



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM  
POSGRADO 

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

Instituto de Investigaciones Biomédicas

MOVIMIENTO DE  $\text{Ca}^{2+}$  INTRACELULAR  
INDUCIDO POR DOS CEPAS MEXICANAS  
DE *Trypanosoma cruzi* QUE PRESENTAN  
DIFERENTE CAPACIDAD PARA INVADIR  
LAS CÉLULAS HOSPEDERAS

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A:**

**NATALIA PAOLA LÓPEZ ÁLVAREZ**

Tutor: Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez

Instituto de Investigaciones Biomédicas

MÉXICO, D. F.

Febrero 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

A la UNAM por haberme permitido ser parte de ella y poder realizar mis estudios de posgrado.

A la Dra. Bertha Espinoza por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, por su apoyo y sus enseñanzas para la realización de este trabajo.

Al M. en C. Ignacio Martínez por su apoyo en el manejo de cultivos celulares.

A mi comite tutorial, la Dra. Yolanda López Vidal y la Dra. Leticia Rocha, les agradezco por sus comentarios y sugerencias que contribuyeron de manera importante a este trabajo.

Al Dr. Carlos Rosales por el apoyo brindado para la realización de los ensayos de movimiento de  $\text{Ca}^{2+}$ .

A la Bióloga Adriana Rodríguez por su asesoría en los ensayos de calcio.

Al Sr. Oswaldo Martínez por su apoyo en la esterilización del material de laboratorio.

Se agradece el apoyo otorgado por el programa PAPIIT-DGAPA IN 206512 a la Dra. Bertha Espinoza.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca que me otorgó durante el curso de la maestría.

## **DEDICATORIAS**

*Dedico esta trabajo a mis queridos padres Doris y Germán por su apoyo constante, por su motivación para que siga adelante ante las dificultades y cumpla con mis objetivos.*

*A mi hermano Mauricio por sus consejos y apoyo que ayudaron a que mi estancia en México fuera la mejor.*

*Agradezco a toda mi familia y amigos que a pesar de la distancia estuvieron apoyándome.*

*A mi querido Gary gracias por todo tu amor, comprensión y tu apoyo que hicieron de este recorrido una linda experiencia que recordaré siempre.*

*A mis queridas amigas Adriana y Eréndira muchas gracias por brindarme su amistad, por su cariño que hicieron que mi estancia en México sea muy agradable.*

*A la familia Torres por brindarme su amistad y su cariño.*

*A mis compañeros de laboratorio: Génesis, Mariana, Alejandra, Deyanira, Wendy, Paulina, Julio, Ana, Angela muchas gracias por brindarme su amistad y por sus conejos.*

*A mi querida y recordada Asly.*

# ÍNDICE

<b>I. ABREVIATURAS.....</b>	<b>1</b>
<b>II. RESUMEN .....</b>	<b>2</b>
<b>III. ABSTRACT.....</b>	<b>3</b>
<b>IV. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>4</b>
IV.1. La enfermedad de Chagas.....	4
IV.2. Agente causante.....	4
IV.3. La transmisión .....	5
IV.4. Manifestaciones clínicas .....	5
IV.4.1. Fase aguda.....	5
IV.4.2. Fase crónica.....	6
IV.5. Diagnóstico y Tratamiento.....	6
IV.6. Características y ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> .....	7
IV.7. Proceso de invasión celular por <i>T. cruzi</i> .....	10
IV.7.1. Adhesión y reconocimiento durante el proceso de invasión de <i>T. cruzi</i> .....	10
IV.7.2. Cascadas de señalización celular durante el proceso de invasión de <i>T. cruzi</i> .....	11
IV.7.2.1. Vía de señalización para la movilización de calcio .....	11
IV.7.2.2. Vía de señalización de TFG- $\beta$ .....	14
IV.7.2.3. Otras moléculas de invasión de <i>T. cruzi</i> .....	14
IV.7.3. Mecanismos de invasión de <i>T. cruzi</i> en células fagocíticas y no fagocíticas .....	15
<b>V. ANTECEDENTES .....</b>	<b>18</b>
<b>VI. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>19</b>
<b>VII. HIPÓTESIS.....</b>	<b>19</b>
<b>VIII. OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
VIII.1. Objetivo general.....	20
VIII.2. Objetivos específicos.....	20
<b>IX. METODOLOGÍA.....</b>	<b>21</b>
IX.1. Cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	21
IX.2. Cultivo de tripomastigotes en monocapas de células Vero.....	21
IX.3. Obtención de extracto proteico y proteínas de excreción y secreción de tripomastigotes .....	21

