



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

Caracterización bioquímica de tres
componentes glicoprotéicos de tres aislados
mexicanos de Trypanosoma cruzi

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

BIOL. LORENA GONZÁLEZ LÓPEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. PAZ MARÍA SALAZAR SCHETTINO

MÉXICO, D.F.

ENERO, 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

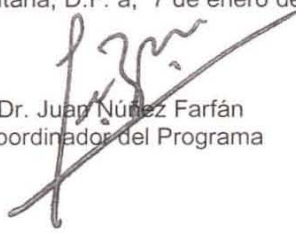
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 27 de agosto de 2007, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **GONZALEZ LOPEZ LORENA** con número de cuenta **505013712** con la tesis titulada **"Caracterización bioquímica de tres componentes glicoproteicos de tres aislados mexicanos de Trypanosoma cruzi"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. PAZ MARIA SILVIA SALAZAR SCHETTINO**;

Presidente: DR. FIDEL DE LA CRUZ HERNANDEZ HERNANDEZ
Vocal: DR. PEDRO ULISES OSTOA SALOMA
Secretario: DRA. PAZ MARIA SILVIA SALAZAR SCHETTINO
Suplente: DR. EDGAR ARTURO ZENTENO GALINDO
Suplente: DRA. INGEBORG DOROTHEA BECKER FAUSER

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 7 de enero de 2008.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente de la interesada.

Este trabajo fue realizado con el apoyo económico del consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) en el Laboratorio de Biología de Parásitos del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Comité Tutorial

Dra. Paz María Salazar Schettino

Dra. Ingeborg Becker Fauser

Dr. Pedro Ulises Ostoa Saloma

AGRADECIMIENTOS

A la Dra Paz María Salazar por permitirme ser parte de su equipo y por creer en mí. Gracias por la confianza, el apoyo en momentos difíciles, por fomentar mi gusto hacia la parasitología y la investigación, por transmitirme sus bastos conocimientos sobre esta enfermedad y enamorarme de este magnífico parásito. Por alentarme a seguir adelante.

A la M. en C. Martha I. Bucio Torres por su apoyo a la revisión de esta tesis, sus valiosas aportaciones a este trabajo, la experiencia transmitida en el trabajo de laboratorio, por su paciencia y confianza.

Al Dr. Edgar Zenteno por las ideas aportadas, por permitirme discutir y analizar los resultados obtenidos, así como la ayuda, aportaciones para mi crecimiento académico y apoyo en algunas de las metodologías realizadas en el trabajo experimental.

Al Dr. Fidel de la Cruz Hernandez por su apoyo incondicional, por transmitirme parte de su gran experiencia académica tanto en clases como en mi vida profesional, por permitirme ser parte de su equipo, por sus valiosísimas aportaciones, por fomentar mi gusto hacia la investigación y sobre todo por ser un gran amigo.

A la Dra Febe Elena Cázares Raga por todo su apoyo en el proceso experimental, por sus valiosísimas aportaciones para el proyecto, por su paciencia, trabajo y sus palabras de aliento en momentos difíciles, gracias por ser una gran amiga.

A la Dra. Yolanda López Vidal y al Dr Mauricio Rodriguez por su apoyo en el análisis de los geles bidimensionales así como por sus aportaciones.

A la Biol. Elia Torres por su apoyo en la parte experimental de este proyecto así como su invaluable amistad.

A la M. en C. Yolanda Guevara por el mantenimiento de los aislados, por los conocimientos transmitidos, su cariño y amistad.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Biología de Parásitos, M.C. Adela Ruíz, M. en C. Margarita Cabrera, M. en C. Gloria Rojas, Biol. Mauro Vences, Biol. Santiago Rosales, Biol. Nelia Luna, Biol. Laura Flores y nuestra laboratorista Evita por su apoyo, conocimiento transmitido y todos los buenos momentos que hemos vivido juntos.

Al M. en C. Hugo Aguilar Diaz por sus aportaciones académicas, sugerencias y apoyo en la realización de esta tesis.

A mi comité tutorial, Dra Ingeborg Becker y Dr. Pedro Ostoa por sus observaciones durante cada comité tutorial y su apoyo.

A la máxima casa de estudios, la UNAM, porque es un orgullo pertenecer a esta gran institución y aprender de grandes investigadores que la hacen ser la mejor.

DEDICATORIAS

A mi mamdrecita (Pili) y papito (Ezequiel)!!! Gracias por su cariño, paciencia y dedicación, por siempre alentarme a ser la mejor, por apoyarme en cada una de los proyectos que emprendo, por su regaños y sus risas, por **ser mis modelos a seguir**, por ser la luz al final del túnel y por ser los mejores padres y amigos que pude haber tenido, gracias y esto va por ustedes!!!

A mi bromulito (Charly) por tus consejos, por todas las cosas buenas que hemos vivido juntos, por siempre haberme ayudado a mis tareas cuando era peque, por fungir como otro padre y ser un amigo, por enseñarme que todo lo que queremos se puede lograr, por siempre estar por mi y ayudarme a alcanzar mis sueños, Gracias Hermanito!!!!

A mi Gusanito (Hugo)!! No hay palabras para expresar toda la gratitud y todo lo que siento, indudablemente esto no habria sido posible sin tu apoyo, gracias por la paciencia, por jalarme las orejas cuando fue necesario, por alentarme, por creer en mi, por ser mi motor para seguir adelante y ser la mejor, por este tiempo que hemos vivido juntos, por las buenas, las malas y las peores, por las risas y lágrimas, pero sobre todo por el amor, **TE AMO!!** y este éxito o meta tambien es tuyo!!!

A mis amigas, las biolocas, Polla, Parka, Cuack, Flaca y Sofi, gracias por enseñarme que la amistad existe y que los verdaderos amigos son para toda la vida, gracias por las risas, por el cuadernito (jajaja), por tener en quien confiar y porque cada una tiene características tan especiales de las que he aprendido y que además, las hace ser únicas y admirables, las quiero y un montón!!!!

A Bettina, mi pecueña malagüña, gracias por los 6 meses que compartimos en Málaga y lo que hemos podido vivir después, por las risas, por los recuerdos!!! Va con cariño hasta tierras Francesas!!!

A mis amigas de la vida libre y reinis, Neileria, Laura migrans, gracias por su apoyo, su amistad y confianza ahhhhh y Eliazoaria, gracias por ser una gran amiga, por escucharme, por tus consejos, tu confianza y por tu apoyo, un millón de gracias y te quiero amiga! A los compas del laboratorio Santi y Mau, gracias por ser tan buenos amigos, por creer en mi y siempre tener una palabra de aliento, gracias!!!

A Febe y Fidel gracias por su apoyo y cariño, por escucharme y darme tantos buenos consejos, gracias por brindarme su amistad, la cual realmente valoro, los quiero mucho!!!

A mis niños del 2206 (FacMed) porque me han hecho ser una mejor profesionista. Gracias por su cariño!!

A todos ustedes porque sin su cariño y apoyo la vida no valdría la pena de ser vivida!!!!

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	
I.1 Generalidades.....	3
I.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
I.2.1. Ubicación Taxonómica.....	4
I.2.2. Morfología.....	4
I.3 Ciclo de Vida.....	6
I.4 Transmisor.....	9
I.4.1. Ubicación Taxonómica.....	9
I.4.2. Importancia en México.....	10
I.5 Reservorios.....	12
I.6 Mecanismos de Transmisión.....	13
I.7 Cuadro clínico.....	15
I.7.1. Fase Aguda.....	15
I.7.2. Fase Indeterminada.....	16
I.7.3. Fase Crónica.....	16
I.8. Patogenia y Patología.....	18
I.9 Diagnóstico.....	20
I.10 Inmunología.....	22
I.11 Heterogeneidad entre aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i>	23
I.12 Bioquímica del Parásito.....	26
I.13 Genoma de <i>T. cruzi</i>	28
I.14 Proteoma de <i>T. cruzi</i>	33
I.15 Membrana de <i>T. cruzi</i>	37
II. JUSTIFICACIÓN	41
III. HIPÓTESIS	43
IV. OBJETIVOS	44
V. MATERIAL Y MÉTODOS	45
V.1 Material biológico.....	45
V.1.1 Microorganismos.....	45
V.1.2 Sueros humanos reactivos a <i>T. cruzi</i> y <i>Leishmania mexicana</i>	45
V.2 Cultivo de los parásitos.....	45
V.3 Obtención de los extractos proteicos.....	46
V.4 Cuantificación de proteínas totales por el método de Lowry.....	46
V.5 Cuantificación de carbohidratos totales por el método de Dubois.....	47
V.6 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	47
V.7 Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida.....	48
V.7.1 Primera dimensión o el isoelectroenfoco (IEF).....	48
V.7.2 Segunda dimensión en SDS-PAGE.....	49
V.8 Tinción de proteínas con nitrato de plata.....	49
V. 9 Tinción con pro Q Emerald (glicoproteínas).....	50
V.10 Tinción con Sypro Ruby (proteínas).....	50
V.11 Análisis de geles de poliacrilamida.....	50

V.12 Electrotransferencia de proteínas a membranas de Nitrocelulosa.....	51
V.13 Western-blot.....	52
V.14 Oxidación de carbohidratos con Metaperiodato.....	52
V.15 Composición de carbohidratos.....	53
V.16 Ensayos de afinidad con lectinas.....	53
V.17 Análisis Proteómico.....	54
VI. RESULTADOS.....	56
VI.1 Electroforesis en SDS-PAGE.....	56
VI.2 Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida.....	56
VI.3 Tinción de proteínas con nitrato de plata	56
VI.4 Análisis de Imágenes de geles en 2D	60
VI.5 Western-blot.....	65
VI.6 Oxidación de Carbohidratos con Metaperiodato.....	69
VI.7 Tinción con pro Q Emerald (glicoproteínas) y Sypro Ruby (proteínas)	70
VI.8 Composición de Carbohidratos.....	71
VI.9 Ensayos de afinidad con Lectinas.....	72
VI.10 Análisis Proteómico.....	74
VII DISCUSION.....	79
VIII. CONCLUSIONES.....	88
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	89

RESUMEN

La caracterización proteómica de *Trypanosoma cruzi* es necesaria para comprender la relación parásito-célula huésped así como identificar moléculas para el diagnóstico. La composición de carbohidratos en las proteínas de membrana es de suma importancia debido al papel que desempeñan en el comportamiento biológico de los aislados; por lo que el objetivo de este trabajo fue caracterizar y comparar extractos enriquecidos en proteínas de membrana, de aislados de epimastigotes del parásito con diferencias en su comportamiento biológico y obtenidos de especies de vectores diferentes, con el fin de encontrar diferencias moleculares que las expliquen. Las proteínas se analizaron por SDS-PAGE, electroforesis 2D y western-blot con sueros de pacientes reactivos a *T. cruzi* y *Leishmania mexicana*. La glicosilación se estudió con proQ Emerald y lectinas comerciales y los monosacáridos totales de los extractos se determinaron por cromatografía de gas. Las proteínas de 14, 22 y 38kDa fueron analizadas por MALDI-TOF. Se identificaron proteínas entre 15 y 150kDa, las abundantes entre 20 y 50kDa con pI entre 5 y 6.5 y todas las bandas fueron teñidas con proQEmerald. Se identificaron 13 bandas reactivas a *T. cruzi*, 11 con cruce con *L. mexicana* y cuando los carbohidratos fueron oxidados, los anticuerpos reactivos a *T. cruzi* siguieron reconociendo 10 proteínas entre 14 y 250kDa y ninguna fue reconocida por *L. mexicana*. Los carbohidratos mayoritarios en los extractos fueron galactosa, manosa, glucosa, y N-acetil glucosamina con diferencias en el porcentaje total de las últimas tres. Los resultados sugieren que una misma proteína podría tener diferentes grados de glicosilación en los diferentes aislados y esto podría explicar las diferencias en su comportamiento biológico y por otra parte, indicaron que los carbohidratos son los responsables del cruce inmunológico con miembros del género *Leishmania*

ABSTRACT

The proteomic characterization of *Trypanosoma cruzi* is necessary in order to understand the parasite- host-cell relation and to identify useful molecules for diagnosis. The carbohydrate composition of the membrane proteins is highly important due to the role they play in the biological behavior of the strains, because of this, the objective of this work was to characterize and compare enriched membrane protein extracts obtained from epimastigote strains with differences in their biological behavior and obtained from different vectors species, to the end of finding molecular differences that could explain them. The proteins were analyzed by SDS-PAGE, 2D electrophoresis and western-blot tests with reactive sera of patients to tripanosomiasis and leishmaniasis. The glycosylation was analyzed through proQ Emerald stain and lectin blots and the total monosaccharide composition of the extracts was determined by .gas chromatography. Finally, tryptic peptides of 14, 22 and 38 kDa proteins were obtained by MALDI-TOF. The SDS-PAGE and 2D electrophoresis rendered a band collection between 150 and 15 kDa without qualitative or quantitative differences, the relevant proteins were between 20 and 50kDa with an isoelectric point between 5 and 6.5 and all of them were stained with proQ Emerald. With the western blot test, we identified 13 immunodominant proteins, 11 of them presented cross-reactivity with *L. mexicana*. Proteins electrophoretically resolved and transferred to nitrocellulose membranes were incubated with sodium-metaperiodate and 10 proteins were recognized by human anti-*T. cruzi* sera indicating the peptidic nature of these antigens; none was recognized with *L. mexicana* serum. The main carbohydrates found in the extracts were galactose, mannose, glucose and N- acetyl glucosamine with differences in the total percentage of the former three. The results suggest that a same glycoprotein could have different glycosylation grades in the different strains and might determine the differences in their biological behavior. Furthermore, the carbohydrates could determine the immunological cross-reactivity among the members of the *Leishmania* genus.

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Generalidades

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana es causada por el protozooario hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, de la familia Tripanosomatidae, del orden Kinetoplastida.

Este parásito fue descubierto en 1909 por el Dr. Carlos Chagas y es transmitido a mamíferos, incluyendo al hombre, por insectos hemípteros, hematófagos obligados, de la familia Reduviidae (Chagas, 1909). La prevalencia total de la infección por *T. cruzi* en el continente Americano se estima entre 16 y 18 millones de casos con 100 millones de individuos en riesgo de infección: para México, se ha estimado una seroprevalencia de 540, 000 casos, con 10,854 casos nuevos por año (WHO, 2001, Schofield, 2001).

Actualmente, la Organización Mundial de la Salud considera a la enfermedad de Chagas dentro de las parasitosis prioritarias en América junto con la malaria, schistosomiasis y leishmaniasis. La enfermedad está confinada al continente Americano y se extiende desde el sur de Estados Unidos hasta el sur de Chile y Argentina (WHO, 2001, Schofield, 2001).

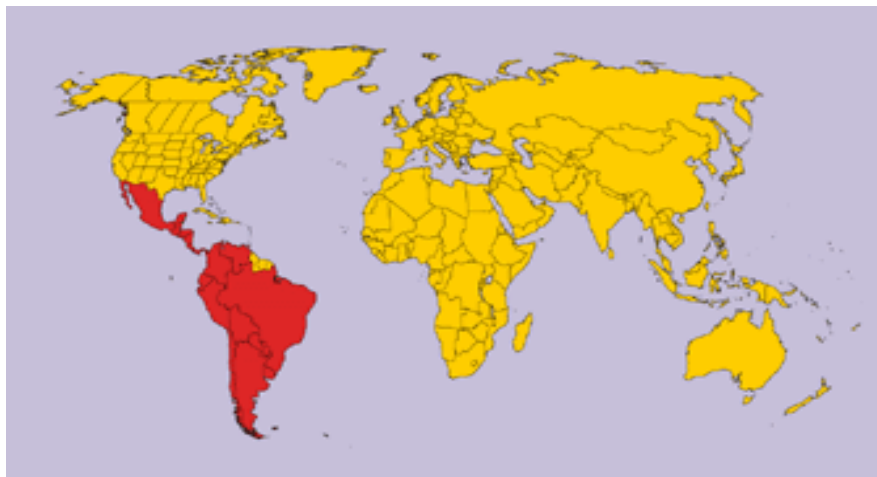


Figura 1. Distribución Geográfica de la enfermedad de Chagas. En rojo se muestran los 18 países endémicos para la Tripanosomiasis Americana. En: www.who.int/int/ctd/chagas/geo.htm.

I.2 *Trypanosoma cruzi*

I.2.1 Ubicación Taxonómica (Levine, 1989)

Reino	Protista
Subreino	Protozoa
Phylum	Sarcomastigophora
Subphylum	Mastigophora
Clase	Zoomastigophorea
Orden	Kinetoplastida
Familia	Trypanosomatidae
Género	<i>Trypanosoma</i>
Especie	<i>Trypanosoma cruzi</i> (Chagas, 1909)

1.2.2 Morfología

T. cruzi presenta diferentes formas o estadios durante su ciclo de vida, en el cual alterna entre un huésped mamífero y uno invertebrado. Estos estadios se diferencian en su morfología y comportamiento biológico; con base en lo anterior se distinguen principalmente las siguientes formas:

a) **Epimastigote** Es una forma replicativa y no infectiva para el huésped vertebrado. Presenta forma oval, alargada, de aspecto fusiforme y mide entre 20 y 40 μm . El cinetoplasto (mitocondria con un arreglo complejo de cadenas ADN) se localiza en la parte anterior del núcleo. A partir de este organelo emerge un flagelo, el cual forma una pequeña membrana ondulante. Este estadio se encuentra presente en el intestino del huésped invertebrado, donde se multiplica por fisión binaria longitudinal y en medios de cultivo axénicos, durante la fase logarítmica de crecimiento (*log*). Los epimastigotes también pueden encontrarse como una forma transicional dentro del vertebrado durante la terminación del ciclo intracelular, cuando los amastigotes se transforman en tripomastigotes (De Souza, 2002). Esta es la forma utilizada más frecuentemente en diversos trabajos de investigación debido a la facilidad de su crecimiento y expansión en medios de cultivo axénicos.

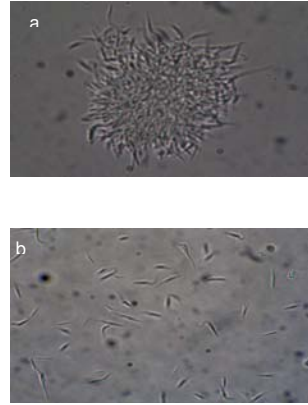
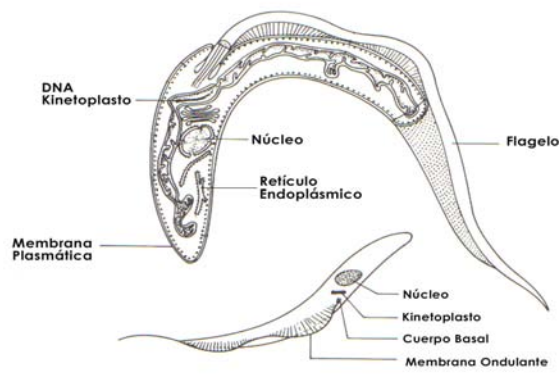


Figura 2. Forma de epimastigote. A la izquierda se observan una representación esquemática de la forma de epimastigote, donde se observan las siguientes estructuras: flagelo, membrana ondulante, núcleo, cinetoplasto anterior al núcleo y retículo endoplásmico. a) Roseta de epimastigotes en medio de cultivo. b) Epimastigotes en medio de cultivo.

b) **Tripomastigote:** Es la fase infectiva del parásito, no es replicativa, puede ser sanguíneo o metacíclico. El tripomastigote sanguíneo se encuentra en el torrente circulatorio del vertebrado y el metacíclico se encuentra en la ampolla rectal, heces, y orina del transmisor así como en la fase estacionaria en cultivo axénico. Presenta una forma característica de “S” o “C”, mide aproximadamente 25 μm de longitud por 2 μm de ancho; presenta un núcleo muy aparente que se sitúa en la parte media central del parásito. El cinetoplasto se encuentra posterior al núcleo y a partir de éste, emerge el flagelo que recorre el cuerpo del parásito, formando la membrana ondulante para finalmente sobresalir libre en la porción anterior y dar movilidad al parásito.

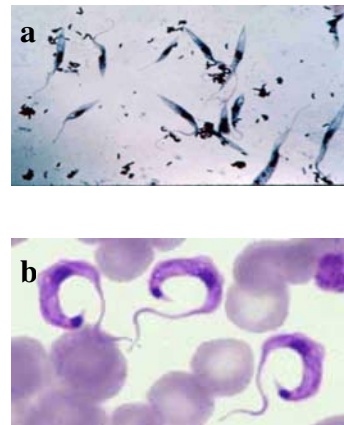
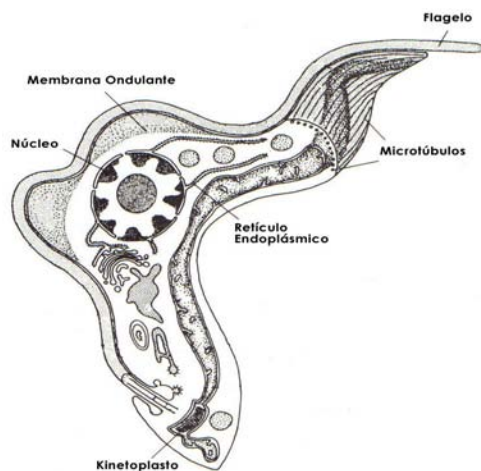


Figura 3. Forma de Tripomastigote. A la izquierda se muestra una representación esquemática de la forma de Tripomastigote, donde se observan las siguientes estructuras: flagelo, membrana ondulante, núcleo, cinetoplasto posterior al núcleo y retículo endoplásmico. a) Tripomastigotes metacíclicos en heces del transmisor. b) Tripomastigotes sanguíneos en sangre en forma de “C”.

c) **Amastigote:** El amastigote es la forma intracelular del parásito; tiene forma esférica de 2 a 4 μm , no posee flagelo libre, el núcleo es muy aparente y el cinetoplasto tiene forma de bastoncillo. Esta es una forma replicativa que se reproduce por fisión binaria longitudinal dentro de las células del huésped mamífero.

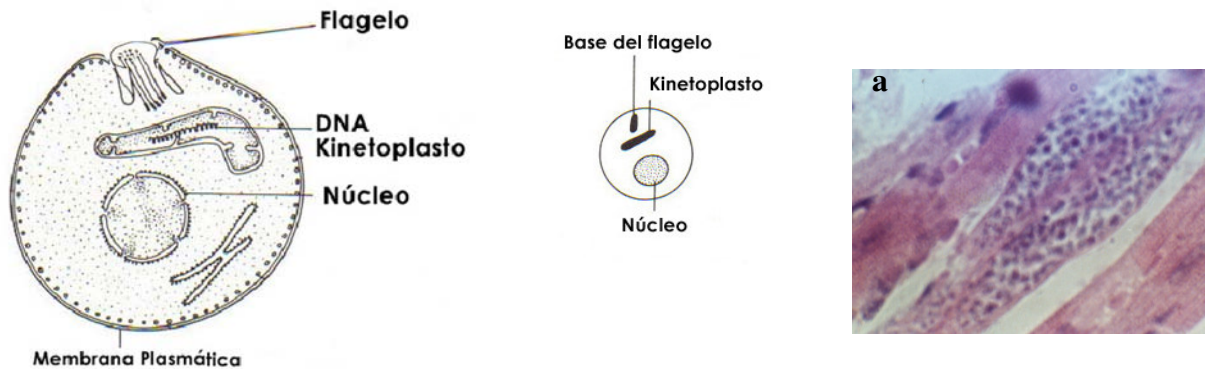


Figura 4. Forma de amastigote. A la izquierda se muestra una representación esquemática de la forma de amastigote, donde se observan las siguientes estructuras: Base del flagelo, cinetoplasto y núcleo. a) Nidos de amastigotes en células de miocardio de ratón.

I. 3 CICLO DE VIDA

El ciclo de vida natural o rural de *T. cruzi* depende de la transmisión del parásito por insectos hematófagos de la familia Reduviidae; estos transmisores llevan las formas infectivas (tripomastigotes metacíclicos) de *T. cruzi* en su materia fecal, la cual es depositada por el insecto sobre la piel durante o después de alimentarse. Los parásitos ingresan al huésped a través de mucosas o de discontinuidades de la piel, donde pueden invadir cualquier célula nucleada; sin embargo, invade principalmente macrófagos, células musculares lisas o estriadas y fibroblastos (Andrade, 2005). Para la invasión de los macrófagos, los tripomastigotes son fagocitados y permanecen dentro del fagolisosoma, de donde subsecuentemente escapan al citosol diferenciándose en amastigotes los cuales se replican libremente. Después de varios ciclos de fisión binaria, los amastigotes se diferencian nuevamente en tripomastigotes móviles, siendo éstos liberados al torrente sanguíneo al ocurrir la lisis de la célula hospedadora; en este lapso, los amastigotes se transforman en formas similares a epimastigotes (epimastigotes intracelulares) (Silver, 2005; Andrade, 2005). El tripomastigote sanguíneo es capaz de invadir nuevamente una amplia variedad de células nucleadas y por tanto, propagar la infección a diversos órganos y tejidos. Durante esta fase sanguínea es ingerido por el transmisor (Kirszenbaum y Stzein, 1994). Los tripomastigotes

sanguíneos se transforman en epimastigotes en el intestino medio del transmisor y se dividen repetidamente por fisión binaria longitudinal. Los epimastigotes se mantienen unidos al intestino medio mediante estructuras tipo hemidesmosomas, por polipéptidos (Zeledón, 1997) o por fuerzas electrostáticas como ha sido sugerido en estudios *in vitro* (Kleffmann *et al.* 1998, Schmidt *et al.* 1998). En la ampolla rectal, una proporción de epimastigotes se transforman en tripomastigotes metacíclicos, los cuales son expulsados junto con las heces y éstos son capaces de infectar al huésped vertebrado cerrando así el ciclo (DeSouza, 2002).

La existencia de la forma predominante en el huésped depende principalmente de las condiciones en las que el parásito se desarrolla (Silver, 2005). Dentro del vector, el ciclo dura entre 6 y 15 días desde que el insecto ingiere la sangre con los tripomastigotes sanguíneos hasta que las formas infectantes del parásito, los tripomastigotes metacíclicos, aparecen en las heces. El triatomino permanece infectado de por vida (Carcavallo, 1998).

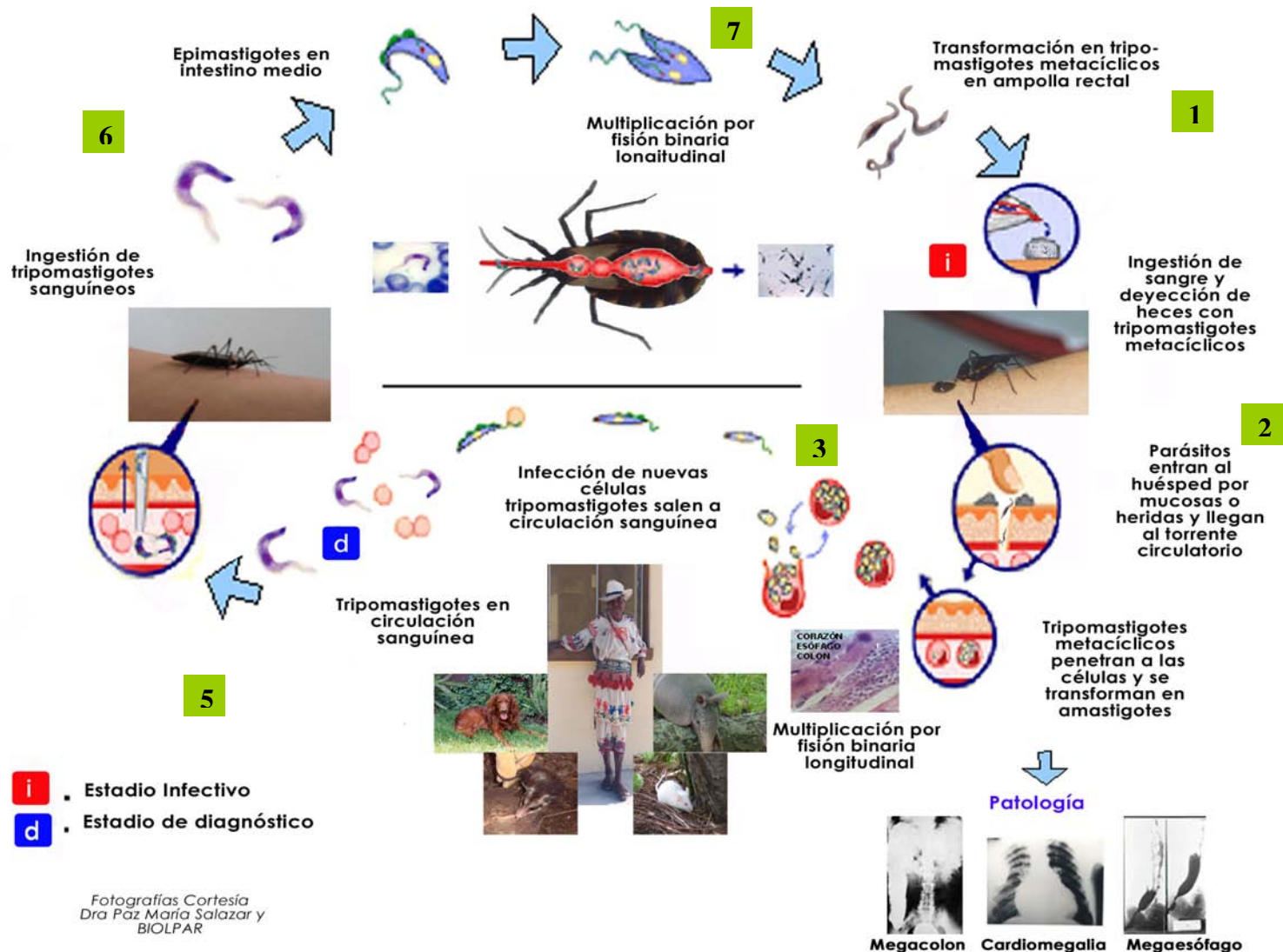


Figura 5. Ciclo de vida natural de *T. cruzi*. Cuando el triatomino se alimenta, deposita tripomastigotes metacíclicos junto con sus deyecciones (1). Los parásitos entran al huésped por mucosas o heridas y llegan al torrente circulatorio (2). Los Tripomastigotes penetran en las células transformándose en amastigotes y multiplicándose por fisión binaria longitudinal; después de varios ciclos de replicación, los amastigotes lisan las células infectadas y salen al torrente circulatorio, donde se transforman en tripomastigotes sanguíneos; estos pueden infectar nuevas células o permanecer en el torrente circulatorio (5) y ser ingeridos por un nuevo transmisor (6). Los tripomastigotes sanguíneos se transforman en epimastigotes en el intestino medio del triatomino (7) donde se multiplican por fisión binaria longitudinal (7). Finalmente, se transforman en tripomastigotes metacíclicos en la ampolla rectal (8) los cuales son expulsados junto con las heces y éstos son capaces de infectar al huésped vertebrado cerrando así el ciclo.

II. 3. TRANSMISOR

I.4 Ubicación Taxonómica

Phylum	Arthropoda
Clase	Hexapoda (Insecta)
Orden	Hemiptera
Familia	Reduviidae
Subfamilia	Triatominae



Géneros reportados para México:	<i>Belminus</i> (Stal, 1859)
	<i>Dipetalogaster</i> (Usinger, 1939)
	<i>Eratyrus</i> (Stal, 1859)
	<i>Paratriatoma</i> (Barber, 1938)
	<i>Pastrongylus</i> (Berg, 1879)
	<i>Rhodnius</i> (Stal, 1859)
	<i>Triatoma</i> (Laporte, 1832)
	<i>Meccus</i> (Stal, 1859)

La subfamilia Triatominae (Reduviidae) contiene numerosas especies que actúan como vectores de *T. cruzi*. Todas las especies de triatominos son hematófagas obligadas para su desarrollo completo. La mayoría de las especies se alimentan de mamíferos terrestres o arbóreos, especialmente didélfidos (tlacuaches), edentados (armadillos) y roedores y otras se encuentran asociadas a murciélagos y aves. Las especies más importantes epidemiológicamente son *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus* (Lent y Wygodzinsky, 1979). El cuerpo de los triatominos suele presentar una coloración marrón o negra. La mayoría de las especies de triatominos adultos pueden ser reconocidas por el patrón de colores sobre las porciones laterales de los segmentos abdominales o conexivo; la gama de colores que presenta va de amarillo, café claro, naranja, coral al rojo. El triatomino adulto difiere morfológicamente de los estadios ninfales en todas las especies (Lent y Wygodzinsky, 1979, Schofield, 1994).

La capacidad de cualquier especie vectora para transmitir eficientemente a *T. cruzi* es variable y depende de sus características biológicas o de comportamiento así como de las preferencias de huésped, hábitos de alimentación, la susceptibilidad a infectarse con el parásito, la proporción y densidad de formas metacíclicas en heces, el tiempo de defecación o su distribución geográfica (Zárate, 1984).

El triatomino es conocido en zonas rurales y según la región recibe diferentes nombres, de los que han sido descritos en el país alrededor de 40, entre los más comunes: chinche picuda, chinche hocicona, chinche besucona, talaje, bedrodum, pick, turicata, chinche voladora, mesquite, botijilla, chupasangre, hijacamat, coruco, chinche del monte, chumil y chinche trompuda, entre otros (Salazar-Schettino, 1988).

I.4.2 Importancia en México

Debido a sus condiciones topográficas y climáticas, México es el país hispanoamericano con mayor diversidad de triatominos (Lent y Wygodzinsky, 1979). Todas las especies de Triatominos son consideradas como vectores potenciales del parásito; sin embargo, las más importantes son aquellas que se han adaptado a la vivienda humana y que tienen un intervalo corto entre la alimentación y la defecación (Guzmán, 2001). Carlos Hoffman en 1928 realizó el primer reporte de transmisores en México con *Conorrhinus dimidiatus* (*Triatoma dimidiata*) en el estado de Veracruz y lo describió como probable transmisor de *T. cruzi*. Luis Mazotti en 1936 describe, por primera vez, un elevado porcentaje de triatominos naturalmente infectados en Oaxaca. A la fecha, en nuestro país se han reportado 8 géneros de triatominos con aproximadamente 30 especies distribuidas a lo largo del territorio nacional entre las que se encuentra el triatomino más grande del mundo, *Dipetalogaster maxima* que habita en Baja California Sur, alcanzando hasta 50 mm de longitud en el estadio adulto y el más pequeño, *Belminus costaricensis* en el estado de Veracruz que presenta una longitud menor a 9 mm en el estadio adulto (Hoffman, 1928, Mazzotti, 1940, Salazar-Schettino, 1988, Carcavallo, 1998).

En México, el género más abundante es *Triatoma*, con 24 especies distribuidas a lo largo del país; sin embargo, solo 20 han sido encontradas naturalmente infectadas, 17 con hábitos intradomiciliados, 4 capaces de colonizar la vivienda humana y de éstas, 11 son consideradas como vectoras importantes (Salazar-Schettino, 2001). En la parte centro y sur de México se localizan *T. barberi*, *T. dimidiata* y *Meccus pallidipennis*, especies consideradas como las más importantes, debido principalmente a su distribución, así como por la estrecha asociación con la vivienda humana (Salazar-Schettino, 2001).

Triatoma barberi es considerado el transmisor más importante de México y es endémico del país; se distribuye en 12 estados (Colima, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Tlaxcala y Veracruz). Su importancia como transmisor de *T. cruzi*, se debe a que se encuentra colonizando el interior del domicilio

con hábitos alimentarios nocturnos, tiene preferencia hacia la sangre de mamíferos y en raras ocasiones por la de aves; la defecación la efectúa durante la ingestión de la sangre y tiene un índice de infección natural aproximadamente del 30% (Salazar-Schettino, 2005).

Triatoma dimidiata es el transmisor que presenta la distribución mas amplia en México; fuera del país, se ha registrado desde el norte de Perú, Ecuador, Colombia, Venezuela, Costa Rica, Honduras, Nicaragua, El Salvador, Guatemala y Belice. En el país, se ha registrado en 16 estados de la República (Campeche, Chiapas, Guanajuato, Querétaro, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Estado de México, Quintana Roo, San Luís Potosí, Tabasco, Veracruz y Yucatán). Esta especie es predominantemente de hábitos intradomiciliados; sin embargo, en la península de Yucatán (Campeche, Yucatán y Quintana Roo) su hábitat es principalmente peridomiciliario. En condiciones de laboratorio, este triatomino defeca entre 20 y 30 min después de la alimentación (Salazar-Schettino, 2005)

Meccus pallidipennis se ha registrado en 11 estados de la república (Distrito Federal, Colima, Guerrero, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Puebla, Querétaro, Veracruz y Zacatecas); esta especie coexiste con *T. dimidiata*. *M. pallidipennis* lleva a cabo su ciclo de vida en el peridomicilio y accidentalmente invade la vivienda en busca de una fuente alimenticia cuando no la encuentra en el peridomicilio; por esta razón, se le ha denominado “transmisor visitante”. El tiempo de defecación es entre 10 y 15 min después de la alimentación (Salazar-Schettino, 2005).

Debido a que el parásito utiliza el lumen intestinal del insecto como ambiente de multiplicación y diferenciación, las interacciones que el parásito establece con su entorno podrían condicionar variaciones en su comportamiento biológico como virulencia y patogenicidad, entre otras.



Figura 5. Tres triatominos de importancia en México. Se muestran ejemplares hembra y macho de cada especie. **a)** *Meccus pallidipennis* distribuida en 11 estados de la República Mexicana. **b)** *Triatoma dimidiata* distribuida en 16 estados. **c)** *Triatoma barberi* distribuida en 12 estados del país (Fotografía cortesía BIOLPAR)

I.5 Reservorios

La infección por *Trypanosoma cruzi* es común entre mamíferos pequeños y marsupiales; se han registrado más de 100 especies de mamíferos pequeños infectados naturalmente con el parásito. En México, se han reportado como reservorios 18 especies naturalmente infectadas, *Didelphys marsupilis* (tlacuache), *Dasypus novemcinctus mexicanus* (armadillo), *Canis familiaris* (perro), *Rattus norvegicus* (rata noruega), *Felis domesticus* (gato), *Mus musculus* (ratón doméstico), *Sciurus vulgaris* (ardilla), *Bos taurus* (toro), *Sigmodon hispidus* (rata de algodón), *Otodylomys phyllotis* (ratón de campo), *Tyloma nudicatus* (ratón de árbol), *Carollia perspicillata* (murciélago frugívoro), *Liomys* sp. (ratón de campo), *Peromyscus* sp. (ratón de campo), *Phylander opossum* (marta), *Equus asinus* (burro), *Suis scrofa* (cerdo) y *Neotoma micropus* (ratón de campo); (Salazar-Schettino, 1997). La seroprevalencia de infección por *T. cruzi* reportada en reservorios varía entre 8% y 62% según la especie y región del país; estos estudios junto con los de los transmisores demuestran que la infección por este parásito es una zoonosis endémica en varias regiones del país (Dumonteil, 1999). Las aves son animales refractarios a la infección por *T. cruzi* debido a que el parásito es lisado por el complemento en la sangre aviar (Schofield, 1994).

I. 6 Mecanismos de transmisión

En el humano la infección por *T. cruzi* puede ser adquirida por diversos mecanismos los cuales se describen a continuación:

1. Vectorial o natural (Chagas rural)

La transmisión vectorial de *T. cruzi* al ser humano, es la forma natural de transmisión, ocurre a través de las heces del insecto hematófago infectado (transmisor) y depende de factores múltiples como la densidad de los transmisores, preferencia alimenticia, tiempo de defecación después de la ingesta de sangre y capacidad para eliminar junto con las heces un gran número de formas infectivas. Es el mecanismo de transmisión más importante en salud pública (Wendel, 1992).

2. Transfusión sanguínea (Chagas urbano)

La transmisión de *T. cruzi* por transfusión de sangre o de componentes sanguíneos, es conocido actualmente como *Chagas Urbano*. Este mecanismo de transmisión, debido a su importancia, es considerado como la segunda forma de adquirir la infección. Por otro lado, la migración humana de áreas endémicas a otras zonas, urbanas o no endémicas, esta aumentando el riesgo para adquirir la infección por esta vía condicionando que la infección extienda sus límites geográficos. En México, Salazar-Schettino (1989) reportó el primer caso de transmisión por transfusión sanguínea. A la fecha, en los bancos de sangre del país, se han reportado prevalencias que van de 0.28 a 17% (Dias, 1999; Manual de Laboratorio UNAM, 2006; Cabrera Bravo; 2004, Wendel, 1992).

3. Transmisión vertical materno-infantil (Chagas CONNATAL)

La transmisión vertical, a pesar de presentar bajas tasas de incidencia, por su importancia epidemiológica, representa el tercer mecanismo más importante de transmisión (Dias, 1999). Esta vía de transmisión fue descrita originalmente por Carlos Chagas en 1911. Se estima que aproximadamente el 1% de hijos de mujeres seropositivas, pueden resultar infectados, lo que sugiere que aproximadamente 8000 nuevas infecciones podrían presentarse anualmente en áreas endémicas. La infección más frecuente en los casos de transmisión vertical involucra la colonización de la placenta por el parásito y de ahí la posibilidad de infectar al feto. Existen otras circunstancias para que se lleve a cabo esta infección como puede ser la contaminación oral por deglución o aspiración de líquido amniótico y hemática durante el trabajo de parto (Wendel, 1992; Dias, 1999).

4. Transplante de órganos y tejidos

Teóricamente, la transmisión de *T. cruzi* puede ocurrir por el transplante de cualquier órgano o tejido de un donador infectado; sin embargo, la mayoría de los casos reportados han sido por transplante de riñón y en menor proporción de corazón, páncreas y médula ósea (Dias, 1999). La infección por transplante se exacerba por la terapia inmunosupresiva administrada al receptor del órgano (Wendel, 1992).

5. Transmisión oral

La transmisión oral de la enfermedad de Chagas es una forma rara de infección por *T. cruzi*. La contaminación de alimentos por heces de triatomíneos infectados, orina o secreciones de las glándulas anales de marsupiales (reservorios selváticos), es probablemente un factor importante en este tipo de transmisión. La existencia de algunos casos por esta vía indica que los parásitos son capaces de penetrar por la mucosa gástrica, a pesar de la presencia de ácidos gástricos (Cardoso, 2006; Camandaroba, 2002).

6. Accidentes de laboratorio

Desde 1938, en que se presentó la primera infección accidental de laboratorio en el Instituto Pasteur de París con una cepa proveniente de Oaxaca, México hasta 1999 se habían reportado cerca de 50 casos como resultado de accidentes de laboratorio. Estos casos, se deben generalmente a punción con agujas infectadas, salpicadura de heces de triatómino contaminadas o manejo de materiales de cultivo (Dias, 1999).

I.7 CUADRO CLÍNICO

En humanos, la historia natural de la enfermedad de Chagas es variable y se divide en tres fases: aguda, indeterminada y crónica. Las manifestaciones clínicas y los criterios diagnósticos son distintos en cada uno de ellas.

I.7.1 Fase aguda

Los hallazgos clínicos están relacionados con el sitio por donde penetra el parásito al organismo, sea a través de piel o mucosa, lo que genera una reacción inflamatoria local con linfadenitis regional aguda; este complejo primario se desarrolla después de un corto periodo de incubación (7 días) y dura aproximadamente un mes (Köberle, 1968); durante este tiempo, los tripomastigotes se encuentran en sangre periférica y también en fluido cerebroespinal en pacientes con infección aguda (Tanowitz, 1992). Cuando el parásito penetra por la conjuntiva ocular, se presenta edema bipalpebral unilateral, conjuntivitis y linfadenitis pre-auricular conocido como signo de Romana. Si el parásito penetra por piel, la lesión consiste en un nódulo de coloración rojiza a violácea, pruriginoso con crecimiento de los ganglios regionales (chagoma de inoculación) (Prata, 1994; Köberle, 1968).

En la fase aguda, la mayoría de los individuos presentan solo manifestaciones inespecíficas; sin embargo, niños, ancianos y con menor frecuencia adultos, pueden desarrollar síntomas severos después de un periodo de incubación de 7 a 14 días. Las principales manifestaciones sistémicas consisten en fiebre, taquicardia, linfadenopatía, hepato-esplenomegalia, náusea, vómito, anorexia y edema (Prata, 1994, Tanowitz, 1992). Aproximadamente el 1% de los individuos en fase aguda, mueren por complicaciones asociadas con miocarditis aguda o meningoencefalitis. La mayoría de los pacientes en fase aguda se recuperan satisfactoriamente en un periodo de 3 a 4 semanas. El diagnóstico se establece mediante frotis o gota gruesa, cultivo y xenodiagnóstico.

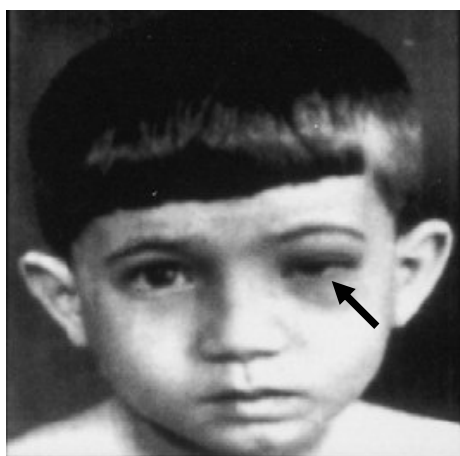


Figura 6. Signo de Romana, signo patognomónico de la fase aguda en la enfermedad de Chagas (flecha). En: Prata A. 2000. *Lancet Infectious Diseases*. 1: 92–100.

6.2 Fase indeterminada

La fase indeterminada es un periodo prolongado de silencio clínico que sigue a la primo-infección parasitaria. Esta fase tiene una duración entre 10 y 20 años y abarca el lapso comprendido después de la fase aguda y la aparición de lesiones características de la fase crónica. Los individuos infectados pueden albergar la infección durante años con escasa o nula sintomatología; presentan evidencias serológicas y/o parasitológicas de infección, permanecen asintomáticos y sin alteraciones electrocardiográficas o anomalías radiológicas cardíacas o del tracto digestivo. Existe un grado bajo de parasitemia debido a la lenta multiplicación intracelular de los parásitos, en asociación con anticuerpos generados por múltiples antígenos de *T. cruzi* (Andrade, 1999).

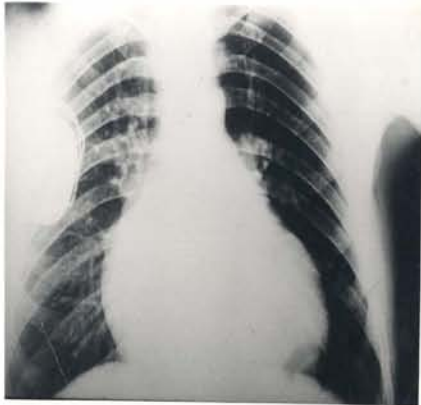
Se estima que aproximadamente el 30% de los individuos que presentan la fase indeterminada evolucionarán hacia la fase crónica con lesiones cardíacas, digestivas o neurológicas (Moncayo, 1997). En esta fase, los métodos de elección para el diagnóstico son los serológicos y debido a la escasa parasitemia, ocasionalmente el xenodiagnóstico o aislamiento del parásito en medio de cultivo.

6.3 Fase crónica

Los pacientes que evolucionan hacia la fase crónica, presentan manifestaciones relacionadas a órganos específicos como corazón, esófago, colon y sistema nervioso principalmente. El 27% de los infectados desarrollan lesiones cardíacas, el 6% digestivas (megacolon o megaesófago) y el 3% compromiso del sistema nervioso periférico (Moncayo, 1997). El megacolon y megaesófago se relacionan con la destrucción de los plexos nerviosos mientéricos. Estas patologías en casos extremos, pueden condicionar la muerte (Dutra, 2005).

Las lesiones cardíacas son progresivas y varían de ligeras a severas. Los casos más severos presentan alteraciones en la conducción del haz de His que se asocian a disrupciones contráctiles en el músculo cardíaco condicionando la miocardiopatía característica en la enfermedad la cual esta asociada con altas tasas de mortalidad (Dutra, 2005). Los métodos de diagnóstico de elección en la fase crónica se dividen en serológicos (ELISA, IFI, HAI) y de gabinete (rayos X, electrocardiografía, entre otros) (Wendel, 1992).

a)



b)

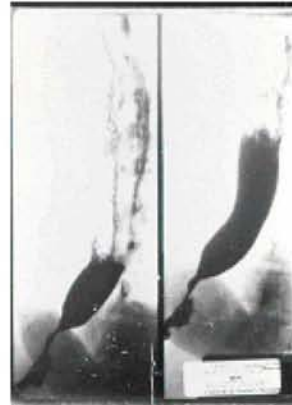


Figura 6. a) Miocardiopatía chagásica en un individuo masculino de 47 años de edad con insuficiencia cardíaca y cardiomegalia. b) Megaesófago chagásico en un paciente femenino de 26 años de edad (Cortesía: Dra. Salazar-Schettino).

a)



b)

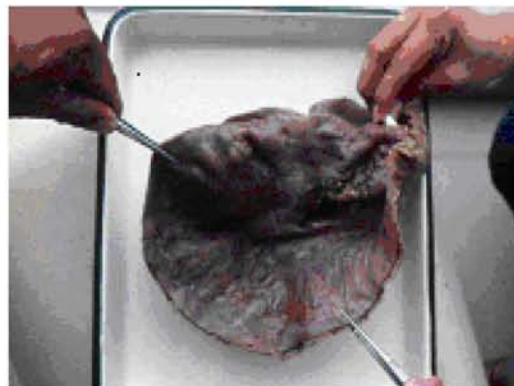


Figura 8. Megacolon chagásico en un paciente masculino de 51 años de edad, intervenido quirúrgicamente (Cortesía: Dra Salazar-Schettino).

1.8 PATOGENIA Y PATOLOGÍA

Se entiende por patogenia a los mecanismos mediante los cuales, el parásito produce lesión; estos mecanismos dependen de numerosos factores que intervienen en la evolución de la enfermedad. Los mecanismos principales se enlistan en la tabla 1.

Tabla 1. Patogenia de la enfermedad de Chagas. A) Factores dependientes del parásito. B) Factores dependientes del huésped.

A) Factores dependientes del parásito	B) Factores dependientes del huésped
Polimorfismo	Constitución genética
Tropismo	Edad
Virulencia	Raza
Constitución antigénica	Respuesta Inmunológica
Número de parásitos inoculados	Infecciones
Reinfecciones	Temperatura
Selección clonal	Estado nutricional
	Dieta

Las diferentes formas anatómo-clínicas de la enfermedad de Chagas están determinadas por el tropismo a diferentes órganos, intensidad del parasitismo, intensidad de la respuesta inflamatoria y evolución de la respuesta inmune (Tafari, 1999).

En la patología se presentan dos tipos de lesiones fundamentales: la inflamatoria y la neuronal; en ambas, la multiplicación de *T. cruzi* parece ser una consecuencia directa de la patología. La lesión inflamatoria está representada por una reacción multifocal progresiva, crónica llevando a la destrucción de miocardio y fibras nerviosas con la presencia de fibrosis (Hontebeyre- Juskowicz, 1992; Dutra, 2005).

Un rasgo patológico común observado en individuos infectados son la presencia de infiltrados inflamatorios de células mononucleares y la lisis celular. Estos mecanismos de control del parásito definen la patología acorde con el tejido involucrado, pudiendo afectar células musculares lisas o estriadas, neuronas o el sistema nervioso simpático y parasimpático (Texeira y Nascimento, 2006).

Se ha correlacionado la presencia de antígenos del parásito y la intensidad de infiltrados inflamatorios en corazones de individuos con la enfermedad. Antígenos del parásito o su

DNA han sido detectados en tejidos cardiacos con lesiones inflamatorias; sin embargo, la discrepancia entre la severidad de las lesiones observadas durante la fase crónica y la baja parasitemia en la circulación y en los tejidos sugieren que la respuesta inmunológica en lugar de responder contra del parásito pudiera estar condicionando el desarrollo de la patología. Esta idea ha dado lugar a numerosos estudios que evalúan el fenómeno de autoinmunidad en la patología, los cuales incluyen: a) presencia de anticuerpos y células autoreactivas, b) mimetismo molecular entre los componentes del huésped y del parásito, c) presencia de células mononucleares de individuos enfermos que pueden responder *in vitro* contra antígenos autólogos, d) presencia de poblaciones celulares relacionadas con fenómenos de autoinmunidad como ocurre con las células B CD5⁺ en individuos enfermos.

Por otra parte, los tripomastigotes presentan enzimas que pudieran contribuir a la patogenia y que corresponden a proteasas, gelatinasas y colagenasas. También han sido detectadas actividades proteolíticas contra la lamina y fibronectina. Estas enzimas pueden desempeñar un papel importante en la degradación de la matriz extracelular con la subsecuente invasión tisular (Tanowitz *et al*, 1992). Otras enzimas parasitarias que pueden causar daño celular y tisular son las trans sialidasas, las cuales remueven el ácido siálico de la superficie de células cardiacas y endoteliales; la pérdida del ácido siálico de estas células, altera la homeostasis de calcio intracelular y finalmente la función miocárdica (Tanowitz *et al*, 1992) .

T. cruzi presenta diversos tropismos produciendo patologías variadas; la razón de esto no ha sido explicado; se ha observado que el tropismo se relaciona con la distribución geográfica y su fuente de origen (domestica o selvática), de los diferentes aislados de *T. cruzi*. La caracterización de los aislados de *T. cruzi*, es esencial para explicar el papel que desempeñan en la patogénesis, presentación clínica y morbilidad de la enfermedad (Bongertz V, 1983; Devera, 2003).

I.9 DIAGNÓSTICO

En parasitología, los métodos de diagnóstico tienen como finalidad la detección y confirmación de individuos infectados o enfermos lo cual es de suma importancia para el adecuado manejo de estos pacientes. En la enfermedad de Chagas la presencia de formas parasitarias y/o anticuerpos anti- *T. cruzi* constituyen los elementos relevantes para el diagnóstico de laboratorio. Actualmente existen métodos de diagnóstico parasitológicos, inmunológicos y moleculares (Manual de laboratorio, UNAM 2002).

a) Métodos Parasitológicos

Los métodos parasitológicos son de elección para el diagnóstico en la fase aguda debido a que permiten demostrar la presencia del parásito en sangre. Estos métodos también son útiles en el diagnóstico de las formas transplacentaria y neonatal o en algunos casos atípicos o de difícil diagnóstico como son los adquiridos por vía transfusional o por trasplante de órganos (Manual de laboratorio, UNAM, 2002). Estos métodos incluyen el examen directo, la gota gruesa y el frotis sanguíneo y permiten observar al microscopio los tripomastigotes sanguíneos. Cuando se requiere incrementar la sensibilidad diagnóstica hasta en un 95%, se pueden utilizar métodos de concentración como el Strout y microhematocrito o métodos de amplificación del número de parásitos que incluyen el xenodiagnóstico, el hemocultivo y la inoculación de animales de laboratorio (Manual de laboratorio, UNAM, 2002, Tanowitz, 1992).

Los estudios histopatológicos y post-mortem son de utilidad para la búsqueda de amastigotes o lesiones histológicas compatibles, especialmente durante la fase crónica de la enfermedad (Manual de laboratorio, UNAM, 2002).

b) Métodos Inmunológicos

El diagnóstico serológico consiste en demostrar la presencia de anticuerpos específicos, particularmente de la clase IgG, generados por la infección por *T. cruzi*. Estos métodos son de elección en las fases indeterminada y crónica de la enfermedad.

Para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, la OPS/OMS recomienda el uso de las siguientes pruebas:

ELISA indirecta

Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Hemaglutinación Indirecta (HAI)

La OMS define para la confirmación del diagnóstico, demostrar reactividad en dos pruebas serológicas. El resultado positivo a una sola prueba serológica no constituye un criterio de diagnóstico suficiente (Manual de laboratorio, UNAM, 2002).

Actualmente se están identificando proteínas de *T. cruzi*. antigénicas, para producir proteínas recombinantes y péptidos sintéticos que puedan ser utilizados como candidatos útiles para el serodiagnóstico. Un gran número de secuencias de DNA que codifican proteínas que son específicamente reconocidas por el suero de individuos infectados han sido reportadas y en algunos casos, estas proteínas han sido evaluadas (Andersson, 2004; Tanowitz, 1992).

c) Diagnóstico molecular

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una metodología altamente sensible lo que puede ser de gran utilidad cuando el número de parásitos en circulación es muy bajo. Esta metodología se basa en la amplificación de ciertas secuencias repetidas del ADN nuclear y del cinetoplasto (nADN y kADN) y es de elección en individuos en fase indeterminada, crónica y en recién nacidos de madres infectadas. El diagnóstico por medio de PCR ha demostrado tener grados variables en cuanto a su eficacia. La utilidad de este procedimiento como un ensayo de rutina en estudios epidemiológicos y en bancos de sangre permanece en espera de ser aprobado por ser un procedimiento mas complicado y costoso que los requeridos en la serología convencional (Tanowitz, 1992; Virreina, 2003).

I.10 INMUNOLOGÍA

T. cruzi es susceptible de ser destruido por reacciones inmunológicas mediadas tanto por componentes de la respuesta inmune humoral como de la celular (Kierszenbaum, 1994; Bogitsh, 2005).

Durante la fase aguda, se presenta un incremento en la producción de IL-12 y en la actividad de células *natural killer* (NK). Se ha reportado que las células NK muestran actividad lítica en aislados virulentos de este parásito y que las células T citotóxicas pueden destruir células infectadas con *T. cruzi*. Investigaciones recientes han demostrado que el control temprano de la carga parasitaria es debido a la expresión de una respuesta Th1 en las células del bazo, mientras que el incremento de niveles de IL-12 e INF- γ , se relacionan con el inicio del daño tisular en la fase crónica de la enfermedad (Kierszenbaum, 1994; Bogitsh, 2005).

La presencia de anticuerpos específicos y la activación de fagocitos por INF- γ , son los elementos principales de la respuesta inmune en el huésped vertebrado infectado. (Bogitsh, 2005). Los mecanismos por los cuales el parásito es capaz de evadir la respuesta inmune son muy complejos y no completamente entendidos; existen varias teorías con el fin de explicar estos fenómenos que incluyen la complejidad y diversidad de receptores requeridos por el parásito para realizar la internalización celular; escapar de la lisis mediada por el complemento por tripomastigotes metacíclicos, polimorfismo antigénico (por ejemplo las proteínas SA85-1 de la superfamilia de las trans-sialidasas de superficie), expresión de varios antígenos inmunodeterminantes mimetismo antigénico, supresión de la liberación de INF- γ por linfocitos Th1, activación policlonal de células T y B y excesiva producción de TNF α (Tafari, 1999; Ouaisi, 2005).

I.11 HETEROGENEIDAD ENTRE AISLADOS DE *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi es una especie heterogénea que consiste en varias subpoblaciones que circulan entre vertebrados silvestres y domésticos además del huésped invertebrado. Variaciones intraespecíficas entre aislados de este parásito han sido observadas con base en: a) comportamiento biológico de diferentes aislados en animales de laboratorio, b) características bioquímicas, c) características moleculares de los aislados (Devera, 2003).

Las diferentes patologías que se pueden presentar en la enfermedad de Chagas han hecho necesaria la identificación de componentes proteicos o glucoproteicos presentes en diversos aislados que pudieran explicar algunas causas de esta diversidad, así como de identificar los mecanismos involucrados en la relación parásito-célula huésped en el mamífero y su relación con el transmisor (De Lima, 2001). El comportamiento biológico de los aislados de *T. cruzi* varía en cuanto a la virulencia y patogenicidad que se presenta *in vivo* en el modelo murino o huéspedes mamíferos y en la sensibilidad a los agentes quimioterapéuticos. Este comportamiento, está influenciado por factores ambientales e inmunológicos y una probable selección de aislados y clonas después de la interacción con el transmisor y el huésped vertebrado. Con base en esta diversidad de los aislados, se han propuesto tres biotipos (I, II y III) en la interacción parásito-ratón (Devera, 2003).

En México, Tay *et al* (1969) evaluaron el comportamiento en modelo murino de una cepa de *T. cruzi* aislada de *Triatoma phyllosoma mazzottii* mediante pases sucesivos usando tres especies diferentes del género *Triatoma* (*T. infestans*, *T. barberi* y *Meccus pallidipennis*) encontrando que cuando la cepa pasaba por *T. barberi*, producía mayor parasitemia tisular. En 1973, los mismos autores, publican los resultados obtenidos al estudiar el comportamiento de seis cepas de origen mexicano de *T. cruzi* aisladas de diferentes especies de triatomíneos y una de sangre humana, determinando el grado de parasitemia después de su aislamiento y correlacionando el porcentaje de nidos de amastigote en diferentes órganos con el grado de virulencia de la cepa.

Posteriormente en 1978, Salazar *et al* realizan un estudio comparativo de la patogenicidad de cuatro aislados de *T. cruzi*; una aislada de humano y tres a partir de deyecciones de *T. barberi* en un modelo murino, encontrando que los aislados que presentaron mayor virulencia fueron, el de origen humano y otro de *T. barberi* de la misma localidad donde se encontró el caso humano.

Mello *et al* (1996), realizaron un estudio en Brasil sobre el comportamiento diferencial *in vivo* e *in vitro* de tres cepas de *T. cruzi* en el intestino y hemolinfa de *Rhodnius prolixus* encontrando diferencias en la colonización del intestino del transmisor, así como en la composición de azúcares en las glicoproteínas de membrana al utilizar diversas lectinas. Esto podría indicar que las lectinas del intestino/hemolinfa y los carbohidratos en la superficie del parásito, podrían ser factores determinantes para la infección del transmisor.

Aguilar Díaz *et al* (2004) realizaron la caracterización de cuatro aislados obtenidos de cuatro especies de triatomíneos (*T. barberi*, *T. dimidiata*, *M. pallidipennis* y *T. mexicana*) encontrando que la aislada de *T. barberi* presentó mayor grado de virulencia.

La caracterización bioquímica de *T. cruzi* se ha basado en el uso de electroforesis de enzimas (perfil isoenzimático); se han realizado estudios en aislados de diferentes regiones de Brasil utilizando seis enzimas: Alanina aminotransferasa (ALAT), aspartato aminotransferasa (ASAT), glucofosfato isomerasa (GPI), glucosa 6 fosfato deshidrogenada (G6PDH), enzima málica (ME) y fosfoglucomutasa (PGM) determinando la existencia de dos grupos diferentes de aislados denominados Zimodemo 1 (Z1) y 2 (Z2). El Zimodemo 1 agrupa aislados de marsupiales y de triatomíneos silvestres y el Z2 agrupa aislados domésticos obtenidos de humanos y mamíferos domiciliados. Estudios adicionales muestran un tercer zimodemo (Z3), asociado también a los ambientes silvestres (Devera, 2003).

Tibayrene y Ayala (1988) analizaron el perfil enzimático de 645 muestras de *T. cruzi*; estas muestras variaron en su origen geográfico y fueron aisladas de una gran cantidad de triatomíneos y vertebrados. Se detectó una gran variabilidad genética y se identificaron 43 zimodemos distintos (Devera, 2003).

Con base a lo anterior, se ha estudiado la estabilidad de los perfiles enzimáticos y se ha observado que este no siempre es estable en aislados que hayan sido mantenidos en cultivo *in vitro* por largo tiempo (Devera, 2003).

Otras técnicas utilizadas con el fin de analizar diferentes aislados basándose en la extracción de ADN mitocondrial (kADN), ha sido el polimorfismo de longitud del fragmento de restricción (RFLP) o esquizodemos. Esta técnica se basa en la separación electroforética de fragmentos de restricción del kADN. A pesar de que estas secuencias son consideradas marcadores estables, la alta heterogeneidad de algunos aislados puede llevar a la obtención

de diferentes perfiles cuando estos se mantienen en animales de laboratorio o en cultivo *in vitro*, así como favorecer la selección de sub-poblaciones del parásito (Devera, 2003).

El análisis del DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD) en estos parásitos ha sido una herramienta útil para establecer relaciones genéticas entre aislados; a pesar de que se han evidenciado perfiles complejos individuales, cuando estos patrones son numéricamente analizados, se observa que *T. cruzi*, como taxón, puede ser dividido en dos grupos principales que corresponden a los principales linajes filogenéticos del parásito denominados *T. cruzi* I y II (Devera, 2003).

En México, son escasos los estudios al respecto; un estudio de análisis isoenzimático muestra que los aislados pertenecen al zimodemo 1 y de acuerdo al Simposio Internacional (1999), estos aislados podrían considerarse como miembros del grupo *T. cruzi* I (Hernández, 2001).

I.12 BIOQUÍMICA DEL PARÁSITO

Los lípidos en el epimastigote constituyen el 20.1% del peso seco; se ha determinado que del total de lípidos presentes en el parásito, el 35% son fosfolípidos y el 65% son lípidos neutros. Entre estos fosfolípidos, el más abundante es fosfatidilcolina (40%) seguido de fosfatidiletanolamina (28%), fosfatidilinositol (12%), esfingomiélin (4%) y en menores proporciones cardiolipina, ácido fosfatídico, lisolecitina y fosfatidilserina los cuales representan el 3% (De Souza, 1984).

Se ha demostrado por citoquímica ultraestructural que *T. cruzi* no posee una reserva de polisacáridos, el metabolismo endógeno en las formas de amastigote, se encuentra aparentemente sostenido por la utilización de lípidos y proteínas en lugar de carbohidratos. En contraste con *T. brucei* y *L. major*, el genoma del epimastigote de *T. cruzi* codifica enzimas capaces de catalizar la conversión de histidina a glutamato; las primeras dos enzimas en esta ruta son la histidina amonio-lias y la urocanato hidratasa. Estas enzimas son abundantes en los estadios presentes en el insecto y casi no detectables en los estadios presentes en el mamífero. Este patrón de expresión es notable debido a que la histidina es el aminoácido predominante en la hemolinfa y heces de los transmisores (p.e. *Rhodnius prolixus*). Este mecanismo para utilizar esta abundante fuente de energía es análoga al uso de prolina como fuente de energía por *T. brucei* (Brener, 1973; De Souza, 1984; Atwood, 2005).

La transición de tripomastigotes a amastigotes al parecer, se acompaña de un cambio drástico del metabolismo energético de carbohidratos a lípidos. Esto se ha demostrado por la aparente ausencia de transportadores de glucosa y la detección de enzimas que oxidan los ácidos grasos para obtener acetil-coenzima A; enzimas del ciclo del ácido cítrico, las cuales oxidan acetil-coenzima A produciendo bióxido de carbono y agua, siendo abundantes también en las formas de amastigote, las cuales parecen ser dependientes de gluconeogénesis para la síntesis de glicoproteínas y glicoinositolfosfolípidos (GIPLs) (Atwood, 2005).

Este parásito posee una gran diversidad de proteínas, las más representativas y estudiadas son las proteínas de superficie; en epimastigote, se ha determinado que entre el 43 y 55% de su peso seco, corresponde a proteínas.

La transformación de epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos se acompaña de la producción de un número de enzimas clave y sustratos importantes en la defensa antioxidante en *T. cruzi*. Las enzimas detoxificantes del H₂O₂ y el peroxinitrato, la ascorbato peroxidasa y la triperodoxina peroxidasa localizada en la mitocondria, se elevan después de la conversión del epimastigote al tripomastigote, así como la triparedoxina, el sustrato de la triparedoxina peroxidasa y las enzimas tripanotion sintasa y la fierro superóxido dismutasa, responsables de la síntesis de tripanotion y la conversión del anión superóxido a peróxido de hidrógeno respectivamente. Estos cambios son consistentes con la preadaptación de los tripomastigotes metacíclicos para resistir al estallido respiratorio por parte de las células fagocíticas en el mamífero. Otro cambio evidente en la transición de los epimastigotes a tripomastigotes es el decremento sustancial en la cantidad de proteínas ribosomales representadas en el proteoma del tripomastigote metacíclico, 37 de las 50 proteínas mas abundantes dentro del proteoma del epimastigote que no se detectan en el tripomastigote metacíclico son proteínas ribosomales. La reducción en la capacidad de síntesis proteica en este estadio es consistente con el hecho de que no es replicativo (Atwood *et al*, 2005).

La presencia de carbohidratos ha sido asociada principalmente con la membrana plasmática del parásito y en menor proporción con membranas intracelulares que forman el aparato de Golgi, el retículo endoplásmico y algunas vesículas endoplasmáticas. Por esta razón, los hallazgos bioquímicos de glicoproteínas o polisacáridos de *T. cruzi* pueden ser considerados como asociados a la membrana celular (Brener 1973; De Souza, 1984).

Pequeñas cantidades de polisacáridos inmunogénicos conteniendo galactosa, glucosa, manosa, xilosa y glucosamina han sido detectados en epimastigotes. (De Souza, 1984).

I.13 GENOMA DE *T. cruzi*

El taxón *T. cruzi* contiene dos grupos definidos: *T. cruzi* I y *T. cruzi* II. El primero se encuentra asociado a ciclos de transmisión rural e infección de marsupiales, mientras que el segundo consiste en 5 subgrupos denominados IIa, IIb, IIc, II d y IIe asociados a ciclos de transmisión domésticos e infección en mamíferos placentarios.

La secuenciación del genoma de *T. cruzi* se realizó a partir de la cepa CL Brener, la cual es un miembro del subgrupo IIe y que ha sido estudiada y caracterizada experimentalmente por diversos grupos de investigación. *T. cruzi* es heterocigoto en varios *loci* con pares de cromosomas homólogos de diferente tamaño. Se estima que el tamaño del genoma diploide de este parásito está entre 106.4 y 110.7 Mb. Con base en el análisis del haplotipo, se estimó que el genoma haploide de *T. cruzi* contiene aproximadamente 12, 000 genes (Tabla 2) (El-Sayed, *et al* 2005). De los genes que codifican proteínas, el 50.8% tienen una función putativa con base en la similitud a proteínas previamente caracterizadas o dominios funcionales conocidos (El-Sayed *et al* 2005).

Aproximadamente el 50% del genoma de *T. cruzi* consiste en secuencias repetidas, en su mayoría grandes familias de genes de proteínas de superficie, retrotransposones y repetidos subteloméricos. La familia más grande de genes codifica proteínas de superficie tales como las proteínas de superficie asociadas a mucina (MASPs), miembros de la super familia de las trans- sialidasas (TS), mucinas y la glicoproteína de superficie gp63 proteasa, que son específicas para *T. cruzi* y representan aproximadamente el 18% del total de genes que codifican proteínas. Existe también una gran familia de β - galactofuranosiltransferasas, las cuales reflejan el uso extensivo de los glicoconjugados en la membrana celular del parásito (Tabla 3) (El-Sayed *et al*, 2005).

Las regiones subteloméricas parecen estar enriquecidas en pseudogenes de retrotransposon hot spot (RHS), proteínas tipo TS y proteínas putativas de superficie DGF-1 (familia 1 de genes dispersos) (Kim, 2005, El-Sayed *et al*, 2005).

Los genes que codifican a varios componentes enzimáticos de reparación del ADN fueron identificados dentro del genoma de este parásito. En *T. cruzi* se encuentra un único homólogo de O-6 metilguanina alquiltransferasa para alquilación reversa y AlkB dioxigenasa para reparar el daño oxidativo. Sin embargo, este parásito no contiene un homólogo de

fotoliasa como *Leishmania major* o *T. brucei*, el cual probablemente sea necesario para la fotoreactivación (El-Sayed et al, 2005).

El ADN mitocondrial en tripanosomatidos es una estructura única, con una disposición de red. Esta estructura, conocida como ADN del kinetoplasto (kADN) se compone de miles de minicírculos y docenas de maxicírculos topológicamente interpuestos y replicados en un tiempo específico del ciclo celular. Además, se han encontrado múltiples ADN ligasas y helicasas. El genoma de este parásito no revela genes candidatos que codifiquen para una primasa mitocondrial, proteínas de unión a una cadena o factores de procesividad para la ADN polimerasa (El-Sayed et al, 2005)

Existe intercambio genético tanto en *T. brucei* como en *T. cruzi*; sin embargo, el proceso molecular involucrado en el intercambio genético ha sido poco estudiado. De los genes expresados únicamente durante la meiosis, 6 fueron identificados al ser suficientemente conservados para ser identificables en el genoma de eucariontes con meiosis obligada. En el genoma de este parásito, se identificaron homólogos para proteínas involucradas en la recombinación homóloga como SPO11, DMC1, MND1, MSH4 y MSH5 y HOP1, que es un componente del complejo sinaptonemal (El-Sayed et al, 2005).

Varias clases de moléculas importantes de señalización están ausentes en tripanosomatidos incluyendo, receptores de serpentina, proteínas heterotriméricas G, la mayor parte de receptores catalíticos, dominios de interacción SH2 y SH3 y factores reguladores de la transcripción. Se han encontrado receptores catalíticos siendo todos del tipo adenilato ciclasas (25 para *T. cruzi*). Además, los kinetoplastidos codifican para un gran complejo de proteína cinasas (PKs) así como una diversidad de proteína fosfatasas. Para el caso del genoma de *T. cruzi*, este codifica 167 PKs diferentes con aparente función catalítica así como 19 PKs atípicas. Estos parásitos también poseen múltiples enzimas involucradas en el metabolismo de fosfoinosítidos así como dominios moduladores. Poco se sabe acerca de su función (El-Sayed et al, 2005).

En comparación con *L. major* y *T. brucei*, *T. cruzi* muestra una gran expansión en varias familias de moléculas de superficie incluyendo las familias *Trans Sialidasa* (TS), mucinas, MASP y gp63 proteasa, que están codificadas por varios cientos de genes (Tabla 3) (El-Sayed et al, 2005). Esto es de gran importancia debido a que, en contraste con los tripanosomas africanos, *T. cruzi* no lleva a cabo mecanismos de variación antigénica y en su

lugar expresa en su superficie múltiples componentes de varias familias de moléculas; las que han sido mejor caracterizadas son las familias de las mucinas y las TS (Kim, 2005; El-Sayed *et al*, 2005; Atwood *et al*, 2005).

El genoma de *T. cruzi* contiene 1430 genes miembros de la superfamilia TS, incluyendo 693 pseudogenes. Estos genes pueden encontrarse en regiones subteloméricas repetitivas aunque pueden encontrarse en arreglos intracromosomales. El análisis de las secuencias de genes tipo TS localizados en los telómeros sugiere que las terminaciones cromosomales en este parásito pudieron haber sido el sitio de generación de nuevas variantes de gp85, una adhesina involucrada en la invasión de células de mamífero (Kim, 2005; El-Sayed *et al*, 2005).

El número de genes de la familia de las TS puede estar subestimado por el tipo de ensamblaje del genoma o por repetidos idénticos cercanos. Existen 725 genes que codifican proteínas similares a las TS sin actividad enzimática con grados variables de homología a las TS con actividad. Sólo 371 genes tienen un motivo conservado de la superfamilia sialidasa (VTVxNVxLYNR); la variabilidad significativa de esta secuencia sugiere una fuerte presión selectiva de esta familia de proteínas para diversificarse. Esta presión pudiera ser provista por la respuesta inmune por parte del mamífero infectado debido a que las TS son blanco tanto de la respuesta inmune humoral como de la mediada por células (El-Sayed *et al*, 2005).

Treinta de las 50 proteínas más abundantes detectadas exclusivamente en el tripomastigote sanguíneo son miembros de la familia TS. De igual forma, el amastigote y el tripomastigote metacíclico parecen expresar subconjuntos de moléculas TS únicas para cada uno de estos estadios mientras que no se ha detectado actividad de TS en el proteoma de los epimastigotes (Atwood *et al*, 2005).

Las mucinas representan otra gran familia de moléculas de superficie (863 miembros) y se dividen en dos subfamilias. La familia de 19 miembros TcSMUG, es relativamente homogénea y sus miembros son expresados en la forma de epimastigote. La subfamilia TcMUC, que es más grande (844 miembros) se encuentra en los estadios presentes en el mamífero (Tabla 3) (El-Sayed *et al*, 2005).

Otra gran familia específica para *T. cruzi*, son las proteínas MASP, denominadas así debido a que regularmente los genes que las codifican se encuentran corriente abajo de las TcMUC II. Estas proteínas se caracterizan por tener dominios N- y C- terminales conservados y un sitio de adición a glicosilfosfatidilinositol (GPI) lo que sugiere una localización superficial en este parásito. La región central de estas proteínas es altamente variable y a menudo contiene secuencias repetidas. De los 1377 genes *masp* identificados, 771 parecen estar intactos y codifican las regiones conservadas N- y C- terminales en tanto que 433 son pseudogenes (El-Sayed *et al*, 2005).

En el análisis realizado por Atwood *et al*, (2005) se identificaron nueve familias de proteínas del gen MASP. Este resultado sugiere que las MASPs son proteínas no expresadas tan abundantemente como las TS o que, como las mucinas, las MASP sufren modificaciones post-traduccionales que complican su detección. Los datos proteómicos de los 4 estadios de *T. cruzi* revelan que existen al menos cuatro genes *masp* distintos en tripomastigotes y otros en epimastigotes (Atwood *et al*, 2005).

La familia gp63 de metaloproteasas de superficie se encuentra presente en *T. brucei*, *L. major* y *T. cruzi* y ha sido implicada en virulencia, infección de la célula huésped y liberación de proteínas a la superficie del parásito. En el genoma se han encontrado más de 420 genes y pseudogenes; estos genes parecen estar dispersos a lo largo del genoma aunque en algunas ocasiones se presentan en grupos en tándem. La razón de la expansión masiva de esta familia de genes no es aún aparente (El-Sayed *et al*, 2005).

Tabla 2. Resumen de los genes que codifican proteínas en *T. cruzi* (El-Sayed *et al*, 2005)

Parámetro	Número
No. de genes modelo	23, 216
No. de genes	22, 570
Número de genes estimado por genoma haploide	~12, 000
Pseudogenes	3, 590
Contenido de G+C (%)	53.4
Densidad de Genes (genes por Mb)	385

Tabla 3. Grandes familias de genes en *T. cruzi*. Los miembros se enlistan como genes totales (los pseudogenes se encuentran entre paréntesis). *Lm*: *Leishmania major*, *Tb*: *Trypanosoma brucei* (El-Sayed *et al*, 2005)

Producto del gen	Miembros	Ortólogos en otros kinetoplastidos
Trans-sialidasa (TS)	1430 (693)	Tb
MASP	1377 (433)	No
Mucina	863 (201)	No
Proteína Retrotransposon hot spot (RHS)	752 (557)	Tb
Familia de genes dispersa de la proteína 1 (DGF-1)	565(136)	No
Proteasa de superficie (gp63)	425 (251)	Tb + Lm
Proteína tipo mucina	123	No
Hipotéticas	117	Lm + Tb
Hipotéticas	93	Lm + Tb
Cinecina, putativa	79	Lm + Tb
Proteína cinasa (grupo CMGC)	77	Lm + Tb
Proteína cinasa (varios grupos)	79	Lm + Tb
Proteína hipotética	42	No
Glicosiltransferasa	52	Lm + Tb
RNA helicasa (eIF-4a)	47	Lm + Tb
Proteína cinasa (grupo NEK)	39	Lm + Tb
Relacionadas a MASP	38	No
Glicosiltransferasa	36	Lm + Tb
Hipotética	35	Lm + Tb
Aminoácido permeasa	28	Lm + Tb
AAA ATPasa	33	Lm + Tb
Proteína fosfatasa	30	Lm + Tb
Proteína de choque térmico HSP70	21	Lm + Tb
Proteína cinasa (grupo STE)	25	Lm + Tb
RNA helicasa	23	Lm + Tb
Fosfatidilinositol fosfato cinasa-relacionada	23	Lm + Tb
Hipotética	24	Lm + Tb
Factor de Elongación 1- γ (EF-1- γ)	22	Lm + Tb
DNA helicasa (reparación DNA)	21	Lm + Tb
Relacionado a Actina	20	Lm + Tb
Cisteína peptidasa	20	Lm + Tb

I. 14 PROTEOMA DE *T. cruzi*

T. cruzi, como otros tripanosomatidos, regula la expresión proteica en primer lugar post-transcripcionalmente a través de variaciones en la estabilidad del mRNA o por la eficiencia del mRNA en ser traducido y en segundo, por modificaciones post-traduccionales las cuales juegan un papel importante en la modulación de la funcionalidad proteica en estos parásitos (Atwood *et al*, 2005; Parodi-Talice, 2004).

En particular, la proteomica es una herramienta útil para el estudio de proteínas expresadas por un organismo en un momento dado y bajo determinadas condiciones concretas de tiempo y ambiente. El identificar las isoformas de las proteínas por medio de electroforesis bidimensional es particularmente importante en *T. cruzi* debido a que el genoma contiene múltiples copias no idénticas de varios genes, incluyendo un gran número de familias de genes con cientos de miembros distintos. Aproximadamente el 30% (838 de 2784) de proteínas idénticas, incluyendo la mayor parte de proteínas documentadas previamente o que se espera que sean traducidas en gran abundancia, fueron detectadas en todos los estadios del ciclo de vida (Tabla 4) (Atwood *et al*, 2005).

Tabla 4. Principales familias de proteínas y clases funcionales de *T. cruzi* (Atwood *et al*, 2005).

Número de Proteínas Identificadas	
<i>Clases de Proteínas Funcionales</i>	
Ribosomales	212
Proteasoma/ Ubiquitina	67
Choque térmico/ Chaperoninas	61
Trascricional/Traduccional	49
Histonas	36
<i>Familias de genes</i>	
Trans-sialidasas	223
RHS	399
GP63	29
Cistein Proteasas	30
MASP	9
Mucinas	0
<i>Genes hipotéticos</i>	
Hipotéticos	155
Hipotéticos conservados	505
Hipotéticos no anotados	348

Actualmente se han realizado diversos estudios para caracterizar e identificar proteínas de *T. cruzi* para comprender algunos aspectos de la biología del parásito e identificar probables

blancos terapéuticos o moléculas que sean de utilidad en el diagnóstico diferencial de la enfermedad de Chagas; al respecto, se ha observado que la mayor cantidad de proteínas/glicoproteínas inmunodominantes se encuentran en la membrana del parásito y debido a que esta es el área de contacto más importante con el huésped, tiene especial interés, el estudio de las moléculas que la conforman (De Lima, 2001).

Snary *et al*, (1979, 1981) identificaron una glicoproteína de 90kDa presente en los tres estadios del parásito. Posteriormente identifica una glicoproteína de 72 kDa específica de epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos. Esta última, se encuentra glicosilada en un 52% con respecto al peso seco y los monosacáridos presentes corresponden a glucosamina, manosa, galactosa, glucosa y tres diferentes pentosas: fucosa, xilosa y ribosa. La inmunización utilizando esta proteína no fue protectora en el modelo murino contra la infección con *T. cruzi*. Estudios posteriores revelaron que los niveles de glicosilación de la gp72 difieren en diferentes aislados y que es el sitio aceptor en la membrana del epimastigote del factor C3 del complemento (Búa, 1990).

Nogueira *et al*, (1981, 1982) describieron una proteína de 75kDa con un punto isoeléctro (pI) de 7.2, también específica para los estadios que se desarrollan en el transmisor, siendo ésta diferente a la propuesta por Snary. Otro componente que se identificó fue de 90kDa con un pI de 5.0. en las formas que se encuentran dentro del vertebrado. Esta molécula esta constituida en un 19% por carbohidratos y posee baja capacidad inmunogénica.

Posteriormente Scharfstein *et al* (1983, 1986) describen una proteína de 25kDa de membrana en todas los estadios y en diferentes aislados del parásito, con buena reactividad inmunológica. Posteriormente identificó una glicoproteína de 57 kDa la cual es un producto primario de la gp25 y componente de otra proteína de 50 kDa.

Andrews *et al*, (1984) realizaron un mapeo de glicoproteínas de superficie por electroforesis bidimensional a partir de tripomastigotes y epimastigotes. Se identificaron dos proteínas, 90 kDa (pI 5.5 -6.5) y 80 kDa (pI 5.3 -6.3) con afinidad a Concanavalina A en tripomastigotes y epimastigotes. En la forma de epimastigotes se identificó una glicoproteína de 70kDa específica de este estadio, mientras que para el tripomastigote se identificaron varios componentes de superficie: 85kDa, pI 5.5; 85kDa, pI 5.0; 100kDa, pI 6.5, 120kDa, pI 6.3 y 68 kDa, pI 6.7; todos estos componentes contienen glucosa y/o manosa y la glicoproteína de 85kDa, pI 6.3-7.5 contiene N-acetil-D-glucosamina y/o ácido siálico (Tc-85). En estudios

posteriores se observó que la porción glicosilada de Tc85 contiene ácido siálico y se le identificó como el receptor a fibronectina con un papel importante en la interacción parásito-célula huésped.

Ferguson *et al*, (1985) identificaron 3 glicoconjugados de membrana de epimastigotes los cuales se encuentran estrechamente asociados, gp24, gp31 y gp37 y un lipopeptidofosfoglicano. Estas glicoproteínas presentan una composición poco común de aminoácidos con escasos residuos hidrofóbicos y están constituidas en un 56% por carbohidratos (w/w) con manosa, galactosa y glucosamina (probablemente N-acetil) presentes en cantidades similares.

En 1988, Fischer *et al*, purificaron una glicoproteína de 58/68 (en su forma reducida) que es uno de los receptores de fibronectina/ colágeno en las formas de tripomastigote. Esta proteína inhibe la unión del factor C3 de la vía alterna del complemento y no posee una actividad inhibitoria en la vía clásica del complemento por lo que provee al parásito de un mecanismo adicional para evadir la lisis mediada por la vía alterna del complemento en el humano.

Bucio *et al* (1999) estudian y comparan por SDS-PAGE y Western-blot, tres aislados de origen mexicano provenientes de dos transmisores de diferente especie y un tercero, aislado de un caso humano. En este trabajo se describieron once proteínas inmunodominantes con pesos moleculares entre 212 y 25 kDa; de estos, cinco (74, 44, 31, 25 y 18 kDa) no presentaron reactividad cruzada con *L. mexicana*, por lo que fueron propuestos para su empleo con fines diagnósticos en México.

Silber (2002) describió una glicoproteína con actividad de unión a galactosa de 67-kDa (LLGP-67) presente en los estadios de epimastigotes y tripomastigotes. Esta proteína se encuentra involucrada en la invasión celular por el reconocimiento de receptores celulares del huésped vertebrado: fue propuesta para ser empleada en el serodiagnóstico por su inmunogenicidad.

Parodi-Talice (2004) analizó 70 proteínas de epimastigotes, de las cuales 45, fueron identificadas; de estas, las tres más abundantes son tubulinas, seguidas de proteínas de choque térmico (HSP) y prostaglandinas F2 α sintasa (enzima capaz de reducir agentes tripanocidas o hidroperóxidos).

Paba *et al* (2004) realizaron un estudio proteómico de tripomastigotes, epimastigotes y amastigotes comparando amastigotes/tripomastigotes y epimastigotes/ tripomastigotes. De los 500 manchas obtenidos, 48 fueron detectados específicamente en el tripomastigote mientras que 39 sólo en amastigotes. Otros 27 fueron significativamente más intensos en tripomastigotes que en amastigotes mientras que 29 tuvieron una mayor expresión en amastigotes. Cuando se realizó la comparación entre los geles bidimensionales de epimastigotes y tripomastigotes se encontró que 10 eran estadio específicos y 44 eran más intensos. En epimastigotes, 20 proteínas fueron encontradas sólo en este estadio y 12 eran altamente expresadas en comparación con las otras formas del parásito. Al realizar el análisis de 80 manchas del tripomastigote, se identificaron 26 que correspondían a 19 proteínas. Entre las proteínas identificadas se encontraron HSP, factores de elongación, enzimas de la ruta glicolítica y algunas proteínas estructurales como la KMP 11, tubulina y la barra paraflagelar.

I.15 MEMBRANA DE *T. cruzi*

La superficie celular del parásito tiene dos componentes: la membrana plasmática y una capa formada por microtúbulos subpeliculares. A pesar de que se ha establecido que en la mayoría de células eucariontes los microtúbulos y los microfilamentos están asociados con la membrana plasmática, en ningún otro tipo celular existe una asociación tan fuerte como en los tripanosomátidos (De Souza, 1984).

La membrana de *T. cruzi* posee propiedades adicionales a las que normalmente se encuentran asociadas a las membranas celulares. Estas propiedades incluyen la presencia de receptores para unión y penetración de las células del huésped vertebrado, la habilidad de sobrevivir en ambientes hostiles dentro del tracto intestinal del insecto vector y la resistencia al sistema inmune del huésped (Snary, 1985). La supervivencia del parásito dentro de estos ambientes requiere de una abundante cubierta de glicoproteínas y glicolípidos, transportes de membrana menos abundantes, enzimas de superficie y receptores que son llevados a la superficie celular por medio de una invaginación especializada en la membrana plasmática, denominada bolsillo flagelar. Este bolsillo flagelar, parece ser el mayor sitio de exocitosis de glicoproteínas, proteoglicanos y glicolípidos, que en conjunto forman la cubierta “protectora” de estos parásitos (McConville, 2002).

Los métodos utilizados para obtener proteínas de la membrana plasmática incluyen, previo a su purificación, sonicación, cavitación con nitrógeno y homogenización en presencia de detergentes no-iónicos. El método seleccionado para la obtención de proteínas determina el producto final incluyendo el tipo de detergente utilizado. En específico la sonicación, es un método que permite recuperar el flagelo del parásito con las membranas adheridas (Snary, 1985).

La mayor parte de proteínas destinadas a la superficie del parásito o de sus lisosomas, se ensamblan inicialmente en el retículo endoplásmico (RE). En tripanosomatidos de rápida división, el RE puede llegar a ser hasta del 60% de las membranas internas (McConville, 2002). Estudios citoquímicos, junto con microscopía electrónica, muestran que el glicocalix esta presente en todos los estadios del ciclo de vida. Este glicocalix es de aproximadamente 15 nm de espesor en los tripomastigotes sanguíneos y de 5 nm de espesor en amastigotes y epimastigotes (De Souza, 1984). La membrana del epimastigote está constituida

generalmente por 31% de proteínas, 34% de lípidos, 16% de carbohidratos y 9% de esteroides con un alto contenido de ésteres de esteroles (Snary, 1985).

Los componentes de superficie de la membrana del parásito se encuentran anclados a la capa fosfolipídica de la membrana por medio de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Los carbohidratos se encuentran presentes en la superficie membranal en todos los estadios del ciclo de vida (De Souza, 1978).

Las moléculas de superficie más abundantes en el epimastigote y el tripomastigote metacíclico son una pequeña familia de glicoinositolfosfolípidos (GIPLs) tipo 1 y una familia de glicoproteínas tipo mucina O-glicosiladas ancladas a GPI. (De Lima, 2001; Ferguson, 1997) Los GIPLs forman un glicocalix denso inmediatamente adyacente a la membrana, con las mucinas proyectándose fuera de esta capa. Las anclas de GPI de mucinas son relativamente simples; sin embargo, hay un cambio en la estructura de lípidos cuando los epimastigotes se diferencian en tripomastigotes metacíclicos. Los GPI de epimastigotes contienen exclusivamente *sn*-1-álquil-2-acilglicerol, mientras que los de metacíclicos contienen cerca del 70% de ceramidas (Ferguson, 1997).

El núcleo polipeptídico de estas glicoproteínas tipo mucinas tiene una longitud de 50-200 aminoácidos y sus secuencias son ricas en residuos de Ser y Thr, los cuales son sitios aceptores para la adición de oligosacáridos. Los carbohidratos representan el 60% de la masa molecular de las mucinas, confiriéndoles un fuerte carácter hidrofóbico y probablemente una conformación extendida. Consistente con esto, los residuos de Cys, Phe, Trp y Tyr se encuentran poco representados o ausentes. En epimastigotes se ha calculado que existen $\sim 4 \times 10^6$ moléculas de mucina por célula (MacRae, 2005; Buscaglia, 2006).

La enzima que inicia la ruta de la O- glicosilación es responsable de la propiedad distintiva de las mucinas de *T. cruzi*. Esta enzima transfiere N- acetilglucosamina (GlcNAC) de un precursor UDP-GlcNAC al grupo hidroxilo de los residuos de Ser o Thr, siendo preferencialmente unidos a residuos de Thr mientras que glicosiltransferasas ortólogas en otros organismos (inclusive el triatomino) transfieren N-acetilgalactosamina.

La estructura de los oligosacáridos, la porción GlcNAC permanece no sustituida, mientras que el resto es posteriormente elongado por adición de Gal β , Gal f en una configuración

tanto piranósica como furanósica y varios enlaces indicando la participación de varias glicosiltransferasas. Los residuos terminales de β -galactopiranosil sirven como receptores de ácido siálico (Buscaglia, 2006; Previato, 1998).

