidos experimentalmente, de la misma forma se identificaron 8 tubulinas, entre α y β con dichas variaciones (Parodi-Talice et al., 2004).

Dentro de las moléculas identificadas destaca la MASP de 50.2 kDa y 5.4 de pI, debido a que se describió recientemente un gran número de genes y pseudogenes que las codifican, siendo un total de 1377 genes y 433 pseudogenes (El-Sayed et al., 2005). Para estas proteínas de superficie asociadas a mucinas de la membrana externa del parásito hasta el momento existen solo dos reportes de su expresión en tripomastigotes, el más reciente se enfocó en las glicoproteínas de tripomastigotes de *T. cruzi*, identificando 2 MASP modificadas postraduccionalmente por glicosilaciones (Atwood et al., 2005 y Atwood et al., 2006). Por otro lado, en datos no publicados de nuestro laboratorio se han identificado por MALDI-TOF 5 MASP en epimastigotes de las mismas cepas de *T. cruzi* empleadas en este trabajo. Como se ha mencionado anteriormente las MASP son un grupo de proteínas que se consideran importantes debido al gran número de genes encontrados en el genoma del parásito que las codifican, de acuerdo a la secuencia génica se creía que su localización era en la superficie celular fenómeno que ha sido corroborado en este trabajo, además de que esta MASP identificada es una proteína que interacciona con las células hospederas, por lo que quizá se trate de un nuevo factor de virulencia de *T. cruzi*.

La metaloproteínasa gp63 se ha considerado por muchos años el principal factor de virulencia de *Leishmania sp* (Yao et al., 2003), sin embargo causo sorpresa que solo existen 4 genes para esta enzima (Ivens et al., 2005), en

contraste en *T. cruzi* existen 425 genes y 251 pseudogenes. Sin embargo hasta el momento no existen reportes de metaloproteasas de ese peso molecular en *T. cruzi*. La gp63 que ha sido ampliamente estudiada en *Leishmania* tiene 10 isoformas con pI de 5.2 a 6.1 y pesos moleculares entre 58 a 63 kDa (Yao et al., 2004), estos parámetros coinciden en el punto isoeléctrico de la gp63 identificada en *T. cruzi* que fue de 5.25 y con un peso de 66 kDa. La gp63 de *Leishmania* presenta propiedades de adhesión a los macrófagos (Russell y Wilhelm, 1986) y la gp63 de *T. cruzi* identificada pertenece al grupo de proteínas que interaccionan con las células Vero por lo que quizá se deba comenzar a considerar a esta molécula como un nuevo factor de virulencia también en *T. cruzi*.

Dentro de las proteínas identificadas que interaccionan con las células Vero están cuatro transialidasas. Esta familia de enzimas, ha sido ampliamente caracterizada en el parásito y se han postulado diversas funciones para ella entre las que destaca la actividad de sialotransferasa (Rubin de Celis et al., 2006), además se han caracterizado transialidasas inactivas enzimáticamente pero con la capacidad de unirse al ácido siálico y a la galactosa presente en las células hospederas lo que pudiera favorecer la invasión por parte del parásito (El-Sayed et al., 2005b); por lo que quizá estas transialidasas identificadas que se unen a las células Vero interaccionen con estos azúcares y participen en el proceso de invasión celular. Los resultados del presente trabajo confirman que esta molécula tiene la capacidad de unirse a la célula hospedera.

Dentro de las proteínas de superficie purificadas que se identificaron por MALDI-TOF llamó la atención la presencia de enzimas como las sintetasa diacilglicerol-CDP, histona deacetilasa, ATPasa, glutatión sintetasa y una cinasa entre otras, ya que no se esperaba que este tipo de moléculas estuvieran presentes en la superficie celular. Sin embargo, existen reportes previos de que algunas enzimas denominadas "housekeeping", que son enzimas que tienen todos los organismos y tienen funciones vitales, pueden encontrarse en la superficie celular, aún cuando carezcan de las secuencias típicas para su transporte a la superficie y los mecanismos necesarios para su anclaje a la membrana y sin que

hasta el momento se conozca el mecanismo de cómo es que llegan a la superficie celular. Por otro lado, estas enzimas han demostrado que aparentemente tienen otras funciones a las ya ampliamente descritas y que posiblemente puedan actuar como factores de virulencia en diversos patógenos; entre estas enzimas de mencionan a la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenada (GAPDH) en bacterias como: *Streptococcus pyogenes* del grupo A, *S. pneumoniae*, *Staphylococcus epidermis* y *S. aureus.*, y en hongos como *Candida albicans*. Se ha demostrado que esta enzima se une a plasmina, fibronectina y laminina. Otra enzima es la enolasa que ha resultado ser el antígeno inmunodominante en la pared celular de *C. albicans* pero no se une a plasminógeno, mientras que la enolasa de *Pneumocystis carinii* sí se une al plasminógeno, el mismo fenómeno se ha observado con el parásito *Onchocerca volvulus* (Pancholi y Chhatwal, 2003). Otros parásitos donde se han encontrado este tipo de enzimas en la superficie y que actúan como factores de virulencia son: la triosafosfato isomerasa, GAPDH y fosfoglicerato cinasa en *Schistosoma mansoni*, alcohol deshidrogenasa en *Entamoeba histolytica* y la enzima málica descarboxilante y las subunidades alfa y beta de la sintetasa de succinil coenzima A en *Trichomonas vaginalis* (Pancholi y Chhatwal, 2003). Otra proteína que se identificó en la superficie de los tripomastigotes por MALDI-TOF fue una HSP-60 mitocondrial y que aunque no se esperaba su localización en la superficie ya existía un reporte previo de que esta proteína puede localizarse en otras organelos no mitocondriales como la superficie celular en células de mamíferos (Soltys y Gupta, 1996 y Smalheiser, 1996). Para confirmar estos datos es necesario realizar la secuenciación de estas proteínas.

En cuanto al análisis comparativo entre las proteínas de superficie marcadas con biotina de las dos cepas mexicanas de *T. cruzi*, se encontró que 388 proteínas de superficie fueron diferentes en estas cepas. Confirmando nuestra hipótesis de que sí bien estas cepas pertenecen al mismo grupo genético (López-Olmos et al., 1998) presentan variaciones en sus proteínas de superficie lo que explicaría sus variadas características biológicas tales como la infectividad (Jiménez-Marín, 2005) y virulencia (Sosa-Aguilar, 2003). En cuanto a las proteínas de superficie marcadas

con biotina que interaccionan con las células Vero, las expresadas de manera diferencial fueron 25 proteínas específicas de la cepa Querétaro, 13 con pI mayor a 6 y 12 con pI entre 5.2 y 5.7; este grupo de proteínas fueron poco expresadas en comparación a otros grupos como los de 76-80 y 92 kDa.

Este trabajo permitió realizar un análisis más detallado de las proteínas de superficie de tripomastigotes de *T. cruzi*, ya que al emplear una técnica como la electroforesis bidimensional se pudo conocer que cada banda que vemos en una electroforesis unidimensional contiene más de una proteína, por lo que permite aumentar el conocimiento acerca de las posibles isoformas de una sola proteína y de la expresión de proteínas con pesos moleculares similares. Para confirmar este fenómeno es necesario realizar la secuenciación de estas proteínas, por razones técnicas este trabajo solo pudo acercarnos más a la identificación de las proteínas por medio del MALDI-TOF, pero en el futuro sería recomendable emplear una técnica más informativa, como la cromatografía de líquidos acoplada en serie con detector de espectrometría de masas (por sus siglas en inglés LC-MS/MS). Sin embargo, la identificación de una MASP de 50.2 kDa y pI 5.4, de la gp63 y de la transialidasa como factores de virulencia da la posibilidad de iniciar estudios más detallados sobre el fenómeno de infección de *T. cruzi* a sus células hospederas.

IX. CONCLUSIONES

1. El análisis por electroforesis bidimensional de las proteínas de superficie de *T. cruzi* marcadas con biotina mostró la abundancia de estas moléculas.
2. Las proteínas de superficie marcadas con biotina se organizan en grupos con peso molecular muy similar y punto isoeléctrico cercano por lo que pudieran tratarse de isoformas de una misma proteína.
3. El marcaje de las proteínas de superficie con biotina de tripomastigotes permitió detectar una expresión diferencial de este grupo de proteínas en dos cepas mexicanas de *T. cruzi*.
4. La cepa Querétaro que en modelos "in vitro" e "in vivo" muestra patrones de infectividad y virulencia diferentes a la cepa Ninoa presentó proteínas de superficie que interaccionan con células hospederas de manera específica.
5. Se identificaron 8 enzimas de las que no existían reportes previos de su localización en la superficie celular de *T. cruzi*.
6. Se identificaron proteínas de superficie que se unen a la célula hospedera como la gp63, MASP y la transialidasa que pudieran ser factores de virulencia en este parásito.

X. BIBLIOGRAFIA

- Almeida I., Gazzinelli R., Ferguson M. y Travassos L. 1999. *Trypanosoma cruzi* mucins: Potential functions of a complex structure. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 94:173-176.
- Andrade L. y Andrews N. 2005. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasión, retention. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:819-23.
- Aparicio I., Scharfstein J y Lima A.P. 2004. A NET cruzipain-mediated pathway of human cell invasion by *Trypanosoma cruzi* requires tripomastigotes membranes. *Infect. Immun.* 72:5892-5902.
- Arroyo R. y Alderete JF. 1995. Two *Trichomonas vaginalis* surface proteinases bind to host epithelial cells and are related to levels of cytoadherence and cytotoxicity. *Arch. Med. Res.* 26:279-85.
- Atwood J.A., Weatherly D., Minning T., Bundy B., Cavola C., Opperdoes F., Orlando R. y Tarleton R. 2005. The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science.* 309:473-476.
- Atwood J.A., Minning T., Ludolf F., Nuccio A., Weatherly D., Alvarez-Manilla G., Tarleton R. y Orlando R. 2006. Glycoproteomics of *Trypanosoma cruzi* tripomastigotes using subcellular fractionation, lectin affinity, and stable isotope labeling. *J. Proteome Res.* 5: 3376-3384.
- Bosseno M.F., Barnabé C., Magallón E., Lozano F., Ramsey J., Espinoza B. y Breniere F. 2002. Predominante of *Trypanosoma cruzi* Lineage I in México. *J. Clin. Microbiol.* 40:627-632.
- Brener Z. 1973. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu. Rev. Microbiol.* 27:347-382.
- Burleigh B. y Andrews N. 1995. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annu. Rev. Microbiol.* 49:175-200.
- Buscaglia C., Campo V., Frasch A. y Di Noia J. 2006. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* 4:229-236.

- Caballero García M. L. 1996. Estudio de la respuesta inmune humoral inducida por cuatro aislados mexicanos de *Trypanosoma cruzi* en modelo murino. Tesis para obtener el título de Biólogo. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Campo V., Buscaglia C., Di Noia J. y Frasch A. 2006. Immunocharacterization of the mucin-type proteins from the intracellular stage of *Trypanosoma cruzi*. *Microb. Infect.* 8:401-409
- Coura JR., Ferreira LF., Rubens J., Pereira NC. Y Silva JR. 1966. Tripanosoma do "complexo cruzi" em reservatório silvestre no Estado da Guanabara. Estudo de sua patogenidades. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 8:125-133.
- Chuenkova M. y Pereira M. E. 1995. *Trypanosoma cruzi* trans-Sialidase: Enhancement of virulence in a murine model of Chagas' Disease. *J. Exp. Med.* 181:1693-1703.
- De Souza W. 1999. A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 94:17-36.
- De Souza W. 2002. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. *Kinetoplastid Biology and Disease.* 1(3) en <http://www.kinetoplastids.com/coqteqt/1/1/3>
- Devera R., Fernández O. Y Rodríguez J. 2003. Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 98:1-12.
- Di Noia J., Pollevick G., Xavier M., Previato J. O., Nedoca-Previato L., Sánchez D. y Frasch A. 1996. High diversity in mucin genes and mucin molecules in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* 271:32078-32083.
- El-Sayed N., et al. 2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science.* 309:409-15.
- El-Sayed N., et al. 2005b. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science.* 309: support material.

- Espinoza B., Vera-Cruz J.M., González H., Ortega E. y Hernández R. 1998. Genotype and virulence correlation within Mexican stocks of *Trypanosoma cruzi* isolated from patients. *Acta Trop.* 70:63-72.
- Ferguson M. 1997. The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 352:1295-1302.
- Fernandes O., Mangia R.H., Lisboa C.V., Pinho Ap. Morel C.M., Zingales B., Campbell D.A: y Jansen A.M. 1999. The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. *Parasitology.* 118:161-166.
- Haynes P. y Cross G. 1996. Differential glycosylation of epitope-tagged glycoprotein Gp72 during the *Trypanosoma cruzi* life cycle. *Mol. Biochem. Parasitol.* 83:253-256.
- Haynes P, Rusell D. y Cross G. 1996. Subcellular localization of *Trypanosoma cruzi* glycoprotein Gp72. *J. Cell Sci.* 109: 2979-2988.
- Henriksson J. Petterson U., Solari A. 1993. *Trypanosoma cruzi*: correlation between karyotype variability and isoenzyme classification. *Exp. Parasitol.* 77:334-348.
- Hueté-Pérez J., Flores-Obando R., Ghedin E. y Caffery C. 2005. Genomic and proteomic approaches for Chagas´ disease: critical analysisi of diagnostic methods. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 5:521-529.
- Imaz M., Esteva M., Velázquez E., Ruiz A., Segura E. y Marcipar A. 1997. Inhibition on tripomastigotes infectivity by a monoclonal antibody directed to a glycoconjugated fraction of *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 39:33-46.
- International symposium to commemorate the 90th anniversary of the discovery of Chagas disease, April 11-16 1999, Rio de Janeiro, Brazil. 1999. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 94:Supl1:429-432.
- Ivens A. et al., 2005. The genome of the kinetoplastid parasite *Leishmania major*. *Science.* 309: 436-442.

- Jang Jun Ho y Hanash S. 2003. Profiling of the cell surface proteome. *Proteomics*. 3:1947-1954.
- Jiménez Marín A. 2005. Análisis de la Respuesta de Macrófagos ante la Infección de dos cepas de *Trypanosoma cruzi* con distinta virulencia. Tesis para obtener el título de Bióloga presenta. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Joiner, K., Hieny, S., Kirchhoff, L. V. and Sher, A. 1985. GP72, the 72 kilodalton glycoprotein, is the membrane acceptor site for complement factor C3 on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *J. Exp. Med.* 161:1196-1212.
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
- López-Olmos V., Pérez-Nasser N., Piñero D., Ortega E., Hernández R. Y Espinoza B. 1998. Biological characterization and genetic diversity of Mexican isolates of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 69:239-254.
- López-Olmos, M. V. 1999. Tesis de Maestría en Investigación Biomédica Básica. Identificación y caracterización de epitopos proteicos de una cepa mexicana de *Trypanosoma cruzi* a través del uso de anticuerpos monoclonales. Colegio de Ciencias y Humanidades. Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Macedo AM., Martins SM., Chiari E., Pena SDJ. 1992. DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. *Mol. Biochem. Parasitol.* 55:147-154.
- Málaga S. y Yoshida N. 2001. Targeted reduction in expresión of *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein gp90 increases parasite infectivity. *Infect. Immun.* 69:353-359.
- Manque P. M., Eichiger D., Juliano M. A., Jiluiano L., Araya J.E. y Yoshida N. 2000. Characterization of the cell adhesion site of *Trypanosoma cruzi* metacyclic stage surface glycoprotein gp82. *Infect. Immun.* 68:478-484.
- Marroquin-Quelopana M., Oyama S., Aguilar T., Spisni A., Aparecida M., Juliano L., Colli W. y Alves M. 2004. Modeling the *Trypanosoma cruzi* Tc85-11 protein

and mapping the laminin-binding site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325:612-618.

- Martínez-Martínez I. 2006. Caracterización molecular de cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi* y sensibilidad de las mismas a Nifurtimox y Benznidazol. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN.
- Martínez-Velasco M. L. 2004. Estudio del proteoma de *Trypanosoma cruzi*. Identificación de moléculas con importancia biológica. Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM.
- Miles MA., Souza AA., Pova M., Shaw JJ., Lainson R. Toye PJ. 1978. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with disease in Amazonian Brazil. *Nature.* 272:819-821.
- Monteón V., Furuzawa-Carballeda R., Alejandre-Aguilar A., Aranda-Fraustro J., Rosales-Encina J. y Reyes P. 1996. American trypanosomosis: in situ and generalized features of parasitism and inflammation kinetics in a murine model. *Exp. Parasitol.* 83:267-274.
- Morel CM., Chiari E. Camargo EP., Mattei DM., Romanha AJ., Simpson L. 1980. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *PNAS.* 77:6810-6814.
- Neira I. Silva F.A., Cortez M. y Yoshida N. 2003. Involvement of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes surface molecule gp82 in adhesion to gastric mucin and invasion of epithelial cells. *Infect. Immun.* 71:557-561.
- Nieto Castañeda G. 1997. Caracterización de proteasas de *Trypanosoma cruzi*, cepa Querétaro. Tesis para obtener el título de Química Farmacéutica Bióloga. Facultad de Química. UNAM.
- Nozaki T., Haynes P. y Cross G. 1996. Characterization of the *Trypanosoma brucei* homologue of a *Trypanosoma cruzi* flagellum-adhesion glycoprotein. *Mol. Biochem. Parasitol.* 82:245-255.

- O'Farrell P. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250: 4007-4021.
- Oaxaca Hernández. 2005. Expresión de quimiocinas en modelo murino de infección con cepas de *Trypanosoma cruzi* que exhiben diferente grado de virulencia. Tesis para obtener el título de Biólogo. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.
- OMS, 2002. Control of Chagas disease. Second report of the WHO Expert Committee. WHO technical report series; 905. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Ortega-Barria E. y Pereira ME. 1992. Entry of *Trypanosoma cruzi* into eukaryotic cells. *Infect Agents Dis.* 1:136-45.
- Paba J., Santana J., Teixeira A. Fontes W., Sousa M. Y Ricart C. 2004. Proteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Proteomics.* 4:1052-1059.
- Parodi-Talice A., Duran R., Arrambide N., Prieto V., Piñeyro M., Protsch O., Cayota A., Cerveñansky C. y Robello C. 2004. Proteome análisis of the causative agent of Chagas disease: *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Parasitol.* 34:881-886.
- Pancholi V. y Chhatwal G. 2003. Housekeeping enzymes as virulence factors for pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* 293: 391-401.
- Ramirez M.I., Cassia R.R., Araya J.E., da Silveira J.F. y Yoshida N. 1993. Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesión molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasión. *Infect. Immun.* 61:3636-3641.
- Rico Ramírez M. D. T. 2004. Respuesta inmune celular contra cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi*: papel de las citocinas. Tesis para obtener el título de Bióloga. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Rubin-de-Celis S., Uemura H., Yoshida N. y Schenkman S. 2006. Expresión of tripomastigotes trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*

increases parasite escape from its parasitophorous vacuole. *Cell. Microbiol.* 8:1888-1898.

- Ruiz Ávila A. A. 2006. Determinación de la actividad del etanidazol (N-(2-hidroxi-etil)-2-nitro-1-imidazolacetamida) contra cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi*. Tesis para obtener el título de Química Farmacéutica Biológica. Facultad de Química. UNAM.
- Ruiz R.C., Favoreto S., Dorta M., Oshiro M. E., Ferreira A., Manque M. y Yoshida N. 1998. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca²⁺ signalling activity. *Biochem. J.* 330:505-511.
- Russell DG y Wilhelm H. 1986. The involvement of the major surface glycoprotein (gp63) of *Leishmania* promastigotes in attachment to macrophages. *J. Immunol.* 136: 2616-2620.
- Sabarth N, Lamer S, Zimny-Arndt U, Jungblut P, Meyert T. y Bumann D. 2002. Identification of Surface Proteins of *Helicobacter pylori* by Selective Biotinylation, Affinity Purification, and Two-dimensional Gel Electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 277:27896–27902.
- Santori F., Dorta M., Juliano L., Juliano M.A., da Silverio J.F.:,, Ruiz R. y Yoshida N. 1996. Identification of a domain of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecule gp82 required for attachment and invasión of mammalian cells. *Mol. Biochem. Parasitol.* 78:209-216.
- Schenkman S., Kurosaki T., Ravetch J. y Nussenzweig V. 1992. Evidence for the participation of the Ssp-3 antigen in the invasion of non-phagocytic mammalian cells by *Trypanosoma cruzi*. *J. Exp. Med.* 175:1635-1641.
- Schenkman S., Eichinger d., Pereira M. y Nussenzweig V. 1994. Structural and functional properties of *Trypanosoma* Trans-sialidase. *Annu. Rev. Microbid.* 48:499-523.
- Shetty J., Diekman A., Jayes F., Sherman N., Naaby-Hansen S., Flickinger C. y Herr J. 2001. Differential extraction and enrichment of human sperm surface

proteins in a proteome: Identification of immunocontraceptive candidates. *Electrophoresis*. 22:3053-3066.

- Schmunis GA. 1999. Prevention of transfusional *Trypanosoma cruzi* infection in Latin American. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 94:93-101.
- Sher A. y Snary D. 1982. Specific inhibition of the morphogenesis of *Trypanosoma cruzi* by a monoclonal antibody. *Nature*, 300:639-640.
- Smalheiser N. 1996. Proteins in unexpected locations. *Mol. Biol. Cell*. 7: 1003-1014.
- Soltys B. y Gupta R. 1996. Immunoelectron microscopic localization of the 60-kDa heat shock chaperonin protein (Hsp60) in mammalian cells. *Exp. Cell. Res.* 222: 16-27.
- Sosa Aguilar S. 2003. Respuesta inmune celular contra cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi*. Tesis para obtener el título de Biólogo presenta. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Tan H. y Andrews N. 2002. Don't bother to knock- the cell invasion strategy of *Trypanosoma cruzi*. *TRENDS Parasitol.* 18:427-428.
- Tibayrenc M. Neubauer K., Barnabé C., Guerrini F. Skarecky D., Ayala F. 1993. Genetic characterization of six protozoa: parity between random primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *PNAS*. 90:1335-1339.
- Travassos LR., Almeida IC., Milani SR. y Gorin P. 1993. Antibody specificity in the conventional serology for Chagas disease. *Ci. Cult. J. Braz. Assoc. Adv. Sci.* 45: 69-73.
- Vermelho A.B. y Meirelles M. 1994. Sialoglycoconjugates in *Trypanosoma cruzi*-Host cell interaction: possible biological model a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 89:69-79.
- Villalta F., Lima M. y Zhou L. 1990. Purification of *Trypanosoma cruzi* surface proteins involved in adhesión to host cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172:925-931.
- Westermeier R. y Naven T. 2002. Proteomics in practice. A laboratory manual of proteome analysis. Wiley-Vch. Alemania. 342 pp.

- Yao Ch., Luo J., Storlie P., Donelson J. y Wilson M. 2004. Multiple products of the *Leishmania chagasi* major surface protease (MSP or GP63) gene family. *Mol. Biochem. Parasitol.* 135: 171-182.
- Yao Ch., Donelson J. y Wilson M. 2003. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania sp.* Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Mol. Biochem. Parasitol.* 132: 1-16.
- Yoshida N. 2006. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *An. Acad. Brasil. Cienci.* 78:87-111.
- Yoshida N., Blanco S.A., Araguth M.F., Russo M. y González J. 1990. The stage-specific 90-kilodalton surface antigen of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 39:39-46.
- Yoshida N., Mortara R., Araguth M. González J. Y Russo M. 1989. Metacyclic neutralizing effect of monoclonal antibody 10D8 directed to the 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 57:1663-1667.

XI. ANEXOS

Anexo 1. SILICONIZACIÓN DE MATERIAL

Para la fijación de células Vero empleadas en el ensayo de ligandos se deben de emplear material de plástico y vidrio previamente siliconizados. El procedimiento se realiza empleando Sigmacote (Sigma, Cat. SL-2), todo el material debe de estar limpio y seco, aplicar el sigmacote y agitar para que toda la superficie este en contacto con la solución y retirar el sigmacote inmediatamente, permitir que el exceso drene y secar al aire por al menos 12 horas. Enjuagar con agua destilada antes de usar el material ([http://www.sigmaaldrich.com/sigma/product information](http://www.sigmaaldrich.com/sigma/product-information)).

Anexo 2. INTERACCIÓN *T. cruzi*-HOSPEDERO.

El proceso de interacción *T. cruzi*-célula hospedera involucra la unión del parásito a la superficie celular. Existen evidencias que indican que la unión se debe a un proceso de reconocimiento que involucra los residuos de azúcares expuestos en la superficie de ambas células.

Una vez que el tripomastigote ha entrado al organismo del hospedero, va a invadir a diversas células e iniciar su ciclo intracelular, que en promedio dura 4 días. La entrada a la célula inicialmente ocurre a través de la formación de una vacuola que posteriormente va a ser lisado para liberar al parásito en el citosol. Una vez en el citosol se transformara en amastigote, que se dividirá por replicación binaria, nueve ciclos se llevan a cabo; antes de diferenciarse a tripomastigotes que van a salir de la célula hacia el torrente sanguíneo (Burleigh y Andrews, 1995). En la figura 27 se ilustran los dos modelos de cómo entra el parásito a células no fagocíticas, se observan los parásitos afuera de las células que están teñidos en rojo, lisosomas de células hospederas en verde y DNA del parásito y células hospedera en azul. Panel superior: (a) tripomastigote extracelular (rojo) unido a la superficie celular. A través de señales intracelulares, los tripomastigotes reclutan lisosomas al sitio de unión, mientras permanece extracelular (b, c). La fusión gradual subsecuente de los lisosomas genera la vacuola parasitofora, que rodea al parásito (d). Panel inferior: *T. cruzi* promueve la invaginación de la membrana de la célula hospedera (e, f), un evento que puede llevar a la internalización completa o al escape del parásito hacia el medio extracelular

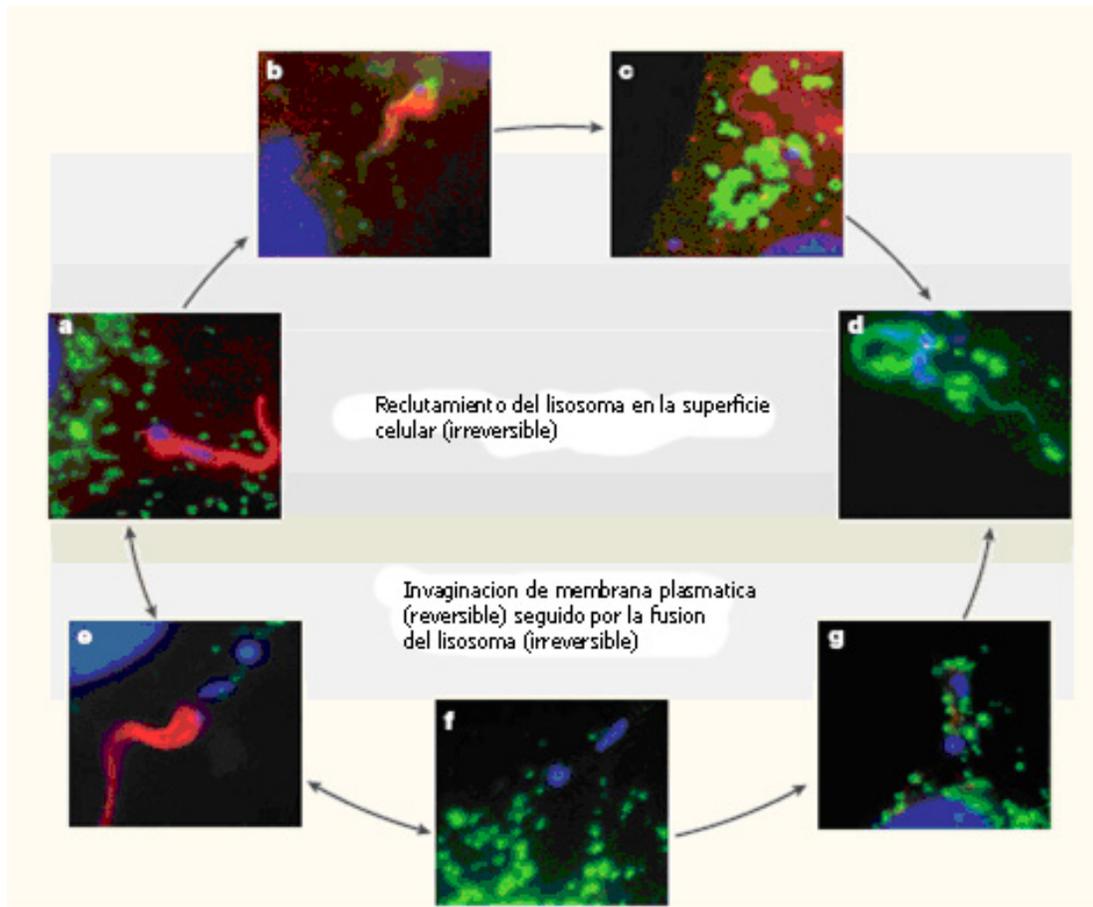
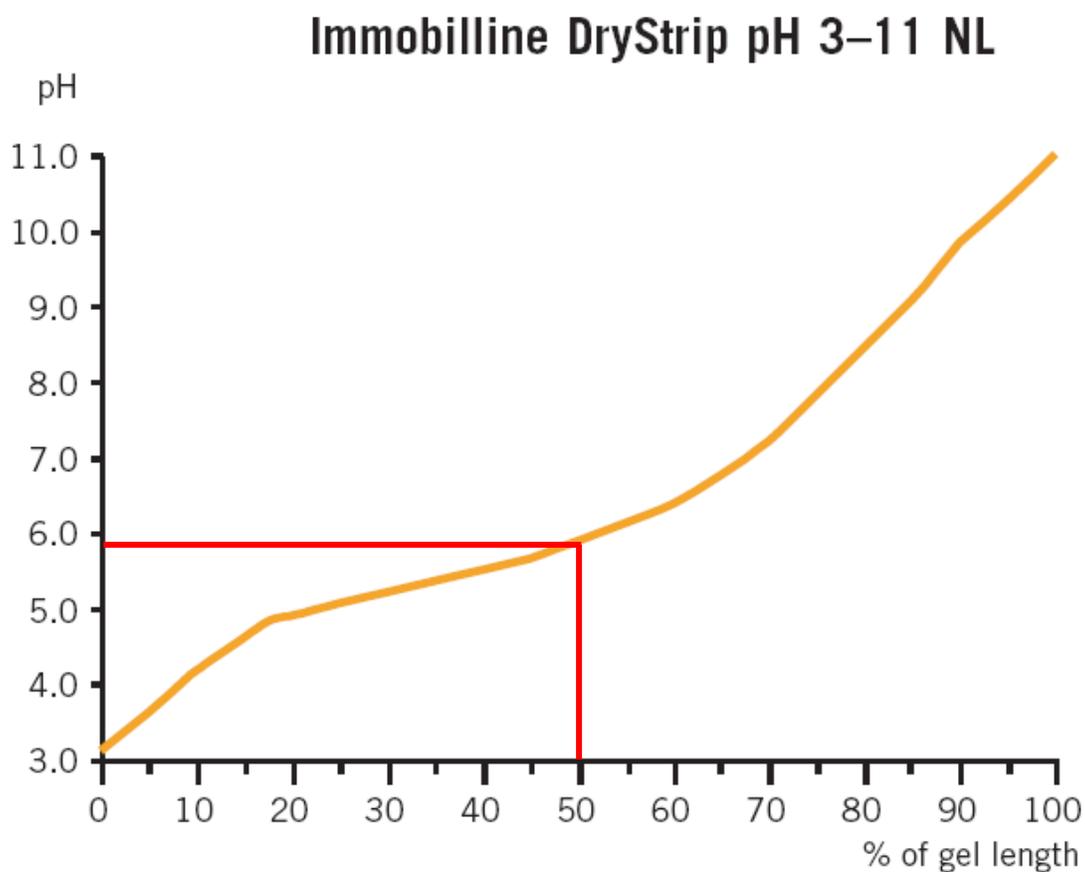