IX.4. Cuantificación de proteínas de extractos de tripomastigotes .....	22
IX.5. Electroforesis de proteínas en geles de acrilamida (SDS-PAGE).....	22
IX.6. Western Blot de las proteínas de secreción-excreción de tripomastigotes .....	22
IX.7. Ensayo de ligandos con extractos de tripomastigotes de la cepa Querétaro y Ninoa. ....	23
IX.7.1. Fijación de células Vero .....	23
IX.7.2. Ensayo de ligandos con extractos de tripomastigotes.....	23
IX.8. Determinación de la concentración de Ca <sup>2+</sup> intracelular en células Vero inducido por extractos de proteínas de tripomastigotes.....	24
IX.9. Ensayo de infección con tripomastigotes de las cepas Querétaro y Ninoa en células Vero tratadas con las drogas thapsigargin y wortmannin.....	24
<b>X. RESULTADOS .....</b>	<b>26</b>
X.1.Características de los cultivos de células Vero infectados con tripomastigotes de las cepas Querétaro y Ninoa. ....	26
X.2.Análisis de las proteínas de los extractos totales y de proteínas de secreción-excreción de tripomastigotes de la cepa Querétaro y Ninoa.....	27
X.2.1. Obtención y cuantificación de extracto proteico total de tripomastigotes.....	27
X.2.2. Análisis de las proteínas de los extractos totales y de proteínas de secreción-excreción de tripomastigotes mediante electroforesis de proteínas (SDS-PAGE).....	28
X.3.Proteínas del extracto proteico total de tripomastigotes de las cepas Querétaro y Ninoa que interactúan con la superficie de las células Vero.....	32
X.4.Movilización de Ca <sup>2+</sup> intracelular en células Vero inducido por diferentes concentraciones de proteínas de extractos totales de tripomastigotes de las cepas Querétaro y Ninoa. ....	34
X.5.Ensayo de infección con tripomastigotes de las cepas Querétaro y Ninoa en células Vero tratadas con las drogas thapsigargin y wortmannin .....	40
<b>XI. DISCUSIÓN .....</b>	<b>44</b>
<b>XII. CONCLUSIONES .....</b>	<b>49</b>
<b>XIII. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>50</b>
<b>XIV. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>51</b>
<b>XV. ANEXOS.....</b>	<b>57</b>

## I. ABREVIATURAS

AS: ácido siálico

BZN: benznidazol

Ca<sup>2+</sup> : calcio

CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono

Cz: cruzipaína

DAG: diacilglicerol

DMEM: medio Eagle modificado de Dulbecco

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

gp: glicoproteína

GPI: glicofosfatidilinositol

HRP: peroxidasa del rábano

IFI: inmunofluorescencia secundaria o indirecta

IP2 : fosfatidil inositol 4,5 bifosfato

IP3: inositol 1,4,5 trifosfato

MASPs: proteínas de superficie asociadas a mucinas

NFX: nifurtimox

PBS: amortiguador de fosfatos

PI3K: fosfatidilinositol 3-cinasa

PLC: fosfolipasa C

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo

RE: retículo endoplasmático

SDS: dodecil sulfato sódico

SFB: suero fetal bovino

TcMUC: Mucinas

TGF-βR: factor de crecimiento TFG- β

TLR2: toll-like receptor 2

TS: trans sialidasas

## II. RESUMEN

La enfermedad de Chagas es causada por el protozoo flagelado llamado *Trypanosoma cruzi*, el cual se internaliza en las células del hospedero para multiplicarse en el citoplasma celular y posteriormente ser liberado a circulación y continuar con su ciclo de vida. Este proceso de invasión se inicia con la interacción del parásito con la célula del hospedero generando un proceso de adhesión y reconocimiento de las moléculas del parásito con los receptores de la célula del hospedero, activando vías de señalización que conllevan al proceso de invasión. Dentro de estas vías de invasión de *T. cruzi*, la vía de invasión dependiente de la liberación de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) del retículo endoplasmático es la más frecuente, durante ésta se genera un reordenamiento de los microfilamentos de actina y reclutamiento de lisosomas al sitio de entrada del parásito, para su posterior internalización. Existe además otra vía de invasión independiente de lisosomas mediada por la invaginación de la membrana y participación de PI3 cinasas. Las cepas mexicanas de *T. cruzi* Querétaro y Ninoa, presentan diferencias en la expresión de proteínas de superficie así como en la infectividad, la cepa Querétaro es más infectiva que la cepa Ninoa. En este trabajo se realizó un estudio de la vía de invasión dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por extractos protéicos de ambas cepas en células Vero. