



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

CARACTERIZACIÓN DE LA ENZIMA
TRANS-SIALIDASA EN DOS CEPAS
MEXICANAS DE *Trypanosoma cruzi* CON
DIFERENTE CAPACIDAD INFECTIVA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A:
ANDREA RUBÍ JIMÉNEZ MARÍN

Tutor: DRA. BERTHA ESPINOZA GUTIÉRREZ



MÉXICO, D. F.

Marzo 2011



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.

CARACTERIZACIÓN DE LA ENZIMA TRANS-SIALIDASA EN DOS CEPAS MEXICANAS DE *Trypanosoma cruzi* CON DIFERENTE CAPACIDAD INFECTIVA

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de Maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez en el laboratorio B-114, en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

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

Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dra. Rosa Navarro	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Gustavo Pedraza Alba	Instituto de Biotecnología, UNAM

Se reconoce la colaboración del Dr. Sergio Schenkman, del Departamento de Biología Celular de Escuela Paulista de Medicina, Universidad Federal de Sao Paulo, Brasil, cuyo laboratorio proporcionó amablemente el anticuerpo mAb39 que se utilizó en este trabajo.

Se reconoce el apoyo otorgado por el Dr. Alejandro Fernández de la Facultad de Medicina de la UNAM por el préstamo del equipo utilizado para la cuantificación de la fluorescencia de los ensayos de actividad enzimática.

El proyecto fue apoyado parcialmente por DGAPA, programa PAPITT IN 229209. Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Clara Espitia Pinzón	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Vocal	Dra. Imelda López	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Secretario	Dr. Gustavo Pedraza	Instituto de Biotecnología, UNAM
Suplente	Dra. Blanca Ruiz	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Suplente	Dr. Ruy Pérez Montfort	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Agradecimientos

A la Dra. Bertha Espinoza. Por las enseñanzas que recibí de tu parte tanto en el ámbito académico como en el personal. Haz sido una gran maestra y una gran amiga.

A la M. en C. Maria Luisa Martínez Velasco por su asesoría en la extracción de proteínas, WB y su invaluable amistad.

Al M. en C. Ignacio Martínez Martínez por su ayuda en la inoculación de los ratones con el hibridoma mAb39 y por ser un gran amigo.

Dedicatorias

A mis papas: Aquí estamos papitos, dando un paso más. Gracias nuevamente por todo; en especial, por toda la confianza y el apoyo incondicional, por sus cuidados y por darme un hogar al que siempre puedo regresar. Los amo profunda y eternamente.

A Tristán: Creo que con solo nombrarte lo digo todo. Gracias por tu amor y por tus ganas. Sabes que te he querido como a nadie en el mundo...

A mis hermanos: Gracias por todo hermanitos. Mis éxitos son también suyos por todo lo que me han dado y enseñado. Los amo.

A mis sobrinos Sebastián Luca y Natalia Paola. Por llenarme de alegría al ver sus caras. Son un motivo más para esforzarme y avanzar. Cuenten conmigo siempre.

A Dalila: Gracias por ser mi fiel e incondicional compañera. Creo que eres el único ser que me entiende realmente. Ojalá todas las personas fueran como tú.

A mis amigos Edna, Erika y Sergio. Gracias por estar a mi lado a pesar del tiempo y la distancia. Los quiero mucho.

A María Luisa, Nacho y Noemí. Gracias por ser mis amigos por todos estos años y apoyarme tanto en el terreno personal como en el profesional. Los extraño, pero sé que siempre cuento con ustedes.

A Edgar: Gracias por estar ahí siempre que te he necesitado. Vales mil.

A todos las personas que durante el 2009 estuvieron a mi lado, apoyándome consciente o inconscientemente. Además de mi familia y mis amigos cercanos, gracias a Rodrigo, María José, Walter, Jessy, Susy.

A George: Te debo la vida amigo. Gracias por todas tus enseñanzas y el apoyo.

Y a los que durante el 2010 me hicieron más leve mi cambio de vida, particularmente a Gustavo y Artemio, así como a los miembros del Galerón 7 del LANGE BIO

Honor a quien honor merezca

...entonces la serpiente dijo a la mujer:

"No, no morirán. Dios sabe muy bien que cuando

Ustedes coman de ese árbol, se les abrirán los ojos

Y serán como dioses, conocedores del bien y del mal".

Génesis 3:4

La mirada de tus ojos grandes, hermosos

Las puertas de tu alma, el brillo de la tierra

La inmensidad de la vida, todo está ahí

En tus ojos, en tu mirada, en ti, solo en ti

Tristán Gómez

I. Resumen	1
II. Abreviaturas.....	1
III. Introducción	2
III.1. Generalidades de la Enfermedad de Chagas	2
III.2. Distribución	2
III.3. Formas de Transmisión.....	4
III.4. Manifestaciones Clínicas de la Enfermedad	5
III.4.1. Fase Aguda.....	5
III.4.2. Fase Crónica.....	6
III.5. El Agente Etiológico.....	8
III.5.1 Clasificación Taxonómica de <i>Trypanosoma cruzi</i>	8
III.5.2. Morfología	8
III.5.2.a. Tripomastigote	9
III.5.2.b. Amastigote	10
III.5.2.c. Epimastigote	10
III.6. Variabilidad Genética de <i>T. cruzi</i>	14
III.7. Infección de la célula hospedera	17
III.8. Moléculas involucradas en la invasión de las células hospederas por tripomastigotes de <i>T. cruzi</i>.	19
III.8.1 Superfamilia gp85/TS.....	20
III.9. Características de la TS	21
III.9.1. Estructura de la TS.	22
III.9.2. Características de la hendidura del sitio activo de la TS de <i>T. cruzi</i>	24
III.9.3. Mecanismo general de acción de la TS.....	25
III.9.4. Funciones biológicas de la TS.....	29
IV. Justificación.....	32
V. Hipótesis	33
VI. Objetivos.....	34
VI.1. Objetivo General:.....	34
VI.2. Objetivos particulares:	34
VII. Metodología	35
VII.1. Parásitos.....	35

VII.2. Células	35
VII.3. Extracción de RNA Total de tripomastigotes.....	36
VII.4. Detección de mRNA de TS por RT-PCR.....	37
VII.5. Anticuerpos	39
VII.6. Producción de Líquido de Ascitis.....	39
VII.7. Extracto proteico	40
VII.8. Obtención del Medio condicionado de parásitos	40
VII.9. Western Blot.....	41
VII.10. Análisis Densitométrico	42
VII.11. Ensayo de Actividad de TS	42
VII.12. Fijación de células THP1	43
VII.13. Ensayo de Ligandos	44
VII.14. Ensayo de inhibición de la infección	44
VII.15. Análisis estadístico	45
VIII. RESULTADOS	46
VIII.1. Diseño de Iniciadores	46
VIII.2. Estandarización de la extracción de RNA.....	48
VIII.3. Estandarización del RT-PCR	49
VIII.4. Expresión de mensajeros para TS en las cepas mexicanas Ninoa y Qro de <i>T. cruzi</i>	50
VIII.5. Identificación de la Transialidasa en extractos totales de tripomastigotes de las cepas Ninoa de <i>T. cruzi</i>	55
VIII.6. Expresión de TS en extracto total de tripomastigotes de las cepas Ninoa y Qro.	56
VIII.7. Secreción de TS en medio condicionado con parásitos (MCP) de las cepas Ninoa y Qro.	57
VIII.8. Actividad enzimática de la TS en las cepas Ninoa y Qro de <i>T. cruzi</i>	60
VIII.9. Ensayo de ligandos para detectar la unión de TS a células THP1.....	61
VIII.10. Ensayos de infección utilizando el anticuerpo mAb39 como bloqueo de TS	63
IX. Discusión	65
X. Conclusiones.....	73
XI. Bibliografía	74
XII. ANEXOS.....	87

Anexo I. Alineamiento del gen de TS.....	87
Anexo II. Alineamiento de las secuencias de tres genes representativos de la familia TS	90
Anexo III. Ensayo no-radioactivo para la detección de actividad de TS	94
Anexo IV. Datos arrojados por el Fluorometro del primer ensayo de actividad de TS	95

I. Resumen

El parásito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* puede invadir cualquier célula nucleada. El establecimiento de la infección depende de una serie de eventos que tienen que ver con la interacción de diversas moléculas del parásito con componentes de la célula hospedera. Una de estas moléculas forma parte de una familia de enzimas denominadas trans-sialidasas (TS) que comprende miembros de pesos moleculares en un rango de 120 a 200 KDa y ha sido ampliamente estudiada en cepas sudamericanas. Esta molécula se expresa en grandes cantidades en la superficie de los tripomastigotes, las formas infectivas del parásito, además de ser secretada por éstos. Se le ha propuesto como un importante factor de virulencia de *T. cruzi* al catalizar la transferencia de ácido siálico de glicoconjugados del hospedero a moléculas aceptoras en la membrana plasmática del parásito. En este trabajo se caracterizó la expresión de la enzima TS en dos cepas mexicanas de genotipo TcI, las cuales difieren entre sí en capacidad infectiva. Los resultados obtenidos en los ensayos de RT-PCR sugieren que no hay diferencias en la expresión genética de TS, al no haber diferencias significativas en el análisis semi-cuantitativo de los mensajeros para esta enzima. Por otro lado, al hacer ensayos de Western Blot en busca de la proteína se encontró que la cepa poco infectiva expresa 4 veces más esta enzima que la cepa con mayor infectividad. También se encontraron diferencias en la secreción de esta enzima por parte de las dos cepas, siendo 30 veces mayor la secreción en la cepa avirulenta. Los ensayos de actividad enzimática no mostraron diferencias significativas. Estos resultados sugieren que la cepa menos infectiva produce y secreta más TS que la cepa más infectiva. Este fenómeno sugiere que esta enzima no tiene un papel clave en el proceso de infección en estas cepas mexicanas. Se discute y se propone hacer más estudios con esta enzima y con más cepas Mexicanas.

II. Abreviaturas

Å – angstrom
AMP – adenosín monofosfato
Arg – arginina
Asp – ácido aspártico
β-Gal – beta galactosidasa
CO₂ – bióxido de carbono
DEPC – dietilpirocarbonato
DMEM – medio Eagle modificado de Dubelcco
DNA – ácido desoxirribonucleico
dNTP – desoxirribonucleótidos trifosfato
EDTA – ácido etilendiaminotetraacético
Gln – glutamina
Glu – ácido glutámico
GPI - glucosilfosfatidín
HCl – ácido clorhídrico
HRP – peroxidasa
KDNA – ácido desoxirribonucleico del cinetoplasto
Leu – leucina
MASP – proteínas de superficie asociadas a mucinas
MgSO₄ – sulfato de magnesio
MU – 4-metilumbeliferil
MUGal – 4-metilumbeliferil-β-D-galactopiranosido
PBS – amortiguador de fosfatos
PCR – reacción en cadena de la polimerasa
PIPES – piperazine-N-N'-bis(2-etanesulfonato)
PI-PLC – fosfolipasa C
Pro – prolina
RNA – ácido ribonucleico
RPMI – medio Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR – reverse transcripción de la reacción en cadena de la polimerasa
SAPA – antígeno secretado de fase aguda
SDS – dodecil sulfato de sodio
SFB – suero fetal bovino
TM – temperatura de fusión
Trp – triptofano
Tyr – tirosina
Val – valina
WB – Western blot

III. Introducción

III.1. Generalidades de la Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es una enfermedad parasitaria crónica causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. La transmisión de esta enfermedad se da habitualmente por la contaminación de la piel y mucosas con las deyecciones del insecto vector, generalmente del género *Triatoma*, o por transfusiones sanguíneas provenientes de individuos infectados con *T. cruzi* (OPS, 2006).

III.2. Distribución

La enfermedad de Chagas es endémica del Continente Americano, extendiéndose desde el sur de los Estados Unidos hasta el sur de Argentina debido, entre otras cosas, a que es en esta región donde se encuentran los vectores, los cuales son insectos hematófagos de la familia Reduviidae. Sin embargo, el número de personas infectadas ha crecido en países desarrollados no endémicos como Australia, Japón, Estados Unidos, Canadá y Europa Occidental, debido al incremento de la migración de personas de América Latina que, sin saberlo, portan el parásito en su sangre (Schmunis, 2007; Guerri-Guttemberg *et al.*, 2008) (Fig. 1)

La enfermedad de Chagas representa un problema de salud pública en 21 países de Latinoamérica, con una estimación de 100 millones de personas expuestas a la enfermedad y de 16 a 18 millones de personas infectadas en toda América Latina, de las cuales mueren 50,000 cada año (WHO, 2008).

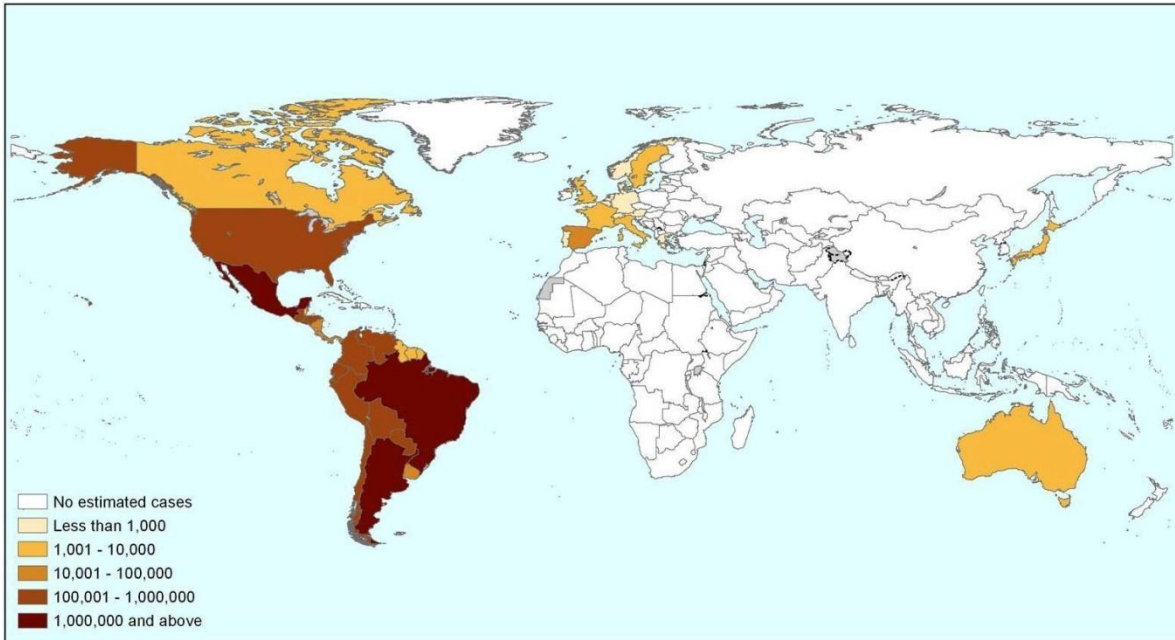


Figura. 1. Estimación global de población infectada con *T. cruzi* alrededor del mundo. Mapa tomado de <http://www.treatchagas.org> (2009).

En México, el vector y los mamíferos infectados se han reportado, entre otros, en los estados de Chiapas, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Veracruz, Puebla, Sonora, Yucatán, Querétaro y Zacatecas (Velasco-Castrejón *et. al.*, 1992; Herrera-Aguilar *et. al.*, 2009). La prevalencia de la enfermedad es alta en los estados costeros del Pacífico, de Chiapas a Nayarit, en la península de Yucatán y algunas áreas que rodean el Altiplano (Rangel-Flores *et al.*, 2001).

En nuestro país, la Enfermedad de Chagas por infección vectorial es un problema de salud pública que se urbaniza y puede representar un problema diagnóstico en la práctica cardiológica debido a que la principal patología relacionada con esta enfermedad es la cardiomiopatía dilatada (Sierra-Johnson *et. al.*, 2005) que se presenta en la mayoría de casos sintomáticos humanos.



Figura 2. Distribución de casos humanos de infección por *T. cruzi* en México. Tomado de Cruz-Reyes y Pickering-López 2006.

Encuestas serológicas hechas en bancos de sangre de la República Mexicana indican que más del 1.5% de la sangre para transfusión está contaminada con *T. cruzi* (Guzmán-Bracho, 1998; Monteón-Padilla *et. al.*, 1999) (Fig. 2).

III.3. Formas de Transmisión

La principal forma de transmisión de esta enfermedad, como ya se mencionó, es por medio de la contaminación de mucosa y piel con las deyecciones del insecto vector; esta forma representa del 80 al 90% de los casos registrados. La segunda forma de transmisión es la transfusión sanguínea con sangre contaminada. La posibilidad de evolución de la infección está condicionada por la cepa infectante y la inmunidad del receptor (WHO, 2008). La vía congénita, en la cual mujeres gestantes con infección aguda pasan la infección a sus hijos, representa también una importante forma de transmisión (Prata *et. al.*, 2001).

También se han reportado casos debidos a accidentes de laboratorio, manipulación de animales infectados (Tay, *et al.*, 1996) y casos de infección oral (Coura *et al.*, 2002; Roelliget. *al.*, 2009).

III.4. Manifestaciones Clínicas de la Enfermedad

Las manifestaciones clínicas se pueden agrupar en dos fases:

III.4.1. Fase Aguda

Existe un periodo de incubación que generalmente es asintomático y oscila de 4 a 10 días. Algunas veces, cuando la transmisión se hizo a través de la conjuntiva ocular, aparece una manifestación de puerta de entrada conocida como Signo de Romaña (complejo oftalmoganglionar) que consiste en una inflamación de los párpados inferior y superior (blefaritis bpalpebral) indolora, unilateral, con reacción conjuntiva y ganglionar. O bien, un chagoma, cuando la inoculación se dio en otra parte del cuerpo. Al chagoma se define como una nodulación dura, eritemo-papulosa que puede presentar pequeñas vesículas y la cual no supura, teniendo una evolución lenta de entre 2 y 4 semanas (WHO, 2008).

El crecimiento de los ganglios linfáticos satélites es otro signo importante. En el caso del Signo de Romaña, son palpables los ganglios preauriculares y los de las cadenas cervicales. Cuando la puerta de entrada ocurrió en otra parte del cuerpo, los ganglios vecinos son los que reaccionan. La adenopatía puede persistir durante meses (Velasco-Castrejón, 1991). La fiebre es el signo más importante de esta etapa observándose en el 95% de los casos agudos. La temperatura se eleva precozmente oscilando entre 37 y 38°C con un perfil intermitente, irregular y con picos vespertinos. Generalmente, la fiebre se acompaña de cefalea, debilidad, malestar general, dolores musculares y

articulares (mialgia y artralgia) y pérdida del apetito. En niños frecuentemente se presenta irritabilidad, observándose gran postración en los casos más graves. La duración del periodo febril guarda relación con la parasitemia. La hepatoesplenomegalia se presenta en alrededor del 30 al 40% de los casos con repercusiones clínicas (WHO, 2008).

La meningoencefalitis es rara y de progresión no muy clara. Se presenta principalmente en lactantes en los que son comunes los fenómenos convulsivos generalizados, con crisis frecuentes o espaciadas. En casos menos graves en los que se compromete el sistema nervioso central las molestias se limitan a una irritación meníngea pasajera (WHO, 2008).

La cardiopatía es común en la enfermedad de Chagas aguda y parece ser la lesión anatomopatológica más constante. El electrocardiograma suele ser normal en la mitad de los casos agudos, presentándose apenas taquicardia sinusal. Los casos graves de miocardiopatía chagásica aguda pueden evolucionar hacia la insuficiencia cardiaca congestiva, a veces de instalación súbita y curso violento con pronóstico fatal. Sin embargo, el pronóstico en la fase aguda generalmente es bueno y el cuadro remite espontáneamente entre los 30 y 90 días posteriores a su instalación (WHO, 2008).

III.4.2. Fase Crónica

La fase crónica puede ser dividida a su vez en dos. Una fase crónica asintomática, también llamada fase indeterminada y la fase crónica sintomática.

Fase indeterminada

Durante esta etapa de la infección la parasitemia no es detectada y desaparece la sintomatología. Sin embargo, la serología es positiva, encontrándose con frecuencia datos electrocardiográficos y ecocardiográficos sugestivos de miocarditis si se le estudia adecuadamente (Velasco-Castrejón, 1991).

Esta forma es la más frecuente y más importante desde el punto de vista epidemiológico debido a que el individuo puede estar infectado sin saberlo de 10 a 20 años y es una fuente importante de transmisión vectorial, transfusional y congénita sin que los clínicos la detecten en la mayoría de los casos. Se le denomina “forma subclínica”.

Fase crónica sintomática

Esta fase es la más importante clínicamente de la enfermedad de Chagas, ya que, además de incapacitar al hombre, con frecuencia lo lleva a la muerte (Velasco-Castrejón, 1991).

La miocardiopatía chagásica crónica instalada en su evolución natural avanza insidiosamente hacia la insuficiencia cardíaca, a pesar que en las áreas endémicas frecuentemente se ve interrumpida por la muerte súbita. Sin embargo, alrededor del 40% de los casos muestra una evolución benigna permitiendo una sobrevivencia del enfermo hasta los 60 o más años de edad, cuando otras patologías como la cardiopatía isquémica y la cardioesclerosis se suman y se confunden con la Enfermedad de Chagas. Los casos graves de cardiopatía chagásica ocurren más comúnmente en la tercera y cuarta década de vida, lo que es un importante factor de mortalidad en esas edades (Velasco-Castrejón, 1991). El cuadro clínico

varia considerablemente de acuerdo al grado de insuficiencia cardíaca o al tipo de alteración del ritmo (Velasco-Castrejón, 1991).

III.5. El Agente Etiológico

III.5.1 Clasificación Taxonómica de *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi es un protozooario hemoflagelado con la siguiente clasificación taxonómica (Leedale y Vickerman, 2000):

REINO: Protista

PHYLUM: Euglenozoa (Cavalier-Smith, 1981)

CLASE: Diplonemea (Cavalier-Smith, 1993)

ORDEN: Kinetoplastida (Honingberg, 1963)

FAMILIA: Trypanosomatidae (Duflein, 1901)

GENERO: *Trypanosoma* (Gruby, 1843)

ESPECIE: *cruzi* (Chagas, 1909)

III.5.2. Morfología

Como miembro del Phylum Euglenozoa, *T. cruzi* posee un flagelo, el cual está involucrado con dos procesos biológicamente importantes: el movimiento y el anclaje del protozooario a la superficie celular del hospedero vertebrado y a la membrana perimicroviliar del intestino del hospedero invertebrado. El flagelo emerge de la célula a través de una estructura denominada bolsa flagelar, la cual también está relacionada con un gran número de macromoléculas por parte del parásito.

Como todos los miembros del orden Kinetoplastida, *T. cruzi* tiene una estructura llamada cinetoplasto, el cual, corresponde a una condensación extranuclear de DNA dentro de una región bien definida de la mitocondria,

formando una estructura redondeada muy próxima a la base del flagelo. El DNA del cinetoplasto (KDNA) puede contener alrededor del 30% del DNA total de la célula. La estructura del cinetoplasto ha sido bien estudiada y se ha observado que está formado por una red de alrededor de 20,000 a 30,000 minicírculos asociados estrechamente. Además de los minicírculos, el KDNA también presenta maxicírculos, los cuales corresponden al bien conocido DNA mitocondrial presente en eucariontes.

Por otro lado, el núcleo de *T. cruzi* no ha sido investigado a detalle, aunque se ha observado que la membrana nuclear permanece intacta durante los procesos de división celular.

El citoesqueleto de *T. cruzi* está formado básicamente de placas de microtúbulos localizados unidos a la membrana plasmática.

La identificación de los estadios de desarrollo de *T. cruzi* está basado en criterios morfológicos como la forma de la célula, la posición del cinetoplasto con respecto al núcleo, y la región en donde el flagelo emerge de la bolsa flagelar. De acuerdo con esto, hay tres estadios identificados los cuales presentan propiedades biológicas características:

III.5.2.a. Tripomastigote

En este estadio el parásito tiene el cinetoplasto posterior al núcleo y un tamaño de aproximadamente 20 μm de largo y 2 μm de ancho (Fig. 3A). En el hospedero mamífero el tripomastigote puede ser encontrado intracelularmente en los tejidos y extracelularmente en circulación. En el hospedero invertebrado (triatómino), éstos se encuentran siempre de manera extracelular en la parte posterior del intestino del insecto. Cuando el tripomastigote se encuentra dentro

del hospedero mamífero se le llama tripomastigote sanguíneo. Por otro lado, debido a que se asume que la infección empieza en el hospedero mamífero y termina en el insecto, el tripomastigote encontrado en el intestino del insecto es llamado tripomastigote metacíclico (De Souza, 2002).

III.5.2.b. Amastigote

Es el estadio del parásito redondeado y de 3-5 μm de diámetro (Fig. 3B). Es la forma replicativa intracelular de *T. cruzi* dentro del hospedero vertebrado, en donde se dividirá por fisión binaria dentro de una gran variedad de tipos celulares con un tiempo de duplicación de entre 7 a 14 horas. Este tiempo de duplicación fue determinado en cultivos celulares y se encontró que depende de algunos parámetros como la cepa de parásito y la temperatura del cultivo; además, se le ha atribuido la capacidad de infectar células hospederas por si mismo (De Souza, 2002).

III.5.2.c. Epimastigote

Este estadio presenta el cinetoplasto en posición anterior al núcleo, tiene forma de huso de entre 20-40 μm (Fig. 3C). Es la forma replicativa del parásito que se encuentra en el insecto vector. Se encuentran localizados en el intestino medio del insecto, donde se multiplican y mantienen la infección a lo largo de toda la vida del insecto (De Souza, 2002).

II.5.3. Ciclo de Vida

En la sangre periférica del hospedero mamífero los tripomastigotes de *T. cruzi* son una población pleomórfica constituida por una mezcla de dos morfologías básicas que generalmente son descritas como alargadas o anchas.

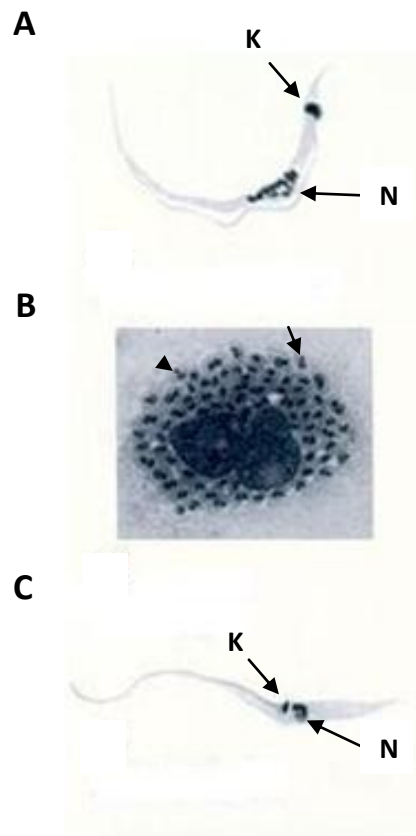


Figura. 3. Izquierda: Microfotografías de los distintos estadios de *T. cruzi*. A, Tripomastigote, B, Amastigote intracelular (las cabezas de flecha señalan amastigotes) y C, Epimastigote. N, núcleo, K, cinetoplasto. Modificado de www.uta.edu/chagas/images.jpg.

Consecuentemente, el insecto vector al alimentarse de sangre de un vertebrado infectado, toma una población de tripomastigotes sanguíneos en donde irán mezclados alrededor de un 10% de amastigotes (Andrews *et. al.*, 1987; Ley *et. al.*, 1988). Una vez dentro del insecto vector, en la porción del intestino medio, los tripomastigotes se transforman en formas redondeadas pasando por un gran número de formas intermedias (Tyler y Engman., 2001). Esta forma redondeada mide generalmente de entre 3-5 μm de diámetro es replicativa y en el ambiente del intestino medio del insecto, se transformará en epimastigote el cual también es replicativo. Inicialmente, la forma redondeada se hincha y extiende su flagelo, el cual comienza a ser visible. A este estado se le conoce generalmente con el

nombre de esferomastigote. El cuerpo celular y el flagelo de los esferomastigotes se elonga conforme va incrementándose la densidad celular dando lugar a la clásica forma de epimastigote (Fig. 3). En estudios *in vitro*, la transformación de la forma redondeada a la forma de epimastigote parece ser reversible y es dependiente de la concentración de glucosa en el medio (Tyler y Engman., 2001).

Posteriormente, el epimastigote se une hidrofólicamente a la pared en la porción posterior del intestino del insecto para diferenciarse a la forma metacíclica (Kleffmann *et. al.*, 1998). Este proceso, llamado metaciclogénesis, puede ser disparado por la interacción hidrofóbica entre el flagelo y el sustrato al que se ancla y es un proceso mediado por AMP cíclico (Tyler y Engman., 2001).

Una vez formado el tripomastigote metacíclico se desprende de la serosa y es excretado y como ya se ha dicho con anterioridad, la contaminación de piel y mucosas con las heces que excreta el reduvido al momento de alimentarse, permite la entrada del parásito dentro del hospedero mamífero y conduce a la infección.

Los tripomastigotes metacíclicos son capaces de parasitar una gran variedad de células nucleadas en el mamífero. Una vez en el citoplasma celular, el tripomastigote se transforma en amastigote. El amastigote prolifera por medio de fisiones binarias y da lugar a un nido de amastigotes o pseudoquiste (Andrews, 1993). Cuando la cantidad de parásitos dentro de la célula es elevada, los amastigotes darán lugar a los tripomastigotes sanguíneos, los cuales escaparán del pseudoquiste hacia el torrente sanguíneo y a linfa en su típica forma alargada e invadirán nuevas células. Las células que son lisadas prematuramente pueden liberar amastigotes, los cuales han sido observados durante la fase aguda de la

infección en el torrente sanguíneo. Estos amastigotes sirven para propagar la infección ya que también son capaces de infectar células, particularmente células fagocíticas (Ley *et. al.*, 1988). Finalmente, la mezcla de tripomastigotes y amastigotes presentes en la sangre de un mamífero infectado servirán para completar el ciclo de vida cuando sean tomados por el triatomo al momento de alimentarse (Fig. 4).

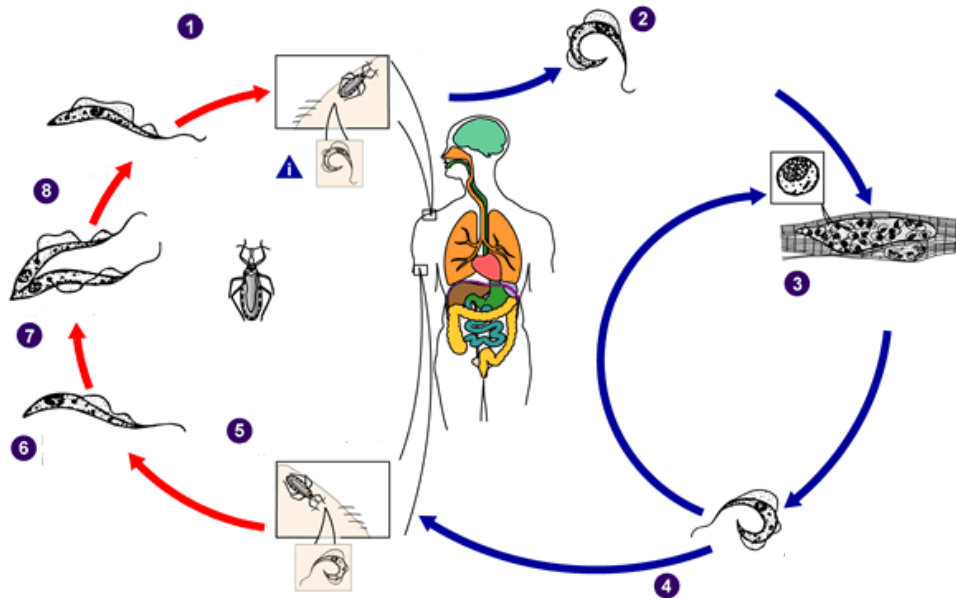


Figura. 4. Ciclo de vida de *T. cruzi*: 1 Un insecto infectado toma sangre de un individuo sano y en sus heces, deposita los tripomastigotes que entrarán al hospedero mamífero; 2 Los tripomastigotes metacíclicos entran a varios tipos celulares para transformarse en amastigotes; 3 Los amastigotes se dividen por fisión binaria dentro de las células infectadas; 4 Los amastigotes intracelulares se transforman en tripomastigotes los cuales lisan las células y se depositan en el torrente sanguíneo en donde podrán infectar nuevas células; 5 Al alimentarse de sangre, una chinche toma los tripomastigotes sanguíneos; 6 Los tripomastigotes se transforman en epimastigotes en la porción media del intestino de la chinche, 7 se dividen y 8 pasan a la porción posterior del intestino de la chinche para transformarse en tripomastigotes metacíclicos cerrando así el ciclo al ser depositados en las heces del insecto vector.

▲ adio infeccioso. Tomado de: CDC. www.dpd.cdc.gov/dpdx

III.6. Variabilidad Genética de *T. cruzi*

Las poblaciones de *T. cruzi* son poblaciones heterogéneas, compuestas por un conjunto de cepas que circulan dentro de los ciclos doméstico y selvático dentro del hospedero humano, al insecto vector y los animales reservorios. El aislamiento y el estudio de poblaciones de *T. cruzi* de diferentes orígenes han demostrado la presencia de un amplio rango de cepas con diferencias biológicas, inmunológicas, bioquímicas y farmacológicas. Estudios en los que se han utilizado poblaciones aisladas o clonas de *T. cruzi*, refuerzan la teoría de la heterogeneidad y han demostrado que las cepas están compuestas de subpoblaciones con características diferentes (Postan *et. al.*, 1986; Finley y Dvorak, 1987; Higo *et. al.*, 2004).

Los estudios con isoenzimas fueron los primeros en demostrar la existencia de distintas poblaciones de *T. cruzi* llamados zimodemas. Miles y colaboradores, en estudios hechos en 1977 y 1978, estudiando cepas aisladas en Brasil, describieron la presencia de tres zimodemas: Z1, Z2 y Z3. Los parásitos pertenecientes a los zimodemas Z1 y Z3 fueron encontrados en el ciclo selvático y en unos pocos casos agudos en humano, mientras que los parásitos pertenecientes a Z2 fueron asociados a la transmisión dentro del ciclo doméstico (Fonseca y Romanha, 1999). Después de esto, se hicieron varios estudios isoenzimáticos a un gran número de aislados de diferentes orígenes geográficos y provenientes de humano, vector y reservorio. Estos estudios demostraron la presencia de más zimodemas comenzando por 4 (zimodemas ZA, ZB, ZC y ZD) (Carneiro *et. al.*, 1990; Fonseca y Romanha, 1999). Posteriormente, se hizo un

gran estudio que comprendía 645 muestras aisladas de *T. cruzi* provenientes de una amplia variedad de hospederos vertebrados e invertebrados, en el que se analizaron 15 sistemas isoenzimáticos. En este estudio se observó una gran variabilidad genética. Fueron identificados al menos 43 zimodemas naturales distintos (Tibayrenc *et. al.*, 1986). Debido a esta gran variabilidad genética y al hallazgo de que muchos de estos zimodemas se encontraban distantes geográficamente, los autores de este estudio propusieron una estructura poblacional multiclonal para *T. cruzi* (Tibayrenc y Ayala, 1988; Zhang *et. al.*, 1988, Hernández *et. al.*, 2001).

Posteriormente, se usaron características fenotípicas y genotípicas para dividir las cepas de *T. cruzi* en dos grandes grupos genéticos. De acuerdo a un consenso internacional estas divisiones fueron llamadas *T. cruzi* I y *T. cruzi* II (Anonymous, 1999). El linaje *T. cruzi* II se dividió a su vez en 5 subgrupos, de *T. cruzi* IIa al *T. cruzi* IIe basados en el análisis de secuencias de ADN. El grupo *T. cruzi* I consistió de un solo clado relativamente homogéneo, mientras que *T. cruzi* II emergió como dos o tres clados diferentes filogenéticamente (Brisse *et. al.*, 2001; Machado y Ayala, 2001; Gaunt *et. al.*, 2003).

T. cruzi I fue originalmente descrito como proveniente del ciclo selvático en Brasil. *T. cruzi* I predomina en el norte del Amazonas donde es la principal causa de la enfermedad de Chagas, así como en otras áreas endémicas como el caso de Venezuela, Colombia y Panamá (Añez *et. al.*, 2004; Herrera *et. al.*, 2006; Sousa *et. al.*, 2006). En contraste, *T. cruzi* II predomina en la transmisión del ciclo doméstico en los países del sur de Sudamérica (Argentina, Brasil, Bolivia, Chile,

Paraguay y Uruguay) (Dias *et. al.*, 2002). Las diferencias en cuanto a la patología causada por *T. cruzi* I y *T. cruzi* II todavía no son muy claras. En la región del cono sur, en donde circula *T. cruzi* II, los megasíndromes chagásicos son muy comunes, mientras que en el norte del Amazonas, donde circula *T. cruzi* I, estas dolencias se consideran virtualmente ausentes (Coura *et. al.* 2002). Comparaciones hechas en ratones C3H/HeN sustentan la noción de que ciertas cepas de *T. cruzi* II, pueden inducir más lesiones en el timo y producir mortalidades más altas que las producidas por *T. cruzi* I (Di Noia *et. al.*, 2002). Recientemente, se ha propuesto una nueva nomenclatura en la cual, TCI es el mismo grupo que *T. cruzi* I y se han encontrado cuatro haplotipos: TC1a, TC1b, TC1c y TC1d (Herrera *et. al.*, 2007). Por su parte, *T. cruzi* II ha sido dividido en TCII, TCIII, TCIV, TCV y TCVI (Zingales *et. al.*, 2009).

En lo referente a las cepas mexicanas de *T. cruzi* se han realizado análisis de la diversidad genética de las poblaciones *T. cruzi* en México por isoenzimas y por la técnica de amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD); encontrando que cerca del 98% de las cepas mexicanas pertenecen al grupo genético *T. cruzi* I y solo un 2% pertenecen al grupo *T. cruzi* II (López-Olmos *et. al.*, 1998; Bosseno *et al.*, 2002). Estos resultados contrastan con la situación de los países de Sudamérica en donde los parásitos que circulan son una mezcla de ambos linajes (Bosseno *et. al.*, 2000; Brisse *et. al.*, 2000; Coura *et. al.*, 2002). Estudios hechos a 5 aislados provenientes de pacientes mexicanos demostraron que, a pesar de que en México circula predominantemente el grupo *T. cruzi* I, existen diferencias importantes en cuanto a patogenicidad y virulencia dentro de este grupo en los

aislados mexicanos (Espinoza *et. al.*, 1998). Recientemente, también se han podido subdividir las cepas mexicanas en 3 subgrupos de acuerdo a un análisis de sus microsatélites, observándose además una susceptibilidad diferencial a los antiparasitarios Nifurtimox y Benznidazol (Martínez *et. al.*, 2010).

III.7. Infección de la célula hospedera

T. cruzi sobrevive en el hospedero vertebrado como un parásito intracelular y la invasión de las células hospedera juega un papel fundamental en la persistencia y amplificación de la infección. A nivel molecular, se han descrito interacciones dependientes de carbohidratos mediadas por ácidos siálico, galactosa y manosa; además de interacciones independientes de carbohidratos. A pesar de que la adhesión es un paso temprano importante, no todos los tripanosomas que tocan la superficie de la célula hospedera permanecen anclados. Otros pasos son necesarios para una infección exitosa: invasión, escape de la vacuola de entrada, diferenciación y división en el citoplasma de la célula hospedera y ruptura de la célula hospedera con liberación de parásitos (Espinoza y Manning, 2007).

De manera clásica, los tripomastigotes entran en la célula hospedera (ya sea fagocítica o no fagocítica) y permanecen de una a dos horas dentro de la vacuola parasitófora. La movilidad del parásito se mantiene por un período de tiempo y eventualmente alcanza el citoplasma donde se diferencia completamente a amastigote después de la degradación de la membrana de la vacuola parasitófora, probablemente por la acción de enzimas del parásito como la TcTox (Andrade y Andrews, 2005) y la Trans-sialidasa (Rubin de Celis *et. al.*,

2006). Un ambiente con pH bajo es necesario, debido a que la enzima TcTox se activa a pH ácido. Después de aproximadamente 35 horas, los amastigote empiezan un proceso de división binaria en el citoplasma, con un tiempo de duplicación promedio de 14 horas. Finalmente, los amastigotes dan lugar a tripomastigotes a través de varios estadios intermedios, en un proceso de diferenciación dependiente de prolina (Tonelli *et. al.*, 2004). La población de parásitos intracelulares no se diferencia de manera sincronizada. Así, después de un tiempo, todos los estadios de transición que aparecen entre amastigote y tripomastigote pueden ser encontrados en una célula, predominando algunas formas dependiendo de la cepa del parásito, la temperatura y el tiempo de infección.

Los tripomastigotes, como ya se mencionó, son liberados al espacio intercelular y bien pueden infectar células vecinas o alcanzar el torrente sanguíneo, infectando otras células distantes o siendo ingeridos por un insecto durante su alimentación iniciando un nuevo ciclo biológico (Fig 5).

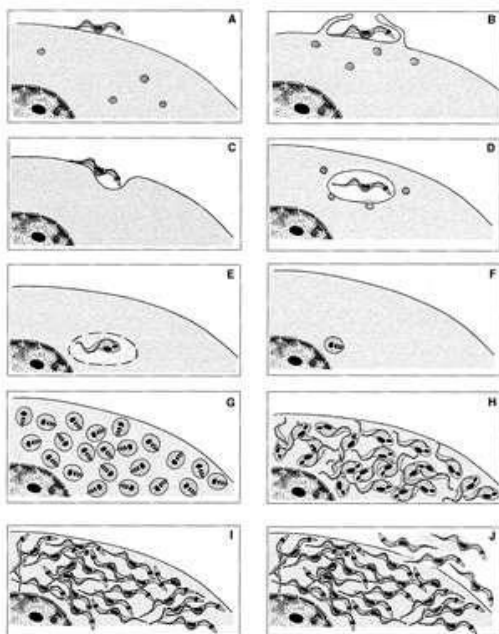


Figura 5. Esquema de los pasos de la entrada de *T. cruzi* a la célula hospedera: Reconocimiento del parásito y la célula hospedera (A). Fagocitosis del parásito (B y C) y formación del fagolisosoma al que se reclutarán lisosomas (D) para formar un fagolisosoma (E), dentro del cual el parásito se transformará en amastigote (F) y será liberado al citoplasma para dividirse por fisión binaria (G). Posteriormente, el amastigote se transformará en tripomastigote, pasando por varias formas intermedias (H e I), hasta lisa la célula y ser liberados al torrente sanguíneo (J). Tomado de: De Souza 2002.

III.8. Moléculas involucradas en la invasión de las células hospederas por tripomastigotes de *T. cruzi*.

Los tripomastigotes expresan un repertorio de moléculas que pueden ser cualitativamente o cuantitativamente diferentes cuando se comparan estadios o cepas de *T. cruzi*.

Muchas moléculas involucradas en la invasión de tripomastigotes de *T. cruzi*, incluyendo proteasas y sus vías de señalización han sido objeto de estudios (Burleigh y Woolsey 2002, Burleigh, 2005, Mortara *et. al.*, 2005). Este repertorio de moléculas permite al parásito interactuar con distintos ambientes, como lo son el tracto intestinal del insecto vector y el hospedero vertebrado.

Sin embargo, la interacción ligando- receptor en el proceso de adhesión y las respectivas vías de señalización en la célula hospedera han sido establecidas en muy pocos casos. Los eventos de señalización intracelular en el parásito no han sido bien descritos para *T. cruzi*, durante la invasión, excepto por la liberación de Ca²⁺ y la fosforilación de residuos de tirosina (Yoshida, 2006).

En particular, una de las familias de proteínas del parásito más estudiadas que participa en la invasión de células por los tripomastigotes es la superfamilia de glicoproteínas gp85/TS. Esta superfamilia comprende enzimas distantemente relacionada a las sialidasas de virus y de bacterias. Es una de las familias de genes más grandes del parásito, junto con las proteínas de superficie asociadas a mucinas (MASP) y las mucinas, contando con 1430 genes según lo reportado por el proyecto del genoma (El-Sayed *et. al.*, 2005).

III.8.1 Superfamilia gp85/TS

La superfamilia gp85/TS incluye genes con variables grados de homología, que codifican para proteínas con o sin actividad de Trans-sialidasa (TS) y que se caracterizan por la presencia de, al menos, 1 motivo de neuraminidasa conservado (caja ASP-SXDXGXTW) y el motivo VTV (VTVXNVXLYNR) (Colli, 1993; Cross y Takle, 1993; Frasch, 2000). Sólo 375 genes tienen el motivo conservado VTV como se ha podido observar por análisis en la cepa CL- Brener. La superfamilia gp85/TS está formada por genes polimórficos con diferentes grados de variación en su secuencia intercalados con regiones más conservadas e interesantemente, quimeras constituidas por dominios de MASP o mucinas con gp85/TS (El-Sayed, 2005), sugiriendo una fuerte presión de selección para la variabilidad. El mecanismo que determina esta mezcla de genes es desconocido.

La superfamilia Gp85/TS ha sido subdividida en varios grupos por diferentes autores (Colli, 1993; Cross y Takle 1993; Schenkman, 1994), destacando la subdivisión de Frasch (2000), el cual la divide en dos grupos principales: el grupo I- moléculas sin actividad de TS. Este subgrupo incluye la familia gp85; una proteína de 160kDa (involucrada en la regulación del complemento) y la Tc13 (de 85kDa, con función desconocida); y el grupo II- glicoproteínas ancladas por medio de enlaces GPI en un rango de 120-200kDa con actividad de TS. La TS aislada de tripomastigotes contiene repeticiones de 12 aminoácidos en tandem en la porción C- terminal conocido como antígeno secretado de fase aguda (SAPA) el cual está ausente en la TS aislada de epimastigote (Chaves *et. al.*, 1993; Briones *et. al.*, 1995). Este grupo ha sido

extensamente estudiado y se le ha implicado en invasión de la célula hospedera por *T. cruzi* y en procesos de evasión de la respuesta inmune del hospedero.

III.9. Características de la TS

La TS de *T. cruzi* tiene actividad de sialil-transferasa, permitiendo al parásito quitarmoléculas de ácido siálico con unión α -2, 3 de sialoglicoconjugados donadores en el medio exterior para sialidar sus propios glicoconjugados de superficie usando como aceptores residuos β -Gal (Fig. 6) (Frasch 2000; Schenkman *et. al.* 1994). El papel del ácido siálico en la interacción extracelular célula-célula es ahora bien conocido. La localización de este monosacárido en posiciones expuestas de moléculas y células, su diversidad estructural, y su fuerte carga electronegativa provee las bases para que el ácido siálico actúe como molécula de señalamiento (Schauer, 2000).

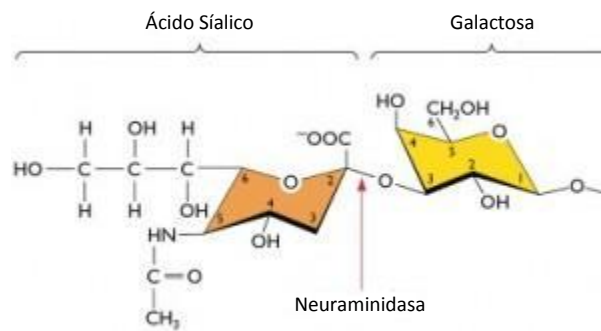


Figura 6. Esquema que muestra al ácido siálico unido a la galactosa por medio de una unión α -2,3. Esto quiere decir que el átomo de carbono en la posición número 2 de la hexosa del ácido siálico está unida, vía un átomo de oxígeno, al carbono en posición 3 de la hexosa de la galactosa. La flecha indica el lugar de ataque de la neuraminidasa. Tomado de <http://www.virology.ws>

En *T. cruzi*, la sialidación de su superficie juega un papel central en la evasión de la respuesta inmune temprana mediada por complemento (Tomlison y Raper, 1998) y en el mecanismo de adhesión e invasión de las células hospederas

(Schenkman y Eichinger, 1993). Debido a que *T. cruzi* es incapaz de sintetizar ácido siálico de novo (Previato *et. al.*, 1985; Schauer *et. al.*, 1983), la TS parece ser una enzima clave para la capacitación de parásitos competentes en la invasión y en la infección.

III.9.1. Estructura de la TS.

La estructura de la TS consta de dos dominios (Buschiazzo *et. al.*, 2002) (Fig. 7): el dominio catalítico N- terminal (del residuo 1 al 371), el cual se pliega en seis laminas β planas características de las sialidasas microbianas (Taylor, 1996), conectadas a través de una larga alfa hélice (de los residuos 372 al 394), al dominio parecido a lectina C-terminal (de los residuos 395 al 632). La proteína termina con una alfa hélice enroscada (de los residuos 614 al 626), la cual desaparece gradualmente hacia la porción C- terminal. En la enzima, ésta hélice es seguida por una región hidrofóbica de tamaño variable (de entre 100 a 500 residuos) identificada como el antígeno secretado de fase aguda o SAPA (por sus siglas en inglés) (Buscaglia *et. al.* 1999), el cual consta de repeticiones de un motivo de 12 residuos altamente antigénico.

El dominio parecido a lectina de la TS de *T. cruzi* se asemeja a dominios similares que flanquean el centro catalítico de las sialidasas de la bacteria del cólera y de *Microbdella decora*. Sin embargo, la interfase hidrofóbica entre el dominio parecido a lectina y el dominio β -hélice en la enzima de *T. cruzi* es significativamente más larga, cubriendo una superficie total de 2550 Å comparada con los 1300-1600 Å en las otras sialidasas (Buschiazzo *et. al.* 2002).

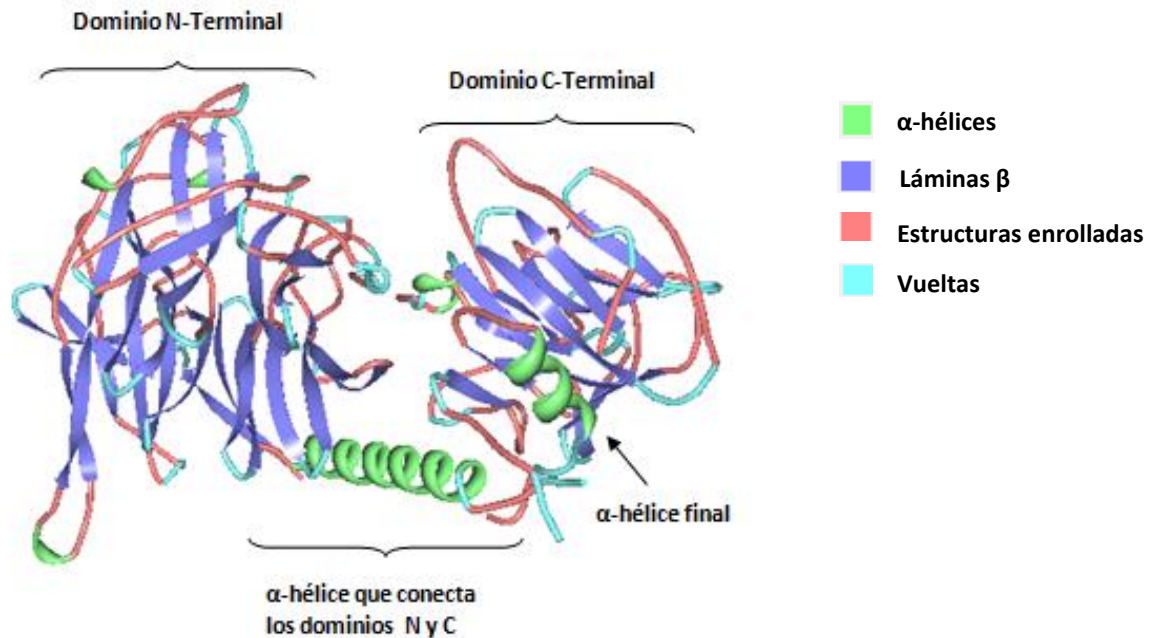


Figura 7. Forma Ortorrómbica de la TS de *T. cruzi*. Tomado de la página de Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1MR5>)

Esta interfase indica un centro rígido de proteína que, dado el ensamblaje espacial de las dos subunidades estructurales, directamente excluyen la implicación del dominio parecido a lectina en la actividad de transglicosilación (Buschiazzo *et. al.* 2002).

La arquitectura molecular del sitio activo de la TS de *T. cruzi* comparte algunas características conservadas con las sialidasas microbianas: una tríada de argininas (Arg35, Arg 245 y Arg314) que une el grupo carboxilado presente en todos los derivados de ácido siálico, un ácido glutámico (Glu 357) que estabiliza a la arginina 35, un ácido aspártico (Asp 59) que es esencial para la catálisis, y dos residuos (Tyr 342 y Glu 230) en el piso de sitio activo, que están bien posicionados para estabilizar la reacción de las especies en estado de transición. También

conservado en la sialidasas, se encuentra en la TS de *T. cruzi*, un bolsillo hidrofóbico que se une al grupo N-acetil del motivo de ácido siálico, definido por los residuos Val 95, Leu 176 y Trp120 (Fig. 8B). Esta similitud sugiere fuertemente que la alta eficiencia de transglicosilación de la TS de *T. cruzi* es una característica evolutiva adquirida por una hidrolasa tripanosomatida ancestral (Buschiazzo *et. al.* 2002).

III.9.2. Características de la hendidura del sitio activo de la TS de *T. cruzi*

El sitio activo de la TS de *T. cruzi* exhibe un bolsillo de unión al sustrato estrecho y muy hidrofóbico. Presenta dos residuos aromáticos (Tyr119 y Tyr248), que junto con los residuos Trp120, Val203 y Trp312 definen un ambiente hidrofóbico que pueda contribuir a excluir el agua del centro de reacción, favoreciendo así la transglicosilación (Fig. 8 A y B). En la TS sin ligando, la cadena lateral del Tyr119, apunta en la dirección del piso del bolsillo catalítico, ocupando parcialmente el espacio que normalmente desocupado por los motivos de ácido siálico del sustrato. La cadena lateral de Tyr119 está estabilizada por interacciones de puente de hidrógeno mediadas por agua entre su grupo fenol y tres cadenas laterales de residuos en el fondo de la hendidura (Asp96, Gln195 y Glu230). Otro aminoácido crítico es la Pro283, el cual ha mostrado ser importante para la transglicosilación en experimentos de mutagénesis. Este último aminoácido permite a la cadena lateral de un triptófano conservado estar más cerca del centro catalítico, modulando la arquitectura de la hendidura catalítica en de una manera crucial (Buschiazzo *et. al.* 2002).

III.9.3. Mecanismo general de acción de la TS

Dos hipótesis básicas han sido formuladas para explicar la transglicosilación de la TS de *T. cruzi*, un mecanismo convencional de ping pong (típico de glicosilasas) con intermediarios de reacción de vida larga, o un mecanismo de complejo ternario (secuencial) implicando la preexistencia de dos distintos sitios de unión para los complejos substrato-donador y sustrato-aceptor. Los estudios estructurales y de unión de la TS de *T. cruzi* reportados revelan una situación más compleja, en la cual la flexibilidad intrínseca de la hendidura del sitio activo juega un papel crucial en la transglicosilación. El modo propuesto de acción toma elementos del mecanismo secuencial sugerido por los estudios de genética y es consistente con pruebas experimentales de mutagénesis. De acuerdo con la estructura cristalina, el galactosil 3-OH de la lactosa está bien posicionado para interactuar tanto con Asp59 catalítico como con el carbono anomérico para que se lleve a cabo el ataque nucleofílico del sustrato (o reacción intermediaria) (Buschiazzo *et. al.* 2002).

Se ha demostrado que la localización exacta de la lactosa contra la cadena lateral del anillo aromático del Trp312 puede ser crítica para la reacción de transferencia ya que la mutación del Trp312 por Alanina o la Pro283 por Glutaminainhiben completamente la actividad de transglicosilación de la Trans-sialidasa de *T. cruzi* (Buschiazzo *et. al.* 2002).

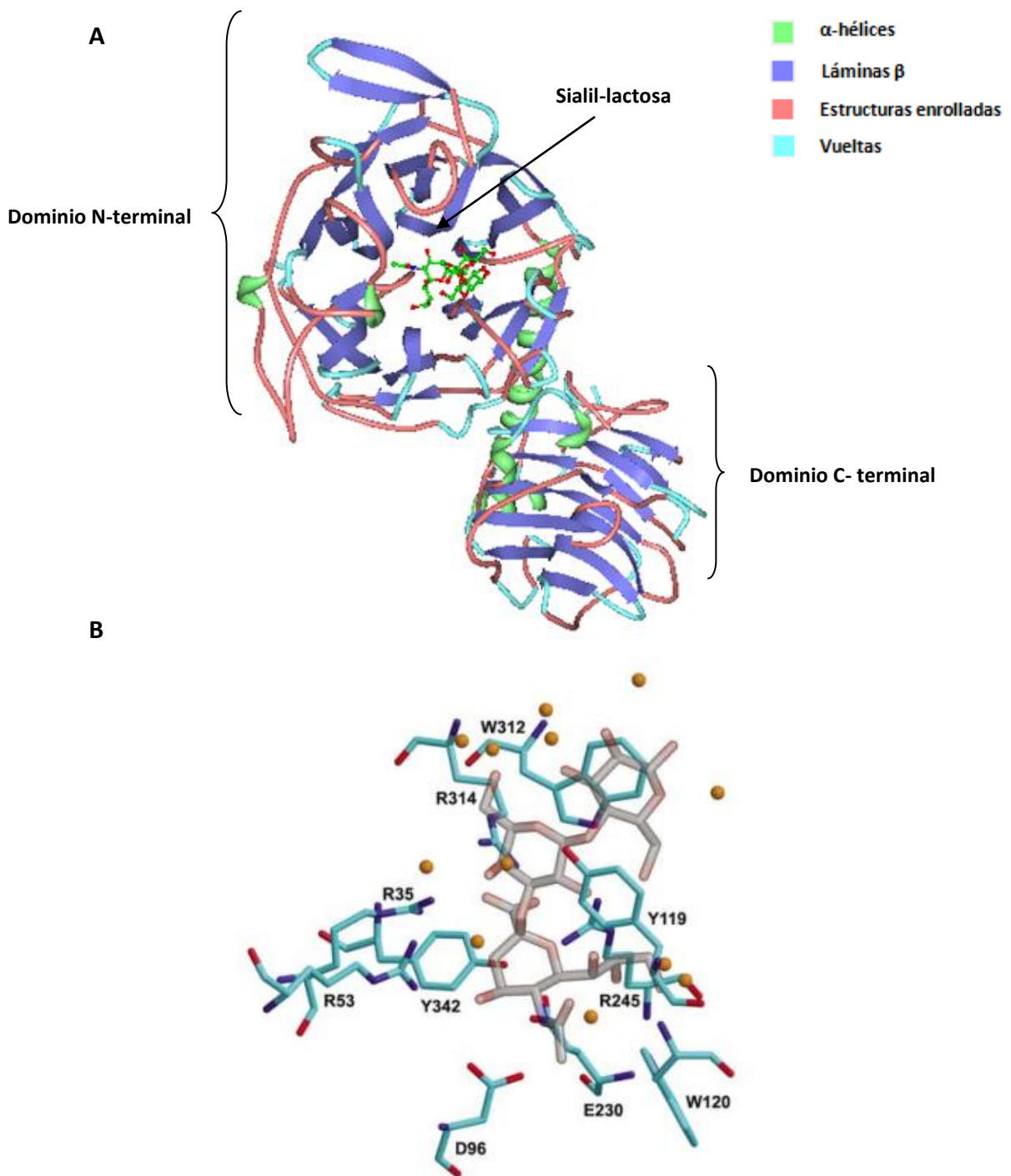


Figura 8. A. Estructura de la TS de *T. cruzi* en complejo con sialil-lactosa, destacando el dominio N-terminal donde se aprecia la hendidura del sitio activo, formado por seis láminas β . La flecha señala a la sialil-lactosa representada por la molécula verde al centro. Tomado de la página de Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1S0I>). B. Esquema donde se muestra la interacción del sustrato (sialil-lactosa en gris), con residuos de proteína y moléculas de agua (esferas amarillas), en el sitio activo de la TS. Tomado de Buschiazzo *et. al.* 2002.

Un modelo general para explicar el modo de acción de la TS, como se sugiere por la información disponible que se tiene sobre estructura, mutagénesis y cinética, se describe a continuación. La enzima libre incapaz de unirse al sustrato receptor, es inicialmente encontrada en un estado inactivo, debido a la inexistencia de puentes de hidrógeno entre Tyr342 y Glu230. Una vez unido el donador (sialoconjugado) el sustrato puede entonces disparar un cambio conformacional con dos consecuencias principales: crear las condiciones para la unión del azúcar aceptor (lactosa), que involucra la reorientación de la cadena lateral de Tyr119, y la activación de la enzima a través del reposicionamiento Tyr342/Leu 36. Por otro lado, el mecanismo de activación involucra el posicionamiento de Tyr342/Glu230, lo cual sirve para desacelerar el primer paso hidrolítico, permitiendo a los dos sustratos ser posicionados antes de que la reacción empiece. La reacción química puede proseguir como en otras sialidasas, con el 3-OH motivo galactosil del aceptor reemplazando una molécula de agua nucleofílica. De acuerdo con este modelo, la hidrólisis representa un bajo porcentaje en la reacción catalizada por producto y en la TS de *T. cruzi* ya que el sacárido aceptor desplaza el agua antes de que tome lugar el primer paso de reacción, y el ambiente hidrofóbico del bolso catalítico contribuye a excluir el agua del centro catalítico (Buschiazzo *et. al.* 2002) (Fig. 9).

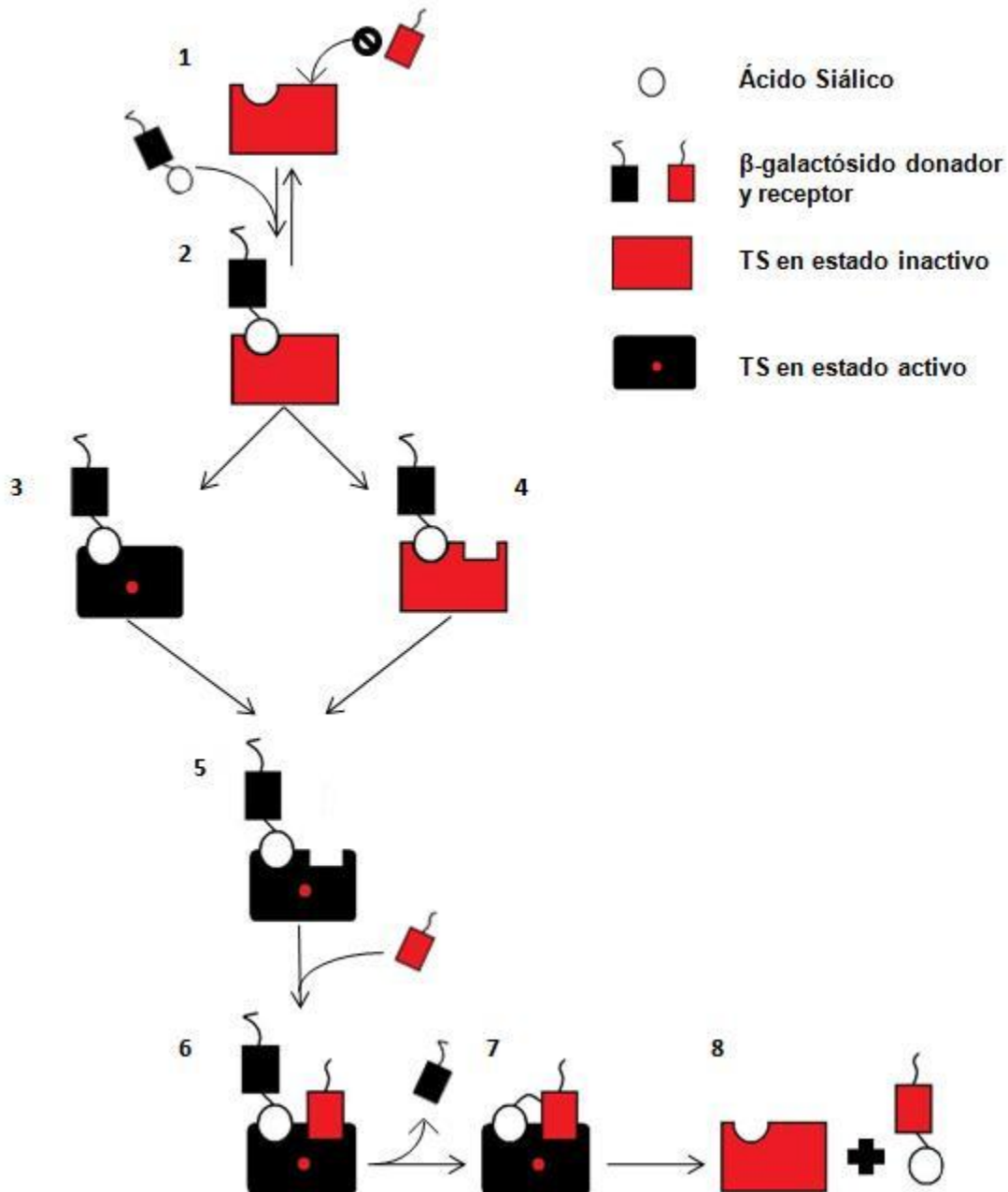


Figura 9. Esquema del mecanismo de acción de la TS. La TS inactiva tiene, en su sitio catalítico, la capacidad de unirse a la molécula donadora de ácido siálico pero es incapaz de unirse a la molécula aceptora (1). Al momento de unirse con el sustrato donador (2) ocurren dos cosas: Se activa la enzima (3) y la enzima sufre un cambio conformacional que aumenta su afinidad por el sustrato aceptora (4). Una vez activada completamente (5), la enzima es capaz de unirse al aceptora y se hidrolizará el ácido siálico de la molécula donadora (6) para, posteriormente, llevar a cabo la reacción de transglucosilación de la molécula aceptora (7). Al terminar la reacción, la enzima libera el producto sialidado y queda en su estado inactivo (8). Modificado de Buschiazzo *et. al.* 2002.

III.9.4. Funciones biológicas de la TS

Como se mencionó con anterioridad, la principal función biológica de la TS es la de cortar y transferir residuos de ácido siálico de los glicoconjugados en la superficie de la célula hospedera a proteínas en la superficie del parásito debido a que este último es incapaz de sintetizar ácido siálico de novo. Sin embargo, una gran cantidad de evidencia biológica indica que la TS es también un factor de virulencia muy importante para el parásito. Cuando los tripomastigotes de *T. cruzi* emergen de las células del hospedero mamífero, contienen un poco de ácido siálico o carecen completamente de él. Rápidamente después de entrar en circulación, ellos empiezan a expresar TS. La transferencia del ácido siálico a las moléculas de superficie del parásito, conduce al ensamblaje de un epítipo específico de tripomastigotes que es denominado Ssp-3 (Schenkman *et. al.*, 1991b). Anticuerpos monoclonales que reconocen los residuos de ácido siálico de la Ssp-3 inhiben la unión de los tripomastigotes a la célula hospedera (Schenkman *et. al.*, 1991a), sugiriendo que la TS provee a la Ssp-3 con las características estructurales requeridas para el reconocimiento de la célula blanco. Por este hecho, la TS ha sido implicada en la unión e invasión de la célula hospedera.

Otra función biológica importante atribuida a la TS es la de la formación de un blindaje de ácido siálico en la superficie del parásito lo cual le permite a los tripomastigotes evadir la respuesta inmune mediada por complemento (Tomlinson *et. al.*, 1994).

Además de ayudar a evadir el sistema inmune innato del hospedero, la TS desequilibra la inmunidad adquirida contra *T. cruzi*, induciendo la sobre-expresión de IL-6 (Gao y Pereira 2001), y/ o co-estimulando la activación de linfocitos T del

hospedero (Todeschini *et. al.*, 2002) y ocasionando trombocitopenia al remover ácido siálico de la superficie de las plaquetas (Tribulatti *et. al.*, 2005).

La administración del TS a los ratones antes de un reto con *T. cruzi* correlaciona con un fenotipo invasivo del parásito y una evolución severa concomitante de la infección (Chuenkova y Pereira 1995).

Se ha mostrado recientemente que la TS es la responsable de las alteraciones en el timo observadas durante la infección con *T. cruzi* y que el uso de anticuerpos neutralizantes previenen estas patologías y reducen la parasitemia (Pérez *et. al.*, 2007).

Por otro lado, la TS de *T. cruzi* ha demostrado ser altamente antigénica debido, entre otras cosas, a la presencia de SAPA que, como se ha mencionado con anterioridad, consta de repeticiones en tandem de un motivo de 12 residuos de aminoácido. El hecho de que la TS sea altamente inmunogénica y que sea un blanco bien caracterizado para la respuesta inmune del hospedero, además de que está altamente expresada como proteína de superficie en los tripomastigotes y puede ser secretada al medio, ha hecho de la TS un importante candidato de vacuna contra la infección con *T. cruzi*. Algunas proteínas de la familia de TS (ya sea activas o inactivas), o sus genes han sido usados como inmunógenos profilácticos o terapéuticos para incrementar la respuesta inmune, resultando en un mejor control de la parasitemia y aumentando la sobrevivencia en protocolos experimentales (Pereira-Chioccola *et. al.*, 1999; Fontanella *et. al.*, 2008; Dumonteil, 2009).

Como la TS es considerada un importante factor de virulencia, se han hecho estudios de caracterización de esta enzima y se han hecho comparaciones

entre cepas pertenecientes a los grupos *T. cruzi* I y *T. cruzi* II-VI (Risso *et. al.*, 2004). En estos estudios se ha llegado a la conclusión de que algunas cepas de los grupos *T. cruzi* II-VI como la Y y Tulahuen son más virulentas que las cepas del grupo *T. cruzi* I, como la cepa G, debido a que inducen una mortalidad del 100% en ratones. Además, las cepas de los grupos *T. cruzi* II-VI expresan y secretan mayores cantidades de TS que las cepas del genotipo *T. cruzi* I. Así, la TS se ha convertido en el primer factor de virulencia de cepas sudamericanas de *T. cruzi* en el que se ha identificado su expresión diferencial en los grupos principales del parásito y se ha asociado a su comportamiento contrastante.

IV. Justificación

La Trans-sialidasa de *T. cruzi* es un importante factor de virulencia para este parásito y es de interés caracterizar esta enzima en cepas mexicanas de *T. cruzi* de genotipo I, las cuales presentan alta heterogeneidad y muestran diferencias biológicas tanto en virulencia como en patogenicidad.

V. Hipótesis

Debido a que se ha demostrado que existe una diferencia de expresión de la TS entre cepas con diferente virulencia pertenecientes a los genotipos *T. cruzi I* y *T. cruzi II-VI* sudamericanas, es de esperar que existan diferencias en la expresión de esta enzima en las cepas mexicanas MHOM/MX/1994 (Ninoa) y ITRI/MX/0000 (Querétaro), las cuales presentan diferentes grados de virulencia y patogenicidad.

VI. Objetivos

VI.1. Objetivo General:

Caracterizar la TS de las cepas mexicanas de *T. cruzi* con diferente grado de virulencia y patogenicidad.

VI.2. Objetivos particulares:

- Analizar la expresión de TS en cepas de *T. cruzi* con diferente virulencia.
- Analizar la actividad enzimática de la TS en estas cepas del parásito.

VII. Metodología

VII.1. Parásitos.

Se utilizaron tripomastigotes de las cepas MHOM/MX/1994 (Ninoa) y ITRI/MX/0000 (Querétaro) (avirulenta y virulenta respectivamente) pertenecientes al grupo genético *T. cruzi* I Lopez-Olmos et al., 1998; Bosseno et al., 2002), obtenidos de ratones infectados y mantenidos en cultivos de células Vero, en cajas de 75cm² con medio D-MEM (GIBCO, No. Cat. 12100-046) suplementado al 10% de SFB e incubados a 37° C, 95% de humedad relativa y 5% de CO₂. La re-siembr a de los cultivos fue hechacada tercer día (cuando el cultivo se encontraba en confluencia), utilizando 4ml de EDTA 5mM por 12min y 2ml de Tripsina en PBS (Sigma, 1mg/ml) por 5min para despegar la monocapa de células. Se tomaba 0.5ml de la suspensión de células obtenidas, la cual era puesta en una caja de 75cm² con 10ml medio D-MEM suplementado fresco. Para la obtención de grandes cantidades de parásitos, 2.5ml de la suspensión de células obtenidas de la tripsinización de las cajas de 75cm², era puesta en cajas de 225cm² con 50ml de medio D-MEM, en cuyo caso, las células se despegaban cada 5° día con 10ml de EDTA y 5 ml de tripsina en las condiciones antes mencionadas.

VII.2. Células

Para los ensayos de infección se utilizaron células Vero (fibroblastos de riñón de mono verde), mantenidas en cultivo en medio D-MEM suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB) e incubados a 37°C, 95% de humedad relativa y 5% de CO₂ hasta su uso, cuando las células eran despegadas utilizando 4ml de

EDTA 5mM por 12min y 2ml de tripsina en PBS (Sigma, 1mg/ml) por 5min. La suspensión celular se centrifugó a 800g y el pellet obtenido se resuspendió en 1ml de medio D-MEM suplementado fresco para hacer el conteo celular.

Para los ensayos de ligandos se utilizaron células THP-1 (monocitos humanos) mantenidas en medio RPMI suplementado con 10% de SFB, L-Glutamina, Vitaminas y aminoácidos no esenciales. Las células se incubaron a 37°C, 95% de humedad relativa y 5% de CO₂. En este caso, las células en suspensión se centrifugaron también a 800g y al pellet se le dio el mismo tratamiento que a las células Vero.

VII.3. Extracción de RNA Total de tripomastigotes

Para una extracción óptima de RNA y evitar degradación, todo el material utilizado fue tratado con agua con 0.01% de dietilpírocarbonato (DEPC). El material como guantes, pipetas, gradillas y tubos fue radiado 20min con luz UV antes del procedimiento. La extracción de RNA total se realizó por el método de TRIZOL™ (Invitrogen Cat. No. 15596-026) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, 100 X 10⁶ tripomastigotes de las cepas Ninoa y Querétaro fueron tomados del sobrenadante de células Vero infectadas y centrifugados a 800g por 10 min, al pellet obtenido se agregó un mililitro de TRIZOL directamente. Posteriormente, el homogenado del TRIZOL junto con las células lisadas se colectó en tubos Eppendorf libres de RNasas. Se mezcló con vortex y se procedió a incubar cada muestra durante 10min en hielo y 5min a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 200µl de cloroformo y se mezcló por inversión, para incubarse después, durante 3min a temperatura ambiente, enseguida se

centrifugó a 12000g durante 15min a 4° C. Se recuperó la fase acuosa en un tubo limpio vacío y se adicionaron 500µl de alcohol isopropílico, se mezcló por inversión e incubó por 10 min. a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 g durante 10min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 1ml de etanol al 75% y se centrifugó a 7500g durante 5min a 4°C. Finalmente, se decantó el sobrenadante y la pastilla fue secada al aire durante 15min y resuspendida con 50µl de H₂O tratada con DEPC 0.1%. La cantidad de RNA se determinó por medio de espectrofotometría con la ayuda del equipo Gene Quant Pro (Amersham) Posteriormente, se procedió a analizar la integridad de la muestra por medio de geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio (Sambrook et al., 1989).

VII.4. Detección de mRNA de TS por RT-PCR.

Antes de realizar la reacción de RT-PCR, 1µg de RNA de cada muestra fue tratado con deoxyribonucleasa I amplification grade (DNasa I), (Invitrogen Cat. No. 18068-015) para eliminar posibles contaminaciones con DNA. Se siguieron las recomendaciones del fabricante, que fueron adicionar en tubos Eppendorf en hielo 1µg de RNA, 1µl de buffer de reacción DNasa I 10X, 1µl de DNasa I grado de amplificación (1U/µl) y agua tratada con DEPC para completar un volumen de 10µl. Se mezcló por inversión e incubó por 15min. a temperatura ambiente. Para inactivar la DNasa se agregó 1µl de EDTA 25mM, seguido de una incubación a 65° C durante 10min.

La expresión de mensajeros de las TSs fue analizadas por RT-PCR y como control endógeno se empleó la amplificación del gen ribosomal S4 de *T. cruzi* (Pérez-Escobar *et. al.*, 2007). Las secuencias de los iniciadores y tamaño de los

productos de PCR para los genes de las TSs se diseñaron con la ayuda del programa PRIME3 usando como molde la secuencia de un gen de TS con actividad enzimática (Anexo 1) y de una región consenso verificada por el alineamiento de varios genes que codifican para TS (Anexo 2). Los iniciadores de S4, ya estaban previamente reportados (Pérez-Escobar *et. al.*, 2007).

La reacción de RT-PCR se realizó con el método en un solo paso, utilizando el sistema SuperScript™ One-step RT-PCR con Taq platinum^R (Invitrogen Cat. No. 10928-042). La mezcla de RT-PCR consistió en 1 µg de RNA tratado con DNasas, 25µg de Buffer de reacción 2X (que contiene 0.4mM de cada dNTP, 2.4mM MgSO₄), 1µl de RT/Platinum Taq Mix, 10µM primer directo (GGTGATGAAAATTCCGCCTAC) y 10µM del primer reverso (AATCAACGGTATCGCTTTGC), la reacción se completó con agua libre de RNasas a un volumen de 25µl. Se empleó un termociclador PTC-100 (MJ Research. Inc.) y se usaron las siguientes condiciones de reacción del RT-PCR en un solo paso. Para la síntesis de cDNA 55° C durante 30 min.; 94° C, 2 min. para inactivar la transcriptasa reversa y activación de platinum Taq. La amplificación de PCR se realizó con 35 ciclos de 94°C, 15 segundos; 60.8°C, 30 segundos; 72°C, 1 min, con una extensión final de 72°C por 7min. Para todos los grupos de iniciadores se corrió un control negativo (sin templado) en paralelo. El producto de los amplificados se corrió en un gel de agarosa al 2% para su posterior análisis densitométrico.

VII.5. Anticuerpos

El hibridoma productor del anticuerpo anti-TS mAb39 fue donado amablemente por el Dr. Sergio Schenkman (Schenkman et. al. 1992). Este anticuerpo es isotipo IgG de ratón y reconoce las repeticiones en tándem de la porción carboxi-terminal de la trans-sialidasa (SAPA). El hibridoma fue mantenido en cultivo en medio RPMI en incubación a 37°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa. El anticuerpo C16D, reconoce una proteína de 71KDa de *T. cruzi*, y fue obtenido en el laboratorio de la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez (López-Olmos 1999). El anticuerpo isotipo OKT4, que reconoce el CD4 humano y fue donado amablemente por el Dr. Rafael Saavedra.

VII.6. Producción de Líquido de Ascitis.

Tres ratones Balb/c hembras de 8 semanas de edad fueron inyectadas intraperitonealmente con 0.5ml de Pristan (Sigma No. Cat. P2870-100ML). Siete días después, a cada uno de estos ratones se les inyectó intraperitonealmente 5X10⁶ células del hibridoma productor del anticuerpo mAb39 anti-TS, en 0.5ml de PBS estéril. El líquido de ascitis fue drenado a la semana y media posterior a la inoculación del hibridoma, cuando el abdomen de los ratones se veía notablemente distendido, con la ayuda de una aguja de jeringa del calibre 18 en un tubo Falcon de 15ml. El líquido de ascitis obtenido se incubó a 37°C por 1 hora y posteriormente a 4°C toda la noche para permitir la precipitación de restos celulares. Finalmente, se centrifugó a 3,000g por 10min, recuperándose el sobrenadante que contenía el anticuerpo monoclonal mAb39 anti-TS en un tubo limpio (Horlow y Lane, 1998).

VII.7. Extracto proteico

Para obtener el extracto proteico del parásito, los tripomastigotes obtenidos de cultivo fueron tratados con el método de Urea-Tiourea, el cual, permite una óptima extracción de proteínas (Westermeyer y Naven, 2002). Brevemente, los tripomastigotes para el extracto proteico se obtuvieron por medio de centrifugación (800g por 10 min) de los sobrenadantes de los cultivos celulares infectados en cajas de 225cm² (entre 60 y 150 X 10⁶ parásitos). Las células fueron lavadas tres veces con PBS. En el último lavado el pellet fue pesado y se añadió buffer de lisis (urea 8M, tiourea 2M, CHAPS 4%, TRIS 10mM) en una relación buffer: peso de parásitos 3:1 en presencia de inhibidores de proteasas (EDTA 0.012M, leupeptina 0.1M, pepstatina 1x10⁻³mM y PMSF 1mM). La mezcla fue agitada en vortex por dos min., seguida de una incubación de 10 min en hielo. Posteriormente se centrifugó a 13,000rpm por 15min., al sobrenadante resultante se le llamó extracto proteico. La cuantificación de proteínas se realizó con el Kit 2D Quant (Amersham, No. Cat. 806483-56). El extracto proteico de cisticercos de *Taenia solium* utilizado como control negativo en el primer ensayo de actividad (como proteína no relacionada), fue amablemente donado por el Dr. Raúl Bobes del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

VII.8. Obtención del Medio condicionado de parásitos

Para la obtención del medio condicionado de parásitos (MCP) se utilizaron 30X10⁶ tripomastigotes de cada cepa en 300µl de medio D-MEM sin suplementar por una hora a 37°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad. Transcurrida la hora, la suspensión de parásitos fue centrifugada a 800g por 10min. El sobrenadante obtenido fue

filtrado por membrana de 0.22 μ m. Los MCP's obtenidos fueron utilizados para ensayos de detección de TS por western blot (WB).

VII.9. Western Blot

Se realizaron corrimientos electroforéticos en condiciones reductoras en geles de poli-acrilamida al 12% a 200V, cargando 5 μ g de extracto proteico total de tripomastigotes de la cepa Ninoa y Querétaro por carril. Posteriormente, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se bloquearon con PBS con 10% de leche descremada a 4°C toda la noche. Se incubaron con el mAb39 (líquido de ascitis) en una dilución 1:500 por un lapso de 2 horas. Se realizaron 3 lavados de 5min. con PBS-Tween y posteriormente se añadió el segundo anticuerpo anti IgG de ratón acoplado a HRP (Amersham No. Cat. RPN1001) en una dilución 1:1000 (Martínez-Velasco 2004) por 2 horas. Finalmente, se realizaron 3 lavados de 5min con PBS-Tween y fueron revelados con 3-3-diaminobenzidina y peróxido de hidrógeno.

Para detectar la secreción de TS al medio de cultivo, 100 μ l de MCP se corrieron electroforéticamente en geles de acrilamida al 12% en condiciones reductoras por 1 hora a 200V. Posteriormente, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se bloquearon con PBS con 10% de leche descremada a 4°C toda la noche. Posteriormente, se incubaron con anticuerpo mAb39 (líquido de ascitis) en una dilución 1:500 por un lapso de 2 horas y se siguió el procedimiento descrito en el párrafo anterior.

VII.10. Análisis Densitométrico

La adquisición de las imágenes de las membranas de WB se realizó con la ayuda de un equipo Kodak Gel Logic 200 Imaging System. Posteriormente, las imágenes fueron analizadas densitométricamente con el programa Quantity-One 4.6.7 de BioRad.

VII.11. Ensayo de Actividad de TS

Este ensayo es un ensayo fluorescente modificado del reportado por Schrader *et. al.* (2003). El fundamento y los materiales utilizados se describen en el Anexo 3. El procedimiento se describe a continuación. Previo al ensayo, se sónica el stock de 4-metilumbeliferril- β -D-galactopiranosido (MUGal) (Sigma M1633) 2mM por 10min para obtener una dispersión homogénea. Se transfieren 12.5 μ l de buffer PIPES (Ver Anexo III), en pozos de placas de prolipropileno de 96 pozos, se añaden 5 μ l de 3'-sialilactosa (Sigma No. Cat. A9079) 10mM y 20 μ l de la solución de TS (extracto crudo en una concentración de 128 μ g de proteína). Como blanco, se pone en un pozo 20 μ l del buffer PIPES. La reacción comienza por la adición de 12.5 μ l del stock de MUGal en cada pozo, se coloca una tapa en la placa (sealed cap), se agita y se incuba a 25°C por 30min. La reacción se detiene con 350 μ l del agua fría y la placa se mantiene en hielo hasta el paso de filtración.

Por otro lado, se ponen 300 μ l de Q-Sepharose (Sigma No. Cat. Q1126-100M) por pozo en las placas UNIFILTER (Whatman No. Cat. 7700-2811) y se lava tres veces con agua utilizando vacío con ayuda de un QIAVac (Qiagen No. Cat. 19504). Se transfiere la mezcla del ensayo a las mini-columnas, se aplica vacío

lento hasta absorber el total de la muestra. Se remueve el exceso de MUGal con 6 lavados con 500µl de agua bajo vacío. Posteriormente se eluye con HCl 1M, se descartan los primeros 100µl y se eluye el producto sialilado con 6 volúmenes de 150 µl de HCl 1M. El eluido se colecta en placas DeepWell de 96 pozos (No. Cat. 278606). Esta placa se pone a baño maría a 95°C por 45 min. e inmediatamente después se pone en hielo por 15 min. Se le ajusta el pH a 10 con NaOH. Finalmente, se transfieren 500µl de la reacción a una cubeta de cuarzo para cuantificar la fluorescencia debida a la liberación de 4-metilumbeliferil(MU) a 365nm de excitación y 450 de emisión en un Fluorómetro de la marca ISS modelo Pc1, el cual fue facilitado amablemente por el Dr. Alejandro Fernández de la Facultad de Medicina, UNAM.

VII.12. Fijación de células THP1

Para la realización de los ensayos de ligandos, se fijaron células THP1 con glutaraldehído. Brevemente, se recogió la suspensión de células THP1 y se centrifugaron a 800g por 10min, posteriormente, fueron transferidas a tubos siliconizados de 1.5ml para ser lavados 3 veces con PBS pH7. Una vez lavadas, se contó la densidad celular y 150×10^6 células fueron tratadas con glutaraldehído al 2.5% en PBS por una hora a 4°C. Transcurrido este tiempo, se lavaron 5 veces con PBS frío. Las células fijadas fueron bloqueadas con glicina 0.2M en PBS pH7 por una hora a temperatura ambiente en la misma proporción que el glutaraldehído. Se lavaron 5 veces con PBS pH 7 y 3 veces con TDSET (10mM Tris-HCl pH 7.0, 10mM EDTA, 0.2% deoxicolato, 0.1% SDS y 1% de Tritón X-

100). Finalmente, las células fueron divididas en tubos con 2×10^6 células en un volumen de 400 μ l y mantenidas en congelación a -20°C hasta su uso.

VII.13. Ensayo de Ligandos

Para el ensayo de ligandos, 2×10^6 células THP1 fijadas fueron puestas a interactuar con extracto proteico de ambas cepas de *T. cruzi* (400 μ g) por 18 horas a 4°C en agitación suave. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron las células a 800g por 5 min. y se recuperó el sobrenadante (lo que no estaba unido). El pellet obtenido fue lavado 3 veces con 1 ml de TDSET. A cada muestra se le agregaron 60ml de buffer de carga para proteínas 1Xy se eluyeron durante 20 min a 37°C . Finalmente, las muestras fueron centrifugadas a 2000g por 5 min. y el sobrenadante se cargó en geles de acrilamida al 12% para corrimiento electroforético y el posterior Western Blot.

VII.14. Ensayo de inhibición de la infección

Las células Vero se sembraron en laminillas de 18 pozos con teflón estériles (Cell-line No. Cat. 10-476)(Jiménez-Marín 2005)a razón de 3,000 células por pozo, en medio D-MEM suplementado con 10% de SFB por un lapso de 4 horas en incubación a 37°C , 5% de CO_2 y 90% de humedad relativa para permitir la adhesión de las células al sustrato (Jiménez-Marín, 2005). Posteriormente, las células fueron puestas en contacto con los tripomastigotes obtenidos de cultivo en una relación parásito-célula hospedera 10:1, los cuales fueron previamente incubados con 100 μ g/ml los anticuerpos mAb39 y C16D por 2 horas a 4°C (López-Olmos, 1999). La interacción de las células con los parásitos fue de 24 horas. Una vez transcurridos el tiempo postinfección, se lavaron las laminillas con PBS, fijadas

con metanol absoluto por un minuto y teñidas con Giemsa por 15min para su posterior análisis microscópico, el cual consistió en contar 100 células por pozo por triplicado y cuantificar las células que contenían parásitos, así como determinar el número de parásitos intracelulares (Jiménez-Marín 2005).

VII.15. Análisis estadístico

Los resultados son expresados como la media aritmética del análisis de 3 ensayos independientes con su desviación estándar. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas si $p < 0.05$ por una prueba de t-Student con la ayuda del programa Prisma (<http://www.graphpad.com/prism/>).

VIII. RESULTADOS

VIII.1. Diseño de Iniciadores

El diseño de los iniciadores usados para la amplificación de los RNA mensajeros de la TS mediante la técnica de RT-PCR, fue realizado con la ayuda del programa computacional PRIME3. La secuencia del gen de TS que se eligió para este diseño es la perteneciente a un miembro de la familia de las TSs (GeneBank L26499) de 1929pb y la cual mostró, al realizar un alineamiento, una homología del 100% con 50 miembros de ésta familia. En el Anexo 2 se muestra el alineamiento representativo de 3 secuencias pertenecientes a genes de TS publicados en el GeneBank.

Las características de los iniciadores con que se alimentó al programa fueron que tuvieran un tamaño de 20pb, con un producto de amplificación con un tamaño no superior a las 500pb. El programa proporcionó un juego de iniciadores, sentido y anti-sentido de 20pb. El iniciador directo con secuencia GGTGATGAAAATTCCGCCTAC, inicia en el nucleótido 1009 de la secuencia L26499 y tuvo una TM de 59.90°C (Figura 10, Anexo 1). Por su parte, el iniciador reverso, cuya secuencia fue AATCAACGGTATCGCTTTGC, inicia en el nucleótido 1436 y tuvo una TM de 60.10°C (Figura 10, anexo 1). El tamaño del producto de amplificación esperado con estos iniciadores fue de 428pb.

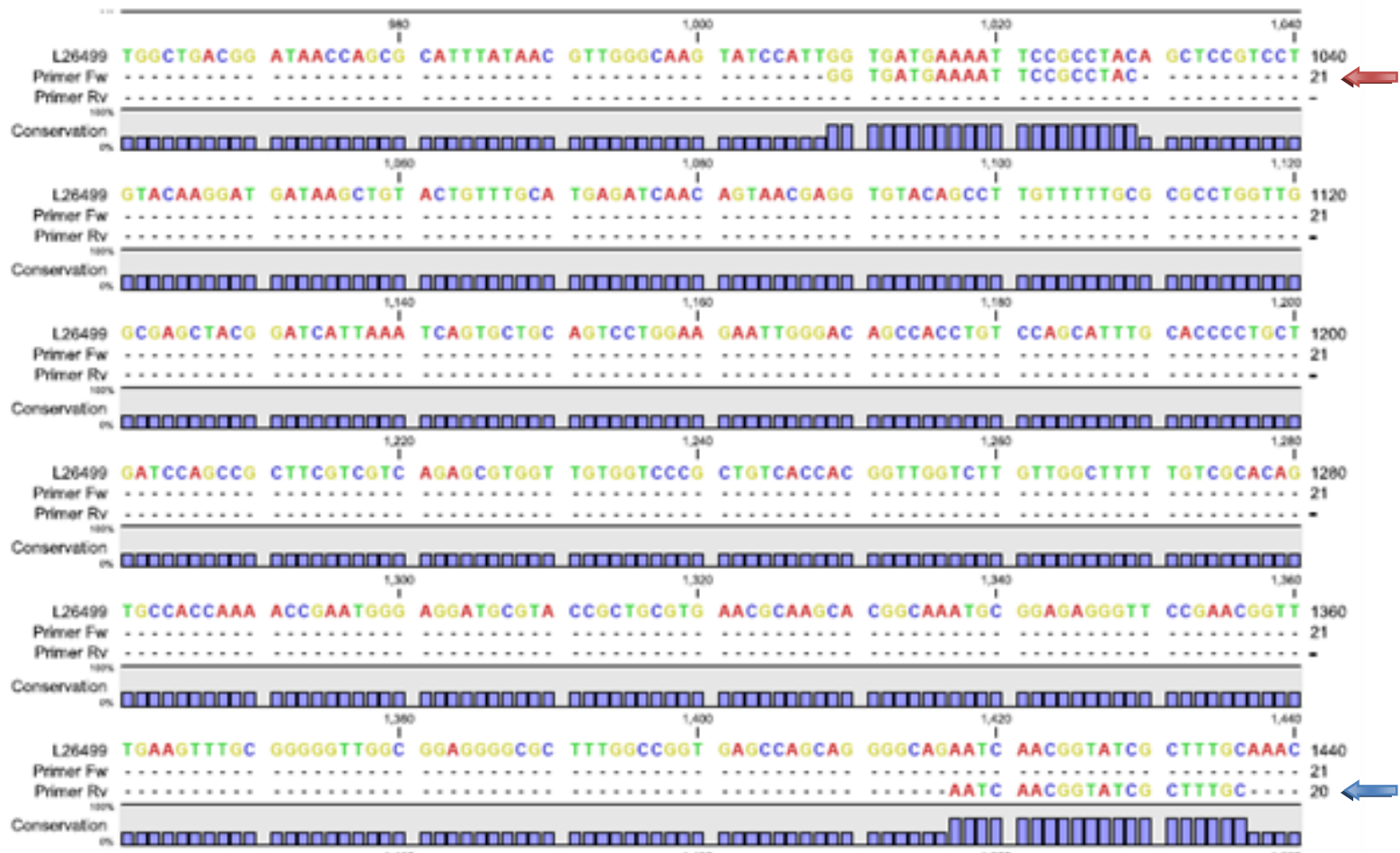


Figura 10. Alineamiento del gen de TS L26499 (GeneBank) con los iniciadores diseñados con la ayuda del programa Prime3. El iniciador sentido (Fw, flecha roja) inicia en el nucleótido 1009 y tiene una longitud de 21pb. El iniciador anti-sentido (Rv, flecha azul) inicia en el nucleótido 1436 y mide 20pb. El amplificado esperado es de 428pb. La barra azul indica el porcentaje de nucleótidos conservados. En el Anexo I se muestra la secuencia completa del gen L26499 alineado con los dos iniciadores.

VIII.2. Estandarización de la extracción de RNA

Para la extracción de RNA total de tripomastigotes obtenidos a partir de cultivo celular de las cepas Ninoa y Qro, se utilizó el método de Trizol descrito en la sección de Metodología. Las muestras de RNA obtenidas fueron corridas electroforéticamente en geles de agarosa al 1% y fotografiados en un fotodocumentador Kodak, previa tinción del gel con bromuro de etidio. El resultado de la extracción se muestra en la figura 11, que es una imagen representativa de tres extracciones hechas independientemente. Se puede observar la integridad del RNA extraído, apreciándose las tres bandas características del RNA de *T. cruzi* en un rango de 2,000 a 1,500pb. También se puede apreciar una banda inespecífica de alrededor de 3,000pb.

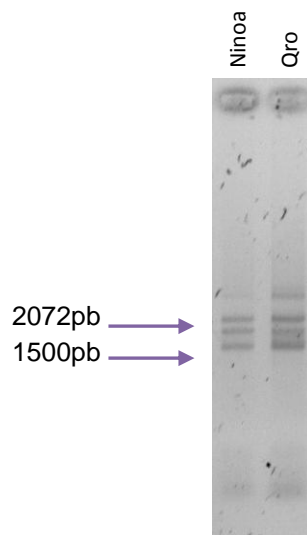


Figura 11. Visualización del RNA total extraído de tripomastigotes de las cepas Ninoa y Qro. Tripomastigotes de la cepas Ninoa y Qro de *T. cruzi* fueron tratados por el método de Trizol para la extracción de RNA total. Los productos de la extracción fueron corridos en un gel de agarosa al 1% a 100V por 40min. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio para su visualización. RNA de tripomastigotes de la cepa Ninoa. RNA de tripomastigotes de la cepa Qro.

VIII.3. Estandarización del RT-PCR

Una vez corroborada la integridad del RNA, se cuantificó en un equipo Gene Quant Pro y se procedió a hacer la estandarización del RT-PCR. Para ello, se realizó un PCR con un gradiente de temperaturas de alineamiento para los iniciadores de TS con temperaturas de 60°C, 60.8°C, 62.8°C y 64°C, observándose que la temperatura óptima era la de 60.8°C. Esta temperatura fue la utilizada en los posteriores ensayos de RT-PCR. Una vez conocida la temperatura de alineamiento para estos iniciadores, se hizo un ensayo RT-PCR en un solo paso con una sola muestra de RNA tratada con DNAsal por cada cepa para verificar la amplificación tanto de la TS como del gen constitutivo S4 (Fig. 12 carriles 2, 3, 6 y 7). Además, se corrieron los controles pertinentes: el blanco, el cual tiene todos los reactivos para la amplificación de S4, con excepción del templado de RNA (Fig. 12 carriles 4 y 8) y un control que en lugar de tener la enzima Reverso-transcriptasa (RT), sólo tiene la Taq polimerasa, esto para descartar contaminaciones con DNA en la amplificación de S4 (Fig. 12 carriles 5 y 9). Como se puede observar en la figura 12, se tiene una buena amplificación del gen constitutivo S4 con un tamaño de 840pb, tanto en la cepa Ninoa (Fig. 12 carril 2) como en la cepa Qro (Fig. 12 carril 6). De la misma forma, se detectó una buena amplificación del gen de TS, con un tamaño esperado de 428pb, en ambas cepas (Fig. 12 carriles 3 y 7). Por otro lado, no se observó amplificación en las muestras blanco sin templado lo que nos indicó que los reactivos estaban libres de contaminaciones (Fig.12 carriles 4 y 8). Tampoco se observó amplificación en las muestras que no tenían la RT y que sólo tenían la TaqPolimerasa, con lo que se

infiere que el tratamiento con DNasal fue efectivo y no existe contaminación con DNA genómico en nuestras muestras (Fig. 12 carriles 5 y 9).

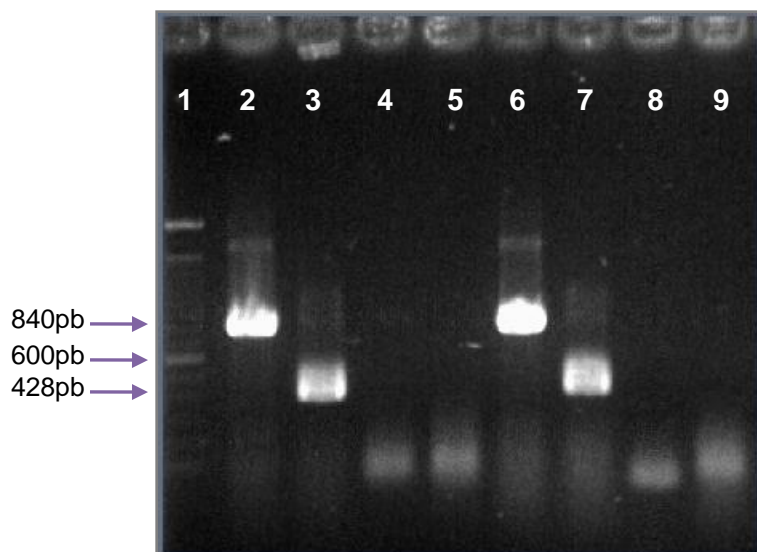


Figura 12. Productos de amplificación de los mensajeros para S4 y TS en tripomastigotes de cultivo de las cepas Ninoa y Qro. La reacción de RT-PCR se corrió a 40 ciclos utilizando iniciadores para la TS y para S4 con RNA de las cepas Ninoa y Qro de *T. cruzi* tratado con RNasal. 1. Marcadores de tamaño molecular 100pb. 2. Amplificado de S4 en la cepa Ninoa. 3. Amplificado de TS en la cepa Ninoa. 4. Blanco. 5. S4 en la cepa Ninoa sólo con TaqPol. 6. Amplificado de S4 en la cepa Qro. 7. Amplificado de TS en la cepa Qro. 8. Blanco. 9. S4 en la cepa Qro. sólo con TaqPol.

VIII.4. Expresión de mensajeros para TS en las cepas mexicanas Ninoa y Qro de *T. cruzi*.

Con el fin de conocer el nivel de expresión génica de la enzima TS en las dos cepas mexicanas de estudio Ninoa y Qro, las cuales están catalogadas como poco virulenta y virulenta respectivamente, se realizó el análisis de la expresión de RNA mensajeros para TS, utilizando como templado tres muestras de RNA de cada cepa extraídas independientemente, por medio de un ensayo semi-cuantitativo de RT-PCR hecho en un solo paso. Los datos densitométricos

obtenidos con el programa Quantity One 4.6.7 y que posteriormente se utilizaron para hacer las gráficas, se muestran en la Tabla 1. Como se puede ver en la figura 13 y en la Tabla 1, la expresión de TS en las dos cepas es muy similar, no habiendo diferencias significativas entre ellas al momento de hacer la normalización de los datos densitométricos con el control endógeno (Fig. 13B, Tabla 1).

Tabla 1. Amplificación de TS por RT-PCR.

	Valores densitométricos (INT* mm ²)		Relación TS/S4		
	TS	S4			
Ninoa	931.35	656.17	1.41		
Ninoa	1029.24	1114.83	0.92	Promedio	1.04
Ninoa	1787.36	2260.01	0.79	Desv. Est	0.33
Qro	876.79	979.86	0.89		
Qro	835.57	921.76	0.90	Promedio	0.88
Qro	1879.16	2200.37	0.85	Desv. Est	0.02

Los valores densitométricos fueron obtenidos en el RT-PCR pertenecen a tres extracciones de RNA independientes por cepa y están reportados en unidades de intensidad por milímetro cuadrado (INT*mm²).

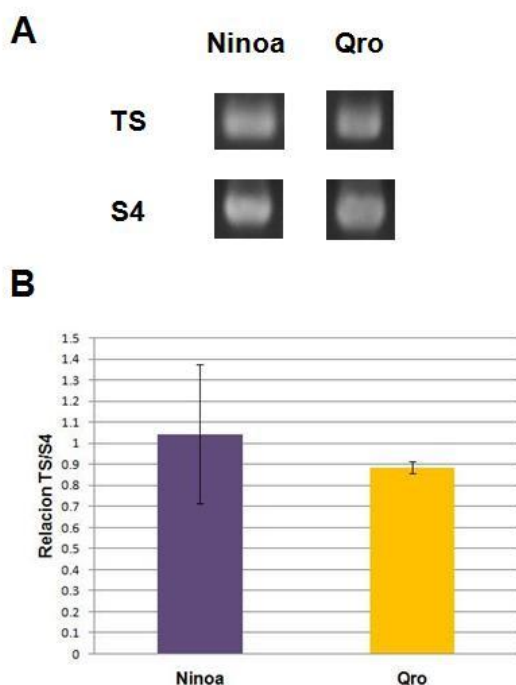


Figura 13.A. Productos amplificados por RT-PCR para detectar la expresión de mensajeros para TS en las cepas Ninoa y Qro. El RNA total de tripomastigotes de ambas cepas fue extraído por el método de Trizol. Se realizó el RT-PCR en un solo paso. Los productos fueron corridos en un gel de agarosa al 2% y posteriormente teñidos con Bromuro de Etidio. Las bandas mostradas son representativas de tres ensayos realizados con RNA extraído en tres experimentos independientes. Se usó como control interno el gen ribosomal S4 de *T. cruzi*. **B.** Gráfica de la normalización de los datos obtenidos por densitometría usando la relación TS/S4.

En el ensayo anterior, se utilizaron las condiciones recomendadas por el fabricante del kit SuperScript™ One-step RT-PCR con Taq platinum^R, las cuales sugieren 40 ciclos de amplificación en el ensayo. Al no detectarse diferencias en la expresión de esta enzima a 40 ciclos, se realizaron ensayos de RT-PCR reduciendo el número de ciclos para corroborar la ausencia de diferencias en la expresión de esta enzima.

Se corrieron ensayos con 40, 35, 30, 25 y 20 ciclos en las mismas condiciones de temperatura que el ensayo anterior y que están descritas en la Metodología. Los productos se corrieron en geles de agarosa al 2% y se tiñieron con bromuro de etidio para su posterior análisis densitométrico. Los datos obtenidos de este análisis los podemos ver en la Tabla 2. Los datos obtenidos de estos ensayos (Fig. 14 y Tabla 2), muestran que no existen diferencias en la expresión de mensajeros para TS con 40, 35 y 30 ciclos de amplificación. En las muestras que tuvieron 25 ciclos de amplificación se puede ver una diferencia, siendo la expresión de esta enzima en la cepa Ninoa ligeramente superior que la de la cepa Qro. Sin embargo, al hacer el análisis estadístico, esta diferencia no fue significativa (Fig. 14 y Tabla 2). Podemos apreciar también que en las muestras que tuvieron 20 ciclos de amplificación se ve claramente la reducción en la cantidad de amplificado producido con respecto a los otros ensayos con mayor número de ciclos de amplificación. Se puede observar un ligero aumento en la cantidad de mensajeros de TS en la cepa Ninoa con respecto a la cepa Qro, pero nuevamente este resultado no es estadísticamente significativo.

Tabla 2. Amplificación de TS por RT-PCR utilizando diferente número de ciclos.

40 ciclos	Valores Densitométricos (INT*mm ²)		Relación TS/S4		
	TS	S4			
Ninoa	411.80	410.16	1.00		
Ninoa	407.23	421.44	0.96	Promedio	0.98
Ninoa	437.47	450.75	0.97	Desv. Est	0.02
Qro	402.40	408.74	0.98		
Qro	428.80	435.20	0.98	Promedio	0.96
Qro	418.21	445.25	0.93	Desv. Est	0.02
35 ciclos					
Ninoa	376.87	402.65	0.93		
Ninoa	412.26	435.36	0.94	Promedio	0.93
Ninoa	399.07	431.07	0.92	Desv. Est	0.01
Qro	394.21	392.63	1.00		
Qro	407.14	420.00	0.96	Promedio	0.95
Qro	370.13	416.17	0.88	Desv. Est	0.05
30 ciclos					
Ninoa	329.96	389.19	0.84		
Ninoa	415.05	410.96	1.00	Promedio	0.98
Ninoa	401.13	369.48	1.08	Desv. Est	0.12
Qro	238.73	299.65	0.79		
Qro	393.77	356.73	1.10	Promedio	1.02
Qro	418.96	358.73	1.16	Desv. Est	0.19
25 ciclos					
Ninoa	295.29	347.66	0.84		
Ninoa	310.39	354.81	0.87	Promedio	0.87
Ninoa	296.91	329.71	0.90	Desv. Est	0.02
Qro	250.14	318.63	0.78		
Qro	265.31	335.92	0.78	Promedio	0.78
Qro	302.35	381.28	0.79	Desv. Est	0.0039
20 ciclos					
Ninoa	83.35	271.04	0.30		
Ninoa	136.50	310.27	0.43	Promedio	0.35
Ninoa	87.42	288.50	0.30	Desv. Est	0.07
Qro	55.42	179.18	0.30		
Qro	63.48	300.26	0.21	Promedio	0.24
Qro	65.43	322.59	0.20	Desv. Est	0.05

Densitometría de mensajeros para TS y S4 en tripomastigotes de las cepas Ninoa y Qro. de *T. cruzi* en ensayos de RT-PCR, utilizando RNA de tres extracciones independientes, con diferente número de ciclos de amplificación (40, 35, 30, 25 y 20). Los valores están reportados en unidades de intensidad por milímetro cuadrado (INT*mm²).

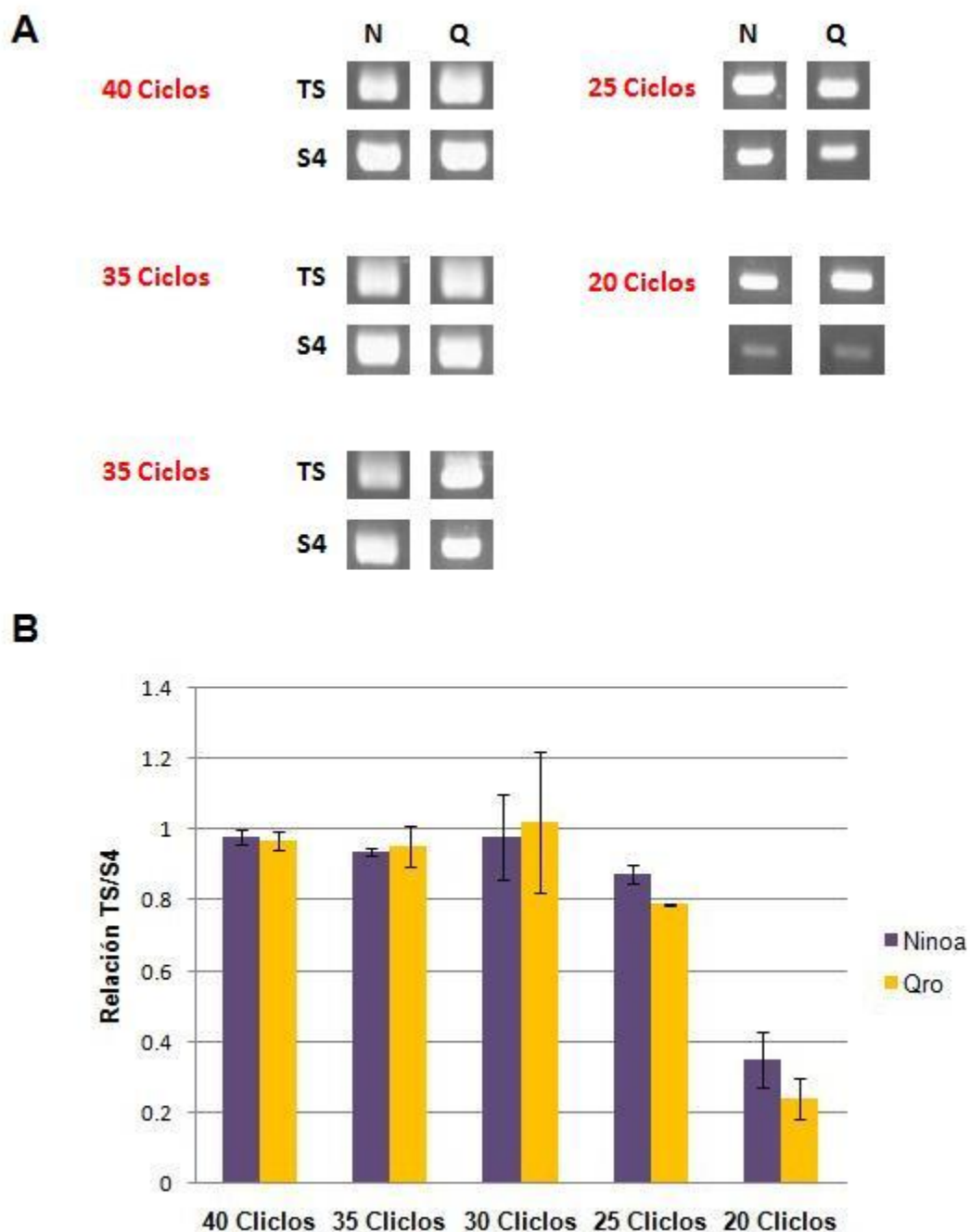


Figura 14.A. Productos amplificados por RT-PCR para detectar la expresión de mensajeros para TS en las cepas Ninoa y Qro. El RNA total de tripomastigotes de ambas cepas fue extraído por el método de Trizol. Se realizó el RT-PCR en un solo paso con diferente número de ciclos de amplificación (40, 35, 30, 25 y 20). A. Los productos fueron corridos en un gel de agarosa al 2% y posteriormente teñidos con bromuro de etido. Las bandas mostradas son representativas de tres ensayos realizados con RNA extraído en tres experimentos independientes. Se usó como control interno el gen ribosomal S4 de *T. cruzi*. **B.** Gráfica de la normalización de los datos obtenidos por densitometría usando la relación TS/S4.

VIII.5. Identificación de la Transalidasa en extractos totales de tripomastigotes de las cepas Ninoa de *T. cruzi*.

Con el fin de determinar el patrón de reconocimiento de la TS por el anticuerpo anti-TSmAb39, se realizaron ensayos de Western Blot(WB) utilizando el sobrenadante de los hibridomas productores de este anticuerpo y usando como antígeno extracto proteico total de tripomastigotes de la cepa mexicana Ninoa. Como se muestra en la figura 15A, se pueden observar cuatro bandas por arriba de los 180Da, lo que coincide con lo reportado con anterioridad para este anticuerpo que reconoce un grupo de proteínas pertenecientes a la familia de la TS en un rango de 180 a 200 KDa (Fig. 15B).

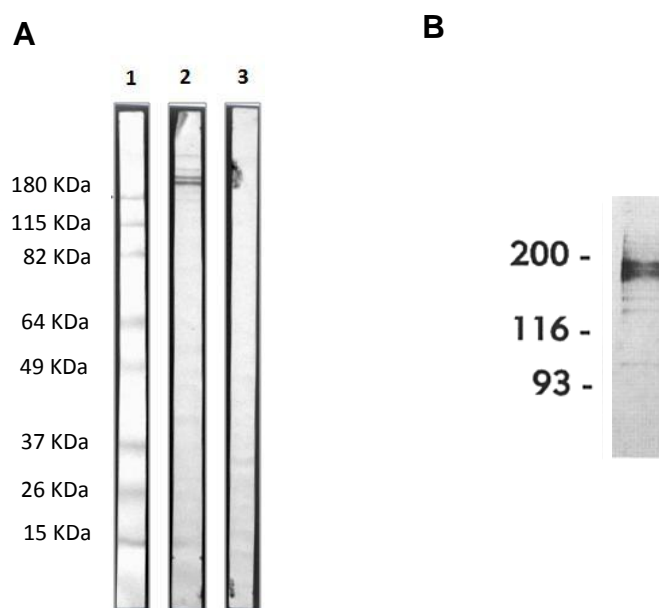


Figura 15. Western Blot para la detección de la TS. A) Extracto total de tripomastigotes de la cepa mexicana Ninoa de *T. cruzi* fue corrido por electroforesis en geles de acrilamida al 12% y transferido a membrana de nitrocelulosa. 1: Marcadores de peso molecular, 2:Anticuerpo anti-transalidasa mAB39, 3: Suero de ratón no infectado (control negativo). Como segundo anticuerpo se utilizó un Anti-IgG de ratón acomplado a HRP para ser revelado con 3-3-Diaminobenzidina. B) Figura tomada de Schenkman et. al. 1992 donde se aprecia la TS detectada con el anticuerpo mAb39.

VIII.6. Expresión de TS en extracto total de tripomastigotes de las cepas Ninoa y Qro.

Una vez confirmado el patrón de reconocimiento del anticuerpo anti-trans-sialidasa mAb39, el siguiente paso fue hacer el análisis comparativo con este anticuerpo en extractos totales de tripomastigotes de las cepas mexicanas Ninoa y Qro. Se realizó el WB utilizando ahora membranas con extractos de la fase de tripomastigotes infectivos de las dos cepas. La figura 16A, es un WB representativo de tres ensayos independientes y cuyos datos densitométricos pueden verse en la Tabla 3.

Tabla 3. Reconocimiento de TS por el anticuerpo mAb39.

	Valores Densitométricos (INT*mm ²)			Promedio	Desv. Est.
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3		
Ninoa	121.01	78.02	148.85	115.96	35.68
Qro	22.80	19.26	40.72	27.59	11.50

Los ensayos se hicieron utilizando extracto total proteico de tripomastigotes de las cepas Ninoa y Qro de *T. cruzi* en tres ensayos independientes. Los valores están reportados en unidades de intensidad por milímetro cuadrado (INT*mm²).

Se pudo observar que existe una expresión proteica diferencial de TS detectada por el anticuerpo mAb39 en las cepas Ninoa y Qro de *T. cruzi* en un rango de 180-200 KDa (Fig. 16, carriles 8 y 9, Ninoa y Qro respectivamente), aún y cuando se cargó la misma concentración de proteína (5µg) de los extractos de las dos cepas, lo cual fue corroborado por la tinción de una parte de las tiras con Negro Amido (Fig. 16A, 4 y 5). La mayor expresión fue detectada en el extracto

de la cepa Ninoa (Fig. 16B) comprobándose que la cepa Qro expresa alrededor de 4 veces menos TS que la cepa Ninoa. Dicha diferencia es estadísticamente significativa al hacer la prueba T de Student por medio del programa Prisma.

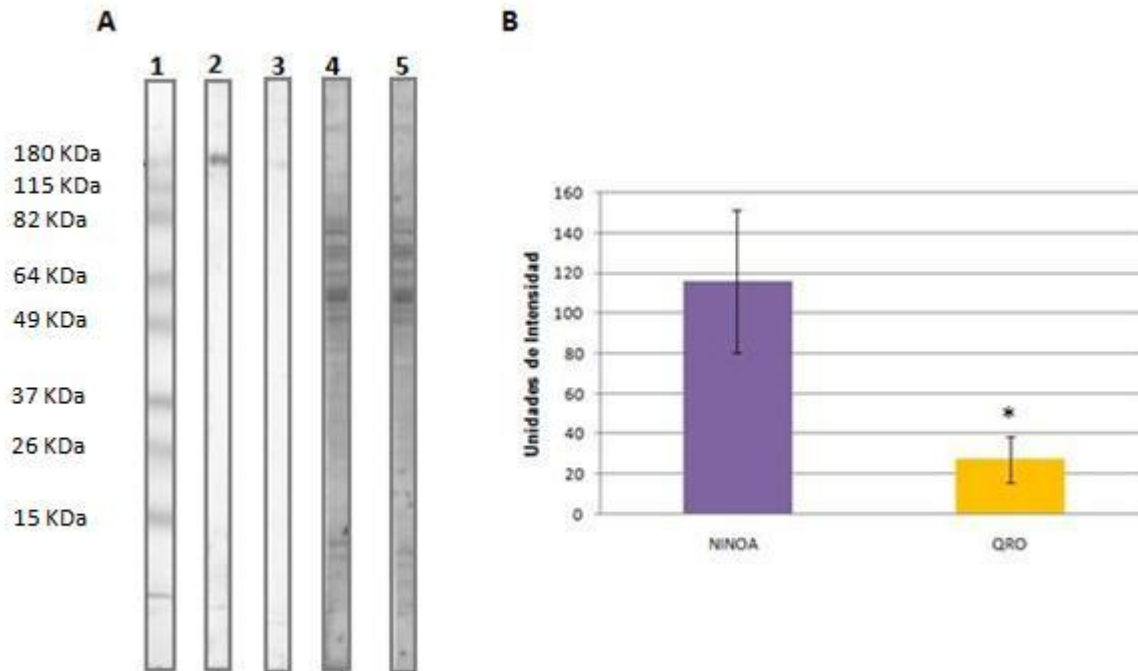


Figura 16. Western Blot para detectar TS en tripomastigotes de las cepas Ninoa y Qro. A. Extracto total de tripomastigotes de *T. cruzi* corrió por electroforesis en geles de acrilamida y transferido a membrana de nitrocelulosa. MP: Marcadores de peso molecular, 2: Anticuerpo anti-transialidasa mAB39, usando como antígeno extracto total de la cepa Ninoa, 3: Anticuerpo anti-transialidasa mAB39, usando como antígeno extracto total de la cepa Qro. 4 y 5, tinción con negro amido de las tiras con extracto total de las cepas Ninoa y Qro respectivamente. Como segundo anticuerpo se utilizó un Anti-IgG de ratón acoplado a HRP para ser revelado con 3-3-diaminobenzidina. B. Gráfica de los valores del análisis densitométrico (Quantity One) en unidades de intensidad. El asterisco indica diferencias significativas entre los valores densitométricos de las cepas Ninoa y Qro (n=3 p<0.005).

VIII.7. Secreción de TS en medio condicionado con parásitos (MCP) de las cepas Ninoa y Qro.

Debido a que a nivel de proteína la enzima TS es expresada diferencialmente en las cepas Ninoa y Qro, se hicieron ensayos de WB con MCP's de ambas cepas para determinar si esta enzima pudiera estar siendo

secretada al medio de manera diferencial. Como se hizo con anterioridad, las membranas del WB fueron analizadas densitométricamente con el programa Quantity One. Como puede apreciarse en la figura 17A y en la Tabla 4, en la detección de la TS en el MCP de la cepa Ninoa se aprecian dos bandas evidentes, una banda de 180KDa y otra alrededor de 200KDa, pertenecientes a la familia de TS. Por el contrario, el MCP de la cepa Qro parece no tener niveles detectables de esta enzima a pesar de haber la misma cantidad de proteína en ambas cepas como lo demuestra la tinción con negro amido del MCP en las membranas de nitrocelulosa (Fig. 17A 4 y 5).

Tabla 4. Reconocimiento de TS por el anticuerpo mAb39 en MCP.

	Valores Densitométricos (INT*mm ²)			Promedio	Desv. Est.
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3		
Banda 180KDa					
Ninoa	32.007	42.457	38.442	37.63	5.27
Qro	1.151	4.657	-2.024	1.26	3.34
Banda 200KDa					
Ninoa	57.082	61.232	62.889	60.401	2.991
Qro	1.099	2.802	1.385	1.762	0.911

Secreción de la enzima TS en MCP de las cepas Ninoa y Qro de *T. cruzi* en tres ensayos independientes. Los valores están reportados en unidades de intensidad por milímetro cuadrado (INT*mm²).

Al momento de hacer el análisis de la densitometría de las bandas de 180 y 200KDa (Fig. 17B y C), se puede evidenciar la cantidad de TS secretada diferencialmente por la cepa Ninoa con respecto a la Qro, siendo significativamente mayor en la primera para ambas proteínas. Estos datos sugieren que la TS no solo se encuentra en mayor concentración en los tripomastigotes de la cepa Ninoa, sino que además, es excretada en mayor cantidad por esta cepa.

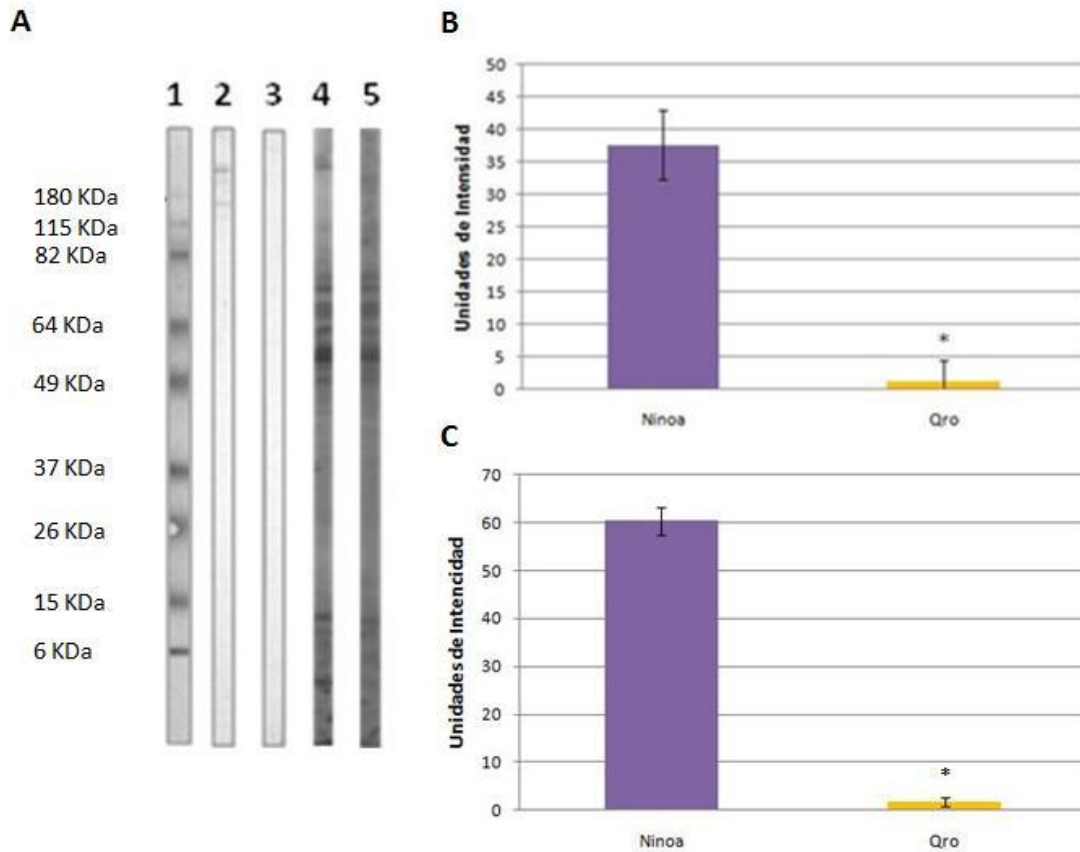


Figura 17. Western Blot para TS en medio condicionado con parásitos (MCP) de las cepas Ninoa y Qro. A. MCP (100µl) obtenido de 30×10^6 tripomastigotes de las cepas Ninoa y Qro. fueron corridos por electroforesis en geles de acrilamida al 12% y transferidos a membranas de nitrocelulosa. 1. Marcadores de peso molecular. 2. Anticuerpo anti-TS mAb39, usando como antígeno MCP de la cepa Ninoa. 3. Anticuerpo anti-TS mAb39, usando como antígeno MCP de la cepa Qro. 4 y 5. Tinción con negro amido de las tiras con MCP de las cepas Ninoa y Qro respectivamente. Como segundo anticuerpo se utilizó un Anti-igG de ratón acoplado a HRP para ser revelado con 3-3-Diaminobenzidina. B. Gráfica de los valores densitométricos (Quantity-One) de la banda de 180KDa en unidades de intensidad. C. Gráfica de los valores densitométricos (Quantity-One) de la banda de 200KDa en unidades de intensidad. El asterisco indica diferencia significativa ($n=3$ $p<0.05$).

VIII.8. Actividad enzimática de la TS en las cepas Ninoa y Qro de *T. cruzi*.

Se realizó el análisis de la actividad enzimática de la TS utilizando extracto total de tripomastigotes de cultivo de las cepas Ninoa y Qro de *T. cruzi* en un ensayo fluorescente que utiliza 3-Sialilactosa como donador de ácido siálico y la molécula MUGal como aceptor. Se usaron dos controles negativos, uno de los cuales era la mezcla de reacción sin extracto proteico de *T. cruzi*, mientras que el otro era un extracto proteico no relacionado con la familia de los tripanosomátidos, como lo es el extracto total de cisticercos de *Taenia solium*. Éste último arrojó valores de actividad específica similares a las del blanco sin proteína (Tabla 5), lo que indica que los cisticercos carecen de esta enzima, la cual es exclusiva de los tripanosomátidos *T. cruzi* y *T. brucei*.

Tabla 5. Actividad de TS en las cepas Ninoa y Qro.

	Unidades de Fluorescencia			
	Blanco	Ninoa	Qro	Cisti
Ensayo 1	1292.02	415402.85	374507.41	1668.41
Ensayo 2	841.79	266147.14	192003.35	1477.81
Ensayo 3	1394.15	290293.37	248899.27	1412.30
Promedio	1175.99	323947.79	271803.34	1519.51
Desv. Est.	293.89	80117.29	93382.98	133.04

Cada uno de los ensayos de actividad enzimática fue hecho por duplicado y los valores indicados para cada ensayo representan el promedio de estos duplicados cuyos datos crudos pueden verse en el anexo IV. Cisti: cisticerco de *Tenia solium*.

Por otro lado, la actividad de TS de los tripomastigotes de las cepas Ninoa y Qro es muy alta y apreciable en comparación al blanco y al control no relacionado (Tabla 5 y Fig. 18). Aunque se puede apreciar que la actividad de TS de la cepa Ninoa es ligeramente mayor que la de la TS de la cepa Qro, ésta diferencia no es

estadísticamente significativa (Fig. 18). Por lo tanto, estos datos juntos sugieren que no hay diferencias en la actividad de TS en las cepas Ninoa y Qro de *T. cruzi*.

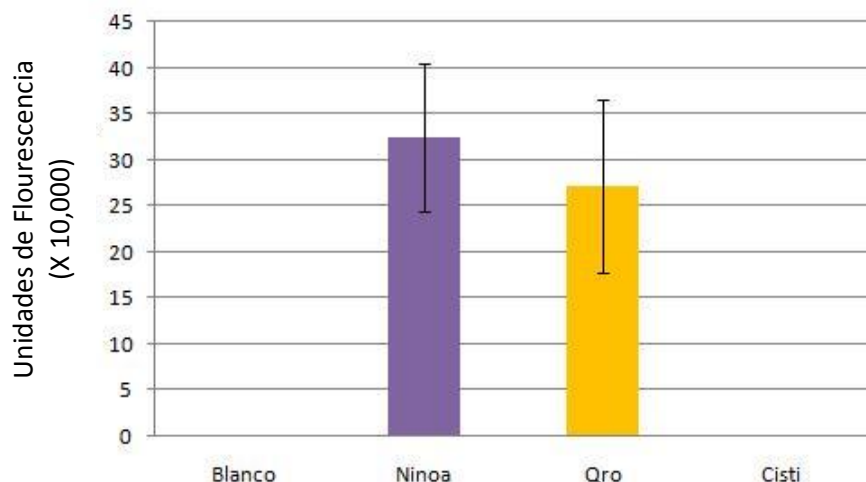


Figura 18. Actividad de TS. Se realizó el ensayo fluorescente para la detección de actividad de la enzima TS usando extractos proteicos totales de tripomastigotes de las cepas Ninoa y Qro, así como extracto total de cisticerco. Este ensayo de TS consiste en dos pasos: Inicialmente, la TS es incubada con los sustratos sialilactosa y MUGal. Segundo, el producto formado MUGalNeu5Ac (4-metilumbeliferil- β -D-sialilgalactosido), es separado del MUGal que no ha sido sialidado usando una cromatografía de intercambio aniónico, seguida por la hidrólisis ácida del MUGalNeu5Ac y la detección del metilumbeliferil liberado (MU) por medio de un Fluorómetro. Los datos crudos obtenidos en el fluorómetro se pueden apreciar en la sección de Anexos IV.

VIII.9. Ensayo de ligandos para detectar la unión de TS a células THP1

Para verificar que la TS de las cepas Ninoa y Qro se une a la célula hospedera, como se ha reportado con anterioridad para otros tipos celulares y para otras cepas de *T. cruzi*, se realizaron ensayos de ligando usando células THP1 fijadas con glutaraldehído. Las células se pusieron en interacción con 400 μ g de extracto proteico total de las cepas Ninoa y Qro por separado y una vez terminada la interacción se obtuvieron las proteínas unidas a la membrana de las células y se prepararon las muestras para ser corridas por electroforesis y transferidas en membranas de PVDF. Se realizó el WB utilizando como primer anticuerpo el mAB39 anti-TS y para revelar un anticuerpo IgG anti-ratón acoplado a

HRP para su posterior revelado con 3-3-diaminobenzidina. Como se puede observar en la Figura 19, el anticuerpo mAb39 reconoce varias proteínas que se asocian a la célula hospedera en este ensayo de ligandos. Una proteína, de alrededor de 64KDa es reconocida de igual forma como ligando de ambas cepas. Por otro lado, hay un triplete de proteínas alrededor de 15KDa que es reconocido por el mAb39 en las proteínas de la cepa Ninoa unidas, y sólo una banda cuando se usó el extracto de la cepa Qro.

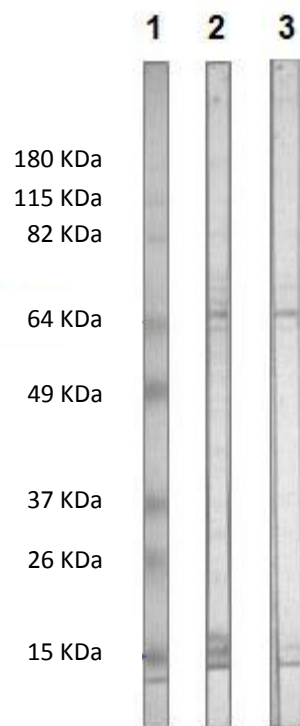


Figura 19. Ensayo de ligando para la detección de la interacción de TS con células THP1. El eluido de de la interacción del extracto proteico de tripomastigotes de las cepas Ninoa y Qro con células THP1 fijadas fue corrido por electroforesis en geles de acrilamida y transferido a membrana de nitrocelulosa. 1: marcadores de peso molecular, 2: ensayo de ligandos utilizando extracto proteico total de la cepa Ninoa, 3: ensayo de ligandos utilizando extracto proteico total de la cepa Qro. En ambos casos se utilizó el anticuerpo anti-transialidasa mAB39 y como segundo anticuerpo un anti-IgG de ratón acoplado a HRP para ser revelado con 3-3-Diaminobenzidina.

VIII.10. Ensayos de infección utilizando el anticuerpo mAb39 como bloqueo de TS

Para determinar si el anticuerpo mAb39 es capaz de bloquear la TS y así reducir la infección de los tripomastigotes, se realizaron ensayos de infección de células Vero con tripomastigotes de la cepa Ninoa y Qro. Se incubaron a los parásitos con el anticuerpo, así como con un anticuerpo producido en el laboratorio (mAbC16D) que se sabe reduce la infección de los parásitos como control positivo, también se usó un anticuerpo del mismo isotipo (OKT4) y un ensayo sin anticuerpo como controles negativos.

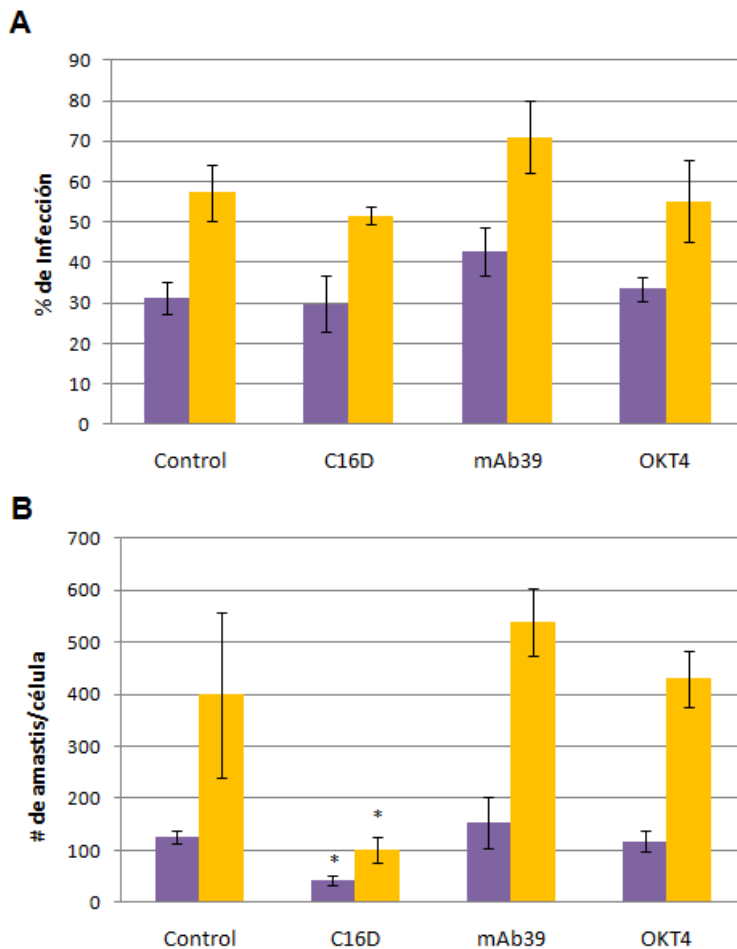


Figura 20. Infecciones con tripomastigotes de las cepas Ninoa (morado) y Qro (amarillo) tratados con anticuerpos anti TS. 3×10^3 células Vero fueron adheridas a laminillas de 18 pozos recubiertas con teflón e infectadas con tripomastigotes preincubados con el anticuerpo mAb39, el C16D, el OKT4 y sin tratar por 2 hrs, en una relación parásito-célula hospedera 10:1 por 24 hrs. A. Porcentaje de infección. B. Numero de amastigotes contados en 100 células. El asterisco indica diferencias significativas con respecto al control ($n=3$ $p<0.005$).

Como se observa en la figura 20A, el anticuerpo mAb39 no reduce la infectividad de los parásitos, determinada por el porcentaje de infección, en la cual los tripomastigotes tratados con el mAb39 tiene porcentajes de infección muy similares a los de las infecciones realizadas con parásitos no tratados o incubados con el anticuerpo no relacionado del mismo isotipo, mientras que la infección de los parásitos tratados con el anticuerpo C16D se ve un poco reducida como previamente se ha reportado. El efecto de la reducción se puede apreciar mejor en la figura 20B en donde se representa el numero de parásitos intracelulares contados en 100 células y en donde se ve la disminución significativa de parásitos intracelulares en las infecciones hechas con los parásitos pre-tratados con el anticuerpo C16D, mientras que los parásitos intracelulares contados en las células infectadas con tripomastigotes tratados con el anticuerpo mAb39 tuvieron nuevamente valores similares a las del control sin tratar y tratados con el anticuerpo no relacionado del mismo isotipo.

IX. Discusión

Muchos patógenos, incluyendo parásitos protozoarios, muestran una compleja variabilidad genética. Esta variabilidad genética afecta las características biológicas generales observadas en estos organismos, incluyendo propiedades muy importantes como la patogenicidad, la habilidad para evadir la respuesta inmune, a virulencia y la resistencia a fármacos. La diversidad de los parásitos, junto al polimorfismo natural humano, conduce a manifestaciones clínicas variables de estas infecciones.

El parásito hemoflagelado *T. cruzi* se ha dividido en seis grupos principales: el denominado grupo *T. cruzi* I, el cual corresponde al ciclo selvático del parásito en Sudamérica y es principal genotipo que infecta humanos del norte de Sudamérica hasta México (Risso et al., 2011); y los denominados como grupos *T. cruzi* II, *T. cruzi* III, *T. cruzi* IV, *T. cruzi* V y *T. cruzi* VI, los cuales se han descrito, circulan en el domicilio/peridomicilio en regiones de Brasil, Argentina y Bolivia (Zingales et al. 2009).

En los diferentes grupos genéticos se han reportado variaciones en la expresión de moléculas, consideradas factores de virulencia. Además, se ha descrito que el parásito tiene preferencia por ciertas vías de señalización, activadas por determinadas moléculas de superficie dependiendo del grupo genético al que pertenezca la cepa o el aislado de estudio. Por ejemplo, en la unión y entrada en las células hospederas, los tripomastigotes metacíclicos de la cepa altamente invasiva CL (la cual pertenece al recientemente designado grupo *T.*

cruzi VI), participa la molécula de superficie gp82, que de manera eficiente dispara la vía de señalización Ca^{2+} tanto en los tripomastigotes metacíclicos como en las células hospederas. Por su parte, los tripomastigotes de la cepa G, perteneciente al grupo *T. cruzi* I y poco invasiva, utilizan principalmente a la molécula gp35/50 para su internalización. Las moléculas gp35/50 no son tan efectivas como gp82 promoviendo la invasión, debido probablemente a su pobre actividad induciendo la señalización de Ca^{2+} (Yoshida, 2006).

Se sabe por estudios realizados por Espinoza y colaboradores (1998), que el principal grupo genético de *T. cruzi* que circula en México es el grupo *T. cruzi* I y que este grupo es el causante de patología cardíaca en niños y adultos (Nivardo-Sobrinio *et. al.*, 2009; Salazar-Schettino *et. al.*, 2009), además de representar un problema de infección persistente en el país (Galaviz-Silva *et. al.*, 2009; Luquetti *et. al.*, 2009). Aunque recientemente por métodos inmunológicos se propone la presencia de genotipos previamente considerados TC II en pacientes mexicanos, (Risso *et al.*, 2011).

En este trabajo, se analizó la expresión de uno de los principales factores de virulencia de este parásito, la TS, en dos cepas mexicanas de *T. cruzi* del grupo genético *T. cruzi* I (López-Olmos *et. al.*, 1998; Bosseno *et. al.*, 2002) que muestran un comportamiento biológico diferente entre ellas en modelo murino. Al inocular el mismo número de formas infectivas (1×10^5 tripomastigotes) por vía intraperitoneal a ratones BALB/c, una mata al 100% de los ratones durante la fase aguda de la infección (Qro), mientras que la otra cepa (Ninoa) no mata a ninguno de los ratones infectados, llegando estos últimos hasta la fase crónica de la

infección, además de que la respuesta inmune inducida por estas cepas es claramente diferente (Espinoza *et. al.*, 2010).

Se ha demostrado que la enzima TS es un factor de virulencia importante. En un estudio hecho con cepas sudamericanas se describió que esta enzima se encuentra más expresada en cepas de *T. cruzi* del previamente considerado grupo II altamente virulentas, las cuales matan a los ratones en fase aguda con un inóculo de 50 tripomastigotes por vía intraperitoneal, mientras que cepas del grupo genético *T. cruzi* I sudamericanas, las cuales son avirulentas con inóculos de 5×10^4 tripomastigotes por vía intraperitoneal, tienen una expresión reducida de esta enzima (Risso *et. al.*, 2004).

Una primera aproximación para la realización del presente trabajo fue el de determinar la expresión a nivel genético de la enzima TS, mediante la detección de sus RNA mensajeros por medio de la técnica de RT-PCR. Los resultados obtenidos de este análisis indican que no hay diferencias en la expresión de esta enzima a nivel genético (Fig. 13 y 14). Cabe mencionar que la TS es miembro de una gran familia que consta de alrededor de 1,400 genes los cuales codifican en su mayoría para proteínas sin actividad enzimática. Se ha manejado la hipótesis de que estos grupos de genes se están constantemente transcribiendo, esto probablemente para que las proteínas sin actividad sirvan como distractores para los anticuerpos neutralizantes y así, permitir que las TS con actividad enzimática cumplan su función (El-Sayed, 2005).

Un punto importante a considerar es que no necesariamente todos los mensajeros transcritos son traducidos a proteína. Esto se pudo comprobar claramente con las cepas mexicanas estudiadas en los resultados de los ensayos que se realizaron para detectar la proteína total presente en los parásitos y la que, por ser ésta enzima una proteína secretada, se encontraba en los sobrenadantes. En ambos casos se pudo observar que la cepa avirulenta Ninoa expresa mayor cantidad de TS que es reconocida por el anticuerpo mAb39 anti-TS, mientras que la TS detectada por este mismo anticuerpo en las muestras de la cepa Qro era significativamente menor (Fig. 16 y 17).

El resultado obtenido por nuestro estudio en la expresión de esta proteína resulta un tanto contradictorio debido al hecho de que una de las funciones propuestas de esta enzima activa es la de reconocimiento y adhesión a las células hospederas (Schenkman *et. al.* 1991a y 1991b), por lo que se esperaría que la cepa que expresara mayoritariamente esta enzima fuera la más infectiva y no al revés. Esto pudiera ser explicado por el hecho de que en este estudio se utilizó un solo anticuerpo monoclonal para la detección de esta enzima (mAb39, Schenkman 1992) y que por lo tanto, solo se estén detectando las variantes de esta enzima reconocidas por este anticuerpo o las que posean el sitio que éste reconoce, el cual se encuentra en la porción carboxi-terminal de la enzima en las repeticiones en tándem (SAPA). El resto de enzimas de diferente peso molecular que no posean esta región reconocida por el mAb39, no serán detectadas por éste anticuerpo.

Existen estudios en los que se ha comparado por medio de WB la expresión de diferentes moléculas consideradas igualmente factores de virulencia entre los miembros de los grupos genéticos *T. cruzi* I y II (Yoshida, 2006). En ese caso, moléculas como gp90, gp82 y gp35/50 han sido estudiadas con el uso de diferentes anticuerpos monoclonales y se ha observado que los tripomastigotes de aislados altamente invasivos son deficientes de las variantes de gp90 y gp35/50 reconocidos por los anticuerpos monoclonales 1G7 y 10D8 respectivamente. Sin embargo, estos mismos aislados expresan variantes de gp90 y gp35/50 identificadas por diferentes anticuerpos monoclonales, como son el anticuerpo monoclonal 5E7 anti-gp90 y el 2B10 anti-gp35/50. Por su parte, los tripomastigotes de aislados poco invasivos tienen una mayor expresión de gp90 y gp35/50 que es detectada por los cuatro anticuerpos monoclonales antes mencionados de manera indistinta (Yoshida, 2006). Estos resultados demuestran que el reconocimiento de un mismo anticuerpo puede ser diferencial dependiendo de la cepa usada en el estudio.

Uno de los resultados que llama fuertemente la atención es el hecho de que en los sobrenadantes de tripomastigotes de la cepa Qro aparentemente haya muy poca TS reconocida por el anticuerpo mAb39. Como se ha reportado, la TS es una enzima que se secreta y que se encuentra unida a la superficie de los tripomastigotes por su parte carboxi-terminal por medio de enlaces GPI. Esta unión entre GPI y la porción C-terminal de la enzima es cortada para liberar la enzima y secretarla. Una posible explicación al fenómeno observado en los MCP, que aún está por comprobarse, es que el corte hecho para liberar la enzima en la

cepa Qro modifique de alguna manera la región reconocida por el mAb39 anti-TS y éste no pueda reconocerla eficientemente. Otra explicación sería que algunos miembros de la TS de la cepa Qro, carezcan definitivamente o tengan modificada la región reconocida por este anticuerpo, lo cual quedó descartada debido a otros resultados obtenidos en nuestro laboratorio con fosfolipasa C (PI-PLC) de *Bacillus thuringiensis*. La PI-PLC corta las uniones GPI que anclan a la TS a la membrana del parásito, liberándola al sobrenadante. En estos ensayos se pudo observar que la TS liberada con PI-PLC de la cepa Qro. si es detectada con el mAb39 y que es menor que la liberada por la cepa Ninoa por medio de la misma técnica pero que esta diferencia no es significativa. Por lo tanto, se puede concluir que la cepa Qro está secretando menos TS que la cepa Ninoa.

Un punto importante al momento de caracterizar esta enzima es la medición de la actividad enzimática de esta molécula en los tripomatigotes de estas dos cepas de *T. cruzi*. El resultado de estos ensayos demostró que no hay diferencias significativas estadísticamente en la actividad de esta enzima en las dos cepas por lo que se refuerza la opinión de que lo observado en los ensayos de detección de la proteína tanto en extracto total de parásito como los hecho en MCP se refiere a la presencia de las TS que contiene la región SAPA reconocida por el mAC39.

Con lo referente a los resultados de los ensayos de ligandos es de llamar la atención que el anticuerpo mAb39 reconoce en las dos cepas bandas de diferente peso que lo reportado para la TS. Se reconocen en ambas cepas una banda de 65KDa y diferencialmente las bandas por arriba de los 15KDa, las cuales son más evidentes en los proteínas unidas cuando se empleo la cepa Ninoa. La diferencia

de pesos de las proteínas reconocidas por este anticuerpo que normalmente reconoce una familia de entre 180-220KDa puede deberse a la unión de ciertas fracciones de la enzima o a un artefacto debido al tratamiento durante este ensayo. Posteriores experimentos serían necesarios para determinar con precisión cual es el caso.

En los ensayos de infección tampoco se detectó que este anticuerpo inhibiera la entrada de los tripomastigotes a la célula hospedera por parte de ninguna de las dos cepas. Este efecto puede deberse a que la TS tiene el sitio activo para el corte y transferencia de ácido siálico en su región amino terminal y el anticuerpo mAb39 reconoce la porción carboxi terminal de la TS, lo cual no impide su acción catalítica y por lo tanto no neutralizaría su acción como factor de virulencia.

En conclusión, parece que en las cepas estudiadas las TSs reconocidas por el mAb39 no tienen un papel primordial en el fenómeno de infección y no parece tampoco ser un factor de virulencia importante ya que, a pesar de encontrarse representada diferencialmente a nivel de proteína, la actividad enzimática es similar en ambas, independientemente de la capacidad infectiva de la cepas. Nuestros resultados contradicen el papel que se le ha atribuido a esta enzima en cepas Sudamericanas que pertenecen a genotipos diferentes al estudiado en este trabajo (Risso *et. al.*, 2004).

Los resultados observados a lo largo de este trabajo llaman mucho la atención dada la naturaleza e importancia de esta enzima en la biología del

parásito *T. cruzi*, por lo que se tienen que profundizar en el estudio de la TS en más cepas mexicanas y con otros anticuerpos para caracterizar a esta familia de manera completa. También, el uso de anticuerpos neutralizantes, ayudaría a entender el papel que tiene esta molécula en el proceso de invasión en estas cepas. Con respecto a la actividad enzimática, sería de gran importancia su estudio en los sobrenadantes de tripomastigotes para ver cómo se comporta la TS secretada por estos parásitos.

X. Conclusiones

- La TS en cepas mexicanas de *T. cruzi* no presenta diferencias a nivel de expresión de mensajeros y de actividad enzimática.
- La TS reconocida por el anticuerpo mAb39 es expresada diferencialmente en extracto proteico total, así como la secretada en las cepas mexicana de *T. cruzi* Ninoa y Qro.
- La TS se une a células THP1.
- El anticuerpo mAb39 no reduce la infectividad de los parásitos.

Perspectivas: se debe realizar la caracterización de esta enzima con la ayuda de otros anticuerpos monoclonales que reconozcan otros miembros de la familia de TS's, así como hacer ensayos de actividad en MCP para profundizar el conocimiento de esta enzima en las cepas mexicanas de *T. cruzi*.

XI. Bibliografía

- Andrade L. O. and Andrews, N. W. 2005. **The *Trypanosoma cruzi*–host-cell interplay: location, invasion, retention.** Nat. Rev. Microbiol. 3: 819–823.
- Andrews N. W., Hong K. S., Robbins E. S., Nussenzwvig V. 1987. **Stage specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*.** Exp. Parasitol. 64: 474-484.
- Andrews N. W. 1993. **Living Dangerously: How *Trypanosoma cruzi* uses lysosomes to get inside host cell, and then escapes into the cytoplasm.** Biol. Res. 26: 65-67.
- Anonymous. 1999. **Recommendations from a satellite meeting.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 94, Suppl. I: 428-432.
- Añez N., Crisante G., da Silva F. M., Rojas A., Carrasco H., Umezawa E. S., Stolf A. M., Ramirez J. L. Teixeira M. 2004. **Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas' disease.** Trop. Med. Int. H. 9 12:1319–1326.
- Bosseno M. F., Espinoza B., Sánchez B., Breniere, A. F. 2000. **Mexican *Trypanosoma cruzi* stocks: analysis of minicircle kDNA homologies by cross-hybridization.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz 95: 473-476.
- Bosseno M. F., Barnábe C., Magallón E., Kasten F. L., Ramsey J., Espinoza, B., Brenière S. F. 2002. **Predominance of *Trypanosoma cruzi* lineage I in México.** J. Clin. Microbiol. 40: 627-632.
- Brisse S., Barnabé C., Tibayrenc M. 2000. **Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis.** Inter. J. Parasitol. 30: 35-44.

- Brisse S., Verhoef J., Tibayrenc M. 2001. **Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon gene further support the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages.** Int. J. Parasitol. 31: 1218-1226.
- Briones M. R., Egima C. M., Schenkman S. 1995. ***Trypanosoma cruzi* trans-sialidase gene lacking C-terminal repeats and expressed in epimastigote forms.** Mol. Biochem. Parasitol. 70: 9–17.
- Burleigh B. A. y Woolsey, A. M. 2002. **Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion.** Cell. Microbiol. 4: 701-711.
- Burleigh B. A. 2005. **Host cell signaling and *Trypanosoma cruzi* invasion: do all roads lead to lysosomes?** Sci. STKE p36.
- Buscaglia C. A., Alfonso J., Campetella, O., Frasch, A. C. C. 1999. **Tandem amino acid repeats from *Trypanosoma cruzi* shed antigens increase the half-life of proteins in blood.** Blood 93: 2025-2032.
- Buschiazzo A., Amaya M., Cremona M., Frasch A., Alzari P. 2002. **The crystal structure and mode of action of Trans-sialidase, a key enzyme in *Trypanosoma cruzi*.** Pathogenesis Molecular Cell. 10: 757-768.
- CentersforDiseaseControl. Pagina de Internet. www.dpd.cdc.gov/dpdx
- Carneiro M., Chiari E., Gonçalves A. M., da Silva Pereira A. A., Morel C. M., Romanha A. J. 1990. **Changes in the isoenzyme and kinetoplast DNA patterns of *Trypanosomacruzi* strains induced by maintenance in mice.** Acta Trop. 47: 35-45.
- Chaves L. B., Briones M. R., Schenkman S. 1993. **Trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes is expressed at the stationary phase and is different from the enzyme expressed in trypomastigotes.** Mol. Biochem. Parasitol. 60: 97–106.

- Chuenkova M. y Pereira M. E. 1995. **Trypanosoma cruzi trans-sialidase: enhancement of virulence in a murine model of Chagas' disease.** J. Exp. Med. May 1;181: 1693-1703.
- Colli W. 1993. **Trans-sialidase: a unique enzyme activity discovered in the protozoan *Trypanosoma cruzi*.** Faseb J. 7: 1257–1264.
- Coura J. R., Junqueira A. C. V., Fernandes O., Valente S. A. S., Miles M. A. 2002. **Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil.** Trends Parasitol. 18: 171-176.
- Cross G. A. y Takle G. B. 1993. **The surface trans-sialidase family of *Trypanosoma cruzi*.** Annu. Rev. Microbiol. 47: 385 – 411.
- De Souza W. 2002. **From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: Dreams and Reality.** Kinetoplastid Biology and Disease. 1: 1-21.
- Dias J. C. P., Silveira A. C., Schofield C. J. 2002. **The Impact of Chagas Disease Control in Latin America - A Review.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz 97:603-612.
- Di Noia J. M., Buscaglia C. A., De Marchi C. R., Almeida I. C., Frasch A. C. 2002. **A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas disease is due a single parasite lineage.** J. Exp. Parasitol. 195: 401-413.
- Dumonteil E. 2009. **Vaccine development against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* species in the post-genomic era.** Infect Genet Evol. 9:1075-1082.
- El-Sayed N. M., Myler P. J., Bartholomeu D. C., Nilsson D., Aggarwal G., Tran A. N., Ghedin E., Worthey E. A., Delcher A. L., Blandin G., Westenberger S. J., Caler E., Cerqueira G. C., Branche C., Haas B., Anupama A., Arner E., Aslund L., Attipoe P., Bontempi E., Bringaud F., Burton P., Cadag E., Campbell D. A., Carrington M., Crabtree J., Darban H., da Silveira J. F., de Jong P., Edwards K., Englund P. T.,

- Fazelina G., Feldblyum T., Ferella M., Frasch A. C., Gull K., Horn D., Hou L., Huang Y., Kindlund E., Klingbeil M., Kluge S., Koo H., Lacerda D., Levin M. J., Lorenzi H., Louie T., Machado C. R., McCulloch R., McKenna A., Mizuno Y., Mottram J. C., Nelson S., Ochaya S., Osoegawa K., Pai G., Parsons M., Pentony M., Pettersson U., Pop M., Ramirez J. L., Rinta J., Robertson L., Salzberg S. L., Sanchez D. O., Seyler A., Sharma R., Shetty J., Simpson A. J., Sisk E., Tammi M. T., Tarleton R., Teixeira S., Van Aken S., Vogt C., Ward P. N., Wickstead B., Wortman J., White O., Fraser C. M., Stuart K. D., and Andersson B. 2005. **The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease.** Science. 309: 409–415.
- Espinoza B., Vera-Cruz J. M., González H., Ortega E., Hernández R. 1998. **Genotype and virulence correlation within mexican stocks of *Trypanosoma cruzi* isolated from patients.**Acta Trop. 70: 63-72.
 - Espinoza G. B. y Manning-Cela R. G. 2007. **An overview of mammalian cell infection by *Trypanosoma cruzi*: Cellular and molecular basis.** Advances in the Immunobiology of Parasitic Diseases. Ed. Research Signpost Fort P.O. pp 291-311.
 - Espinoza B., Rico T., Sosa S., Oaxaca E., Vizcaino-Castillo A., Caballero M. L., Martínez I. 2010. **Mexican *Trypanosoma cruzi* T. cruzi I strains with different degrees of virulence induce diverse humoral and cellular immune responses in a murine experimental infection model.** J. Biomed. Biotechnol. Apr 11.
 - Finley R. W. y Dvorak J. A 1987. ***Trypanosoma cruzi*: Analysis of the population dynamics of heterogeneous mixtures.**J. Protozool. 34: 409-415.
 - Fonseca S. M. y Romanha A. J. 1999. **Characterization of *Trypanosoma cruzi*.** Mem Inst Oswldo Cruz, 94, Suppl. I: 177-180.
 - Fontanella G. H., De Vusserb K., Laroyb W., Daurelioa L., Nocitoc A. L., Revelli S., Contrerasb R.2008. **Immunization with an engineered mutant *trans*-sialidase**

- highly protects mice from experimental *Trypanosoma cruzi* infection: A vaccine candidate.** *Vaccine* 26: 2322—2334.
- Frascch A. C. 2000. **Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*.** *Parasitol. Today* 16: 282 – 286.
 - Galavíz-Silva L., Molina-Garza D. P., González-Santos M. A., Mercado-Hernández R., Reyes González-Galavíz J., Rosales-Encina J. L., Molina-Garza Z. J. 2009. **Update on Seroprevalence of Anti-*Trypanosoma cruzi* Antibodies among Blood Donors in Northeast Mexico.** *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 81:404–406.
 - Gao W. y Pereira M. A. 2001. ***Trypanosoma cruzi* trans-sialidase potentiates T cell activation through antigen-presenting cells: role of IL-6 and Bruton's tyrosine kinase.** *Eur. J. Immunol.* 31: 1503-1512.
 - Gaunt M. W., Yeo M., Frame I. A., Stothard J. R., Carrasco H. J., Tylor M. C., Mena S. S., Veazey P., Miles G. A., Acosta N., De Arias A. R., Miles M. A. 2003 **Mechanism of genetic exchange in american tripanosomes.** *Nature.* 421: 936-939.
 - Guerri-Guttenberg R. A., Grana D. R., Ambrosio G. Milei J. 2008. **Chagas cardiomyopathy: Europe is not spared!** *European Heart Journal* 29: 2587–2591.
 - Guzmán-Bracho C., García-García L., Floriani-Verdugo J., Guerrero-Martínez S., Torres-Cosme M., Ramírez-Melgar C., Velasco-Castrejón O. 1998. **Riesgo de transmisión de *Trypanosoma cruzi* por transfusión de sangre en México.** *Rev. Panam. Salud Publica.* 4(2):94-99.
 - Harlow E. y Lane D. **Antibodies: a laboratory manual.** 1988. CSHL Press USA 726pp.
 - Herrera-Aguilar M., Be-Barragán L. A., Ramirez-Sierra M. J., Tripet F., Dorn P., Dumonteil E. 2009. **Identification of a large hybrid zone between sympatric**

- sibling species of *Triatoma dimidiata* in the Yucatan peninsula, Mexico, and its epidemiological importance.** *Infect Genet Evol.* 9:1345-1351.
- Herrera C., Bargues M. D., Fajardo A., Montilla M., Triana O., Vallejo G. A., Guhl F. 2006. **Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia.** *Inf., Gen. and Evol.* 7:535–539.
 - Herrera C., Bargues M. D., Fajardo A., Montilla M., Triana O., Vallejo G. A., Guhl F. 2007. **Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia.** *Infect. Gen. and Evol.* 7: 535–539.
 - Hernández R., Herrera J., Bosseno S. F., Espinoza B. 2001. ***Trypanosoma cruzi*: Data supporting clonality in Mexican stocks.** *J. Parasitol* 87:1178-1181.
 - Higo H., Miura S., Horio M., Mimori T., Hamano S., Agatsuma T., Yanagi T., Cruz-Reyes A., Uyema N., Rojas de Arias A., Matta V., Akahane H., Hirayama K., Takeuchi T., Tada I., Himeno K. 2004. **Genotypic variation among lineages of *Trypanosoma cruzi* and its geographic aspects.** *Parasitol Int.* 53:337-44.
 - Jiménez-Marín A. 2005. **Análisis de la respuesta de macrófagos ante la infección de dos cepas de *Trypanosoma cruzi* con distinta virulencia.** Tesis para obtener el título de Bióloga. Facultad de Ciencias. UNAM.
 - Kleffmann T., Schmidt J., Scaub G. A. 1998. **Attachment of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes to hydrophobic substrates and use of this property to separate stages and promote metacyclogenesis.** *J. Eukaryot. Microbiol.* 45: 548-555.
 - Leedale G. F. y Vickerman K. 2000. **An illustrated guide to the protozoa. Organisms traditionally referred to a protozoa, or newly discovered groups.** Society of Protozoologists, USA. Lawrence. 1432pp.

- Ley V., Andrews N. W., Robbins E. S., Nussenzweig V. 1988. **Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells.** J. Exp. Med. 168: 649-659.
- López-Olmos V., Pérez-Nasser N., Piñero D., Ortega E., Hernández R. Espinoza B. 1998. **Biological characterization and genetic diversity of mexican isolates of *Trypanosoma cruzi*.**Acta Trop. 69: 239-254.
- López Olmos M. V. 1999. **Identificación y caracterización de epitopos proteicos de una cepa mexicana de *Trypanosoma cruzi* a través del uso de anticuerpos monoclonales.** Tesis de Maestría en Investigación Biomédica Basica. Colegio de Ciencias y Humanidades. Unidad Académica de los Ciclos Profesinales y de Posgrado. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Machado C. A. y Ayala F. J. 2001. **Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*.**Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98: 7396-7401.
- Martínez I., Noguera B., Martínez F., Espinoza B. 2010. **Microsatellite and Mini-exon Analysis of Human Genotype I *Trypanosoma cruzi* Strains and Their Susceptibility to Nifurtimox and Benznidazole.** Enviado a publicar.
- Martínez-Velasco M. L. **Estudio del proteoma de *Trypanosoma cruzi*. Identificación de moléculas con importancia biológica.** Tesis para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM.
- Miles M. A., Toyne P. J., Oswald S. C., Godfrey D. G. 1977. **The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil.** Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 71: 217-225.

- Miles M. A., Souza A, Povoá M., Shaw J. J., Lainson R., Toyé P. J. 1978. **Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil.** Nature. 272: 819-821.
- Monteón-Padilla V. M., Hernández N., Guzmán Bracho C., Rosales-Encina J. L., Reyes-López P. 1999. **American Tripanosomiasis (Chagas' Disease) and blood banking in Mexico City: Seroprevalence and its potential transfusional transmission risk.** Archives Med. Res. 30: 393-398.
- Mortara R. A., Andreoli W. K., Taniwaki N. N., Fernandes A. B., Silva C. V., Fernandes M. C., L'Abbate C., Silva, S. 2005. **Mammalian cell invasion and intracellular trafficking by *Trypanosoma cruzi* infective forms.**An. Acad. Bras. Cienc. 77: 77 – 94.
- Nivardo-Sobrinho A., Jiménez-Angeles L., Bialostozky D., Vázquez C., Martínez I., Salazar-Schettino P. M., Bucio-Torres M., Ruiz-Hernández A., Cabrera-Bravo M. 2009. **Evaluation of the function and ventricular synchrony in patients with latency stage of Chagas' disease.** Arch. Cardiol. Mex. 79: 243-8.
- Organización Panamericana para la Salud. 2006. **Estimación Cuantitativa de la Enfermedad de Chagas en las Américas.** WHO/NTD/IDM. pp. 29.
- Pereira-Chiocola V. L., Costa F., Ribeira M., Soares I., Arena F., Schenkman S., Rodrigues M. M. 1999. **Comparison of antibody and protective immune responses against *Trypanosoma cruzi* infection elicited by immunization with a parasite antigen delivered as naked DNA or recombinant protein.**Parasite Immunology. 21:103–110.
- Pérez A. R., Roggero E., Nicora A., Palazzi J., Besedovsky H. O., Del Rey A., Bottasso O. A. 2007 **Thymus atrophy during *Trypanosoma cruzi* infection is caused by an immuno-endocrine imbalance.**Brain Behav. Immun. 21: 890-900.

- Pérez-Escobar M., Cevallos A. M., Espinoza B., Espinosa N., Martínez I., Hernández R. 2007. ***Trypanosoma cruzi* ribosomal protein S4: characterization of its coding locus, analysis of transcripts, and antigenicity of the protein.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz 102:473-479
- Postan M., McDaniel J. P., Dvorak J. A. 1986. ***Trypanosoma cruzi*: constancy of clone pathogenicity for inbred mice during long-term in vitro maintenance.** Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 80: 659-662.
- Prata A. 2001. **Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease.** Lancet Infect. Dis. 1: 92-100.
- Previato, J. O., Andrade, A. F., Pessolani, M. C., and Mendonca-Previato, L. 1985 **Incorporation of sialic acid into *Trypanosoma cruzi* macromolecules. A proposal for a new metabolic route.** Mol. Biochem. Parasitol. 16: 85–96.
- Rangel-Flores, H., Sánchez, B., Mendoza-Duarte, J., Barnabé, C., Brenière, F. S., Ramos, C., Espinoza, B. 2001. **Serologic and parasitological demonstration of *Trypanosoma cruzi* infections in an urban area of central México; correlation with electrocardiography alterations.** Am. J. Trop. Med. Hyg. 65: 887-895.
- Risso M. G., Garbarino G. B., Mocetti E., Campetella O., González-Cappa S. M., Buscaglia C. A., Leguizamón M. S. 2004. **Differential expression of a virulence factor, the Trans-sialidase, by the main *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages.** J. Infec. Dis. 189:2250–2259.
- Risso M. G., Sartor P. A., Burgos J. M., Briceño L., Rodríguez E. M., Guhl F., Chavez O. T. , Espinoza B., Monteón V. M., Russomando G., Schijman A. G., Bottasso O. A., Leguizamón M. S. 2011. **Immunological Identification of *Trypanosoma cruzi* Lineages in Human Infection Along the Endemic Area.** Am J Trop Med Hyg. 84:78-84.

- Roellig D. M., Ellis A. E., Yabsley M. J. 2009. **Oral transmission of *Trypanosoma cruzi* with opposing evidence for the theory of carnivory.** *J Parasitol.* 95:360-364.
- Rubin-de-Celis S. S., Uemura H., Yoshida N. and Schenkman, S. 2006. **Expression of trypomastigote trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* increases parasite escape from its parasitophorous vacuole.** *Cell. Microbiol.* 8: 1888–1898.
- Salazar-Schettino P. M., Perera R., Ruiz-Hernandez A. L., Bucio Torres M. I., Zamora-Gonzalez C., Cabrera-Bravo M., Harnden A. 2009. **Chagas disease as a cause of symptomatic chronic myocardopathy in Mexican children.** *Pediatr. Infect. Dis. J.* Nov 28:1011-3
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. 1989. **Molecular cloning: a laboratory manual.** Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Schauer R., Reuter G., Mühlpfordt H., Andrade A. F. B., Pereira M. F. A. 1983. **The Occurrence of *N*-Acetyl- and *N*-Glycoloylneuraminic Acid in *Trypanosoma cruzi*.** *Physiologische Chemie.* 364: 1053–1058.
- Schauer R. 2000. **Achievements and challenges of sialic acid research.** *Glycoconjugate Journal* 17: 485-499.
- Schenkman, S., C. Diaz, V. Nussenzweig. 1991a. **Attachment of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to receptors at restricted cell surface domains.** *Exp. Parasitol.* 72: 76.
- Schenkman, S., J. Man-Shiow, G.W. Hart, V. Nussenzweig. 1991b. **A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells.** *Cell.* 65: 1117.

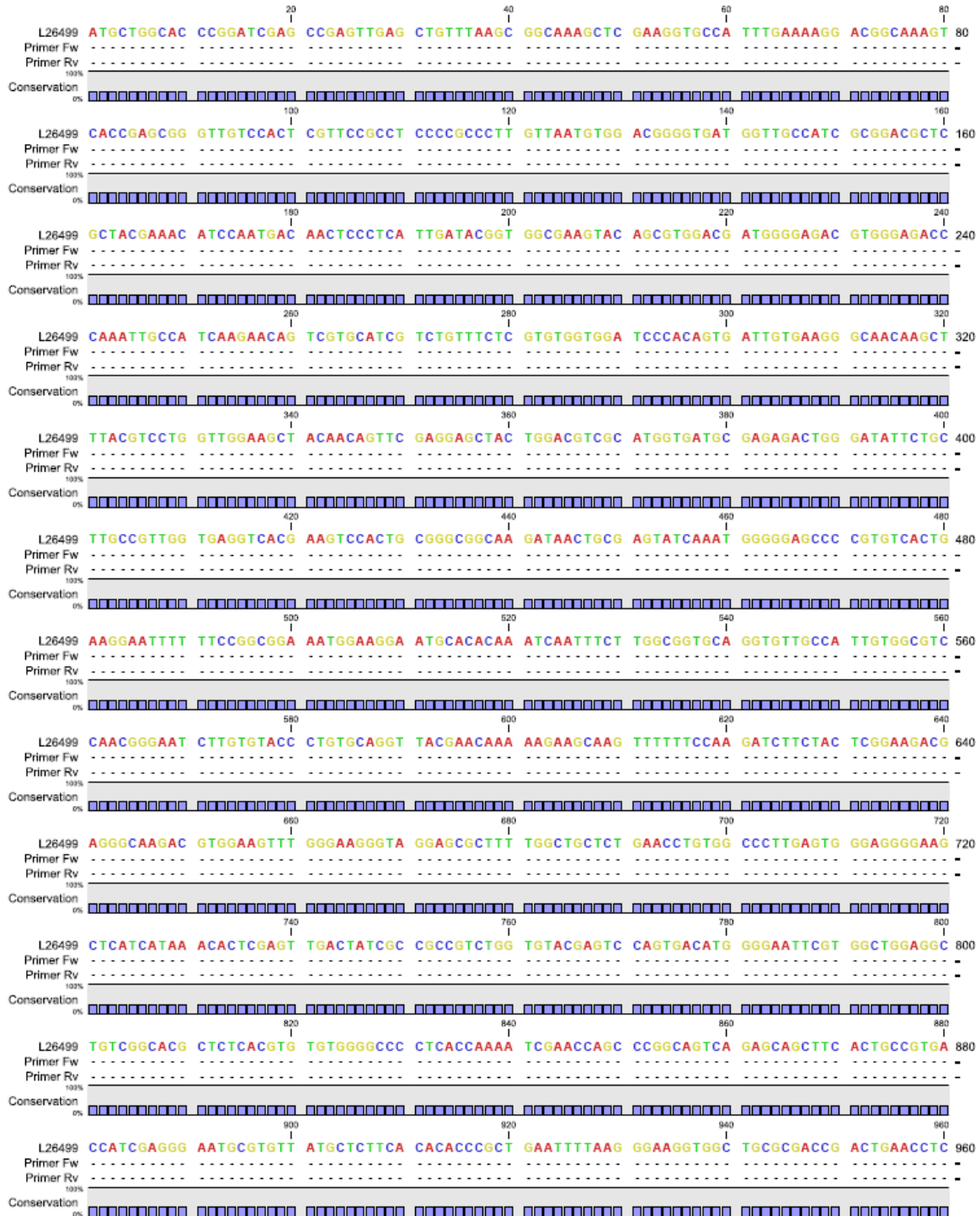
- Schenkman S., Pontes de Carvalho L., Nussenzweig V. 1992: ***Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and neuraminidase activities can be mediated by the same enzymes.** J. Exp. Med. 175:567-75.
- Schenkman S. y Eichinger D. 1993. ***Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and cell invasion.** Parasitology today. 9: 218-22.
- Schenkman S., Eichinger D., Pereira M. E., Nussenzweig V. 1994 **Structural and functional properties of *Trypanosoma* trans-sialidase.** Annual Rev. Microbiol. 48:499-523.
- Schmunis G. A. 2007. **Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration.** Mem. Inst. Oswaldo. 102 Suppl. I: 75-85.
- Schrader S., Tiralongo E., Paris G., Yoshino T., Schauer R. 2003. **A nonradioactive 96-well plate assay for screening of trans-sialidase activity.** Analytic. Biochem. 322: 139–147
- Sierra-Johnson J., Olivera-Mar A., Monteón-Padilla V. M., Reyes P. A., Vallejo M. 2005. **Panorama epidemiológico y clínico de la cardiopatía chagásica crónica en México.** Rev. Saúde Pública 39: 754-760.
- Sousa O. E., Samudio F., de Juncá C., Calzada J. E. 2006. **Molecular characterization of human *Trypanosoma cruzi* isolates from endemic areas in Panama.** Mem Inst Oswaldo Cruz, 101:455-457.
- Tay J., Lara R., Velasco O., Gutiérrez, M. 1996. **Parasitología Médica.** Sexta edición Méndez Editores, México. pp: 107-128.
- Taylor G. 1996. **Sialidases: structures, biological significance and therapeutic potential.** Current Opinion in Structural Biology. 6: 830-837.

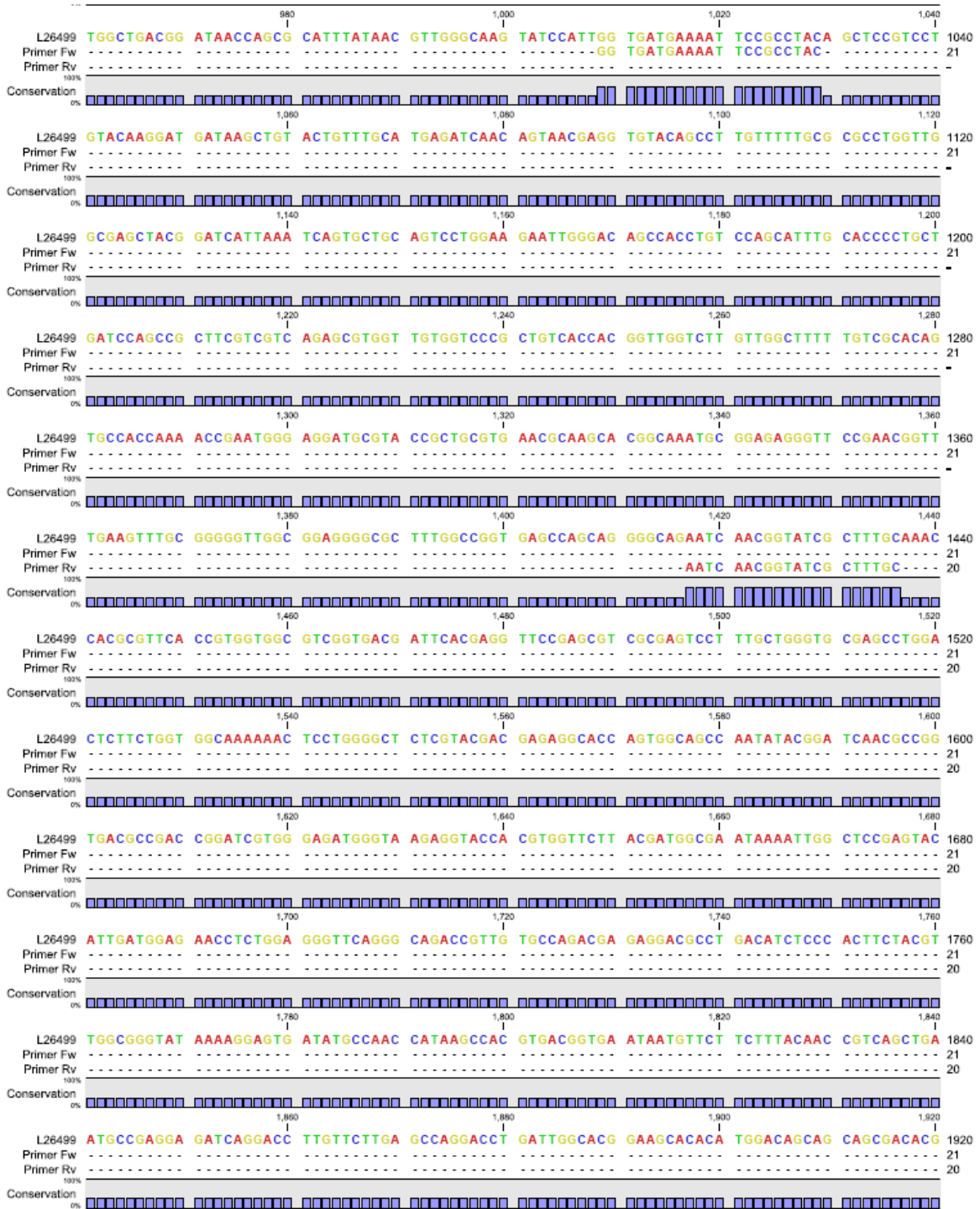
- Tibayrenc M., Ward P., Moya A., Ayala F. J. 1986. **Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 1335-1339.
- Tibayrenc M. y Ayala F. J. 1988. **Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: genetical, taxonomical, and epidemiological significance.** Evolution 42: 277-292.
- Todeschini A. R., Nunes M. P., Pires R. S., Lopes M. F., Previato J. O., Mendonça-Previato L., DosReis G. A. 2002. **Costimulation of host T lymphocytes by a trypanosomal trans-sialidase: involvement of CD43 signaling.** J. Immunol. 168: 5192-5198.
- Tonelli R. R., Silber A. M., Almeida-de-Faria M., Hirata I. Y., Colli W. y Alves, M. J. 2004. **L-proline is essential for the intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi*.** Cell. Microbiol. 6: 733–741.
- Tomlinson S., Pontes de Carvalho L. C., Vandekerckhove F., Nussenzweig V. 1994. **Role of sialic acid in the resistance of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to complement.** J. Immunol. 153: 3141-3147.
- Tomlinson S. y Raper J. 1998. **Natural human immunity to trypanosomes.** Parasitol. Today 14: 354-359.
- Tribulatti M. V., Mucci J., Van Rooijen N., Leguizamón M. S., Campetella O. 2005. **The trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* induces thrombocytopenia during acute Chagas' disease by reducing the platelet sialic acid contents.** Infect. Immun. 73: 201-207.
- Tyler K. M. y Engman D. M. 2001. **The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited.** Int. J. Parasitol. 31: 472-481.

- Velasco-Castrejón O. 1991. **La enfermedad de Chagas**. Publicaciones Técnicas INDRE # 8. SSA. México D .F.
- Velasco-Castrejón O., Valdespino J. L., Tapia-Conyer R., Salvatierra B., Guzmán-Bracho C., Magos C., Llausás A., Gutiérrez G., Sepúlveda J. 1992. **Seroepidemiología de la enfermedad de Chagas en México**. Salud Pública Mex. 34: 186-196.
- Westermeier R. y Naven T. 2002. **Proteomics in practice. A laboratory manual of proteome analysis**. Wiley-Vch. Alemania. 342pp.
- Yoshida N. 2006. **Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi***. An. Acad. Bras. Cienc. 78: 87–111.
- World Health Organization. 2008. **Chagas Disease: Control and Elimination**. Report of the Secretarial. pp. 120.
- Zhang Q., Tibayrenc M., Ayala F. J. 1988. **Linkage disequilibrium in natural populations of *Trypanosomacruzi*(flagellate), the agent of Chagas disease**. J.Protozool 35: 81-85.
- Zingales B., Andrade S.G., Briones M. R., Campbell D. A., Chiari E., Fernandes O., Guhl F., Lages-Silva E., Macedo A. M., Machado C.R., Miles M. A., Romanha A. J., Sturm N. R., Tibayrenc M., Schijman A. G. 2009. **A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 104: 1051-1054.

XII. ANEXOS

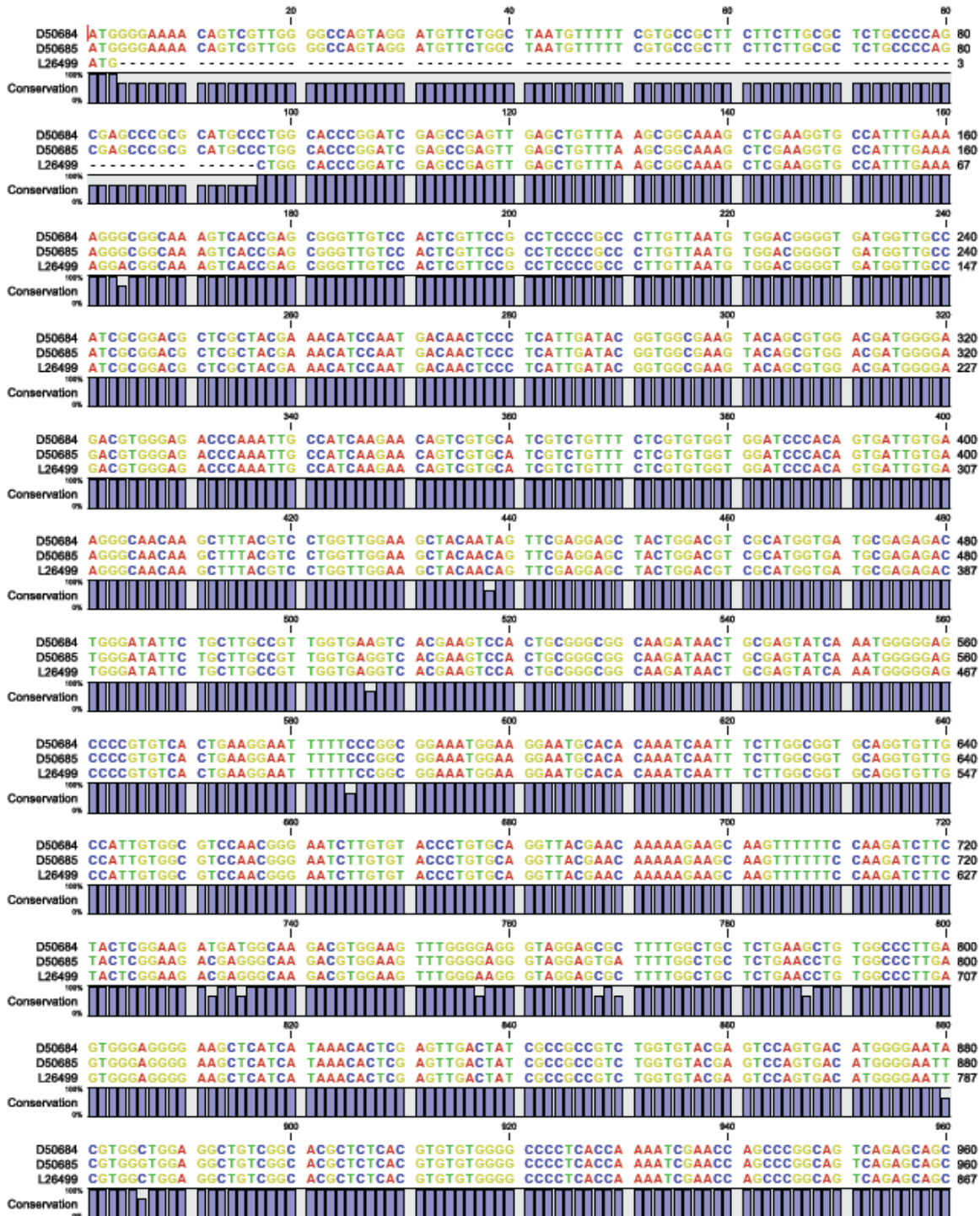
Anexo I. Alineamiento del gen de TS L26499 (GeneBank) con los primers diseñados con la ayuda del programa Prime3. El primer sentido (Fw) inicia en el nucleótido 1009 y tiene una longitud de 21pb. El primer anti-sentido (Rv) inicia en el nucleótido 1436 y mide 20pb. El amplicón esperado es de 428pb. La barra azul indica el porcentaje de nucleótidos conservados.

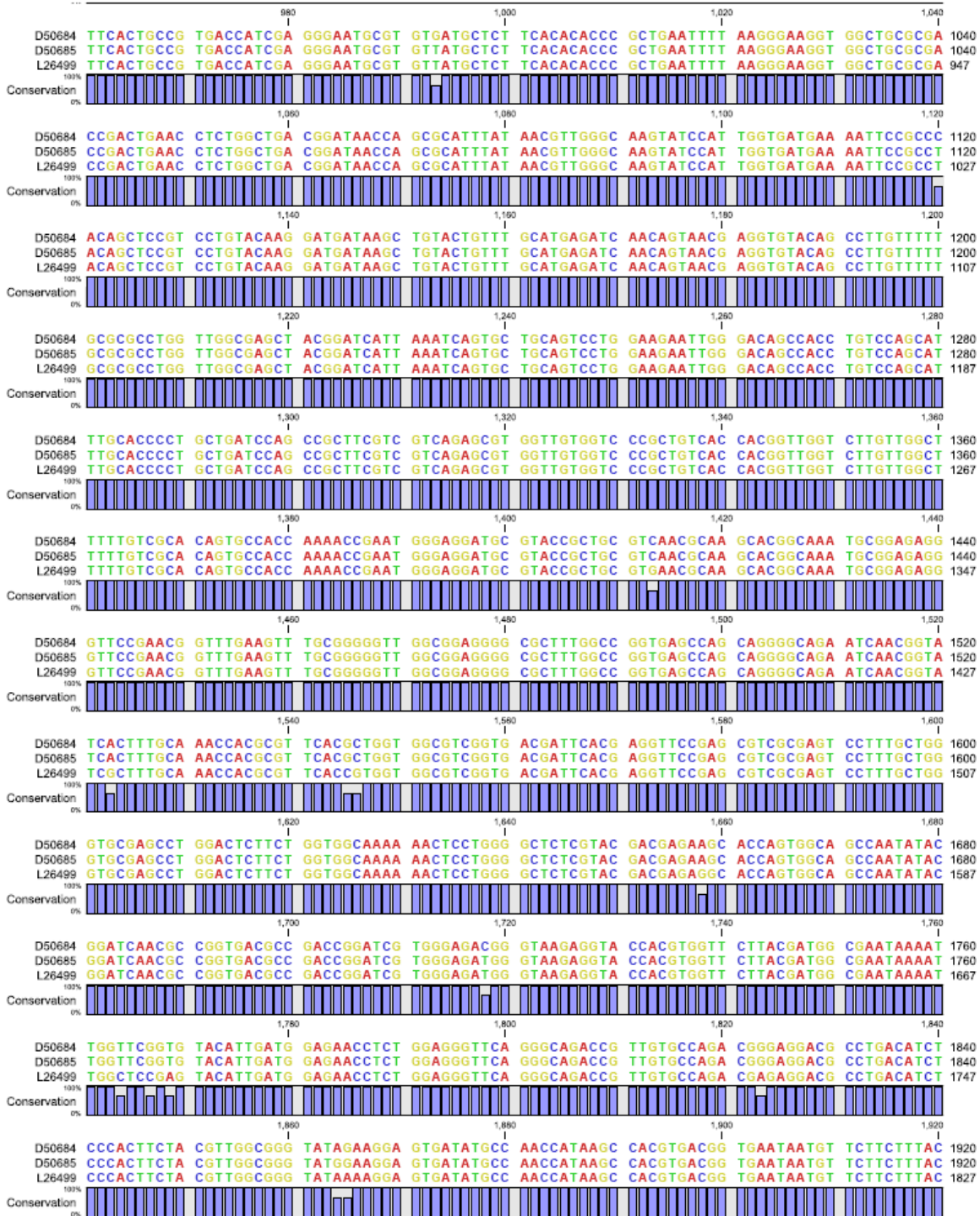


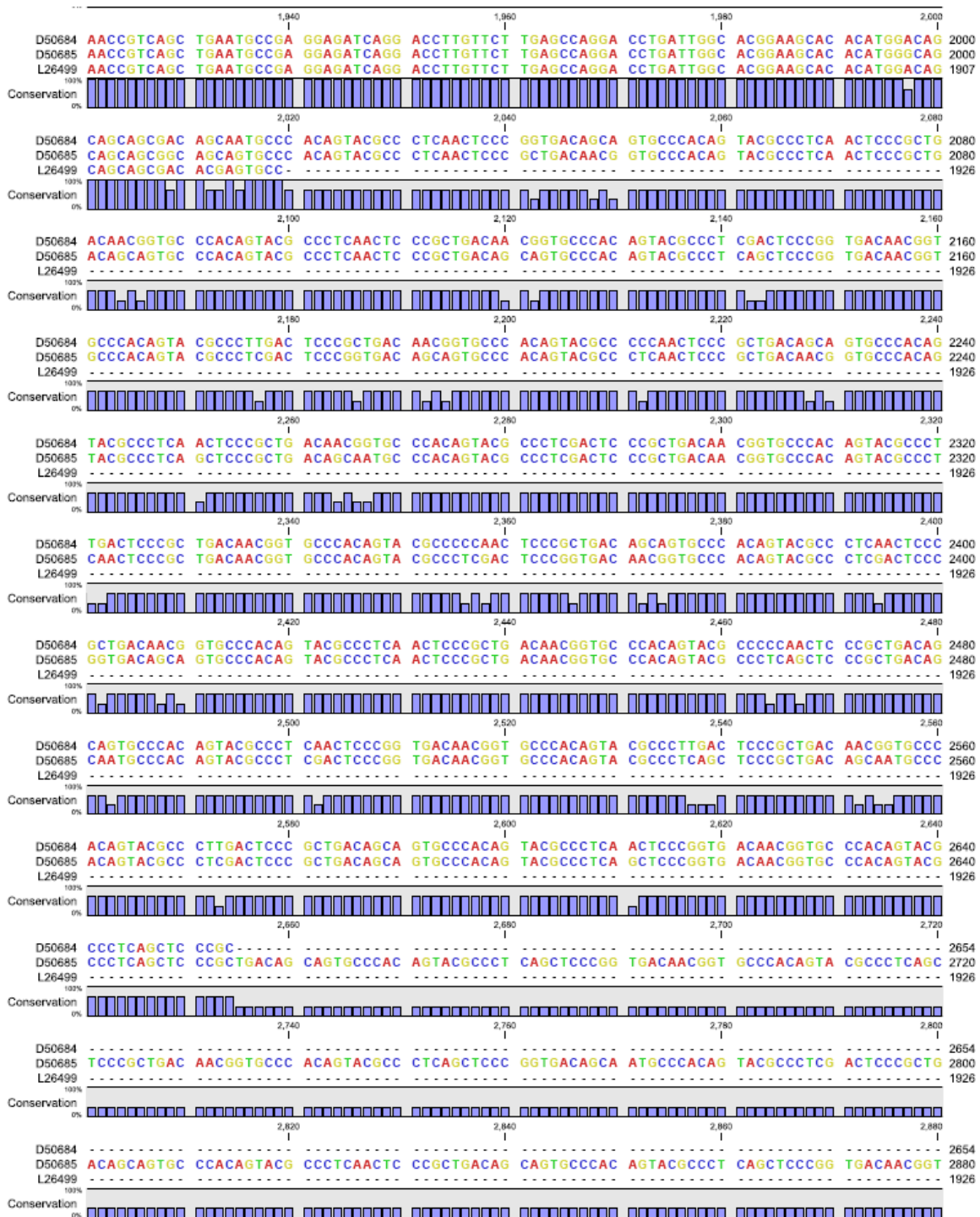


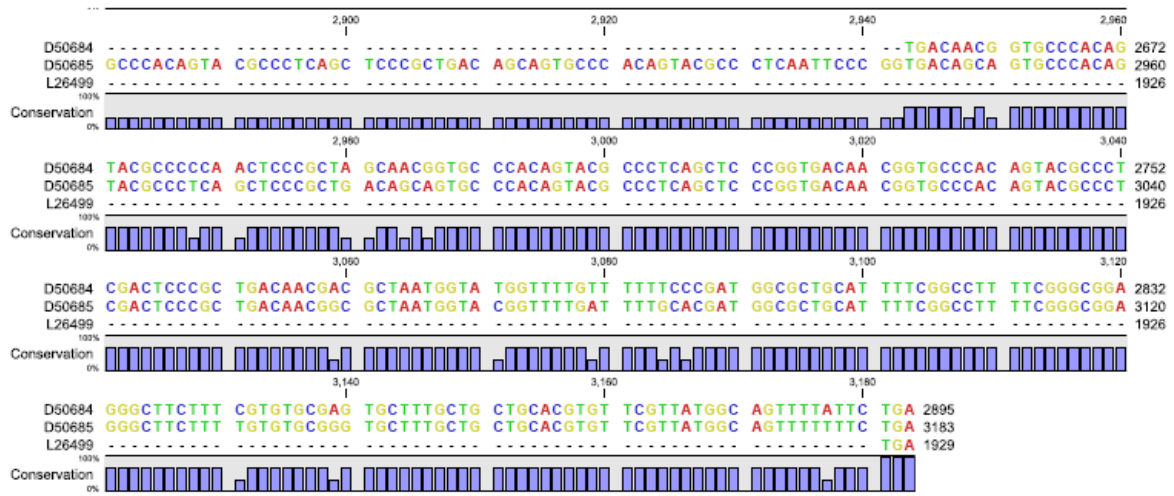
L26499 AGTGCCTGA 1929
Primer Fw - - - - - 21
Primer Rv - - - - - 20
Conservation 100%
0% ■■■■■■■■

Anexo II. Alineamiento de las secuencias de tres genes representativos de la familia TS (GenBank D50685, D50685 y L26499), donde se puede apreciar el porcentaje de nucleótidos conservados entre ellos (barras azules). Los primers diseñados para amplificar el gen de la TS se anclan a una región altamente conservada en estos genes entre el aa 1009 y el 1436 de la sec L26499, por lo que se pueden amplificar varios miembros de esta familia.









Anexo III. Ensayo no-radioactivo para la detección de actividad de TS. Este ensayo de TS consiste en dos pasos: Primero, la TS es incubada con los sustratos sialilactosa y MUGal (4-metillumbeliferil- β -D-galactosido). Segundo, el producto formado MUGalNeu5Ac (4-metillumbeliferil- β -D-sialilgalactosido), es separado del sustrato MUGal usando una cromatografía de intercambio aniónico, seguida por la hidrólisis ácida del MUGalNeu5Ac y la detección de la fluorescencia del metillumbeliferil liberado (MU). El paso de separación es hecho en placas de 96 pozos. Para tener óptimos resultados, es importante adaptar este sistema a las propiedades de la TS usada (Schrader et. al., 2003).

Materiales

- Buffer PIPES (piperazine-N-N'-bis(2-etanesulfonato)) (Sigma No. Cat. P2949) 400mM.
- 3'- Sialilactosa 10mM (3'-SL Sigma No. Cat. A9079) disuelta en agua y almacenada a -20°C.
- MUGal 2mM: se disuelven 2mM de MUGal en agua, se sónica por 10 min, y se almacena a -20°C. Se necesita que se sonique nuevamente por 10 min inmediatamente antes de usarse.
- Q-Sepharosa Fast Flow (Sigma No. Cat. Q1126-100M): Se lavan 100 ml de Q-Sepharosa tres veces con acetato de sodio 1M y se deja hidratando toda la noche con acetato de sodio 1M a 4°C, después se ajusta al radio final del volumen del gel.
- Medio de elución: HCl 1M. se almacena a temperatura ambiente.
- Medio de paro: Solución de NaOH 6M y Glicina/NaOH 1M pH 10. Se almacenan a temperatura ambiente
- Placas polipropileno de 96 pozos (NUNC No. Cat. 278010)
- Pipeta multicanal
- Vacuum manifold
- UNIFILTER 800-filter-well plate (Whatman No. Cat. 7700-2811).
- Placas Nunc DeepWell de 2m (No. Cat. 278606).
- Polyolefin sealing tape
- Nunc well cap
- Fluorometro ISS modelo Pc1.

Anexo IV. Datos arrojados por el Fluorometro del primer ensayo de actividad de TS del día 22-12-08. El aparato hace, en promedio, una cuenta cada segundo por un lapso de 100 segundos y expresa los valores en unidades de Intensidad de fluorescencia. Los valores finales corresponden al promedio (en rojo) y a la Desviación Estándar (en azul).

Blanco 1	Blanco 2	Ninoa 1	Ninoa 2	Qro 1	Qro 2	Cisticerco 1	Cisticerco 2
Intensity	Intensity	Intensity	Intensity	Intensity	Intensity	Intensity	Intensity
1370	1393.7	389378.9	450875.7	376279.8	380743.5	1732.2	1667.7
1258.3	1392.1	388682.4	450968.8	376255.8	380048.1	1791.4	1685
1440.6	1391.6	390102.9	449278.8	374484.6	379832.2	1755.5	1672.1
1368.9	1343.3	388267.1	451556.1	375432.7	381766.6	1760.9	1680.8
1280.7	1388.8	389267.9	451692.4	375937.3	380934	1727.2	1668.8
1369.1	1383.9	389446.3	450244.5	374416.4	380362.8	1746.9	1765.3
1308.8	1274.8	388882.8	450631.6	375976.8	380891.7	1748.2	1656.2
1437	1351.8	389370.9	450300.9	374540.6	378979.7	1668.8	1675.8
1377	1315	389098.3	449576.6	375008.7	379939.4	1699.4	1632.3
1303.7	1397.2	390767.2	448120.2	374580.8	379155.1	1712.1	1675.6
1361.1	1265.2	388650.7	449064.4	375395.6	379191.9	1723.1	1652.7
1408.9	1351.7	387490.8	449168	374887.8	379907.2	1775.2	1681
1284.7	1355.9	389271.9	448788.5	375756.4	378811.9	1795.8	1570
1343.8	1328.1	388762.5	447427.3	374285.4	379780.5	1768.2	1539.8
1313.2	1232.8	389499.2	448388.2	376037.1	380423	1771.2	1692.6
1317.4	1280.7	387829.8	448124.5	373757.3	378663.4	1627.4	1699.2
1276.2	1288.4	388631.4	447507.7	375012	379140.3	1683.2	1655.9
1251.9	1236.7	387585.9	446680.9	372796.9	378211.9	1819.7	1695.4
1307.8	1392.3	388218.3	446019.8	374291.8	379332	1672.1	1651.9
1197	1236.4	387669.9	446887.7	374149.1	378923	1736.7	1612.2
1280.7	1248.3	388970.7	447764.9	372628	377423.2	1708	1560
1212.4	1248.1	388139.6	445699.8	375496.6	378055.4	1703.2	1704.9
1284.4	1340.8	386603.1	447052	373824.5	377474.1	1735.3	1616.8
1303.6	1315.3	387239	448024.3	375036.8	379335.9	1715.7	1703.8
1336.1	1212.2	387371.1	448611	373947.7	378528.1	1731.2	1527.5
1267.6	1216.5	387274.6	446248	372796.6	377423.2	1686.5	1712.4
1288.6	1307.9	387202.1	446064.5	373809.4	379240.8	1636.7	1557.1
1253.2	1194.8	387945.5	446239.1	372713.1	377731.7	1699.5	1604.2
1289.7	1272.7	387767	447244.6	373217.2	377863.2	1627.4	1648.5
1253.3	1331	387167.5	446380.3	372783.9	378399.1	1764.1	1632.6
1320.8	1304.1	388263.7	444435.9	372647.1	379515.8	1659	1632
1311.6	1303.4	386589.9	446907.2	373448.5	377752.1	1739.9	1735.3
1277	1292.2	387162.9	446427.5	372593.5	377631.6	1597.5	1619.9
1344.2	1332.2	388279.1	445756.6	373384.5	377723.1	1640.1	1664.9
1204.3	1361.2	386175.5	444943.8	372583.9	377452.4	1676.1	1545.6
1192.4	1255.8	388192	446064.2	370696.9	376570.7	1731.8	1688.6
1244.6	1295.8	388199.5	444845.5	372601.1	377587.7	1727.8	1704.7
1356.3	1331.6	385507.2	446620.6	372465.1	379182.7	1779.8	1701.7
1264.8	1271.9	386435.2	444106.5	373493.1	375538.4	1735.3	1661.1

1304.5	1275.5	387094.7	444843.9	372912.7	374988	1691	1620.8
1272	1277	386691	444879.9	373561.5	375743.9	1703.5	1584.5
1324.1	1267.9	385174.4	444220.6	372876.5	376411.6	1715.5	1588.7
1248	1267.8	385674.7	443836.7	372448.8	375287.6	1739.3	1653
1201.6	1227	385834.6	444623.9	371977	375879.1	1735.8	1691.4
1360.5	1220.5	386612.4	444172.6	372704.1	377491.7	1671	1592.6
1236.9	1228.4	384858.6	443700	373948.1	375895.1	1715	1628.4
1300.2	1292.6	384983.2	442348.2	373812.2	375358.6	1639.6	1587.7
1220.5	1192.5	386202.5	444096.4	373616.1	377618.1	1682.8	1532.3
1213.1	1271.5	385377.8	444595.9	373831.5	375788.1	1720.6	1612.2
1212.8	1296.3	384710.6	443971.7	372191.4	376127.1	1699.7	1716.5
1361.1	1396.1	384595.3	442748	372268.4	376747.4	1624.2	1612
1292.9	1223.8	385006.3	442524.1	373187.5	376420.2	1623.8	1648
1284.7	1292	385039.6	443892.4	370976.1	375850.8	1718.9	1587.9
1292	1295.9	384864.4	443051.6	371509.2	375886.2	1688.5	1648.7
1285.4	1296.4	384375.4	443628.4	372020.4	375375.7	1691	1645
1264.7	1276.3	383903.6	441024.1	371945.3	375251.5	1662.5	1654.6
1303.8	1303.9	383967.3	443168.3	371561.1	376831.6	1686.5	1679.4
1312.3	1376.3	386676	440496.4	370584.5	375355.1	1794.3	1628.3
1276.1	1303.3	384942	442568.6	371604.3	375294.7	1743.3	1585.1
1336.5	1315.8	386327.3	442953.1	371553.3	373826.9	1692.2	1611.5
1380.6	1271.5	383190.8	441803.6	370456.9	374744.4	1683.1	1556.2
1352.7	1271.9	384419.1	440753.1	369947.6	374436	1733	1715.7
1260.9	1269	383486.9	442623.9	370065.1	374982.4	1687.3	1641.3
1257.2	1264.8	384962.6	441244.2	370377.1	374175.3	1659.3	1599.8
1283.9	1227.1	384323.5	442440.6	369577	374716.1	1687.3	1572.7
1257.1	1296.9	383982.6	441620.4	370656.8	374271.3	1630.7	1620.9
1272.9	1268.1	384054.3	441560.6	368520.2	372990.8	1670.7	1615.8
1284.5	1243.7	384007.4	440816.4	370064.4	374251.4	1753.3	1592.2
1281.1	1247.4	383482.7	442576.3	368828.7	373807.9	1711.5	1660.6
1351.8	1199.6	384967.1	441260.4	369044.8	374166.7	1715.8	1580.1
1220.5	1248.6	383723.1	441156.8	370136.9	375679.8	1679.2	1563.3
1292.9	1231.5	383431.1	440107.9	368376.6	374911.7	1707.6	1680.4
1300.1	1170.5	382951.4	441255	369283.3	374798.4	1664.4	1644.1
1264.3	1187.2	383707.7	442156.4	370292.5	373742.8	1731.1	1728.5
1284.1	1255.9	384003.3	440868.7	369035.5	373556.1	1619.9	1525.3
1229.4	1288.4	384842.6	440505.4	368707	373899.6	1664.3	1616.9
1260.1	1283.9	383259	439565.6	368032.4	372923.4	1636	1572.1
1301.5	1277.1	382654	442156.5	368060.4	373468.3	1730.9	1599.2
1273.3	1306.6	383233.9	438977	369837.2	373418.1	1656.6	1583.8
1325.1	1348	383410.4	439652.1	368925.1	374072.9	1676.5	1656
1368.2	1292.5	382819.2	440499.6	367735.8	373452.2	1755.3	1619.3
1401.5	1243.2	382479.6	440015.9	369323.7	373655.6	1668.3	1681.5
1285.3	1240	381483.8	438671.7	368391.1	372427.7	1658.8	1599.9
1368.5	1271.6	381275.2	438884.1	367292.8	374291.8	1620.7	1456.09
1296.70119	1287.35714	386124.087	444681.618	372279.873	376734.965	1702.98452	1633.8356
54.1534021	54.3209811	2249.26835	3385.28114	2357.49713	2352.8263	47.5515687	56.4367636

Anexo IV (Continuación). Datos arrojados por el Fluorometro del segundo ensayo de actividad de TS del día 28-12-08. El aparato hace, en promedio, una cuenta cada segundo por un lapso de 100 segundos y expresa los valores en unidades de Intensidad de fluorescencia. Los valores finales corresponden al promedio (en rojo) y a la Desviación Estándar (en azul).

Blanco 1	Blanco 2	Ninoa 1	Ninoa 2	Qro 1	Qro 2	Cisticercos 1	Cisticercos 2
Intensity	Intensity	Intensity	Intensity	Intensity	Intensity	Intensity	Intensity
1528.8	1447.3	302373.4	295168.1	241740.2	263939.4	1394.5	1456.3
1656.1	1362.9	303351.1	292467.4	241051.8	262891.8	1348.1	1482.9
1440.5	1322.5	301991.5	293688.3	240327.9	262711.9	1356.8	1475.4
1433.2	1374.4	303951.8	293647.8	240119.8	263065	1383.9	1479
1373.7	1375.1	301463.7	293816.5	240823.9	261939.6	1351.5	1451.4
1377.2	1377.5	301403.7	291277.3	240541.2	261139.9	1399	1484.2
1347.5	1354.5	300544.9	293911	240343.3	262240.6	1425	1455.3
1456	1462.7	298624.4	291456.5	241751.7	261620	1300.6	1442.4
1476.5	1347	299940.2	294853.1	240284.6	261947.8	1336.6	1462.7
1459.6	1437.8	295799.4	293734.1	239427.5	262973.1	1368	1434.9
1448	1393.4	298686.7	292244.3	239767.9	260759.2	1407.6	1486.2
1508.7	1351.1	298099.2	292068	240808.5	262010.7	1320.1	1455.6
1517.9	1326.6	299400.7	292192.2	239316	263220.8	1400.1	1483
1463.9	1411.5	299609	291431.5	238300.2	262223.6	1343.2	1467.5
1437	1399.5	298567.3	292176.3	239955.4	261835	1356.4	1412
1447.8	1403.4	301867.4	292788.5	239380.3	261839.4	1319.2	1479.4
1452.1	1338.4	300002.5	290875.7	238043.8	260344.1	1302.9	1471
1365.5	1418.1	298734.7	291676.6	240039.6	260599.5	1363	1459.3
1448.6	1290.4	298758.9	291224.4	239224.5	261599.5	1363.2	1447.3
1419.8	1375.3	298727.5	291871.4	238295.7	259736.4	1388	1419.1
1376.6	1295.2	299304.1	290147.8	238671.7	262175.7	1379.3	1435.4
1308.4	1350.1	299720.2	291744.1	238256.1	260067.2	1367.6	1480.1
1384.5	1359.5	296572.1	291808.5	240032.3	261935.6	1384.4	1451.2
1437.1	1413.9	297924.7	291360.4	239289.4	260147.3	1367.9	1500.2
1344.5	1266.9	298528.8	290337.3	238644.5	259739.7	1378.5	1532.2
1397.2	1314.6	300540.8	291679.9	239561.1	260648.4	1379.2	1456.3
1372.6	1314.7	297363.8	291463.9	238427.2	260987.8	1400.2	1435.8
1391.5	1443.9	299987.2	289827.9	238187.8	259354.9	1320.4	1451.7
1373.2	1376	298528	290099.7	239199.7	259135.2	1351.2	1447.1
1369.4	1346.3	299440	289443.5	239096.2	261642.5	1395.8	1462.8
1417.6	1302.1	298247.1	289536.8	237652	258862.5	1373.1	1419
1380.5	1414.6	297467.6	289291.5	239464.1	259755.1	1400	1514.7
1388.2	1347.1	296159.1	288608.5	236507.1	260767.7	1408.8	1452.4
1380.4	1295.4	296177.3	289664.5	237256	259433.1	1388.4	1403.4
1341	1358.9	296799.7	287739.5	238395.8	257979.7	1371.5	1415.7
1448.3	1383.4	294624.2	288723.7	237983	258474.5	1347.5	1462.5
1396.5	1410.3	296183.7	288207.6	237439.2	260263.4	1369	1447.8
1344.8	1395.2	295504.3	288000.2	237692	258942.6	1384	1430.9
1380.2	1354.8	294103.9	290979.6	240032	259735.4	1375.4	1498.8
1309.3	1358.8	295895.2	290239.7	238404.4	259451.8	1359.6	1444.1

1365.5	1351.1	295299.9	290639.4	239356.3	259043.2	1359.2	1403
1365.8	1415.6	294919.5	287799.5	238735.4	259383.9	1303.8	1475.1
1461.1	1421.8	294519.5	287376.3	237589.3	259136.7	1360.8	1467.6
1464.2	1351.7	295704.5	289491.1	238858.8	259760	1354.8	1479.1
1525.4	1387.1	293931.4	288411.4	238056.5	257235.7	1384.5	1447.3
1572.2	1379.6	294927.7	287336	237996.8	260007.4	1392.6	1392.7
1613.1	1366.9	294339.2	288232.3	238164.1	258883.3	1332.1	1459.8
1632.1	1327.2	294107.7	285155.7	236963.5	257879.8	1391.9	1418.4
1689.1	1412	294671.6	286964.4	237647.8	259511.3	1352.5	1447.2
1613.7	1342.2	294767	289224.4	237992.2	258294.9	1359.9	1455.9
1645.3	1299.6	293263.8	286720.7	238180.3	259547.9	1336.5	1459.3
1637.5	1267.4	292467.5	287231.4	238195.9	259432.9	1383.6	1448.1
1615.9	1326.6	292676.3	287776.8	238463.8	258596.4	1335.1	1470.9
1501.2	1302.4	292456.4	287211.6	237331.8	258300.2	1360	1480.3
1481.9	1287.8	291523.2	287605.2	237936.3	258680.7	1351.2	1439.4
1464.4	1414.4	293255.6	286381.8	237212.6	257844.5	1338.9	1419.6
1395.7	1302.6	292647.6	287315.7	237072.1	261679.4	1367.5	1414.3
1376.1	1391.5	293571.6	286163.1	237640.1	260523.9	1371	1399.4
1389.4	1346.8	293311.8	285824	237408.6	258147.7	1351.3	1451.4
1441	1359.4	292483.9	286280.4	236624	260115.8	1344.3	1511.8
1448.3	1267.3	292474.9	287452.4	236876.4	259320.6	1333.2	1455
1373.3	1362.4	291616.2	286864.4	237367.6	259716.3	1374.1	1463.2
1361.5	1407.2	291487.6	285975	236660.3	258148.8	1352.8	1435.6
1360	1322.2	291531.4	286795.6	237631.5	258612.3	1358.8	1456.7
1424.8	1402	292500.3	287107	237951.7	258278.8	1388.3	1434.3
1434.3	1355.3	292019.6	286355.8	236808.3	259224.4	1380.8	1474.3
1388.2	1306.7	290079.7	286679.4	237384.8	259852.2	1380.1	1460.8
1376.5	1347.3	290747.9	286255.9	238000.4	258646.7	1331.2	1446.6
1406.1	1412	289777	285940.4	236584.8	257435	1356.2	1451.9
1372.1	1367.1	290246.7	287531.7	235612.6	259007.9	1356.1	1510.6
1356.8	1338.8	290268.8	285508.9	236023.6	256591.6	12391	1531.5
1389.7	1376.5	289459.2	286676.7	237451.4	258704	1351.7	1476.3
1349.6	1355	290092.2	284111.9	236228	257056	1430.7	1426.9
1352.9	1296	291900.1	285916.2	235369	258072.3	1375.1	1462.4
1352.6	1326.1	290687.4	284539.6	236827.5	257447.4	1440.2	1456.1
1371.4	1332	290132	284212	237052	258664.1	1400.2	1435.4
1273.4	1395.9	290743.7	285471.2	235779.6	255588.2	1423.8	1479.3
1373.4	1365.9	290023.1	284503.7	236395.7	257923.7	1439.6	1463.2
1344.3	1368.3	290851.7	286124.4	236984.4	256292.8	1355.9	1451.8
1373.7	1346.3	290131.6	284367.9	236255.4	257952.5	1382.7	1463.7
1493.3	1351.3	288612.3	284507.3	236483.7	255571.3	1345.1	1467.1
1402.3	1462.3	289295.7	284653	236183.1	256684.3	1355.6	1455.1
1396.6	1295.3	290507.6	284803.9	235428.5	257392.6	1371.4	1479.4
1332	1375.3		285316.3	236428.5	255821.1	1356.2	
1428.07024	1360.22976	295313.28	288789.112	238177.743	259620.808	1498.7119	1456.9253
87.5621043	45.4047919	3956.19321	2906.03825	1485.11599	1882.45927	1203.10918	27.8055304

Anexo IV (Continuación). Datos en bruto arrojados por el Fluorometro del primer ensayo de actividad de TS del día 20-05-09. El aparato hace, en promedio, una cuenta cada segundo por un lapso de 100 segundos y expresa los valores en unidades de Intensidad de fluorescencia. Los valores finales corresponden al promedio (en rojo) y a la Desviación Estándar (en azul).

Blanco 1	Blanco 2	Ninoa 1	Ninoa 2	Qro 1	Qro 2	Cisticerco 1	Cisticerco 2
Intensity	Intensity	Intensity	Intensity	Intensity	Intensity	Intensity	Intensity
898.7	764.6	267140.6	267140.6	197840.6	191167.6	1389.2	1424.4
845.8	768.1	269428.8	269428.8	197252.8	190351.9	1396.3	1415.4
869.9	820.7	267808.2	267808.2	196952.6	189671.9	1436.9	1440.1
926.3	848.7	269856	269856	198874.8	189896.4	1365.2	1431.8
918.8	805.7	266341	266341	196593.5	188236	1414	1472.6
871.2	859.9	266752.8	266752.8	197957.2	189052.2	1423.8	1428.1
871.2	805.9	267413.2	267413.2	196900.7	189980.5	1409.1	1468
865.7	829	266364.5	266364.5	196937.3	189144.2	1369.8	1380.7
859.5	824.9	266396	266396	196774.1	189060.8	1417	1396.2
923	821.9	268172.9	268172.9	196948.6	190603.2	1377	1427.8
910.8	761.1	268168.6	268168.6	196448.6	190780.9	1359.5	1459.9
875.7	808.6	269279.5	269279.5	197693.5	189456.4	1357	1399.3
875.4	816.9	268400.8	268400.8	196861.7	188427.3	1461.2	1416.4
865.3	821.9	268112	268112	196062	189624.7	1387.9	1399.9
898.6	845.5	268444.2	268444.2	197281	189688.4	1428.4	1456.1
899.5	783.3	267303.5	267303.5	196809.8	187784.6	1364.8	1431.8
895.6	756.2	267675.9	267675.9	197264.8	189515.1	1387.7	1427.3
839.3	837.1	268633.4	268633.4	196224.9	188952.5	1364.6	1383.1
831	789.2	268084.3	268084.3	197121.2	188113.2	1352.6	1431.5
911.7	816.7	266288.2	266288.2	195669.6	188312.4	1421.3	1488
822.6	837.3	267359.9	267359.9	197384.2	188604.9	1368.7	1443.5
830.4	796.4	266836	266836	196157.3	189368.9	1384.7	1463.9
854.4	821.3	267792.6	267792.6	196045.2	187551.9	1396.6	1398.9
858.2	737.4	268751.9	268751.9	195781.8	187601.1	1395.3	1427.1
806.9	772.3	266235.3	266235.3	195429.3	187869.4	1423.9	1427.9
850.5	778.5	267505.5	267505.5	196313.9	188896.4	1448.6	1476.1
875.2	821.4	266708.3	266708.3	195809.1	188113.3	1400.7	1392.3
931.1	818.3	267265	267265	195837.5	186725.2	1373	1475.6
878.6	793	268036	268036	196516.4	187992	1410	1387.7
878.2	772.7	268948.8	268948.8	197117.9	188700.1	1388.5	1424.9
866.9	792.2	266416.3	266416.3	196109.4	187653.4	1425	1423.2
906.8	836.7	266364.3	266364.3	196316.3	187532.5	1419.9	1408.2
811.1	781.4	267096.5	267096.5	196417.6	187911.7	1413.8	1407.9
910.6	772.3	266764.5	266764.5	196645.8	188507.7	1356.6	1383.2
863.1	797.4	266396.2	266396.2	195433.5	187547.8	1400.8	1430.9
838.4	792.7	266436.7	266436.7	196892.8	187825.7	1369.5	1488.2
939.4	844.2	266600.4	266600.4	195820.9	187932.1	1404.3	1443.6
890.2	765.1	266155.2	266155.2	196532.5	187500.8	1441	1447.9
862.4	825.8	265196.4	265196.4	195530	189180.6	1373.7	1419.9
871.3	749.3	265567.3	265567.3	196321.3	188872.8	1436.7	1428.4

887.1	813.1	265056.6	265056.6	195641.8	187764.6	1413.5	1416
898.8	780.9	265536.1	265536.1	195457.5	188455.6	1413.6	1455.7
901.9	863.8	266256.4	266256.4	195916.9	187300.4	1379.6	1448.5
893.7	772.9	265525	265525	195937.5	187848.8	1456.5	1464.4
935.1	755.5	264872.9	264872.9	195097.5	188117.7	1349.5	1411.2
829.9	813.3	266276.9	266276.9	194828.6	187352.2	1400.2	1404.4
930.2	785.3	265650.9	265650.9	195985.4	188045.1	1377	1424.8
850	816.9	265967.7	265967.7	195397	188572.5	1369.5	1431.4
926.4	797.1	265560.6	265560.6	195532.2	187420.1	1432.1	1403.3
838.8	753.7	266129.7	266129.7	195385.7	187991.8	1388.5	1412.3
848.3	770.4	264988.7	264988.7	195640.1	187552.7	1384.7	1388
903.2	833.6	265760.2	265760.2	195920.9	187767.3	1404.9	1444.7
935.8	840.6	265979.1	265979.1	195937.6	187764.3	1371.7	1428
878.6	836.8	265444.2	265444.2	195869.5	187438.8	1380.6	1411.9
846.2	800.9	265968.4	265968.4	195465.2	186763.1	1345.6	1416.3
922	753.9	266800.6	266800.6	195020.7	187096.9	1412.4	1444.3
925.6	761.1	264772	264772	195596.8	188116.2	1309.5	1456.3
982.8	789.8	265588.7	265588.7	195094.6	187788.2	1387	1435.5
933.7	813	263633.1	263633.1	194945.7	187932.5	1396.7	1417.3
859.1	798	265280	265280	194637.9	188016.8	1416.8	1432
894.3	829.2	264565.1	264565.1	195936.2	188716	1453.3	1430
955.3	793.4	266035.4	266035.4	194793.4	187212.2	1408.5	1459.1
890.9	848.5	263391.6	263391.6	194401.4	187647.8	1360.8	1463.9
870.8	825	265543.8	265543.8	194205.2	187040.1	1360.5	1420.4
878.6	749.1	264984.7	264984.7	194976.9	187568.7	1401	1456
967.4	763.9	264548.6	264548.6	195661	187083.9	1396.3	1436.6
858.2	789.5	265016.2	265016.2	195488.6	187016.8	1380.7	1403.4
870.9	789	264440.6	264440.6	194490	187529	1396.6	1428.3
943.2	797.7	265033.2	265033.2	195381.4	187559.9	1392.8	1423.2
862.4	784.4	265133.2	265133.2	194812.2	186795.1	1365	1498.8
896	804.2	264045.5	264045.5	196453.3	187484.3	1400.9	1365.3
814.2	771.8	262644	262644	195072.9	188356.2	1400.2	1451.1
899.2	789.2	265080.5	265080.5	194797.6	186937.3	1385	1459.3
895.5	816.6	263704.1	263704.1	195751.8	186716.9	1419.5	1443.8
855.2	785.6	265693.4	265693.4	195025.4	186645.5	1408.4	1455.4
883.3	857.3	263886.2	263886.2	195489.4	187272	1372.5	1412.5
842	841.2	265277	265277	194717.5	186737.6	1385.7	1440
854.7	780.7	263581.2	263581.2	194985.6	187501.4	1427.9	1395.4
890.6	764	264132.4	264132.4	195177.2	187420.2	1405.3	1455.8
874.2	820.9	264665.4	264665.4	195297.4	186503.2	1400.9	1444.1
891.2	769.8	264751.5	264751.5	195260.9	187093.5	1348.4	1417.6
882	832	263284.9	263284.9	194425.3	186592.7	1365.2	1395
946.5	749.6	265228.9	265228.9	194996.7	186523.7	1408.8	1415.7
							1415.5
883.651807	799.937349	266147.141	266147.141	195925.161	188081.543	1394.56265	1430.05663
36.7885101	30.6313434	1546.05604	1546.05604	923.571169	1043.3599	28.3041698	27.0584381