Figura 27. Modelo de invasión de *Trypanosoma cruzi* a células no fagocíticas. Las imágenes ilustran los pasos involucrados en los dos mecanismos conocidos de la entrada de *T. cruzi* en células no fagocíticas (Tomado de Andrade y Andrews, 2005).

Uno de los mecanismos más estudiados es el que involucra la elevación de los niveles intracelulares de Ca^{2+} en las células hospederas, lo que lleva a la migración de lisosomas y la fusión al sitio de unión del parásito, evento que precede a la formación de la vacuola parasitofora; dos peptidasas del parásito inducen el aumento de calcio la oligopeptidasa B y la cruzipaina; la cruzipaina es la principal cisteinproteasa del parásito, esta comprende una familia de isoformas que son abundantemente expresadas a lo largo de todo el ciclo de vida y se acumula en los reservosomas. (Aparicio *et al.*, 2004).

Anexo 3. GRAFICA PARA CALCULO DE PUNTO ISOELÉCTRICO EN FUNCIÓN DE DISTANCIA RECORRIDA EN TIRAS IPG DE 3-10 NL.



Para calcular el punto isoeléctrico se mide en el gel la distancia recorrida de la proteína de interés en el gel y se convierte en porcentaje, dicho porcentaje se interpola en la gráfica para conocer el punto isoeléctrico de la proteína. Se ejemplifica una proteína que recorrió el 50% del gel obteniendo un pI de 5.9.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
ARN	Acido ribonucleico
CaCl ₂	Cloruro de calcio
CHAPS	3-[(3-colamidopropildimetilamonio)-1-propanosulfonato
cm	Centimetro
CO ₂	Dióxido de carbono
DMEM	Medio minimo esencial de Eagle´s modificado Dulbecco
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
GIPL	Glicoinositol-fosfolípidos
gp35/50	Glicoproteína 35/50 kDa
gp63	Glicoproteína 63 kDa
gp72	Glicoproteína 72 kDa
gp82	Glicoproteína 82 kDa
gp83	Glicoproteína 83 kDa
gp90	Glicoproteína 90 kDa
GPI	Glicosil-fosfoditidil-inositol
HRP	Peroxidasa de rábano
HSP	Proteína de choque térmico
IFN- γ	Interferon gamma
IL-12	Interleucina 12
IPG	Gradiente de pH inmovilizado
kDa	Kilo Dalton
MALDI-TOF	Desorción/ionización láser asistida por matriz- tiempo de vuelo
MASP	Proteína de superficie asociada a mucinas
mg	Miligramo
mL	Mililitro
ng	Nanogramo
μ g	Microgramo
NH ₄ CO ₃	Bicarbonato de amonio
NL	No Lineal
PBS	Buffer salino de fosfatos
pI	Punto Isoeléctrico
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoruro
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
TBS	Buffer salino de Tris
Tc-85	Familia proteica heterogenea de 85 kDa
TcMUC	Mucinas expresadas en estadios presentes en mamíferos de <i>T. cruzi</i>
TcSMUG	Mucinas expresadas en estadios presentes en epimastigotes de <i>T. cruzi</i>
TFA	Acido trifluoroacético
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TS	Transialidasa
TSSA	Antígeno de superficie pequeño de tripomastigotes