Se ha postulado que la actividad de TS le permite a *T. cruzi* compensar la deficiencia de síntesis *de novo* de ácido siálico, catalizando la transferencia de residuos de ácido siálico α 2-3 – unidos del sustrato donador (glicoconjugados del huésped mamífero) a la posición 3-O de unidades de β -D- galactopiranosil con terminación no reductora de la superficie parasitaria. El mayor aceptor de ácido siálico son las mucinas de *T. cruzi* y *T. carassii*, y el ancla de GPI de prociclinas de los estadios procíclicos de los tripanosomas africanos. En todos estos casos, la integración de ácido siálico a las moléculasceptoras de superficie es crucial para la invasión celular, viabilidad y propagación del parásito (Previato, 1994; Ferguson, 1997; Buscaglia, 2006).

A pesar de que hay diferencias intra- específicas en las estructuras de los carbohidratos, evidencias estructurales e inmunológicas sugieren que la presencia de galactofuranosa está restringida a cepas de *T. cruzi* del grupo I. Este hecho tiene una significancia epidemiológica debido a que los humanos no producen glicoconjugados que posean galactofuranosa y por lo consiguiente montan una fuerte respuesta inmunológica contra estos. Además los anticuerpos dirigidos a epítopes de galactofuranosa que están presentes en las mucinas de *T. cruzi*, inhiben la invasión del parásito (Buscaglia, 2006).

Las mucinas de los parásitos presentes en los estadios que habitan en el insecto transmisor se identifican en geles de poliacrilamida como dipletes o tripletes en un rango entre 35 y 50 kDa y presentan una composición y estructura de aminoácidos y carbohidratos similar. La única diferencia estructural encontrada entre las mucinas de epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos reside en el ancla de GPI, la cual cambia parcialmente de alquil-glicerol a ceramida respectivamente.

Las mucinas de 35- 50 kDa desempeñan un papel protector contra las proteasas que se encuentran presentes en el tracto digestivo del insecto vector, particularmente en el estadio de epimastigote (Buscaglia, 2006).

En los tripomastigotes metacíclicos, las mucinas desempeñan funciones adicionales en los procesos de adhesión e invasión de las células de mamíferos. Además, las mucinas de

tripomastigotes metacíclicos pueden desencadenar la movilización de Ca^{2+} en la célula huésped, proceso asociado con las primeras etapas de invasión del parásito.

La diversidad antigénica a nivel intraespecífico es importante cuando se considera la superficie parasitaria, pero no en las proteínas que intervienen en el metabolismo (Búa, 1990). Las propiedades de la membrana de *T. cruzi* difieren entre cada estadio del ciclo de vida. Estas diferencias se ven reflejadas en la variación en la sensibilidad al complemento. Respecto a lo anterior, se ha evidenciado que existen glicoproteínas estadio específicas comunes en diferentes cepas; sin embargo, se han reportado variaciones en la composición de glicoproteínas tipo mucina en epimastigotes de diferentes aislados así como entre diferentes estadios de un mismo aislado de *T. cruzi* (De Lima, 2001).

II. JUSTIFICACIÓN

La heterogeneidad de aislados de *Trypanosoma cruzi*, hace necesaria la identificación y caracterización de proteínas o glucoproteínas presentes en diferentes aislados para identificar aquellas relacionadas a características como virulencia o patogenicidad, o bien, moléculas que sean compartidas entre diferentes aislados para ser utilizados en el diagnóstico o inmunoprofilaxis. La aplicación de estrategias proteómicas en la investigación de microorganismos patógenos, como *T. cruzi*, ha permitido evidenciar algunas de estas moléculas, así como establecer comparaciones entre los diferentes estadios dentro del ciclo de vida del parásito, lo que está permitiendo comprender algunos aspectos biológicos así como su potencial utilización con fines diagnósticos o terapéuticos (De Lima, 2001, Parodi-Talice, 2004; Atwood, 2005).

A la fecha, se han realizado numerosos estudios sobre caracterización de aislados de *T. cruzi*, con base en aspectos biológicos, bioquímicos, inmunológicos y moleculares que están permitiendo comprender algunos de los mecanismos intrínsecos que se llevan a cabo en la relación parásito-célula huésped así como de la presentación y desarrollo de patologías que se pueden presentar durante la historia natural de la enfermedad; al respecto, se ha evidenciado que cepas provenientes de diversos vectores muestran diferencias biológicas en modelo murino con respecto a la carga parasitaria en sangre y factores de patogenicidad y virulencia (Tay, 1969; Salazar-Schettino, 1978).

T. cruzi presenta un ciclo de vida complejo que alterna entre huéspedes vertebrados y el triatomino, con diferentes formas en cada uno y probablemente, las interacciones entre el insecto y el parásito determinan características de los aislados, que inciden en su virulencia, patogenicidad e inmunogenicidad. En el presente trabajo se utilizaron extractos proteicos de epimastigotes de tres aislados. Estos aislados presentan diferencias en la parasitemia y crecimiento en medios de cultivo (Aguilar-Díaz, 2004). Debido a que México presenta una gran biodiversidad de triatominos (Carcavalho, 1999), esto es de suma importancia para entender la relación entre el parásito, el huésped invertebrado y su comportamiento biológico en el mamífero.

En México existen pocos estudios de caracterización biológica y bioquímica de aislados regionales de *T. cruzi*, por lo que es importante identificar las características

que influyen en la presentación clínica que muestran diferentes aislados en el país dado que se ha evidenciado la relevancia de componentes de aislados regionales para el diagnóstico de esta enfermedad en comparación con aislados de procedencia sudamericana, los cuales son menos reactivos ante sueros de origen mexicano (Bucio, 1999).

III. HIPÓTESIS

Si se han observado diferencias en el comportamiento biológico y de reactividad inmunológica de aislados provenientes de diversos vectores de *Trypanosoma cruzi*; entonces, se podrían esperar diferencias en las moléculas presentes en los diferentes aislados.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Identificar, comparar y caracterizar 3 glucoproteínas extraídas de tres aislados de *Trypanosoma cruzi* de origen mexicano provenientes de tres especies de triatomíneos con el fin de determinar diferencias que expliquen las divergencias en su comportamiento biológico.

Objetivos Particulares:

- Analizar los patrones electroforéticos de proteínas en extractos de tres aislados de *T. cruzi*
- Identificar las proteínas inmunodominantes
- Identificar las moléculas inmunodominantes sin cruce inmunológico con *L. mexicana*
- Determinar la reactividad inmunológica ante las fracciones proteica o glicosídica de los extractos
- Identificar las proteínas/glucoproteínas “diferenciales” entre los tres aislados
- Identificar las proteínas glicosiladas
- Determinar por cromatografía de gas la composición de monosacáridos totales en los extractos
- Comparar cualitativamente la composición de carbohidratos mediante afinidad con lectinas
- Determinar 3 proteínas inmunodominantes para su análisis mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF)

V. MATERIAL Y MÉTODOS

V.1 MATERIAL BIOLÓGICO

V.1.1 Microorganismos

Se emplearon tres aislados de *Trypanosoma cruzi* obtenidos a partir de tres especies de triatomíneos naturalmente infectados procedentes de diferentes estados de la república (tabla 4); los ejemplares fueron colectados por el personal del Laboratorio de Biología de Parásitos de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Tabla 4. Aislados de *Trypanosoma cruzi* utilizados en este estudio

Aislado	Triatomino	Estado y Localidad	Año de aislamiento
Querétaro (Qro)	<i>Triatoma barberi</i>	La Cueva, Querétaro	1986
Tequesquitengo (Tq)	<i>Meccus pallidipennis</i>	Tequesquitengo, Morelos	1992
Xalapa (Xal)	<i>Triatoma dimidiata</i>	Xalapa, Veracruz	2003

V.1.2 Mezcla de sueros de humano reactivos a *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania mexicana*

Los sueros humanos anti-*T. cruzi* fueron proporcionados por el laboratorio de Biología de Parásitos de la Facultad de Medicina de la UNAM y los reactivos a *Leishmania mexicana*, proporcionados por la Dra. Ingeborg Becker del Laboratorio de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM.

V. 2 Cultivo de los parásitos

El cultivo de parásitos se realizó en medio LIT (Liver Infusion Tryptose Medium) (Camargo, 1964) suplementado con hemina (5mg/ml) y enriquecido con suero fetal de bovino al 5% (GIBCO) en matraces de vidrio con tapón de rosca los cuales después de ser inoculados fueron incubados a 28°C y fueron revisados cada tercer día durante 15 días. Para definir las fases de crecimiento para cada uno de los aislados se cuantificó el número de parásitos cada 24 h durante 30 días para construir las curvas de crecimiento correspondientes. La cosecha se realizó al inicio de la fase estacionaria para asegurar un mayor porcentaje de formas de epimastigote.

V.3 Obtención de los extractos proteicos

Para la obtención de los extractos proteicos se siguió la metodología descrita por Bucio *et al* en 1999.

- a) Cosecha, lavados y cuantificación de la masa parasitaria. Los parásitos fueron cosechados por centrifugación a 2,500xg durante 20 min a 4°C (Sorvall RT 6000D); se realizaron cinco lavados con amortiguador de fosfatos (PBS) pH 7.2 (KCl 2.7 mM, KH₂PO₄ 1.7 mM, NaCl 138 mM y Na₂PO₄12H₂O 8.12mM, c.b.p 1000ml). El sobrenadante en cada paso fue desechado y finalmente, se pesaron las masas parasitarias obtenidas de los tres aislados.
- b) Las masas parasitarias fueron resuspendidas en una solución de TrisHCl 50mM (pH 7.4) con CHAPS (3-[(3-colamidopropil) dimetil amonio]-1-propansulfonato) 10mM (Sigma) en presencia de una mezcla de inhibidores de proteasas al 5% (AEBSF 23mM, EDTA 100mM, Bestatina 2mM, Pepstatina A 0.3mM, E-640.3mM) (Sigma).
- c) La lisis y ruptura de los parásitos se realizó mediante un procesador ultrasónico (Vibra Cell VC50) sometiendo la suspensión parasitaria a 7 pulsos de sonicación a 40 watts durante 60 segundos con intervalos de enfriamiento en hielo-etanol.
- d) Los extractos obtenidos, fueron centrifugados a 43 000xg a 4°C durante 60 min (Sorvall RC 26 Plus); se recuperaron los sobrenadantes y para su conservación y mantenimiento fueron separados en alícuotas de 500 µl en microtubos tipo eppendorff -20°C hasta su uso.

V. 4 Cuantificación de proteínas por método de Lowry

Las proteínas totales de cada extracto se cuantificaron por el método de Lowry modificado (Lowry *et al*, 1951) (Kit comercial Bio Rad RC DC). Las reacciones se realizaron en placas de poliestireno de 96 pozos con fondo plano (Costar). Para las determinaciones, se construyó una curva patrón con albúmina sérica bovina (BSA SIGMA) (1mg/ml) con rango entre 0.125 y 1 mg; las muestras fueron diluidas con H₂O destilada para obtener concentraciones dentro del rango de concentración proteica de los estándares. Se colocaron 5µl por pozo de los estándares y muestras por triplicado. Debido a que las muestras contenían detergentes, por cada ml de reactivo A (Bio-Rad) se agregaron 20µl de solución S (Bio-Rad) adicionando 25 µl a cada pozo. Posteriormente se agregaron 200 µl de Solución de Folin (Bio-Rad) y se dejó incubar durante 15 min. Las muestras fueron leídas en un espectrofotómetro para placas

(Microplate reader Bio-Rad Modelo 550) a una longitud de onda de 690nm. Los resultados de la curva patrón fueron graficados, se obtuvo la regresión lineal y por medio de la ecuación de la ordenada al origen ($y=mx+b$) se calcularon las concentraciones de las muestras en cada caso.

V. 5 Determinación de carbohidratos totales por método de Dubois (Fenol-Sulfúrico)

La concentración de carbohidratos totales se determinó por el método de Dubois (fenol-sulfúrico) (Dubois, 1956) construyendo una curva patrón con glucosa en concentración de 100mg/ml (Sigma) en un rango entre 20 y 100mg/ml en un volumen de 1 ml; se tomó una alícuota de las muestras, las cuales fueron diluidas con H₂O destilada para obtener una dilución dentro del rango de concentración de los estándares en un volumen total de 1ml. Posteriormente se agregó 1ml de Fenol al 5% y se agitó durante 1 min; se adicionaron 4 ml de H₂SO₄ concentrado en frío. Se agitó durante 1 min y se determinó la densidad óptica en espectrofotómetro (Pharmacia LKB Ultrospec Plus) a una longitud de onda de 490nm. Los resultados de la curva patrón fueron graficados, se obtuvo la regresión lineal y por medio de la ecuación de la ordenada al origen ($y=mx+b$), se calcularon las concentraciones de las muestras en cada caso.

V.6 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)

La separación de las proteínas por peso molecular se realizó por electroforesis en una dimensión en condiciones reductoras en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil-sulfato de sodio (SDS) (Laemmli, 1970). Para realizar la electroforesis en un gel de 8 x 10 x 0.75 mm, se prepararon los geles separadores a diferentes porcentajes 7.5, 10, 12 y 15% en volúmenes de 7.45 ml, mezclando acrilamida/ bisacrilamida (30%/0.8%) (1.87, 2.5, 3 y 3.75 ml respectivamente), amortiguador Tris 1.5 M (Tris [hidroximetil] aminometano) (Bio-Rad) pH 8.8 (1.875 ml), SDS (Sigma) al 10% (75 µl), H₂O destilada (3.6, 3, 2.5 y 1.75ml respectivamente) y los catalizadores para polimerizar el gel, persulfato de amonio (Bio-Rad) al 10% (37.5µl) y TEMED (Bio-Rad) (2.5µl). Para 1.7 ml de gel concentrador al 5%, se mezclaron acrilamida/ bisacrilamida (30%/0.8%) (212.5 µl), amortiguador Tris 0.5 M (Bio-Rad) pH 6.8 (200 µl), H₂O destilada (1.137ml) y los catalizadores para polimerizar el gel, persulfato de amonio (Bio-Rad) al 10% (7.75 µl) y TEMED (0.8 µl). Después de preparar los geles, se dejaron “madurando” por lo menos 1 h, después de lo cual se colocaron las muestras

en cada pozo. La corrida electroforética se llevó a cabo en un voltaje (V) constante de 150V/≈1.5 h ó 100V/≈2 h en un equipo Mini-Protean II Electrophoresis Cell (Bio-Rad). Para la preparación de la muestra se utilizó el amortiguador de muestra de Laemmli (Bio-Rad) V/V sometándose a ebullición en baño maría durante 5 min. Los marcadores de peso molecular utilizados (Precision Plus Protein, Bio-Rad), constaban de 10 proteínas de 10, 15, 20, 25, 37, 50 75, 100, 150 y 250 kDa. Se utilizó amortiguador de corrimiento constituido por Trizima base 0.025 M (Bio-Rad), Glicina 0.192 M (Sigma) y SDS al 0.1%, pH 8.3. Los geles fueron fijados en una solución de metanol, H₂O, ácido acético en proporción de 5:4:1, para realizar tinción con azul de Coomassie; para teñir con nitrato de plata R, se utilizó metanol al 50% y para teñir con proQ Emerald, metanol, H₂O, ácido acético en proporción 50:45:5.

V. 7 Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida

El análisis de las proteínas por su punto isoelectrico (pI) y peso molecular se realizó basándose en el sistema de electroforesis bidimensional de O'Farrel (1975) con algunas modificaciones. A las muestras de proteínas de los extractos proteicos obtenidas en Tris HCl-CHAPS y en presencia de cocktail de inhibidores de proteasas, se les añadió 1 volumen de amortiguador de lisis [BL: urea ultrapura (GIBCO BRL) 9.5M, NP-40 (Sigma) 2% (v/v), β-mercaptoetanol (Sigma) 5%(v/v), mezcla de anfollinas (Bio-Rad) 2% (v/v)], se alicuotó y se guardaron a -20°C hasta su uso. Para los experimentos se utilizaron varias mezclas de anfollinas de pH: 3-10/; 5-7/6-8/3-10 (relación 1:2:1).

V.7.1 Primera dimensión por isoelectroenfoco (IEF)

Los geles de acrilamida para realizar el IEF se prepararon en tubos de vidrio de 2 x 1560mm, marcados a los 130mm y sellados con Parafilm™ en un extremo. Para preparar el gel se hizo una mezcla con 5.5 g de Urea ultrapura, 1.33 ml de acrilamida/bisacrilamida (Bio Rad) 30%, 2 ml de H₂O bidestilada, 2 ml de NP 40 10%, la mezcla se agitó suavemente y ocasionalmente se calentó a 36°C en baño maría y se desgasificó durante 3-5 min. A continuación se agregaron 0.5 ml de la mezcla de anfollinas (6-8/5-7/3-10; 5-7/3-10; 3-10) (Bio-Rad) y los catalizadores, 10 µl de Persulfato de Sodio al 10% y 7 µl de TEMED. La mezcla se vació a los tubos de y se dejó polimerizar durante 2 h. Posteriormente la urea se retiró y se le pusieron 20 µl de BL. Se utilizó un tubo por cada muestra y dos controles sin muestra, se montaron en la cámara para IEF (GIBCO BRL) y se añadió H₃PO₄ 0.01 M en la cámara inferior (polo

+) (eliminando las burbujas atrapadas entre los geles y el amortiguador) y NaOH 0.02 M en la cámara superior (polo -) sin romper las fases, en ambos casos los amortiguadores fueron desgasificados por 2 h. Los geles fueron preenfocados a 200V/30 min, 400V/ 45 min y 600V/ 45min. Después de esto se retiró el NaOH y el BL de la parte superior de los tubos y se pusieron las muestras. Encima de las muestras se pusieron 20 µl de solución urea-anfolinas urea 4.5 M, anfolinas 1% y azul de bromofenol (ABF) al 5% (p/v)] y encima el amortiguador de corrida (NaOH 0.02 M) cuidando de no romper las fases durante la operación de carga. Los geles se enfocaron a 600V/≈16h y 800V/≈2hr, suficiente para acumular ≈12 000V/h.

Para recuperar los geles después del IEF, a cada tubo se le conectó una jeringa de 20 ml mediante una manguera de Tygon acoplada al diámetro del tubo para empujar el gel suavemente sin romperlo. Los geles se equilibraron en amortiguador TGS (Tris 1 M, Glicerol, SDS 20%, β-mercaptoetanol, H₂O bidestilada) durante 15-30 min y se corrieron inmediatamente en la segunda dimensión o se conservaron a -20°C hasta su uso. Los dos geles enfocados sin muestra, se cortaron en fracciones de 5 mm, cada fracción se puso en H₂O bidestilada, se incubaron por 30 min a TA con agitación constante y se midió el pH de la solución con un electrodo.

V.7.2 Segunda dimensión en SDS-PAGE

El gel separador para la segunda dimensión, se preparó al 12% y el gel concentrador plano al 4% (sin carriles individuales) sobre el cual se puso horizontalmente el gel tubular donde se corrió la primera dimensión, colocando el lado ácido (+) del gel del lado izquierdo y el básico del lado derecho (-), inmovilizándolos con agarosa de bajo punto de fusión (Gibco BRL) preparada al 1% en amortiguador TGS con ABF al 0.1%. Como control se pusieron del lado izquierdo del gel, marcadores de peso molecular (Precision Plus Protein, Bio-Rad) consistente de 10 proteínas con un rango de 10 a 250kDa, inmovilizados en pequeños bloques de agarosa de bajo punto de fusión-TGS. Los geles se corrieron a 45V durante ≈16 h (O'Farrel, 1975; Adams, 1989).

V.8 Tinción de proteínas con nitrato de plata

La tinción de las proteínas separadas por SDS-PAGE ó 2D con nitrato de plata, se hizo por el método de reducción de AgNO₃ (Wray *et al*, 1981; Heukeshoven y Dernik, 1985). Después de la electroforesis, el gel se fijó en metanol al 50% por lo menos 30 min y se incubó en etanol al 70% durante 30 min con dos cambios. Para teñir las

proteínas en el gel, se prepararon las siguientes soluciones: Sol A. 0.8g de AgNO_3 (Merck), esta solución se protegió de la luz; Sol B. 21 ml de NaOH (Merck) al 0.36%, 1.4 ml de NH_4OH (Merck) 14.8 M; Sol C (mezcla de la solución A con la B). El gel se incubó en Solución C durante 15 min en agitación suave, se lavó con H_2O bidestilada 3 veces durante 5min y se reveló en una solución de ácido cítrico- formaldehído (2.5 ml de ácido cítrico al 1% y 0.25ml de formaldehído al 38%, H_2O bidestilada) durante el tiempo necesario (5-10 min) hasta la aparición de bandas o manchas cafés. La reacción se detuvo con una solución metanol, H_2O , ácido acético (5:4:1).

V.9 Tinción con pro Q Emerald (glicoproteínas)

La tinción de las proteínas glicosiladas separadas por SDS-PAGE, se realizó con proQ Emerald 300 (Steinberg, 2001). Los geles fueron fijados con metanol 50%- ácido acético 5% en dH_2O durante 45 min en agitación (2 ciclos); se realizaron 2 lavados con ácido acético glacial al 3% en dH_2O durante 20 min, los geles se incubaron en 500 ml de solución oxidante (ácido acético al 3%- ácido periódico) durante 30 min y se lavaron en tres ocasiones con 500 ml de la misma solución empleada anteriormente durante 20 min. Los geles se incubaron en 200 ml de la solución de tinción pro-Q Emerald 300 (Multiplex Proteomics) durante 2 h en agitación y posteriormente se lavaron en dos ocasiones durante 20 min. Las glicoproteínas fueron visualizadas utilizando una excitación máxima a 280nm y una emisión máxima de 530nm.

V. 10 Tinción con Sypro Ruby (proteínas)

Después de la detección de las glicoproteínas con Pro Q Emerald, los geles fueron teñidos con Sypro Ruby (Multiplex Proteomics) (Berggren, 1999; Steinberg, 2000) ya que éste, es un colorante compuesto de rutenio y un complejo orgánico que interactúa no covalentemente con las proteínas; al ser un compuesto orgánico de metales de transición que se une por mecanismos electrostáticos, es ultrasensible y luminiscente. Las proteínas fueron fijadas nuevamente en metanol 50%- ácido acético 7% en dH_2O durante 30 min en agitación (2 ciclos); posteriormente fueron lavados con agua ultrapura durante 10 min en tres ocasiones; los geles se incubaron en la solución de tinción Sypro Ruby durante toda la noche en oscuridad y agitación constante; se lavaron en 2 ocasiones en una solución 10% metanol -7% ácido acético durante 30 min. Las proteínas fueron detectadas a una excitación máxima de 280/ 450nm y a una emisión máxima cercana a los 610 nm.

V. 11 Análisis de Imágenes de geles en una y dos dimensiones

Las imágenes de los geles en una dimensión fueron obtenidas utilizando un equipo ChemiDoc™ XRS (Bio-Rad) y los pesos moleculares de las proteínas de los 3 extractos se determinaron utilizando el programa Quantity one (Bio-Rad).

Las imágenes de los geles en dos dimensiones fueron capturadas con un scanner GS-800 (Bio-Rad) y analizadas utilizando el programa PDQuest Versión 8.0 (Bio-Rad); después de escanear la imagen, se filtró el ruido de fondo para aclarar la imagen y así evidenciar los manchas y crear los puntos 3-D Gaussianos virtuales; se realizó la verificación visual de los manchas automáticamente al comparar la imagen obtenida con la del gel original. Como resultado se obtuvieron tres imágenes separadas por gel de cada aislado: la original del gel bidimensional, la filtrada y la Gaussiana. Los ensayos se realizaron por triplicado a partir de geles de experimentos independientes.

La cuantificación de los manchas, el análisis de su densidad y distribución, fueron analizados en la imagen Gaussiana y a partir de éstos parámetros se evaluó el índice de variación entre los geles de cada aislado para poder ser comparados entre sí.

Las imágenes Gaussianas de los triplicados fueron superpuestas automáticamente creando un Gel Maestro por aislado y así poder realizar las comparaciones de las proteínas presentes en cada aislado. El programa identificó tanto los manchas que coincidieron como los que no entre los tres aislados; por otra parte, se superpusieron los Geles Maestros de los tres aislados para identificar las proteínas comunes entre estos.

V.12 Electrotransferencia de proteínas a membranas de Nitrocelulosa

Para realizar la detección de proteínas y sus carbohidratos, se realizó transferencia de las proteínas separadas por electroforesis en una o dos dimensiones a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad ó Hybond ECL de Amersham Biosciences) de 0.45µm (Towbin, 1979) para lo cual se siguieron dos protocolos:

1. Geles en una dimensión: después de la corrida electroforética, los geles fueron incubados en amortiguador de transferencia (BT) (Tris-Base 0.025 M, Glicina 0.192 M, Metanol al 20%, H₂O bidestilada c.b.p. 1000ml pH 8.3) durante 30

min; la transferencia se realizó usando corriente constante, a 12V por 45 min en un aparato Trans-Blot SD SemiDry Tranfer (BIO-RAD).

2. Para geles bidimensionales, después de la corrida electroforética, las proteínas fueron incubadas en BT 1X (Stock 8X: Tris- Base 25 mM, 24.22 g/l y glicina 192mM, 115.36 g/l; se prepararon 6 l de BT 1X mezclando 600 ml de Stock 8X, 1200 ml de metanol, 4 200 ml de H₂O bidestilada), durante 15-30 min. A continuación, el gel se colocó en el bastidor de la cámara de electrotransferencia (Gibco BRL). El "sandwich" se sujetó con los soportes respectivos, se colocó inmediatamente dentro de la cámara de electrotransferencia con los polos positivo y negativo correctamente orientados. Las proteínas se electrotransfirieron usando corriente constante a 400mA durante 3-4 h o 100mA durante 12-16 h a 4°C.

Después de la transferencia, las membranas se conservaron a -20°C hasta su uso.

V. 13 Western-blot

Después de la transferencia, la membrana se bloqueó con leche descremada al 5% (DIFCO), disuelta en amortiguador en TBS pH 7.4 (20 ml de Tris HCl 1M (Sigma), 140mM de NaCl (JT Baker) en H₂O destilada) con Tween 20 al 0.1% (Sigma), durante 2 h a TA.

La inmunogenicidad de las proteínas presentes en los extractos se determinó por medio de Western-blot (Towbin *et al*, 1979). Después de bloquear la membrana se realizaron tres lavados rápidos con TBS /Tween 20 (0.01%) y se incubaron los sueros reactivos a *T. cruzi* y *L. mexicana* en dilución 1:150 cuando fueron revelados con 3-3'Diaminobenzidina (DAB) y a 1:20, 000 cuando fueron reveladas con el reactivo de quimioluminiscencia ECL (Amersham Biosciences), disueltos en leche descremada (DIFCO) al 5% preparada en TBS/ Tween 20 (0.1%), con agitación constante durante toda la noche a 4°C. Se realizaron cinco lavados con TBS/Tween 20 (0.1%) en agitación ligera durante 10 min cada uno a temperatura ambiente y posteriormente se incubó con el segundo anticuerpo [anti IgG humana conjugado a peroxidasa (Zymed)] en dilución 1:15 000 en leche 5%- TBS -Tween 20 (0.1%) durante 2 h a temperatura ambiente. Al término se realizaron 10 lavados con TBS/Tween 20 (0.1%) en agitación ligera, durante 10 min cada uno, a temperatura ambiente. Para el revelado con 3-3'DAB se colocó como sustrato una solución de TBS (50ml), 3-3'DAB (25mg), H₂O₂ al

30% (25µl). La reacción se frenó con H₂O destilada a los 5 min. Cuando se utilizó el reactivo de quimioluminiscencia, las membranas fueron incubadas en la solución de detección (ECL Western blotting detection reagents; Amersham Biosciences) durante 1 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, las membranas de nitrocelulosa fueron expuestas a placas de autoradiografía (Kodak) durante 2 min; el revelado de estas placas se realizó con solución reveladora X-O- Mazt y fijadora (Kodak) en oscuridad.

V. 14 Oxidación de carbohidratos con Metaperiodato

Después de la transferencia del gel, la membrana fue lavada con TBS pH 7.4 durante 10 min a temperatura ambiente o a 4°C 12 h. La membrana fue incubada en 30 ml de periodato de sodio 10mM (Sigma) disuelto en acetato de sodio (Sigma) 100 mM / EDTA (Sigma) 5 mM pH 5.5 en oscuridad durante 20 min a temperatura ambiente o 4°C 12 h (Woodward et al, 1985). La membrana fue lavada 3 veces con TBS/Tween 20 (0.01%) durante 10 min a temperatura ambiente. La membrana se bloqueó con leche al 5% (DIFCO), TBS/Tween 20 (0.1%) durante 2 h a temperatura ambiente. Después de bloquear la membrana se realizaron tres lavados rápidos con TBS pH 7.4 / Tween 20 0.01% y se incubaron los sueros reactivos a *T. cruzi* en dilución 1:20, 000 en leche descremada (5%)/TBS/Tween20 (0.1%) en agitación constante durante 12 h a 4°C. Se realizaron cinco lavados con TBS/ Tween 20 (0.1%) en agitación ligera durante 10 min cada uno a temperatura ambiente y posteriormente se incubó con el segundo anticuerpo [anti IgG humana conjugado a peroxidasa (Zymed)] en dilución 1:15 000 en leche descremada (5%)/ TBS / Tween 20 (0.1%) durante 2 h a temperatura ambiente. Al término se realizaron 10 lavados con TBS/Tween 20 (0.1%) en agitación ligera durante 10 min cada uno a temperatura ambiente. Las membranas fueron incubadas en la solución de detección (ECL Western blotting detection reagents; Amersham Biosciences) a temperatura ambiente; transcurrido este tiempo, las membranas de nitrocelulosa fueron expuestas a placas de autoradiografía (Kodak) durante 2 minutos. El revelado se realizó de la forma descrita anteriormente.

V. 15 Composición de carbohidratos

La composición de carbohidratos de las glucoproteínas de los extractos de *T. cruzi* fue analizada mediante cromatografía de gases mediante métodos estándar (Zanetta et al., 2001). Los extractos proteicos de los tres aislados de *T. cruzi* fueron dializados contra agua destilada durante 48 h a 4°C. Las muestras fueron sometidas a un

proceso de hidrólisis con metanol/HCl 5 N durante 24 h a 100°C. Las muestras se dejaron enfriar y fueron neutralizadas con AgNO₃, pH 6.0. Posteriormente las moléculas fueron reacetiladas con anhídrido acético en oscuridad absoluta durante toda la noche y se procedió a extraer los ácidos grasos con heptano. La muestra fue secada con una corriente de N₂, resuspendida en piridina y se realizó la derivación de los alditoles liberados con trifluoroacético. El análisis de los derivados trifluoro-acetil alditoles fue realizada en un cromatógrafo de gases mod. Varian 2100 (Orsay, France) equipado con un detector de flama.

V. 16 Ensayos con lectinas

Después de la transferencia del gel, la membrana fue bloqueada con albúmina sérica bovina (ASB) al 5% (SIGMA), TBS pH 7.4/Tween 20 (2%) durante 1h a temperatura ambiente (Towbin, 1979). Después de bloquear la membrana se realizaron tres lavados rápidos con TBS pH 7.4/Tween 20 (2%) y se incubaron con las siguientes lectinas como se muestra en la tabla 5 (Sharon, 1989).

Tabla 5. Afinidad de las lectinas utilizadas en el estudio.

Lectina	Abreviación	PM (kDa)	Afinidad
<i>Cannavalia ensiformis</i>	Con A	26	α-D-Man, α-D-Glc
<i>Maackia amurensis</i>	MAA	35 – 40	Neu5Ac α-2,3-Gal/GalNAc
<i>Sambucus nigra</i>	SNA	36 – 38	Neu5Ac α-2,6-Gal/GalNAc
<i>Amaranthus leucocarpus</i>	ALL	35	Galβ-1,3GalNAcα-1,0-Ser/Thr
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	MRL	19	Neu5,7,9Ac2
<i>Triticum vulgare</i>	WGA	36	N-acetil β-D-glucosamina

Todas las lectinas se utilizaron en dilución 1:25 000 en TBS / Tween20 (2%) en agitación constante durante 3 h a TA y 9 hrs a 4°C. Se realizaron cinco lavados con TBS – Tween 20 al 2% en agitación ligera durante 10 min cada uno a TA. En el caso de ConA y WGA, las lectinas estaban conjugadas a peroxidasa y las membranas fueron inmediatamente reveladas con la solución de detección (ECL Western blotting detection reagents; Amersham Biosciences) durante 2 min a temperatura ambiente; transcurrido este tiempo, las membranas de nitrocelulosa fueron expuestas a placas de autoradiografía (Kodak) y se revelaron de la forma descrita anteriormente. En el

caso de MAA, SNA, ALL, MRL y MEA, las membranas fueron incubadas con estreptovidina conjugada a peroxidasa (Pierce) a una dilución 1:10 000 durante 2 h a TA. Se realizaron cinco lavados con TBS – Tween 20 al 2% en agitación ligera durante 10 min cada uno a TA. Las membranas fueron reveladas con la solución de detección (ECL Western blotting detection reagents; Amersham Biosciences) durante 2 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, las membranas de nitrocelulosa fueron expuestas a placas de autoradiografía (Kodak) y se revelaron de la forma descrita anteriormente.

V. 17 Análisis Proteómico

a) MALDI-TOF

Después de la electroforesis en una dimensión, las bandas conteniendo las fracciones de proteína, fueron retiradas del gel con una hoja de bisturí y sometidas a cortes con 0.05 mg de tripsina en 500 µl de bicarbonato de amonio, pH 8.0 por 24 h, 37°C. La actividad enzimática fue inhibida colocando la mezcla a 2° C por 4 h. La enzima y la muestra digerida fueron secadas por evaporación usando un Gyrovap (Howe, Londres) y preparadas mezclando directamente en la matriz 1 ml del producto de reacción (50 pM) y 1 ml de ácido 2,5-dihidroxibenzoico. La mezcla se dejó cristalizar a temperatura ambiente. Los iones positivos de los péptidos fueron detectados por su tiempo de vuelo, en un espectrofotómetro de masas Visión 2000 (MALDI-TOF, Finnigan MAT Bremen, Germany) equipado con un lector UV a 337 nm. Los espectros de masa fueron determinados en modo reflectrón bajo 8 keV de voltaje de aceleración y detección positiva. Como controles se usaron muestras con solo Tripsina para identificar sus péptidos que forman el fondo del experimento y Angiotensina como estándar (Mr 296.7). Las masas de los iones fueron comparadas los de la base de datos UniProtKB/TrEMBL (Expasy)

VII. RESULTADOS

VI.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

El análisis de las proteínas en los extractos proteicos, se realizó mediante SDS-PAGE a diferentes porcentajes de poliacrilamida. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie R-250 y analizados con el programa Quantity One. Los patrones de proteínas obtenidos mostraron similitudes entre los tres extractos, identificando un total de 15 proteínas entre 150 y 14 kDa, con pesos moleculares de: 150, 90, 81, 67, 51, 45, 40, 31, 28, 27, 24, 22, 18, 15 y 14 kDa (Fig. 9). La región entre 37 y 50 kDa presentó proteínas con mayor abundancia, a diferencia de las proteínas de alto peso molecular cuya abundancia es menor (Fig. 9A, 9B y 9C). Cabe resaltar que en los geles utilizados al 12% se resolvió la mayor cantidad de componentes,(15 bandas) a comparación de el de 10% donde se resolvieron 12 proteínas entre 17 y 90 kDa (Figura 9B) y los de 7.5 (Figura 9C) y 15% (Figura 9D) donde se identificaron 8 y 12 proteínas respectivamente. Por esta razón, los geles del 12% fueron seleccionados para experimentos posteriores (Fig. 9C).

VI.2 Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida

Se realizaron geles bidimensionales a diferentes combinaciones de anfollinas y posteriormente teñidos con azul de Coomassie R-250. La combinación de anfollinas óptimo, debido a que fue donde se resolvió la mayor cantidad de proteínas fue el de 3 a 10. Los patrones de proteínas abundantes en 2D mostraron mucha similitud entre los tres extractos (Fig. 10) con pocas proteínas de alto peso molecular y como en las electroforesis realizadas en geles de una dimensión, la mayor parte de las proteínas se encuentran entre 20 y 50 kDa y en un rango de pI de 5 a 6.5 en todos lo casos.

VI.3 Tinción de proteínas con nitrato de plata

Los perfiles de proteínas en 2D teñidos con plata mostraron mucha similitud entre los tres extractos (Fig. 11) con excepción de algunas proteínas en la región entre 20 y 15 kDa y pI 4.6 a 4.9, las cuales estuvieron presentes en el Extracto de Querétaro (Fig. 11 A, flecha) y Xalapa (Fig. 11 C, flecha) y ausentes en el de Tequesquitengo (Fig. 10 B). La mayor parte de las proteínas se encuentran entre 50 y 20 kDa y en un rango de pI de 5 a 6.5.

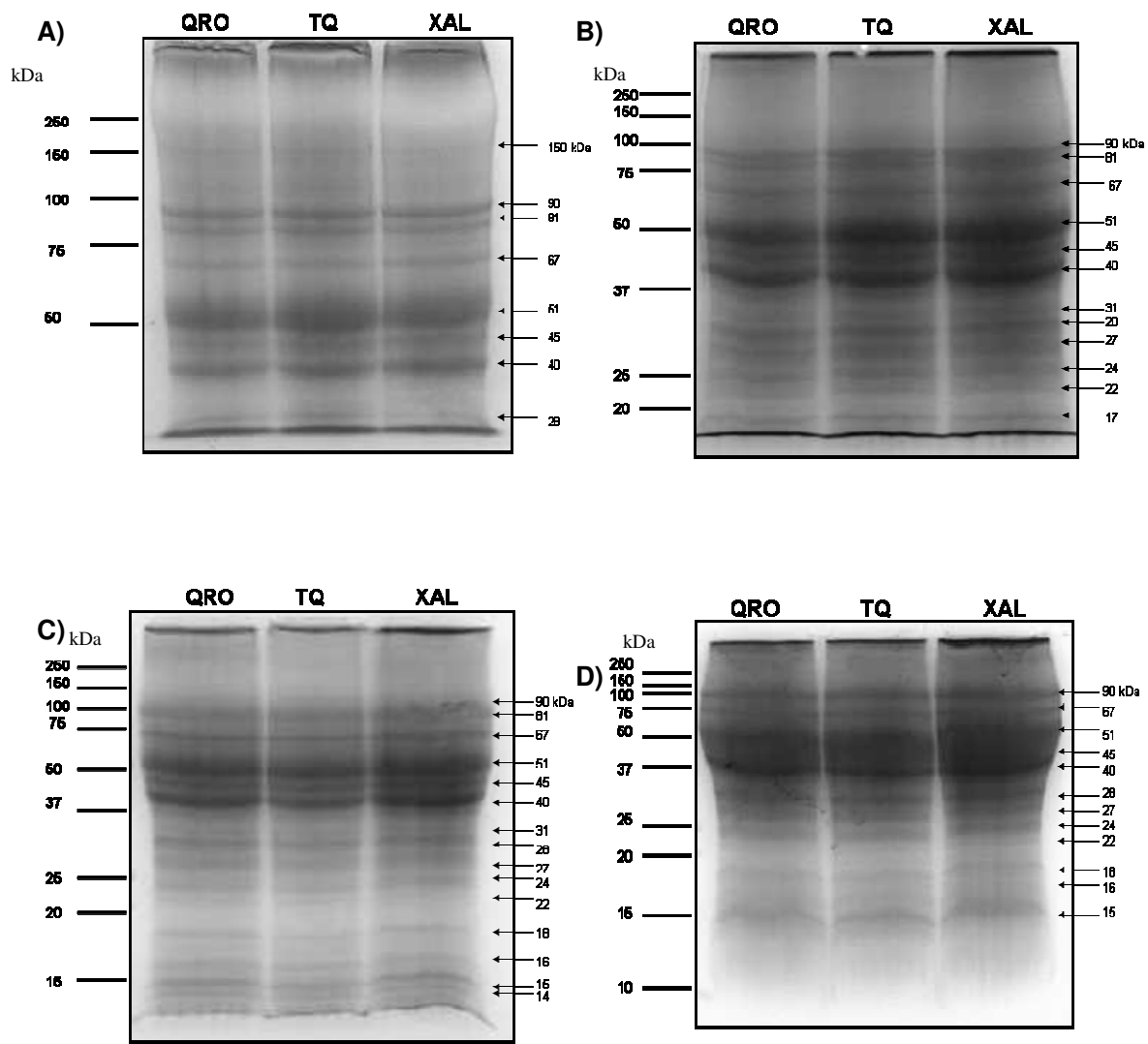


Figura 9. SDS-PAGE de los extractos proteicos. La electroforesis se corrió con 200µg de proteína de cada muestra por carril. **(A)** PAGE-SDS al 7.5%; **(B)** PAGE-SDS al 10%; **(C)** PAGE-SDS al 12%; **(D)** PAGE-SDS al 15%. QRO: Querétaro, TQ: Tequesquitengo, XAL: Xalapa.

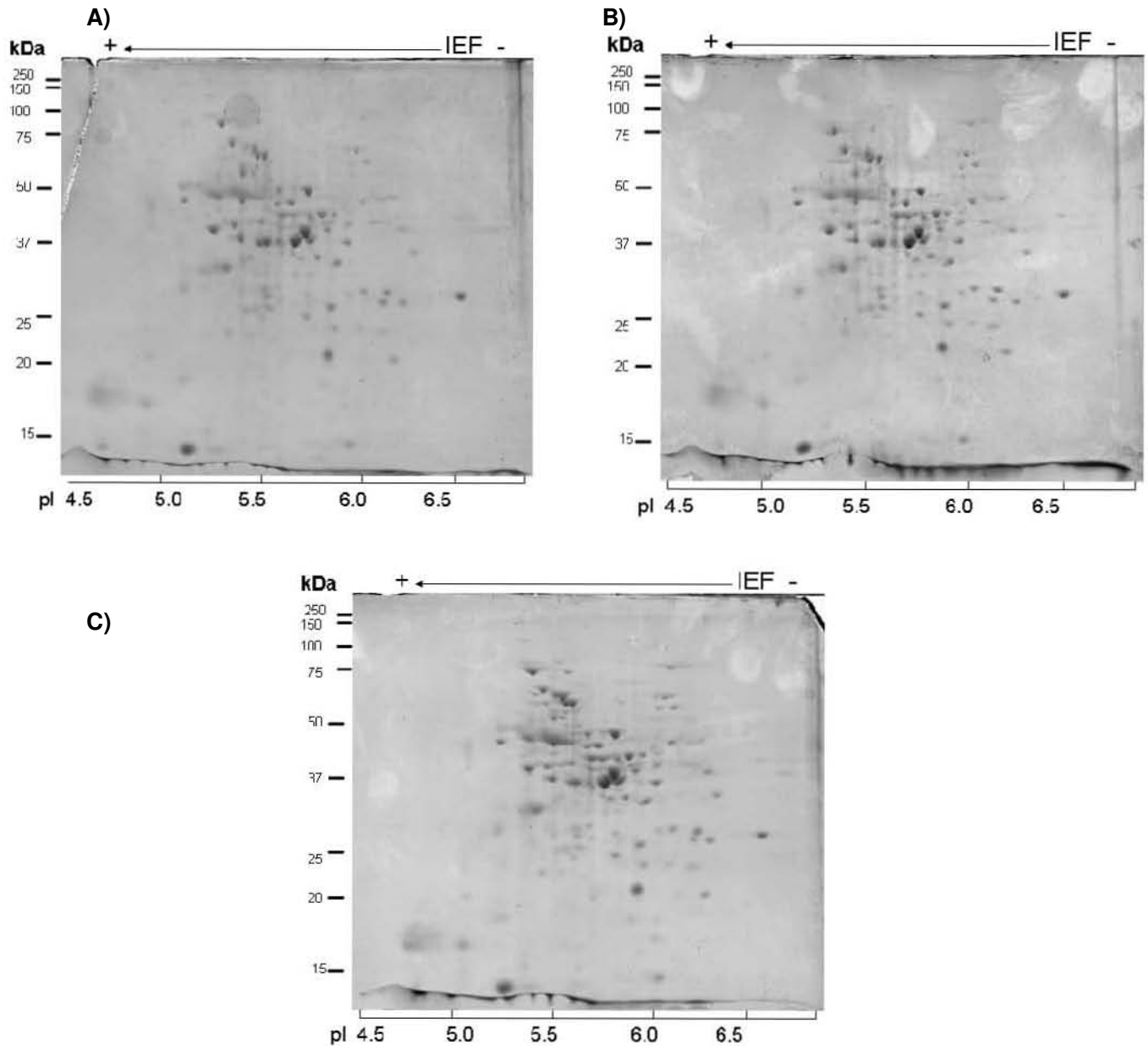


Figura 10. Análisis de las proteínas de tres extractos proteicos. Se utilizaron 700µg de proteína. La primera dimensión se corrió en un rango de pH de 3 a 10 y la segunda dimensión en PAGE-SDS al 12%. Los gels fueron teñidos con azul de Coomassie R-250. A) Extracto de Querétaro; B) Extrato de Tequesquitengo; C) Extracto de Xalapa.

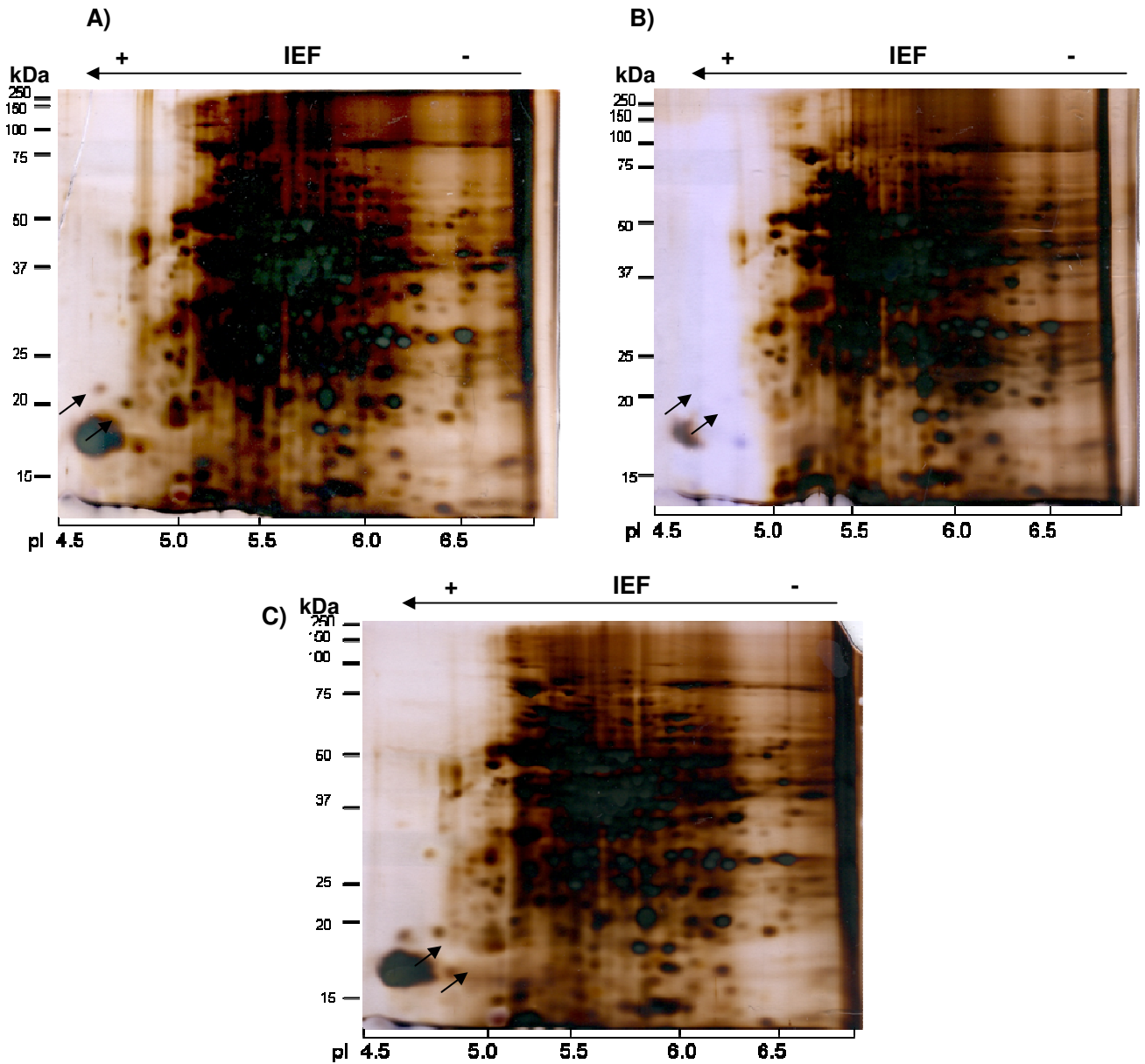


Figura 11. Análisis de las proteínas de tres extractos protéicos de *T. cruzi*. Se utilizaron 700µg de proteína. La primera dimensión se corrió en un rango de pH de 3 a 10 y la segunda dimensión en PAGE-SDS al 12%. Los geles fueron teñidos con plata. A) Extracto de Querétaro; B) Extrato de Tequesquitengo; C) Extracto de Xalapa.

VI. 4 Análisis de Imágenes de geles en 2D

Los geles en 2D teñidos con azul de Coomassie R-250 fueron analizados por triplicado utilizando el programa PDQuest. Se comparo el número de “manchas” identificados y densidad de los mismos para determinar el coeficiente de variación para cada extracto. En todos los casos fue menor al 30%. El patrón de proteínas obtenido en 2D fue analizado y se obtuvo una imagen gel Maestro para cada extracto (Fig 12). Se identificaron para Querétaro 309 manchas (Fig 12A), para Tequesquitengo 284 manchas (Fig 12B) y 296 para Xalapa (Fig 12C). Las proteínas más abundantes se encuentran en un rango de 75 y 25 kDa y un rango de pI de 5.0 a 6.5 en todos los casos.

Por otra parte, para poder identificar las proteínas abundantes y aquellas diferenciales o únicas para cada extracto, se realizó un gel maestro a partir de las imágenes obtenidas de los geles de los tres extractos. Del total de proteínas para cada extracto, se identificaron 139 proteínas compartidas (Fig 13A, círculos amarillos) y la mayor parte de estas se encuentran en un rango de 75 y 20 kDa y un pI de 5.0 y 6.0. Las proteínas diferenciales identificadas para cada extracto identificadas se muestran en la Figura 13B, en se muestran las proteínas diferenciales para cada aislado. En círculos amarillos se muestran las proteínas compartidas entre los tres extractos, cuadros rojos las propias para Querétaro, en triángulos azules las diferenciales para Tequesquitengo y en círculos verdes aquellas que son únicas para Xalapa.

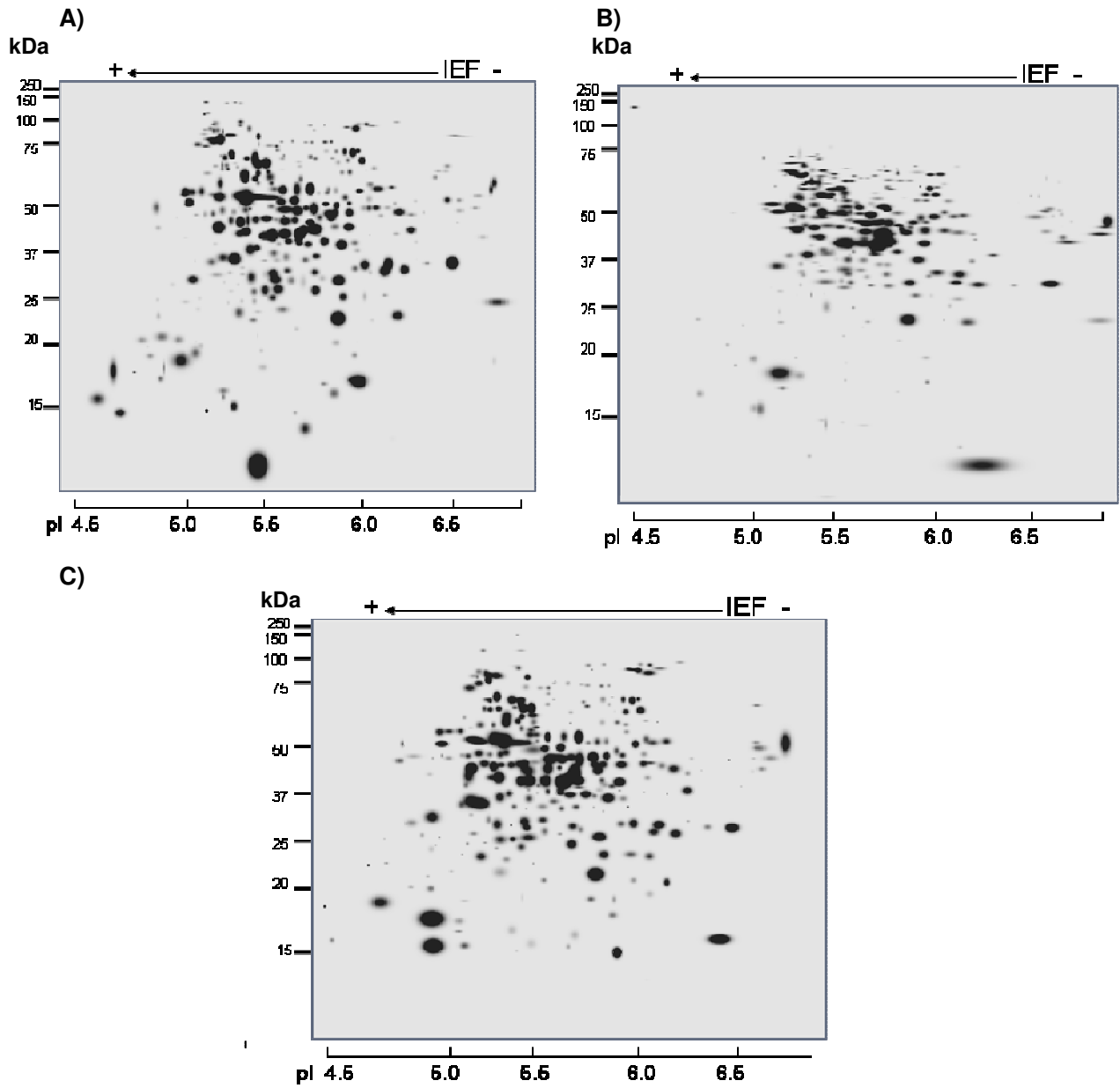


Figura 12. Geles maestros obtenidos mediante el programa PDQuest. A) Extracto de Querétaro; B) Extracto de Tequesquitengo; C) Extracto de Xalapa.

Con base al análisis realizado, se identificaron 54 proteínas diferenciales para el extracto de Querétaro (Fig. 13A, cuadros rojos). Para el extracto de Tequesquitengo, se identificaron 77 proteínas diferenciales (Fig. 13B, Triangulos azules) y Xalapa presenta 52 proteínas diferenciales (Fig 13C. círculos verdes).

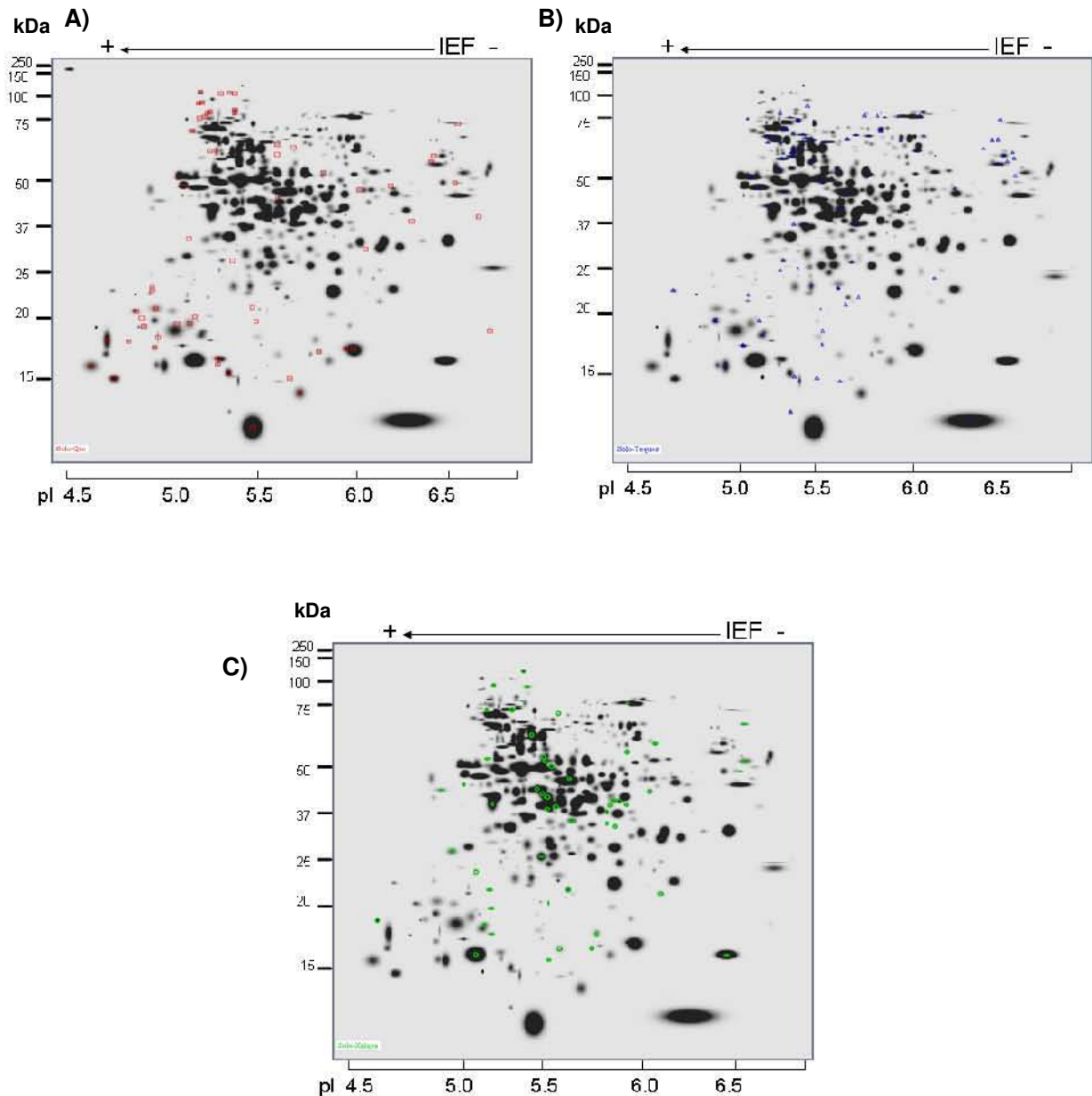


Figura 13. Determinación de proteínas diferenciales. A) Proteínas diferenciales para el extracto de Querétaro, cuadros rojos; B) Proteínas diferenciales para el extracto de Tequesquitengo, triángulos azules; C) Proteínas diferenciales para el extracto de Xalapa, círculos verdes.

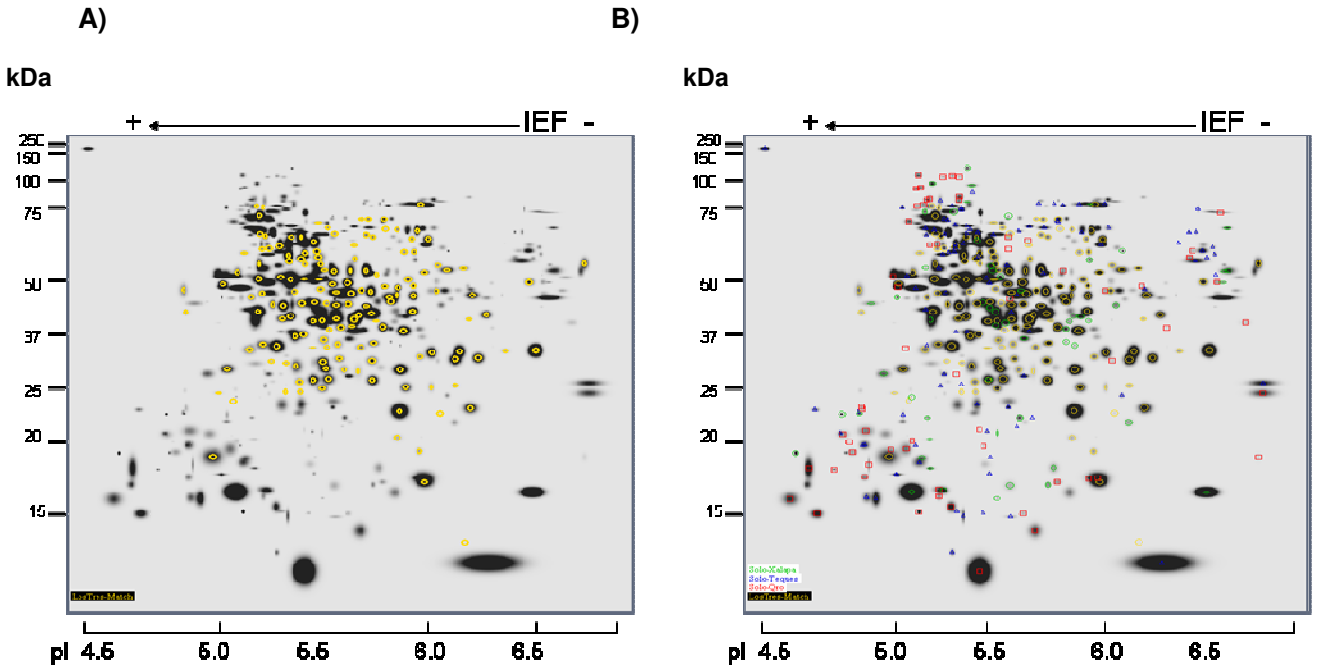


Figura 14. Identificación de proteínas compartidas y diferenciales de tres extractos proteicos de cepas de *T. cruzi*. Los geles 2D donde se resolvieron las proteínas de los extractos de las tres cepas se analizaron y compararon mediante el programa PDQuest. A) Proteínas compartidas entre los tres extractos; B) Proteínas diferenciales para Querétaro, Tequesquitengo y Xalapa. Círculos amarillos corresponden a proteínas compartidas; cuadros rojos las propias para Querétaro; triángulos azules las diferenciales para Tequesquitengo y círculos verdes las únicas para Xalapa.

Con la finalidad de identificar si existían proteínas compartidas exclusivamente entre dos extractos, se analizaron todas las proteínas identificadas para Querétaro con las de Tequesquitengo, identificándose sólo 10 proteínas compartidas (Fig. 15A, flechas rosas). En cuanto a las compartidas entre Querétaro y Xalapa (Fig. 15B, flechas rojas) se identificaron 63 proteínas y las compartidas entre Tequesquitengo y Xalapa, fueron 19 (Fig. 15C, flechas verdes).

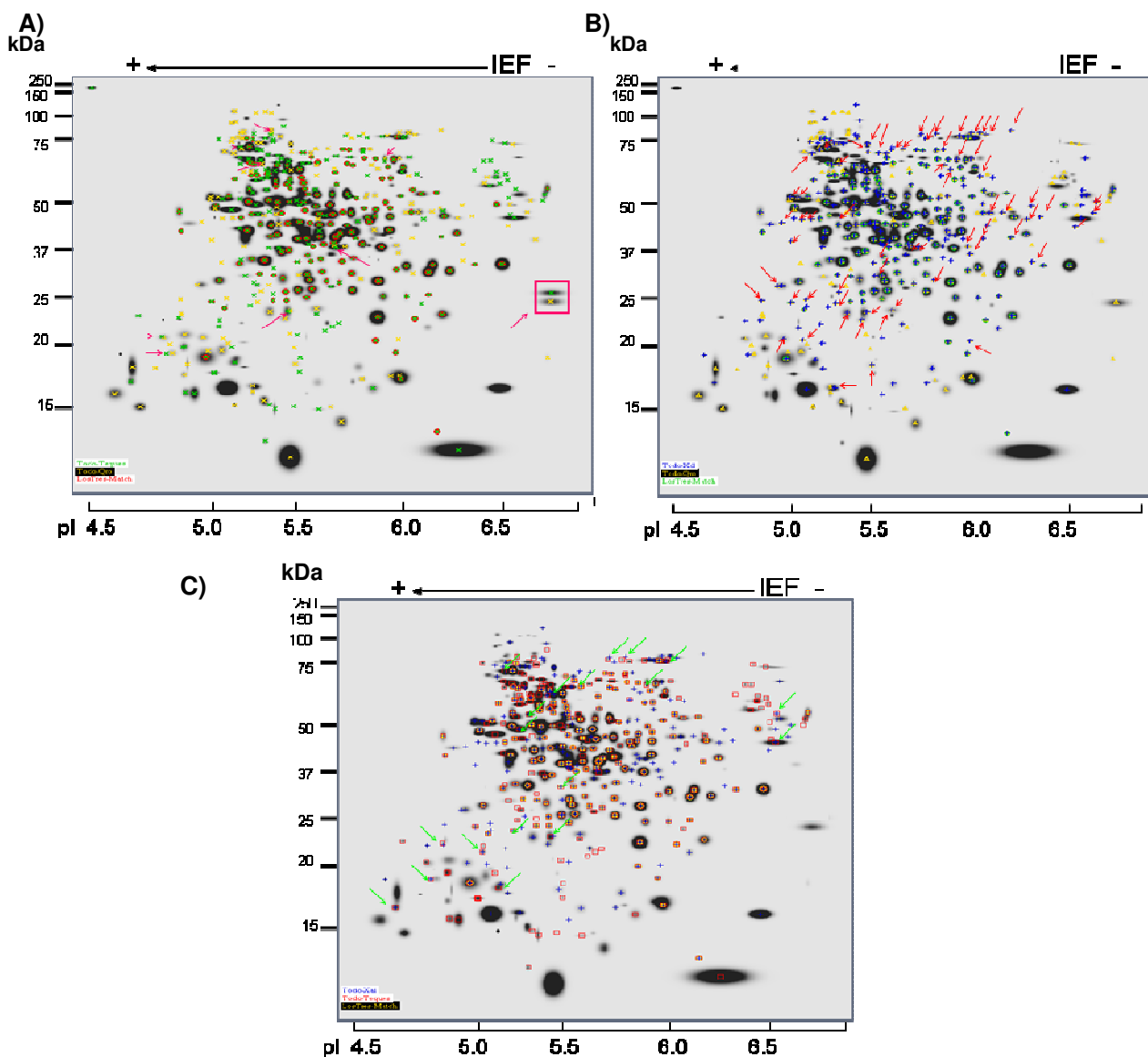


Figura 15. Análisis de los geles maestros para identificar proteínas compartidas exclusivamente entre dos extractos. A) Proteínas compartidas entre Querétaro y Tequesquitengo flechas rosas; B) Proteínas compartidas entre Querétaro y Xalapa, flechas rojas; C) Proteínas compartidas entre Tequesquitengo y Xalapa, flechas verdes.

VI. 5 Western-blot

Para identificar las proteínas inmunodominantes, los extractos se transfirieron e incubaron en presencia de un mezcla de sueros humanos de origen mexicano reactivos anti-*T. cruzi* y otras con sueros reactivos humanos anti-*L. mexicana* (forma diseminada y localizada). En el patrón de reconocimiento de sueros anti-*T. cruzi* revelados con 3'-3 DAB, se identifican 13 proteínas de 250, 150, 79, 72, 45, 38, 35, 29, 26, 22, 17, 14 y 13 kDa. Además, se observó una diferencia en la representatividad de la molécula de 13 kDa en los extractos de Querétaro y Xalapa (Fig. 16A). Las membranas incubadas en presencia de sueros humanos reactivos anti-*L. mexicana* (forma diseminada) muestran 15 proteínas de 250, 115, 91, 63, 45, 41, 35, 31, 29, 26, 22, 19, 17, 14 y 11 kDa y diferencias en el reconocimiento de las moléculas de 17 y 14 kDa en el extracto de Querétaro (Fig.16B) En las membranas que fueron incubadas con sueros humanos reactivos anti *L. mexicana* (forma localizada) solo se identificaron 8 proteínas de 250, 72, 50, 35, 22, 14, 13 y 11 kDa (Fig. 16C).

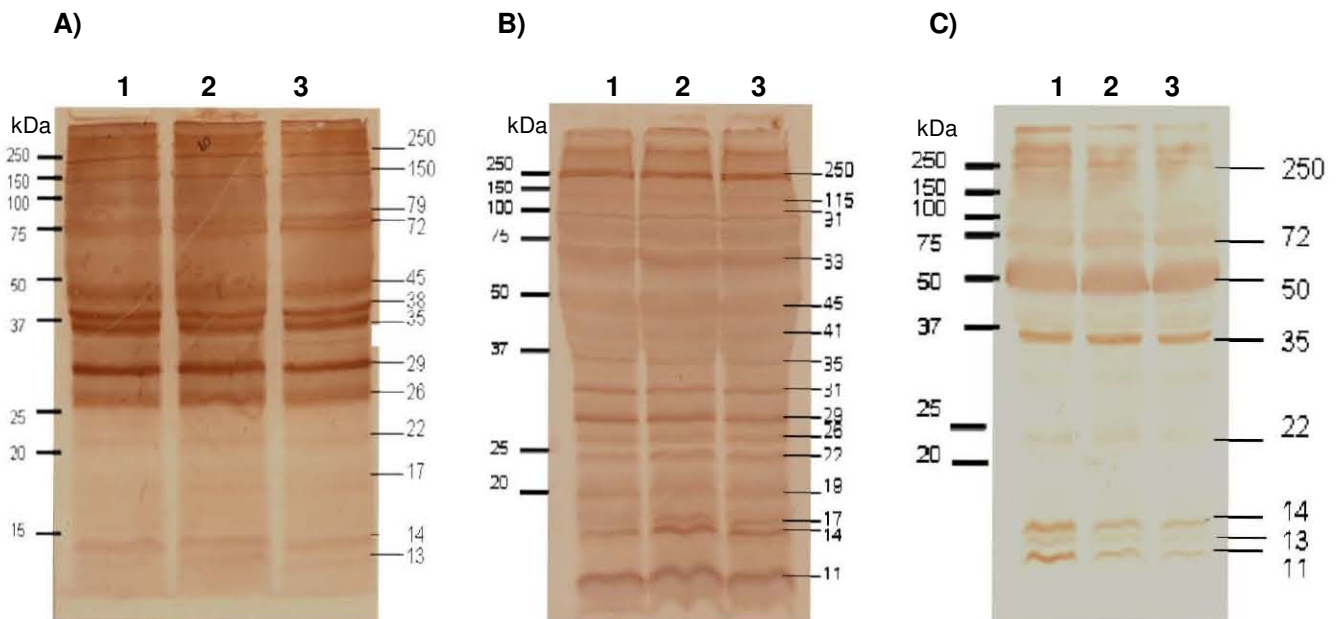


Figura 16. Evaluación de la reactividad a diferentes sueros mediante Western blot con 3-3`DAB. **A)** Sueros anti-*T. cruzi*; **B)** Sueros anti- *L. mexicana* (forma diseminada); **C)** Sueros anti-*L. mexicana* (forma localizada). Carril 1, Querétaro; Carril 2, Tequesquitengo; Carril 3, Xalapa. * Primer anticuerpo (dilución 1:150); segundo anticuerpo (dilución 1:8 000).

Para evaluar la especificidad y sensibilidad de las moléculas reveladas con 3'-3 DAB, los sueros se titularon y revelaron con el reactivo de quimioluminiscencia ECL. Para *T. cruzi* se identificaron 13 proteínas de 250, 150, 90, 79, 72, 45, 38, 35, 29, 26, 22, 17 y 14 kDa (Fig. 17A). Para *L. mexicana*, forma difusa, se identificaron 11 proteínas de 250, 75, 63, 45, 41, 35, 31, 29, 19, 15 y 11 kDa (Fig 17B) y para la forma localizada, no se reconoce ninguna proteína. En la Tabla 6 se comparan los resultados obtenidos de las proteínas inmunodominantes identificadas a partir de Western blot (WB) con sueros anti-*T. cruzi* y anti-*L. mexicana* (forma diseminada y localizada).

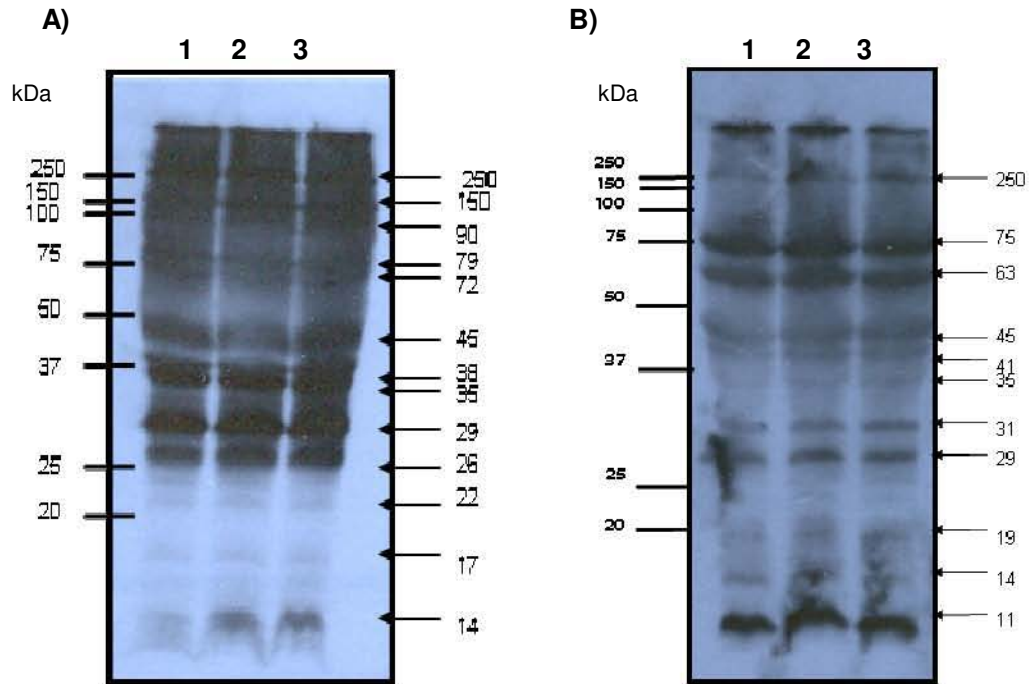


Figura 17. Evaluación de la reactividad a diferentes sueros mediante Western blot con ECL. **A)** Sueros anti-*T. cruzi*; **B)** Sueros anti- *L. mexicana* (forma diseminada. Carril 1, Querétaro; Carril 2, Tequesquitengo; Carril 3, Xalapa. * Primer anticuerpo (dilución 1:20 000); segundo anticuerpo (dilución 1:8 000).

Tabla 6. Comparación de los componentes identificados a partir de WB, utilizando mezcla de sueros reactivos anti-*T. cruzi*, anti- *L. mexicana* (forma diseminada y localizada), revelados con 3-3`DAB (+) y ECL (++) . Q: Querétaro; T: Tequesquitengo; X: Xalapa.

Componente	<i>T. cruzi</i>			<i>L. mexicana</i> Diseminada			<i>L. mexicana</i> Localizada		
	Q	T	X	Q	T	X	Q	T	X
KDa									
250	++	++	++	++	++	++	+	+	+
150	++	++	++						
115				+	+	+			
90	++	++	++						
79	++	++	++						
75				++	++	++			
72	++	++	++	+	+	+	+	+	+
63				+	+	+			
50							+	+	+
45	++	++	++	++	++	++			
41				++	++	++			
38	++	++	++						
35	++	++	++	++	++	++	+	+	+
29	++	++	++	++	++	++			
26	++	++	++	+	+	+			
22	++	++	++	+	+	+	+	+	+
19				++	++	++			
17	++	++	++	+	+	+			
14	++	++	++	++	++	++	+	+	+
13	+	+	+				+	+	+
11				++	++	++	+	+	+

Para identificar las posibles isoformas de las proteínas inmunodominantes se realizó un WB en 2D. Para *T. cruzi* se identificaron proteínas de 72, 50, 45, 38, 35, 29, 26, 22, 17 y 14 kDa (Fig. 18 A). Se identificaron proteínas con un diferente nivel de reconocimiento de 22 y 17 kDa con un pI de 6.4 en Querétaro (Fig 17A flechas) y Xalapa (Fig 17C, flechas) a comparación de Tequesquitengo y una proteína de 15kDa y un pI de 4.8 presente en la cepa de Tequesquitengo (Fig 17B, flecha) no presente en los extractos de Querétaro y Xalapa. El extracto que presenta un mayor grado de reconocimiento es la cepa de Tequesquitengo en comparación de los extractos de Querétaro y Xalapa.

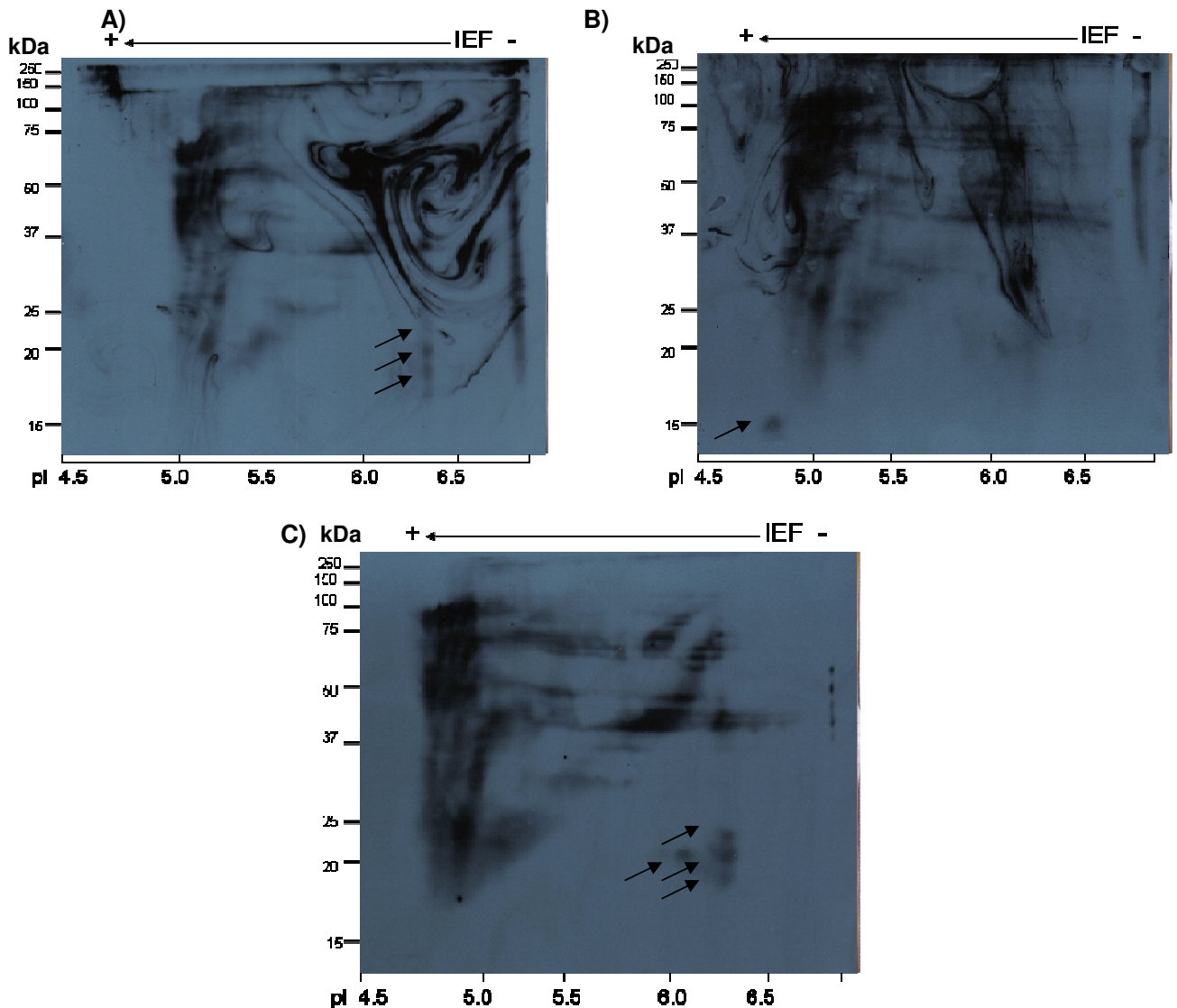


Figura 17. Evaluación de la reactividad a sueros anti-*T. cruzi* mediante Western blot con ECL. **A)** Querétaro; **B)** Tequesquitengo; **C)** Xalapa. * Primer anticuerpo (dilución 1:20 000); segundo anticuerpo (dilución 1:8 000).

VI.6 Oxidación de Carbohidratos con Metaperiodato

Para determinar la afinidad que presentan los anticuerpos hacia la fracción de las moléculas presentes en los extractos se realizó un ensayo de oxidación de carbohidratos con Metaperiodato. Las membranas incubadas en presencia de un suero reactivo humano anti-*T. cruzi* mostraron 7 proteínas entre 250 y 14kDa con los siguientes pesos moleculares: 250, 35, 29, 26, 22, 14 y 11 kDa (Fig. 19A). Las proteínas que presentaron el mayor reconocimiento fueron las de 35, 29 y 26 kDa. Por otra parte y para comparar estos resultados se utilizó una mezcla de sueros reactivos humanos anti-*T. cruzi*, donde se identificaron 10 proteínas entre 250 y 14kDa con los siguientes pesos moleculares: 250, 150, 79, 72, 45, 35, 29, 26, 17 y 14 kDa (Fig. 19B). Las proteínas que presentaron la mayor reactividad fueron de igual forma las de 35, 29 y 26 kDa. El patrón de reconocimiento con este ensayo no mostró diferencias entre los tres extractos. Cabe resaltar que no hubo reconocimiento con sueros anti-*L. mexicana* (forma difusa) en ninguno de los extractos proteicos utilizados (Fig. 19C).

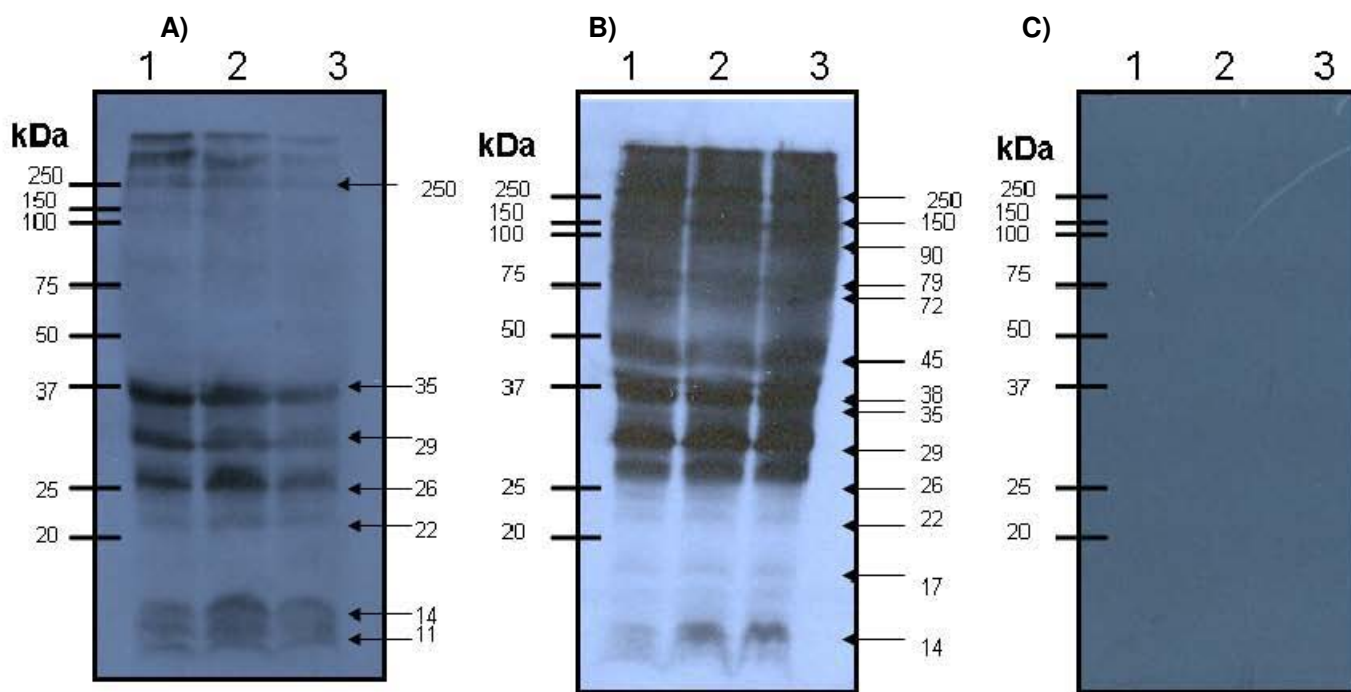


Figura 19. Oxidación de carbohidratos con metaperiodato de las moléculas presentes en los extractos proteicos con sueros anti-*T. cruzi*. **A)** Suero de 1 paciente reactivo anti-*T. cruzi* **B)** Mezcla de sueros reactivos anti-*T. cruzi*; **C)** Mezcla de sueros reactivos anti-*L. mexicana* (forma diseminada). Carril 1, Querétaro; Carril 2, Tequesquitengo; Carril 3, Xalapa. * Primer anticuerpo (dilución 1:20 000); segundo anticuerpo (dilución 1:8 000).

VI. 7 Tinción con pro Q Emerald (glicoproteínas) y Sypro Ruby (proteínas), en geles de poliacrilamida

Para determinar cuáles de las proteínas estaban glicosiladas, se realizó una tinción con el reactivo proQ Emerald, el cual tiñe específicamente a las moléculas glicosiladas, y fue comparado con el perfil obtenido a partir de la tinción con Sypro Ruby el cual tiñe proteínas. Los patrones de proteínas glicosiladas obtenidos con la tinción con proQ Emerald fueron casi idénticas entre los tres extractos, identificando un total de 14 proteínas entre 79 y 11 kDa, con pesos moleculares de: 79, 72, 63, 51, 40, 35, 29, 26, 22, 19, 17, 14 y 13 kDa. La región donde se observó la mayor abundancia de glicoproteínas fue entre 50 y 25 kDa. (Fig. 20B). Los patrones de proteínas obtenidos con la tinción con Sypro Ruby también fueron idénticos entre los tres extractos, identificando un total de 13 proteínas entre 79 y 11 kDa, con pesos moleculares de: 79, 72, 63, 51, 40, 35, 29, 26, 22, 19, 17, 14 y 13 kDa (Fig. 20A). La región entre 50 y 37 kDa presentó proteínas con mayor abundancia a diferencia de las proteínas de alto peso molecular cuya abundancia es menor (Fig. 20A). Es importante mencionar que todas las proteínas identificadas con Sypro Ruby fueron también identificadas con la tinción con el proQ Emerald.

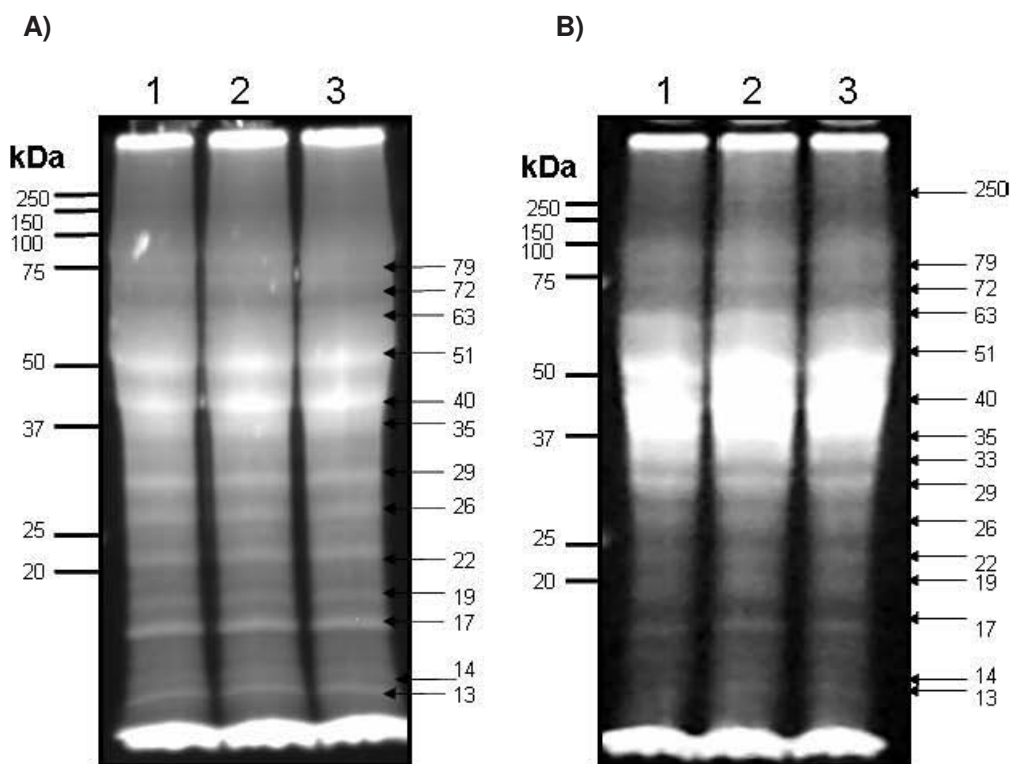


Figura 20. Tinción de proteínas con Sypro Rubi y de glicoproteínas con proQ Emerald. La electroforesis se corrió con 200µg de proteína de cada muestra por carril. (A) Tinción con Sypro Ruby; (B) Tinción con proQ Emerald. Carril 1: Querétaro, Carril 2: Tequesquitengo, Carril 3: Xalapa.

VI.8 Composición de Carbohidratos

Para determinar la composición de carbohidratos presentes en los extractos proteicos totales se realizó una cromatografía de gas. Los resultados muestran la presencia de varios monosacáridos tales como Galactosa (Gal), Manosa (Man), Glucosa (Glc), N-acetil glucosamina (GlcNAc), Xilosa (Xyl) y Ribosa (Rib). Por otra parte, no se identificó la presencia de Fucosa (Fuc), N-acetil galactosamina (GalNAc), Ac Neuraminico (NeuAc), Rhamnosa (Rham), Arabidosa (Ara), (GlucUA) y (GalUA). Los porcentajes totales calculados, muestran diferencias en los azúcares Gal, Man, Glc en las cepas de Querétaro (30.7%, 22.5% y 16.9% respectivamente) y Xalapa (33.46%, 20.82% y 20.45%) en comparación con Tequesquitengo (11.9%, 9.53% y 9%). El porcentaje más alto para GlcNAc lo presenta Tequesquitengo con un 63.62%, mientras que Querétaro y Xalapa muestran un porcentaje de 20.6% y 13.38% respectivamente (Tabla7).

Tabla 7. Porcentaje de monosacáridos obtenidos por cromatografía de gas a partir de extractos proteicos. **Q:** Querétaro; **T:** Tequesquitengo; **X:** Xalapa.

<u>Monosacárido</u>	Q	T	X
<u>Fuc</u>	0%	0%	0%
Gal	30.7%	11.90%	33.46%
Man	22.5%	9.53%	20.82%
Glc	16.9%	9%	20.45%
<u>GalNAc</u>	0%	0%	0%
GlcNAc	20.6%	63.62%	13.38%
<u>NeuAc</u>	0%	0%	0%
<u>Xyl</u>	1.7%	0.73%	2.23%
<u>Rham</u>	0%	0%	0%
<u>Ara</u>	0%	0%	0%
<u>Rib</u>	7.7%	5.18%	9.67%
<u>GlucUA</u>	0%	0%	0%
<u>GalUA</u>	0%	0%	0%

VI.9 Ensayos con Lectinas

Para determinar la composición de los carbohidratos así como identificar diferencias cualitativas presentes en las glicoproteínas de los extractos, se realizó un ensayo utilizando diferentes lectinas. Los patrones de glicoproteínas identificadas con las diferentes lectinas mostraron similitudes entre los tres extractos en todos los casos. Se identificaron para *Cannavalia ensiformis* (Con A) 12 glicoproteínas entre 79 y 11 kDa de: 79, 72, 63, 41, 35, 33, 29, 26, 19, 15, 14 y 11 kDa (Fig. 20A) y siendo más representativas las de 29, 26 y 19 kDa; para *Maackia amurensis* (MAA) hubo reconocimiento para 4 glicoproteínas de 250, 150, 100 y 67 kDa (Fig. 20B). En el caso de *Sambucus nigra* (SNA) se reconocieron 5 glicoproteínas de entre 250 y 67kDa siendo estas de 250, 150, 100, 81 y 67 kDa y siendo la más representativa la de 67kDa (Fig. 20C); para *Amaranthus leucocarpus* (ALL) y *Macrobrachium rosenbergii* (MRL) se identificaron 4 glicoproteínas de 250, 150, 100 y 75kDa, siendo más representativas para la primera las 150, 100 y 75 kDa (Fig. 21A) y las de 150 y 75 para la segunda (Fig. 21B). Finalmente para *Triticum vulgare* (WGA) se identificaron 15 glicoproteínas de los siguientes pesos moleculares: 90, 79, 72, 63, 41, 35, 33, 29, 26, 23, 20, 19, 15, 14 y 11 kDa siendo más representativas las de 70, 79, 72, 63, 41 y 29 kDa (Fig. 21C).

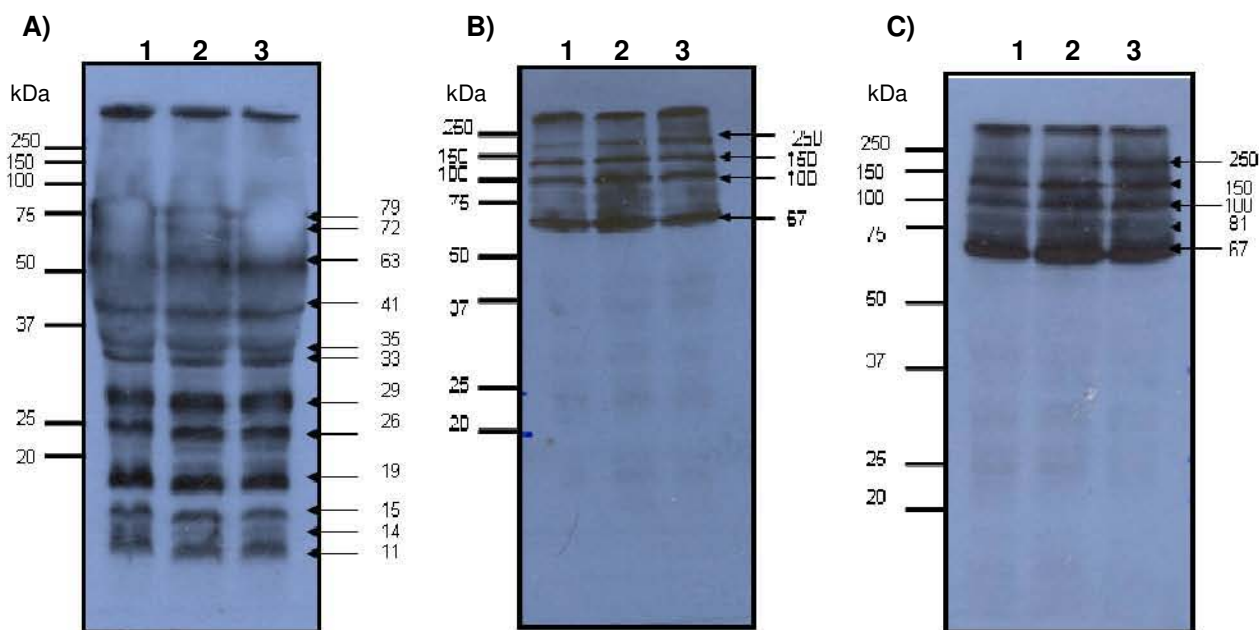


Figura 20. Identificación de la composición de carbohidratos de las glicoproteínas presentes en los extractos proteicos de *T. cruzi* en membranas de nitrocelulosa. **A)** Concanavalina A (ConA); **B)** *Maackia amurensis* (MAA); **C)** *Sambucus nigra* (SNA). Carril 1, Querétaro; Carril 2, Tequesquitengo; Carril 3, Xalapa. * Lectina (dilución 1:50 000; segundo anticuerpo (dilución 1:8 000)).

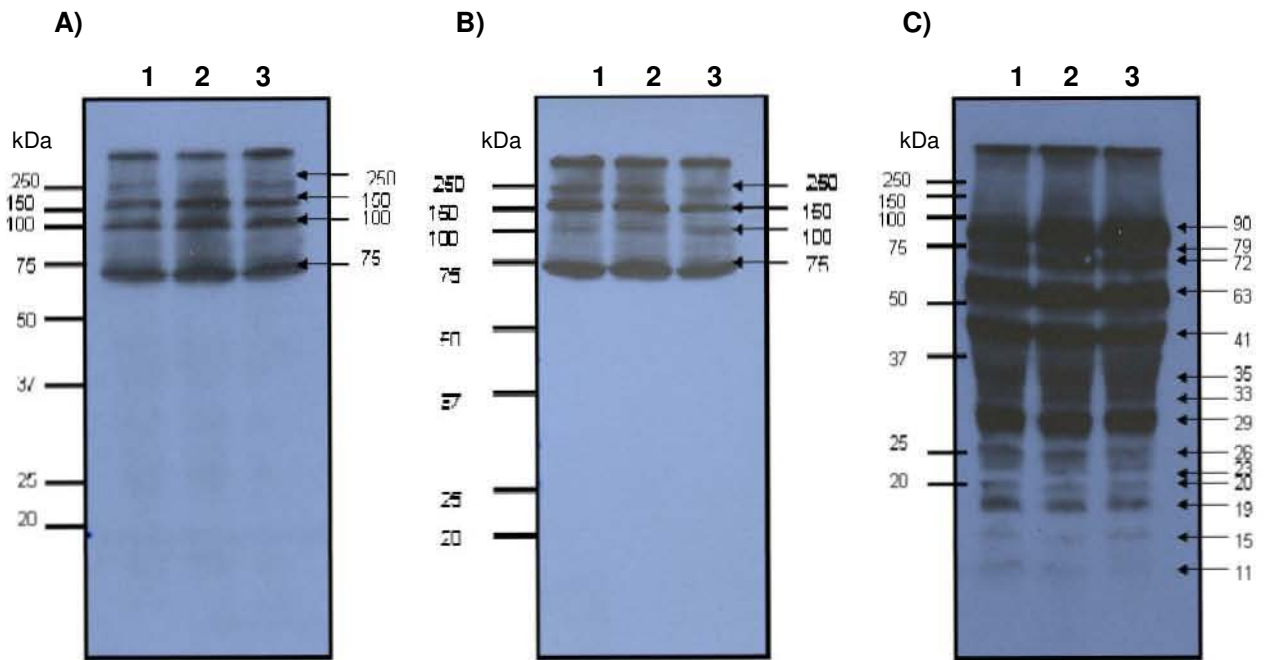


Figura 21. Identificación de la composición de carbohidratos de las glicoproteínas presentes en los extractos proteico de *T. cruzi* en membranas de nitrocelulosa. **A)** *Amaranthus leucocarpus* (ALL); **B)** *Macrobrachium rosenbergii* (MRL); **C)** *Triticum vulgare* (WGA). Carril 1, Querétaro; Carril 2, Tequesquitengo; Carril 3, Xalapa. * Lectina (dilución 1:50 000; segundo anticuerpo (dilución 1:8 000)).

V. 10 Análisis Proteómico

a) MALDI-TOF

El criterio de selección de las proteínas a analizar por medio de espectrometría de masas fue que fueran proteínas inmunodominantes y que se hubieran conservado después del tratamiento con el metaperiodato. De igual forma, se seleccionaron debido a su abundancia para poder ser escindidas y analizadas mediante esta técnica. Las proteínas escindidas a partir de SDS-PAGE fueron tres de 14, 22, y 38 kDa de cada extracto proteico a partir de geles de una dimensión para ser analizadas mediante espectrometría de masas. Los resultados se muestran en cada tabla según lo obtenido en la base de datos de UniProtKB/TrEMBL por medio del programa ExPasy para cada extracto.

Tabla 8. Identificación de las masas monoisotópicas obtenidas para la proteína de 14kDa del aislado de Querétaro

Masa Monoisotrópica obtenida	Masa Monoisotrópica Teórica	Posición	Secuencia de Aminoácidos
1320.682	1320.633	17-27	FDAFDHDKIGR
2345.089	2344.964	62-81	GSVSFDGFCCAMKMAFENMR
2749.308	2749.281	108-130	YILTTQGERLSTDEMNAFVEEMR
2867.416	2867.330	131-154	SEMDMEGNFILSDVVYKMTPEIFR

Los iones moleculares del espectro LSIMS resultantes de la digestión con tripsina del aislado Querétaro(14kDa) fueron identificados al comparar sus valores relativos con aquellos obtenidos de la base de datos del UniProtKB/TrEMBL (05/11/2007). La proteína relacionada corresponde a una Calmodulina Putativa de *Trypanosoma brucei* de 18kDa y un pI de 4.8 con un porcentaje de cobertura del 51% y un Score de 5.17 (Número de acceso Q384M5_9TRYP).

Tabla 9. Identificación de las masas monoisotópicas obtenidas para la proteína de 14kDa del aislado de Tequesquitengo

Masa Monoisotrópica obtenida	Masa Monoisotrópica Teórica	Posición	Secuencia de Aminoácidos
864.412	864.451	90 -95	WRSLMR
885.373	885.411	147-152	CHERQR
1304.577	1304.626	1-12	MAPSSELNVANR
3009.397	3009.524	1-28	MAPSSELNVANRAVLNVPLDASCPQLR

Los iones moleculares del espectro LSIMS resultantes de la digestión con tripsina del aislado Tequesquitengo (14kDa) fueron identificados al comparar sus valores relativos con aquellos obtenidos de la base de datos del UniProtKB/TrEMBL (05/11/2007). La proteína relacionada corresponde a una Proteína putativa no caracterizada de *Trypanosoma brucei* de 19kDa y un pI de 6.92 con un porcentaje de cobertura del 24% y un Score de 3.17 (Número de acceso Q587B5_9TRYP).

Tabla 10. Identificación de las masas monoisotópicas obtenidas para la proteína de 14kDa del aislado de Xalapa

Masa Monoisotrópica obtenida	Masa Monoisotrópica Teórica	Posición	Secuencia de Aminoácidos
832.483	832.391	24-30	DGRAEER
856.524	856.456	17-23	TFLSFNK
929.543	929.505	94-101	VEVDNVVR
1184.577	1184.606	17- 26	TFLSFNKDGR

Los iones moleculares del espectro LSIMS resultantes de la digestión con tripsina del aislado Xalapa (14kDa) fueron identificados al comparar sus valores relativos con aquellos obtenidos de la base de datos del UniProtKB/TrEMBL (05/11/2007). La proteína relacionada corresponde a una Proteína putativa no caracterizada de *Trypanosoma cruzi* de 15kDa y un pI de 5.30 con un porcentaje de cobertura del 16% y un Score de 2.09 (Número de acceso Q4E2M7_TRYCR).

Tabla 11. Identificación de las masas monoisotópicas obtenidas para la proteína de 22kDa del aislado de Querétaro

Masa Monoisotrópica obtenida	Masa Monoisotrópica Teórica	Posición	Secuencia de Aminoácidos
924.526	924.479	64-71	LHEVSDPK
887.513	887.492	83-89	VVVHFMR
2747.270	2747.283	144-168	NTFHSHIIGFDEFGGTDDFASETVIK
2247.026	2246.969	169-189	VLASYGMLNEQGMFAADQGND

Los iones moleculares del espectro LSIMS resultantes de la digestión con tripsina del aislado Querétaro (22kDa) fueron identificados al comparar sus valores relativos con aquellos obtenidos de la base de datos del UniProtKB/TrEMBL (05/11/2007). La proteína relacionada corresponde a una Proteína tipo proteína de unión de ATP de *Trypanosoma brucei* de 22kDa y un pI de 5.16 con un porcentaje de cobertura del 32% y un Score de 3.61 (Número de acceso Q381H0_9TRYP).

Tabla 12. Identificación de las masas monoisotópicas obtenidas para la proteína de 22kDa del aislado de Tequesquitengo

Masa Monoisotrópica obtenida	Masa Monoisotrópica Teórica	Posición	Secuencia de Peptidos
801.506	801.458	16-21	LRDELK
1363.572	1363.663	22-32	DEVQRLQSTCK
789.441	789.410	139-145	SVEEAVR
864.488	864.469	169-175	REGLYAR
773.478	773.452	176-181	IDELKR

Los iones moleculares del espectro LSIMS resultantes de la digestión con tripsina del aislado Tequesquitengo (22kDa) fueron identificados al comparar sus valores relativos con aquellos obtenidos de la base de datos del UniProtKB/TrEMBL (05/11/2007). La proteína relacionada corresponde a una Proteína putativa no caracterizada *Trypanosoma cruzi* de 22kDa y un pI de 6.52 con un porcentaje de cobertura del 19% y un Score de 4.70 (Número de acceso Q4CMA8_TRYCR).

Tabla 13. Identificación de las masas monoisotópicas obtenidas para la proteína de 22kDa del aislado de Xalapa

Masa Monoisotrópica obtenida	Masa Monoisotrópica Teórica	Posición	Secuencia de Peptidos
829.485	829.319	1-6	MMMTCR
861.494	861.309	1-6	MMMTCR
1758.009	1757.928	105-121	EGLGPKVSTEPNTSLTK
1108.663	1108.512	130-139	TETSAEQTNK

Los iones moleculares del espectro LSIMS resultantes de la digestión con tripsina del aislado Xalapa (22kDa) fueron identificados al comparar sus valores relativos con aquellos obtenidos de la base de datos del UniProtKB/TrEMBL (05/11/2007). La proteína relacionada corresponde a una Mucina TcMUCII de *Trypanosoma cruzi* de 22kDa y un pI de 4.92 con un porcentaje de cobertura del 15% y un Score de 2.06 (Número de acceso Q4DVB4_TRYCR).

Tabla 14. Identificación de las masas monoisotópicas obtenidas para la proteína de 38kDa del aislado de Querétaro

Masa Monoisotrópica obtenida	Masa Monoisotrópica Teórica	Posición	Secuencia de Peptidos
1513.942	1513.786	17- 30	GVVDSIDLPLNISR
1581.936	1581.722	62-73	EDYKQFYEQFGK
3123.042	3122.441	144-169	CGLEVLFMTEPIDEYVMQQVKDFEDK
1522.011	1521.809	262-274	KTMEVNPDPHPIIK

Los iones moleculares del espectro LSIMS resultantes de la digestión con tripsina del aislado Querétaro (38kDa) fueron identificados al comparar sus valores relativos con aquellos obtenidos de la base de datos del UniProtKB/TrEMBL (05/11/2007). La proteína relacionada corresponde a una Heat Shock Protein de *Leishmania braziliensis* de 41kDa y un pI de 4.94 con un porcentaje de cobertura del 18% y un Score de 1.50 (Número de acceso A4HL69_LEIBR).

Tabla 15. Identificación de las masas monoisotópicas obtenidas para la proteína de 38kDa del aislado de Tequesquitengo

Masa Monoisotrópica obtenida	Masa Monoisotrópica Teórica	Posición	Secuencia de Peptidos
2280.773	2281.110	111-129	DVNNTVPMRAWWECLITSK
1532.640	1532.881	286-299	RNLLPGALAAFHR
1376.571	1376.780	287-299	NLLPGALAAFHR
2383.652	2384.096	316-337	VEVAEVAESDEDAASAEDRVHR

Los iones moleculares del espectro LSIMS resultantes de la digestión con tripsina del aislado Tequesquitengo (38kDa) fueron identificados al comparar sus valores relativos con aquellos obtenidos de la base de datos del UniProtKB/TrEMBL (05/11/2007). La proteína relacionada corresponde a una Proteína putativa no caracterizada de *Leishmania sp* de 40kDa y un pI de 5.06 con un porcentaje de cobertura del 15% y un Score de 1.89 (Número de acceso Q4FXT3_LEIMA).

Tabla 16. Identificación de las masas monoisotópicas obtenidas para la proteína de 38kDa del aislado de Xalapa.

Masa Monoisotrópica obtenida	Masa Monoisotrópica Teórica	Posición	Secuencia de Peptidos
2219.287	2219.153	14-34	CLVGSVIFTAVVSSAATYAFR
1373.582	1373.641	110-120	MISESFDYPIR
1260.585	1260.601	125-135	FHEFVPANDGK
790.290	790.384	311-317	DTWVGGR

Los iones moleculares del espectro LSIMS resultantes de la digestión con tripsina del aislado Xalapa (38kDa) fueron identificados al comparar sus valores relativos con aquellos obtenidos de la base de datos del UniProtKB/TrEMBL (05/11/2007). La proteína relacionada corresponde a una Proteína putativa no caracterizada de *Trypanosoma brucei* de 41kDa y un pI de 6.33 con un porcentaje de cobertura del 14% y un Score de 12.64 (Número de acceso Q38FT0_9TRYP).

VII. DISCUSIÓN

La familia Trypanosomatiadae comprende un gran número de protozoarios parásitos, algunos de estos causan enfermedades importantes en el humano como son *Trypanosoma brucei* agente etiológico de la enfermedad del sueño, *Leishmania spp.* agentes de las leishmaniosis visceral, muco-cutánea y cutánea y *T. cruzi* agente de la enfermedad de Chagas, la cual se encuentra restringida al continente americano y que fue el motivo del presente trabajo.

Los aislados de *T. cruzi* presentan una gran heterogeneidad genotípica, la cual se refleja fenotípicamente en parámetros biológicos, tales como la forma del parásito, perfil antigénico, virulencia, tasa de crecimiento en cultivo, patogenicidad, tropismo tisular y sensibilidad a los medicamentos. A la fecha, se han realizado numerosos intentos de caracterizar a diversos aislados, cepas y clonas con el fin de identificar los factores que determinan esta variabilidad (Dvorak, 1984; Buscaglia, 2003).

T. cruzi presenta un ciclo de vida complejo que alterna entre huéspedes vertebrados y el triatomino, con diferentes formas en cada uno y probablemente, las interacciones entre el insecto y el parásito determinan características de los aislados, que inciden en su virulencia, patogenicidad e inmunogenicidad. En el presente trabajo se utilizaron extractos proteicos de epimastigotes de tres aislados, provenientes de tres de los vectores reportados como los más importantes para el país: *Triatoma barberi*, *Triatoma dimidiata* y *Meccus pallidipennis*, debido a su amplia distribución y abundancia, como ocurre con *T. dimidiata*, la cual existe en 16 estados de la república mexicana además de Centro y Sudamérica; por la cantidad y porcentaje de formas infectivas en heces del transmisor o bien por mostrar una estrecha relación con el ser humano como ocurre con *T. barberi* (Salazar, 2005). Estos aislados presentan diferencias en la parasitemia y crecimiento en medios de cultivo. El aislado con mayor virulencia fue el proveniente de *T. barberi* (Querétaro); el de mediana virulencia fue el de *T. dimidiata* (Xalapa) y el de menor virulencia fue el de *M. pallidipennis* (Tequesquitengo). El aislado que presentó mejor adaptación a crecer en medios de cultivo, fue el de Tequesquitengo y el de menor, Querétaro (Aguilar-Díaz, 2004).

Los avances obtenidos con las tecnologías del ADN, han permitido la secuenciación de los genomas de diversos organismos; y aunque aún se desconoce la función biológica de la mayoría de las proteínas que se pueden deducir de las secuencias

genómicas, cuando se establezca la conexión entre las secuencias genómicas y su significado biológico, se tendrán herramientas importantes para comprender e incidir en la relación huésped-parásito. Para complementar a la genómica, actualmente se cuenta con la proteómica, que es el estudio a gran escala de las proteínas, y con los datos generados en estas dos disciplinas se obtendrá una visión global e integrada de los procesos celulares. Actualmente, la proteómica ya se aplica para tratar de comprender la relación entre el parásito-célula huésped, identificar moléculas que puedan ser útiles en el diagnóstico diferencial de la enfermedad y encontrar nuevas alternativas de tratamiento (Parodi-Talice *et al* 2004). Por estas razones en este trabajo se realizó, mediante la estrategia proteómica, la comparación de tres aislados de *T. cruzi*. En trabajos previos de comparación de aislados y clonas de epimastigotes de este parásito se han reportado diferencias en la cantidad y tipo de moléculas presentes en los extractos, lo cual en ocasiones ha sido atribuido equivocadamente a las características de los organismos en lugar de las diferentes metodologías de extracción empleadas (Schechter, 1988). En este trabajo, se reprodujo la extracción de moléculas de parásitos según lo descrito por Bucio *et al* (1999), en la cual se enriquecen moléculas de membrana y es utilizada para obtener preparaciones útiles en el diagnóstico específico de la enfermedad de Chagas. El análisis electroforético de los extractos por medio de SDS-PAGE y teñidos con azul de Coomassie, se identificaron 15 bandas entre 14 y 150 kDa con pesos moleculares de 150, 90, 81, 67, 51, 45, 40, 31, 28, 27, 24, 22, 18, 15 y 14 kDa, algunas de las cuales pueden corresponder a moléculas ya descritas involucradas en patogenicidad y virulencia, las cuales en algunos casos han sido propuestas como candidatos a usarse con fines diagnósticos o profilácticos; al respecto, la proteína de 90kDa presente en epimastigotes, ofrece protección *in vivo* al inmunizar animales de experimentación contra tripomastigotes sanguíneos y metaciclícos (Snary,1980) lo cual confirma que este parásito no presenta mecanismos de variabilidad antigénica como sucede en otros parásitos como *T. brucei*. Los patrones de proteínas obtenidos con esta metodología fueron similares entre los extractos, con pocas proteínas de alto peso molecular, acorde con lo reportado por Bucio *et al* (1999) y Mc Daniel *et al*, (1986) quienes compararon los patrones de proteínas obtenidos por SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie; en este último caso, extraídos a partir de epimastigotes de 4 clonas, obteniendo aproximadamente 60 bandas en un rango de 14 a 300 kDa con patrones casi idénticos.

Para el análisis de proteínas mediante E2D de este trabajo, se probaron varias combinaciones de anfolinas y se encontró que la óptima, donde se resolvieron mejor las proteínas y en mayor cantidad, fue la que formó el rango de pH de 3 a 10. Con estas condiciones se obtuvieron en promedio 300 proteínas, lo que en comparación con otros trabajos donde se han obtenido más de 350, fue bajo (Parodi-Talice, 2004, Paba, 2004, Atwood, 2005). Lo anterior puede deberse a la metodología empleada para la extracción proteica ya que en este estudio se analizan las proteínas de una fracción enriquecida en membranas plasmáticas y en los reportes mencionados utilizan extractos de células totales o bien, como se ha reportado en trabajos previos, por la complejidad de proteínas que componen la muestra, debido a que las proteínas de menor abundancia se diluyen en la muestra y por tanto permanecen por debajo del límite de detección de la tinción con plata (Souza, 2007).

El patrón proteico bidimensional fue muy similar entre los aislados comparados en este trabajo, la mayor parte de las proteínas más abundantes, se encontraron en un rango entre 20 y 50 kDa y un pI entre 5.0 y 6.5; estos valores también coinciden con los reportados por Parodi-Talice (2004) y Paba (2004); sin embargo, cuando se analizaron con detalle las manchas presentes en el proteoma, se identificaron proteínas diferenciales para cada aislado. El que presentó la mayor cantidad de proteínas diferenciales fue el extracto de Tequesquitengo con 77, mientras que Xalapa y Querétaro presentaron 52 y 54 proteínas respectivamente. Cuando se analizaron las proteínas que eran compartidas únicamente entre dos aislados se observó que los extractos de Querétaro y Xalapa compartían más proteínas entre sí (63) que con Tequesquitengo (10 y 19 respectivamente), lo cual se podría correlacionar con el comportamiento biológico que presentan estos aislados, ya que Aguilar-Díaz *et al* (2004) reportaron que Querétaro y Xalapa presentan un comportamiento biológico más parecidos entre sí que el presentado por Tequesquitengo.

En relación a la inmunogenicidad de las moléculas de *T. cruzi*, se ha observado que este parásito presenta tanto antígenos propios de cada estadio como otros que son compartidos entre las fases del ciclo de vida y en contraste con otros tripanosomatidos u otros parásitos como *Plasmodium*, ninguna de sus fases presenta antígenos fuertemente inmunodominantes ni existen mecanismos de variación antigénica (Snary, 1980, Bua, 1990). Debido a que este parásito comparte moléculas antigénicas con otros tripanosomatidos, como *Leishmania*, es de suma importancia la

identificación y caracterización de moléculas específicas o únicas de especie para ser utilizadas en el diagnóstico de la enfermedad. En este trabajo, mediante experimentos de Western-blot con sueros de pacientes humanos reactivos a *T. cruzi* y revelado con el sistema de diaminobenzidina (DAB), se observaron 13 bandas de 250, 150, 79, 72, 45, 38, 35, 29, 26, 22, 17, 14 y 13 kDa de las cuales ocho de 250, 45, 35, 29, 26, 22, 17 y 14 kDa también fueron reconocidas por una mezcla de sueros de pacientes humanos anti-*L. mexicana* con la forma diseminada de la enfermedad y seis bandas de 250, 72, 35, 22, 14 y 13 kDa que presentaron cruce inmunológico con sueros anti-*L. mexicana* de la forma cutánea localizada, lo que también se correlaciona con la presentación clínica de *Leishmania mexicana* debido a que en estos pacientes, existe mayor concentración de anticuerpos cuando la forma es diseminada. Al repetir estos experimentos utilizando el sistema de detección por quimioluminiscencia (QL), el cual es mucho más sensible que el sistema DAB, los sueros fueron nuevamente titulados para evaluar su especificidad; se detectaron 13 proteínas utilizando la mezcla de sueros anti-*T. cruzi* siendo las más relevantes las bandas de 250, 38, 35, 29, 26 y 14 kDa; con el suero anti *L. mexicana*, forma difusa, se identificaron 11 proteínas, siendo más representativas las de 75, 63, 31, 29 y 11 kDa y para aquel de pacientes con la forma localizada, no se reconoció ninguna proteína; en términos generales, el reconocimiento de los anticuerpos hacia los componentes de los tres extractos fue similar. Esto es de suma importancia para el diagnóstico de la enfermedad dado que los mismos componentes son compartidos por más de un aislado, lo que permitiría su detección con una sola herramienta inmunológica.

En cuanto a los resultados obtenidos por inmunodetección por E2D usando sueros anti-*T. cruzi* se identificaron 10 proteínas de 72 kDa (con aproximadamente 4 proteínas de diferente pl), 50 kDa (con cerca de 7 proteínas de diferente pl), 45 kDa (con 4), 38 kDa (con 4), 35 kDa (con 3), 29 kDa (con 3), 26 kDa (con 5), 22 kDa (con 2), 17 kDa (con 1) y la de 14 kDa (con 1). Al comparar entre las cepas los puntos reconocidas por los sueros, se observó que algunas presentan diferentes niveles de reconocimiento, como fue el caso de las proteínas de 22 y 17 kDa con un pl de 6.4 en Querétaro y Xalapa que tuvieron una mayor reactividad en comparación con Tequesquitengo y una proteína de 15kDa con pl de 4.8 presente en la cepa de Tequesquitengo y ausente en los extractos de Querétaro y Xalapa. Estos resultados concuerdan con lo obtenido en una dimensión, y nuevamente se observó que los extractos, de Querétaro y Xalapa son los más parecidos entre si.

Continuando con la caracterización de las proteínas reconocidas por el suero de pacientes con tripanosomiasis, para identificar el (los) determinante(s) contra los que están dirigidos los anticuerpos de los sueros utilizados y saber si corresponden a la fracción glicosídica o peptídica de las moléculas, así como identificar epitopos péptidicos comunes entre *T. cruzi*, y *L. mexicana*, las cuales presentan reacción inmune cruzada, se realizó un ensayo de oxidación con metaperiodato. La oxidación ligera de glucanos, después de la transferencia de las glucoproteínas a membranas de nitrocelulosa previo a la inmunodetección; este procedimiento elimina los carbohidratos; lo que permite identificar las fracciones que actúan como determinantes antigénicos (Woodward, 1985). En las proteínas de *T. cruzi* oxidadas y analizadas con el suero anti- *T. cruzi* se identificaron 12 proteínas entre 14 y 250 kDa (250, 150, 90, 79, 72, 45, 38, 35, 29, 26, 17 y 14 kDa) de las cuales, las de 35, 29 y 26 kDa presentaron la mayor reactividad. Cuando se usó la mezcla de sueros anti-*Leishmania*, sobre las proteínas de *T. cruzi* tratadas bajo las mismas condiciones, se observó un reconocimiento nulo, lo que indicó que la reacción cruzada entre estos dos géneros se debe al reconocimiento de la región glicosídica.

En el trabajo de Bucio *et al* (1999), se reportaron cinco proteínas sin cruce inmunológico con *Leishmania* (74, 44, 31, 25 y 18 kDa), y en el presente trabajo se identificaron sólo cinco de 150, 90, 79, 72 y 26; de las proteínas identificadas por nosotros por medio de electroinmunotransferencia, la de 26 kDa podría corresponder con la de 25kDa, reportada por Scharfstein *et al* (1983) la cual es de membrana, está en todos los estadios y en diferentes aislados del parásito y tiene buena reactividad inmunológica.

En los datos presentados en este trabajo, llama la atención el reconocimiento de dos componentes inmunodominantes de alto peso molecular (250 y 150 kDa), de los cuales existe poca o nula información al respecto. Rangel-Aldao (1986), describió un grupo de proteínas antigénicas reconocidas por anticuerpos de huéspedes inmunizados o infectados de peso molecular entre los 75 y 150 kDa y en otros trabajos cuando se indujo la producción de anticuerpos en un modelo murino infectados con *T. cruzi* a los 25 días de ser inoculados los sueros de estos animales detectaron antígenos de 25 a 230 kDa. Umezawa (1996) reportó antígenos de 130 a 200 kDa para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en fase aguda y para la fase crónica

uno de 150-160 kDa sin cruce inmunológico con sueros de pacientes con Leishmaniosis visceral ó mucocutánea.

Dado que se sabe que en células eucariotas los carbohidratos se encuentran principalmente en la membrana plasmática y en menor proporción, en membranas intracelulares que forman el aparato de Golgi, el retículo endoplásmico y algunas vesículas endoplasmáticas puede considerarse que las glicoproteínas de *T. cruzi* están asociadas con la membrana celular (Brener 1973; De Souza, 1984; Bua, 1999). Por esta razón para estudiar las moléculas glicosiladas presentes en los extractos proteicos se procedió a hacer un ensayo con el reactivo proQ Emerald, el cual se une específicamente a las glicoproteínas. El reconocimiento específico de los azúcares se basa en que los glicoles presentes en las glicoproteínas se oxidan inicialmente con ácido peryódico y posteriormente el colorante reacciona con los aldehídos para generar un conjugado altamente fluorescente. Esta técnica, a comparación de otras, como la tinción de Schiff (PAS), es más sensible y rápida (Steinberg, 2001). Con esta técnica se identificaron 15 glicoproteínas de 250, 79, 72, 63, 51, 40, 35, 29, 26, 22, 19, 17, 14 y 13 kDa sin diferencias cualitativas en los componentes de los tres extractos proteicos. Los resultados obtenidos con pro-Q Emerald fueron comparados con los resultados obtenidos con la tinción con Sypro Ruby que tiñe todas las proteínas. Este colorante es un compuesto con metales de transición (rutenio) que interactúa no covalentemente con las proteínas (por mecanismos electrostáticos) y es ultrasensible y luminiscente. Las proteínas identificadas con ambos reactivos fueron las mismas excepto las glicoproteínas de 250 kDa y 33 kDa, las cuales se identificaron sólo con el proQ-Emerald; probablemente debido a que su composición molecular posee un alto contenido de carbohidratos, aún mayor que la mayoría de las proteínas detectadas con este colorante. Con este experimento indica que la mayoría de las proteínas presentes en los extractos se encuentran glicosiladas.

En estudios previos de la presencia de azúcares en las moléculas de *T. cruzi*, Goncalves y Yamaha (1969) describieron que en extractos acuosos alcalinos de epimastigotes existe α -D-manopiranososa, D-galactopiranososa y β -D-galactofuranosa. Por otra parte, el 52% de la glicoproteína de 72kDa, consiste en los carbohidratos glucosamina, glucosa, galactosa, manosa, ribosa y en menor medida fucosa (Snary, 1981), sin embargo, no existe trabajo en el que se compare la composición de monosacáridos entre aislados de epimastigotes.

Debido a la posible importancia de la composición de azúcares sobre el comportamiento de los nuestros aislados de *T. cruzi*, era necesario saber que tipo de monosacáridos estaban presentes en los extractos. Este análisis se realizó por cromatografía de gas, identificándose Galactosa, Manosa, Glucosa, N-acetilglucosamina, Xilosa y Ribosa. Se identificaron diferencias en el porcentaje total de Galactosa, los aislados Querétaro y Xalapa presentan aproximadamente 30% de este monosacárido en comparación con Tequesquitengo que tuvo un 11.9%; para la Manosa se obtuvo cerca del 21% para Querétaro y Xalapa y alrededor del 10% para Tequesquitengo; Glucosa 17% y 20.5% para Querétaro y Xalapa respectivamente en comparación con Tequesquitengo donde se obtuvo el 9% para este monosacárido. Finalmente, el monosacárido que presentó la diferencia más relevante entre los aislados fue N-acetilglucosamina, que el aislado Tequesquitengo presentó la cantidad más elevada con 63.62%, en contraste con Querétaro (20.6%) y Xalapa (13.28%). Estos resultados nuevamente correlacionan lo reportado previamente, siendo más parecidos Querétaro y Xalapa (alta y mediana virulencia, respectivamente) y la más diferente Tequesquitengo (de baja virulencia). Hasta el momento desconocemos la relevancia que pudiera tener el contenido de estos carbohidratos en relación con la virulencia de los aislados de *T. cruzi*; por lo que, para conocer más acerca de la composición de los carbohidratos presentes en los componentes, así como para buscar posibles diferencias en la disposición de azúcares entre los aislados, se realizaron pruebas de unión con diferentes lectinas.

Las lectinas son un grupo de proteínas de origen no inmune que tienen la propiedad de enlazarse de forma específica y reversible a los carbohidratos, ya sean estos libres o que formen parte de estructuras complejas. Todas las lectinas utilizadas (*Cannavalia ensiformis* [Con A], *Maackia amurensis* [MAA], *Sambucus nigra* [SNA], *Amaranthus leucocarpus* [ALL], *Macrobrachium rosenbergii* [MRL] y *Triticum vulgare* [WGA]) reconocieron moléculas en los extractos usados en este trabajo siendo WGA y Con A las más reactivas. Es importante señalar que ninguna de las lectinas utilizadas presentó diferencias cualitativas entre los extractos. La WGA se une a N-acetilglucosamina y existe el antecedente de que puede usarse para marcar específicamente epimastigotes (Pereira, 1980) por el alto nivel de GlcNAc presentes en las glicoproteínas en esta fase del parásito. Según las vías de glicosilación, esto nos podría indicar que las proteínas presentes en los extractos se encuentran N-

glicosiladas; sin embargo, en varios reportes se ha mencionado que las proteínas tipo mucinas, las cuales están O-glicosiladas, en *T. cruzi* no cumplen este criterio debido a que el primer azúcar que se une a residuos de Ser/Thr no es GalNAc como normalmente sucede en otros organismos, sino GlcNAc por lo que las glicoproteínas podrían ser también O-glicosiladas (Previato, 1994, Di Noia, 1998, Previato, 1998).

La ConA tuvo un gran reconocimiento, lo cual correlacionó con las altas concentraciones de manosa y glucosa observadas con la cromatografía de gas. Al respecto, se han reportado que glicoproteínas de 90, 37, 31 y 25 kDa de diferentes formas del parásito, presentan altas concentraciones de galactosa y manosa, siendo éstas aproximadamente el 50% de su peso (Snary, 1985). Por otra parte y desde el punto de vista biológico, cuando los epimastigotes fueron incubados en presencia de esta lectina, los macrófagos los opsonizaron y endocitaron más fácilmente por lo que se propuso que la presencia de estos carbohidratos en la superficie del epimastigote facilita la interacción celular y con ello la endocitosis y lisis dentro de la vacuola endocítica a diferencia de los tripomastigotes cuya composición de carbohidratos cambia (Meirelles, 1983). Desde el punto de vista biológico, se sugiere que estos carbohidratos tienen relevancia con diferentes tipos de células ya que se observó que son esenciales en la fase de epimastigote para poder unirse a la membrana intestinal del triatomino, para establecerse reproducirse y así continuar su ciclo (Alves, 2007).

Las lectinas MAA, MRL y SNA tienen afinidad a oligosacáridos con ácido neuramínico (NeuAc); al realizar los ensayos con las lectinas MAA y MRL se identificaron 4 glicoproteínas (250, 150, 100 y 75 kDa) y 5 con SNA (250, 150, 100, 81, 67 kDa). Lo anterior sugiere que estas proteínas presentan NeuAc en su estructura molecular con diferentes sitios posibles de unión (ver tabla 5). Al respecto, se ha reportado que *T. cruzi* es incapaz de sintetizar su propio ácido siálico y lo adquiere de las células huésped por medio de las trans sialidasas (Snary, 1985, Tonowitz *et al*, 1992, Atwood, 2005). Estas trans sialidasas son funcionales principalmente en el tripomastigote; sin embargo se ha reportado que esta enzima también puede ser funcional en los epimastigotes aunque en menor medida (Previato, 1985, Souto-Padrón, 1985, Chaves, 1993). En este caso al haber reconocimiento por parte de las lectinas MAA, MRL y SNA, se puede sugerir que el parásito adquiere estos residuos de ácido siálico del medio de cultivo, como lo propone Previato (1985), por medio de la acción de una transglicosidasa o bien por una trans sialidasa. Chaves (1993) reportó una trans

sialidasa de 90kDa de epimastigotes y propuso que la función de estas podría ser la de modificar las interacciones con el insecto ayudando al parásito a sobrevivir dentro del tracto digestivo del transmisor. La presencia de NeuAc en nuestros extractos, difiere con los resultados obtenidos mediante cromatografía de gas ya que mediante esta técnica no se detectó este monosacárido. En cuanto a los resultados obtenidos con ALL, se identificaron 4 proteínas de 250, 150, 100 y 75kDa, lo cual también difiere con los resultados encontrados en la cromatografía de gas, debido a la presencia de GalNAc. Al respecto, en reportes previos se demostró que los epimastigotes unen ácido siálico a residuos de GalNAc por medio de una trans sialidasa (Freire *et al*, 2003) y por otra parte, se ha evidenciado por medio del uso de lectinas se sugirió la presencia de GalNAc-Thr en diferentes estadios del parásito (Andrade *et al*, 1991). En trabajos *in vitro* se mostró la participación de la enzima ppGalNAc-T, la cual es responsable de la transferencia de la N-acetilgalactosamina del UDP-GalNAc a residuos de serina o treonina (Freire *et al*, 2003). Lo anterior apoya los resultados obtenidos en los ensayos con la lectinas ALL y las lectinas MAA, MRL y SNA y explica porque las proteínas reconocidas por estas 4 lectinas sean prácticamente las mismas. En contraparte, las diferencias en el porcentaje total de los monosacáridos entre los aislados obtenidos por cromatografía de gas en comparación a lo obtenido con el ensayo de unión a las lectinas, podrían deberse a que la concentración de estos azúcares es tan escasa que no fue suficiente como para poder ser detectados en el análisis cromatográfico.

Por otra parte, con el análisis electroforético en una y dos dimensiones de las proteínas fue posible identificar moléculas diferenciales entre las cepas, las cuales podrían ser las responsables de las diferencias biológicas entre ellas. Por este motivo se intentó la identificación por medio de espectrometría de masas y/o predecir la secuencia de aminoácidos de algunas de estas moléculas; sin embargo, para tener las condiciones óptimas para aplicar este método se requiere, en un primer paso, contar con bases de datos genómicas completas y curadas del organismo en estudio que permitan deducir todas las proteínas que ese organismo tiene la capacidad de producir. En un segundo paso se requiere el sistema informático que, a partir de esas proteínas teóricas, generarían (sus "huellas") durante el procedimiento de MALDI-TOF y que permita identificar las proteínas aisladas experimentalmente. Cuando se logre identificar a plenitud estas moléculas diferenciales, se podrán proponer modelos que expliquen las diferencias biológicas, dependiendo de la función probable de la(s)

molécula(s) expresada(s) diferencialmente. En este trabajo, se intentó utilizando la espectrometría de masas, identificar algunas proteínas. La proteína con la identidad (*score*) más alto fue la de 38kDa del aislado de Xalapa con 12. 64, la cual corresponde a una proteína putativa de *Trypanosoma brucei* y aquella que presentó el *score* más bajo fue la de 38 kDa del aislado Tequesquitengo con un *score* de 1.89 que corresponde a una proteína putativa de *Leishmania sp.* Para la identificación de moléculas se considera como un *score* 60 o 70 como umbral para considerar como adecuada la identificación. La baja identidad o "*score*" encontrada en todos los casos trabajados no permitió identificar inequívocamente alguna molécula, lo cual pudiera deberse al número reducido de secuencias "curadas" disponibles en las bases de datos de este parásito tal y como lo reporta Paba (2004), o bien a la alta glicosilación de las proteínas analizadas por esta metodología, lo cual modifica los valores masa/carga (*m/z*) obtenidos experimentalmente y que los desvía de los generados teóricamente a partir de las bases de datos, los cuales se calculan considerando sólo la región peptídica. Al respecto se ha reportado que las proteínas pueden ser deglicosiladas con una N-glicanasa, para obtener iones cargados correspondientes sólo a la región peptídica de las moléculas (Veenestra, 2006). Lo anterior, podría explicar el número diferente de masas monoisotópicas obtenidas del mismo componente de diferentes aislados al utilizar la misma metodología y por otra parte, explicar el hecho de la baja identidad encontrada en la base de datos.

VII. CONCLUSIONES

1. Los patrones de proteínas de epimastigotes de tres aislados de *T. cruzi* analizados por electroforesis en una y dos dimensiones fueron muy similares aunque se encontraron proteínas diferenciales, siendo Querétaro y Xalapa los más similares y Querétaro y Tequesquitengo las más diferentes lo que concuerda con su comportamiento biológico.
2. En los extractos de epimastigotes de *T. cruzi* se observaron 14 proteínas antigénicas de las cuales las de 150, 90, 79, 38 y 13 kDa. no presentaron cruce inmunológico con sueros de pacientes con *Leishmania mexicana* forma difusa
3. La reacción cruzada con los sueros de pacientes con tripanosomiosis y con sueros de pacientes con *Leishmania mexicana* forma difusa, contra los extractos de epimastigotes de *T. cruzi*, se deben al reconocimiento de carbohidratos
4. Las glucoproteínas de los aislados de *T. cruzi* estudiadas en este trabajo presentaron manosa, glucosa y GlcNAc como azúcares mayoritarios y los aislados Querétaro y Xalapa son los más parecidos en su contenido total de azúcares.
5. Las lectinas que presentaron mayor reconocimiento fueron ConA y WGA por las altas concentraciones de Manosa, glucosa y N-acetilglucosamina presente en los componentes. Las lectinas MAA, SNA, MRL y ALL reconocen las mismas 4 proteínas de 250, 150, 100 y 75kDa debido al tipo de glicosilación que presentan estas moléculas, las cuales pueden estar O-glicosiladas con GalNAc y ser aceptores de ácido siálico.
6. Las proteínas de 14, 22 y 38 kDa, seleccionadas para su análisis por espectrometría de masas, son abundantes, inmunogénicas y permanecen reconocidas después del tratamiento con metaperiodato. Estas se encuentran glicosiladas con presencia de manosa, glucosa o N-acetilglucosamina en su composición, sin diferencias entre los aislados.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Adams LD. 1989. Two- Dimensional gel electrophoresis using the O'Farrel System. In: Current Protocols in Molecular Biology. Ed by Frederick M Ausubel. Greene Publishing Associates, John Wiley & Sons. NY. Vol 2 Unit 10.4
2. Alves CR, Albuquerque-Cunha JM, Mello CB, García ES, Nogueira NF, Bourguignon SC, De Souza W, Azambuja P y MS González. 2007. *Trypanosoma cruzi*: Attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of *Rhodnius prolixus*. Experimental Parasitology. 116: 44-52
3. Aguilar Díaz JH. 2004. Caracterización biológica e inmunoquímica de cuatro aislados obtenidos de cuatro especies de *Trypanosoma cruzi*. Tesis para obtener el título de Biólogo. Facultad de Ciencias, UNAM.
4. Andersson J. 2004. Molecular diagnosis of experimental Chagas disease. TRENDS in Parasitology. 20: 52-53.
5. Andrade Z. 1999. Immunopathology of Chagas Disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 94,Suppl.I: 71-80.
6. Atwood JA, Weatherly DB, Minning TA, Bundy B, Cavola C, Opperdoes FR, Orlando R and RL Tarleton. 2005. The *Trypanosoma cruzi* proteome. Science. 309: 473-476.
7. Bogitsh B, Cater C, Oeltmann T. 2005. Human Parasitology. 3da ed. Elsevier Academic Press. 98-121.
8. Bongertz V and J Dvorak. 1983. *Trypanosoma cruzi*:Antigenic analysis of cloned stocks. Am J Trop Med Hyg. 32(4):716-722.
9. Brener Z. 1973. The biology of *Trypanosoma cruzi*. Annu Rev Microbiol. 27: 347-82
10. Bua J, Bontempi EJ, Ruiz A y E Segura. 1990. Antígenos en *Trypanosoma cruzi*. Revista Argentina de Microbiología. 22: 47-66.
11. Bucio MI, Cabrera M, Segura E, Zenteno E and PM Salazar Schettino. 1999. Identification of Immunodominant antigens in mexican strains of *Trypanosoma cruzi*. Immunological Investigations. 28(4): 257-268
12. Buscaglia C y Di Noia J. 2003. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and epidemiology of Chagas' Disease. Microbes and Infection. 5: 419-427.
13. Buscaglia CA, Campo VA, Frasc AC, Di Noia JM. 2006. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. Nat Rev Microbiol.4(3):229-36
14. Cabrera Bravo M, Bucio M, Rojo J, Bonifaz R, Guevara Y and PM Salazar Schettino. 2004. Detection of antibodies against *Trypanosoma cruzi* in blood donors in the General Hospital of Mexico city. Revista de Patología Tropical. 33(1):71-80.

15. Camandaroba E, Pinheiro Lima C and Andrade S. 2002. Oral transmission of Chagas Disease: Importance of *Trypanosoma cruzi* biotome in the intragastric experimental infection. *Rev Inst Med trop S Paulo*. 44: 97- 103.
16. Camargo EP. 1964. Crescimento e diferenciacao em *Trypanoma cruzi*. I. Origem dos tripanosomas metacíclicos em meio de cultivo liquido. *Ver Inst Méd Trop São Paulo*. 6:93.
17. Carcavallo R, Galindez I, Jurberg J y H Lent. 1998. Atlas of Chagas' Disease Vectors in the Americas. Editora FioCruz. Río de Janeiro. Vol I. 393pp.
18. Cardoso A, Lescano S, Amato Neto V, Gakiya E and Santos S. 2006. Survival of *Trypanosoma cruzi* in sugar cane used to prepare juice. *Rev Inst Med trop S Paulo*. 48: 287- 289.
19. Chagas C. 1909. Nova tripanozomíaze humana. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1: 159-218.
20. Chaves L, Marcelo RS y S Schenkman. 1993. Trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes is expressed at the stationary phase and is different from the enzyme expressed in trypomastigotes. *Mol and Biochem Parasitol*. 61: 97-106.
21. De Lima A, Farías M, Tortolero E, Navarro M y Contreras V. 2001. Purificación parcial y empleo de fracciones glicosídicas de *Trypanosoma cruzi* en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Acta Científica Venezolana*. 52: 235-247.
22. De Souza W; 1978 The cell surface of *Trypanosoma cruzi*: cytochemistry and freeze fracture *J Cell Sci* 33: 285-299)
23. De Souza W. 1984. Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *International Review of cytology*. 86: 197- 283.
24. De Souza W, 2002. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des*. 8(4):269-85
25. Devera R, Fernandez O and J Rodriguez Coura. 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):1-12.
26. Dias JCP and Schofield CJ. 1999. The evolution of Chagas Disease (American Trypanosomiasis) Control after 90 years since Carlos Chagas Discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 94 (Suppl I): 103- 121.
27. Di Noia J, D'Orso I, Aslund L y Sanchez D. 1998. The *Trypanosoma cruzi* Mucin Family is transcribed from hundreds of genes having hypervariable regions. *J Biol Chem*. 273(18): 10843-10850.
28. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA y F Smith. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*. 28(3): 350-356.

29. Dutra WO, Otávio M and Texeira M. 2005. The clinical immunology of human Chagas Disease. *TRENDS in Parasitology*. 21: 581- 587.
30. Dumonteil E. 1999. Update on Chagas' Disease in Mexico. *Salud Pública de México*. 41: 322-327.
31. El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, Ghedin E, Worthey EA, Delcher AL, Blandin G, Westenberger SJ, Caler E, Cerqueira GC, Branche C, Haas B, Anupama A, Arner E, Aslund L, Attipoe P, Bontempi E, Bringaud F, Burton P, Cadag E, Campbell DA, Carrington M, Crabtree J, Darban H, da Silveira JF, de Jong P, Edwards K, Englund PT, Fazelina G, Feldblyum T, Ferella M, Frasch AC, Gull K, Horn D, Hou L, Huang Y, Kindlund E, Klingbeil M, Kluge S, Koo H, Lacerda D, Levin MJ, Lorenzi H, Louie T, Machado CR, McCulloch R, McKenna A, Mizuno Y, Mottram JC, Nelson S, Ochaya S, Osoegawa K, Pai G, Parsons M, Pentony M, Pettersson U, Pop M, Ramirez JL, Rinta J, Robertson L, Salzberg SL, Sanchez DO, Seyler A, Sharma R, Shetty J, Simpson AJ, Sisk E, Tammi MT, Tarleton R, Teixeira S, Van Aken S, Vogt C, Ward PN, Wickstead B, Wortman J, White O, Fraser CM, Stuart KD and B Andersson. 2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. 309(5733):409-15.
32. Ferguson M. 1997. The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites. *Phil. Trans. R Soc Lond*. 352: 1295-1302.
33. Freire T, Robello C, Soulé S, Ferreira F y E Osinaga. 2003. Sialyl-Tn antigen expression and O-linked GalNAc-Thr synthesis by *Trypanosoma cruzi*. *Biochem and Biophys Research Communications*. 312: 1309-1316
34. Gomes M, Galvao L, Macedo A, Pena S and Chiari E. 1999. Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. *Am J Trop Med Hyg*. 60: 205-210.
35. Grögl M y E Kuhn. 1985. Identification of Antigens of *Trypanosoma cruzi* which induce antibodies during experimental Chagas' Disease. *J Parasitol*. 71: 183-191
36. Guzmán-Bracho, C. 2001. Epidemiology of Chagas disease in Mexico: an update. *TRENDS in Parasitology*. 17(8): 372-376.
37. Hernández R, Herrera J, Bosseno MF, Brenière SF and B Espinoza. 2001. *Trypanosoma cruzi*: Data supporting clonality in Mexican Stocks. *J Parasitol*. 87(5): 1178-1181.
38. Heukeshoven J and Dernick R. 1985. Simplified for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis*. 6: 103- 112.
39. Hoffman C. 1928. Nota acerca de un probable transmisor de la Trypanosomiasis humana, en el estado de Veracruz. *Revista Mex Biol*. 8: 12- 18.
40. Hontebeyrie Joskowicz M. 1992. Immunoregulatory mechanisms and Chagas' Disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 87(Suppl V): 101-103.

41. Kleffmann T, Schmidt J y GA Schaub.1998. Attachment of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes to hydrophobic substrates and use of this property to separate stages and promote metacyclogenesis. *J Eukaryot Microbiol.* 45(5):548-55.
42. Kim D, Chiurillo MA, El-Sayed N, Jones K, Santos MRM, Procile P, Andersson B, Myler P, Franco da Silveira J and JL Ramírez. 2005. Telomere and subtelomere of *Trypanosoma cruzi* chromosomes are enriched in (pseudo)genes of retrotransposon hot spot and trans-sialidase-like gene families: the origins of *T. cruzi* telomeres. *Gene.* 346: 153-161.
43. Kierszenbaun F y M Szein.1994. Parasitic Infections and the Immune System; Capítulo 2: Chagas´Disease (American Trypanosomiasis). Academic Press, Inc. 53-78.
44. Köberle F. 1968. Chagas ´disease and Chagas Syndromes: The Pathology of American Trypanosomiasis. *Avances in Parasitology.* 6: 63-116.
45. Lent H and Wygodzinsky P. 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas´ Disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History.* 163: 127-520.
46. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193: 265-275.
47. MacRae J, Acosta Serrano A, Morrice N, Mehlert A y MAJ Ferguson. 2005. Structural Characterization of NENTES, a Novel Glycoconjugate in *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes. *The Journal of Biological Chemistry.* 280(13): 12201-12211.
48. Mazzotti L. 1940. Dos casos de enfermedad de Chagas en el Estado de Oaxaca. *Gac Medica de Mex.* 70(4): 417-420.
49. McConville M, Mullin K, Ilgoutz S and Teadale R. 2002. Secretory pathway of Trypanosomatid parasites. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 66: 122-154.
50. Mello CB, Azambuja P, García ES y A Ratcliffe. 1996. Differential *in Vitro* and *in vivo* behavior of three strains of *Trypanosoma cruzi* in the gut and hemolymph of *Rhodnius prolixus*. *Experimental Parasitology.* 82: 112-121.
51. Meirelles MN, Martinez-Palomo A, Souto Padron T y W De Souza. 1983. Participation of Concanavalin A Binding Sites in the Interaction Between *Trypanosoma cruzi* and Macrophages. *J Cell Sci.* 62: 287-299.
52. Moncayo A. 1997. Progress Towards Interruption of Transmission of Chagas disease. World Health Organization, TDR,CH-1211. Geneva. 27, Switzerland. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 94(supl 1) :401-404
53. O´Farrel PH. 1975. High-resolution two dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem.* 250: 4007- 4021.
54. Ouaiissi A and Ouaiissi M. 2005. Molecular basis of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* interaction with their host(s): exploitation of immune and defense mechanisms by the parasite leading to persistence and chronicity, features

reminiscent of immune system evasion strategies in cancer diseases. Arch Immunol Ther Exp. 53: 102-114.

55. Paba J, Santana J, Texeira A, Fontes W, Sousa M and C Ricart. 2004. Proteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. Proteomics. 4: 1052-1059.
56. Parodi-Talice A, Durán R, Arrambide N, Prieto V, Piñeyro MD, Pritsch O, Cayota A, Cerveñansky C and C Robello. 2004. Proteome analysis of the causative agent of Chagas Disease: *Trypanosoma cruzi*. International Journal of Parasitology. 34: 881-886.
57. Prata A. 1994. Chagas Disease. Infectious Disease Clinics of North America. 8: 61- 76.
58. Prata A. 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. The Lancet Infection Diseases. 1: 92-100.
59. Previato JO, Arnaldo FB, Pessolani MC y L Medoca-Previato. 1985. Incorporation of Sialic acid into *Trypanosoma cruzi* macromolecules, a proposal for a new metabolic route. Mol and Biochem Parasitol. 16: 85-96.
60. Previato J, Jones C, Goncalves L, Wait R, Travassos L, Mendoca-Previato L. 1994. O-Glycosidically linked N-acetylglucosamine- bound oligosaccharides fom glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. Biochem J. 301:151-159.
61. Previato JO, Sola-Penna M, Agrellos O, Jones C, Oeltmann T, Travassos L, Mendoca-Previato L. 1998. Biosíntesis of O-N – Acetylglucosamine-linked Glycans in *Trypanosoma cruzi*. The Journal of Biological Chemistry. 273: 14982-14988.
62. Rangel Aldao R, Comach G, Allende O, Cayana E, Delgado V, Piras R, Piras M, Henríquez D y D Negri. 1986. *Trypanosoma cruzi* polypeptid markers of epimastigotes and trypomastigotes. Mol Biochem Parasitol. 20: 25-32
63. Salazar-Schettino PM, de Haro I y Uribarren T. 1988. Chagas Disease in Mexico. Parasitology Today. 4: 348-352.
64. Salazar-Schettino PM, Bucio MI, Cabrera M y Bautista J. 1997. First case of Natural Infection in Pigs. Review of *Trypanosoma cruzi* Reservoirs in Mexico. Mem Inst Oswaldo Cruz. 92(4): 499-502.
65. Salazar-Schettino PM, Cravioto A y Tapia Conyer R. 2001. Iniciativa México: Propuesta para el control y vigilancia epidemiológica de la enfermedad de Chagas en México. Bol Chil Parasitol. 57: 76-79.
66. Salazar Schettino PM, De Haro I, Cabrera Bravo M. 2005. Tres especies de Triatomínos y su importancia como vectores de *Trypanosoma cruzi*. Medicina (Buenos Aires). 65: 63-69.
67. Schechter M y N Nogueira. 1988. Variations induced by different methodologies in *Trypanosoma cruzi* surface antigen profiles. Molecular and Biochemical Parasitology. 29: 37-46.

68. Schofield CJ. 1994. Triatominae: Biología y Control. UK. Zeneca Public Health. 77pp.
69. Schmidt J, Kleffmann T y GA Schaub. 1998. Hydrophobic attachment of *Trypanosoma cruzi* to a superficial layer of the rectal cuticle in the bug *Triatoma infestans*. Parasitol Res. 84(7):527-36.
70. Sharon, N y H Lis. 1989. Lectins as cell recognition molecules. Science. 246. 227-34
71. Silber AM, Colli W, Ulrich H, Manso MJ, Pereira CA. 2005. Amino Acid Metabolic Routes in *Trypanosoma cruzi*: Possible Therapeutic Targets Against Chagas' Disease. Current Drug Targets- Infectious Disorders. 5: 53-64
72. Silber AM, Marcipar IS, Roodveldt C, Cabeza Meckert P, Laguens R y AJ Marcipar. *Trypanosoma cruzi*: Identification of a galactose-binding protein that binds to cell surface of human erythrocytes and is involved in cell invasion by the parasite. Exp Parasitol. 100: 217-225.
73. Snary D. 1980. *Trypanosoma cruzi*: antigenic invariance of the cell surface glycoprotein. Exp Parasitol 49: 68-77.
74. Snary D. 1985. The Cell Surface of *Trypanosoma cruzi*. Current Topics in Microbiology and Immunology. 117: 76-92
75. Souza RA, Henriques C, Alves-Ferreira M, Mendoca-Lima L y WM Degraeve. 2007. Investigation of a proteína expresión profile by high-resolution bidimensional electrophoresis of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Analytical Biochemistry. 365: 144-146.
76. Souto-Padrón T and W de Souza. 1985. Sialoglycoproteins and sialoglycolipids contribute to the negative surface charge of epimastigotes and trypomastigotes forms of *Trypanosoma cruzi*. Bioch et Biophys Acta. 814: 163-169.
77. Steinberg T, Pretty K, Berggren K, Kemper C, Jones L, Diwu Z, Haugland R y W P. 2001. Rapid and simple single nanogram detection of glycoproteins in polyacrylamide gels and on electroblots. Proteomics. 1: 841-855.
78. Tafuri WL. 1987. Patogenia da doença de Chagas. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 29: 194-199
79. Tafuri WL. 1999. Immunopathology of Chagas Disease-A Historical Overview. Mem Inst Oswaldo Cruz. 94(Suppl I):247- 248.
80. Tanowitz HB, Kirchoff L, Simon D, Morris S, Weiss L and Wittner M. 1992. Chagas' Disease. Clinical Microbiology Reviews. 5: 400- 419.
81. Tay J, Salazar-Schettino PM y D Ontiveros. 1969. El comportamiento en el ratón blanco de una cepa de *Trypanosoma cruzi* mediante pases sucesivos en diferentes especies de triatomas. Rev Lat-Amer Microbiol Parasitol. 11: 79-89

82. Tay J, Gutierrez M, Salazar-Schettino PM, Castillo M y M Ortega. 1973. Estudios sobre seis cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi* Rev Inv Salud Pública (México). 33: 67-76.
83. Texeira A, Nascimento R y Sturm N. 2006. Evolution and pathology in Chagas' disease-a Review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 101: 463-491.
84. Tibayrene M and F Ayala. 1988. Isoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance. Evolution. 42: 277-292.
85. Umezawa ES, Nascimento MS, Kesper N Jr, Coura JR, Borges-Pereira J, Junqueira AC y ME Camargo. 1996. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute and chronic Chagas Disease. J Clin Microbiol. 34: 2143-2147.
86. UNAM, CNTS. 2006. Manual para el Diagnóstico de la Infección por *Trypanosoma cruzi*. México, D.F. 45pp.
87. Velasco-Castrejón O y Guzmán-Bracho C. 1986. Importancia de la enfermedad de Chagas en México. Rev Lat-amer Microbiol. 28: 275- 283.
88. Venestra T y Yates J. 2006. Proteomics for Biological Discovery.Ed. Wiley-Liss USA. 326 pp.
89. Virreira M, Torrico F, Truyens C, Alonso-Vega C, Solano M, Carlier Y and Svoboda M. 2003. Comparison of Polymerase Chain Reaction Methods for reliable and easy detection of Congenital *Trypanosoma cruzi* infection. Am J Trop Med Hyg. 68: 574 – 582.
90. Wendel S, Brener Z, Camargo ME y A Rassi. Chagas Disease (American Tripanosomiasis): Its impact on transfusión and clinical medicine. ISBT Brazil'92. Sao Paulo, Brazil. 271pp.
91. World Health Organization. 2001. Control of Chagas disease (2nd Report of the WHO Expert Committee) WHO Tech Rep Ser. 905: 1-120
92. Woodward MP, Young Jr WW y RA Bloodgood. 1985. Detection of Monoclonal Antibodies Specific for Carbohydrate Epitopes Using Periodate Oxidation. Journal of Immunological Methods. 78: 143-153.
93. Wray W, Boulikas T, Wray UP, Hancock R. 1981. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. Anal Biochem. 118: 197-203.
94. Zarate L. 1984. Comportamiento biológico de los triatomeos en relación a su potencial transmisor de la enfermedad de Chagas (Hemiptera, Reduviidae). Folia Entomológica Mexicana. 61: 257-271.
95. Zeledón R .1997. Some Morphological and Molecular Aspects of the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi* in the Insect Vector. Mem Inst Oswaldo Cruz. 94(Suppl 1): 217-218.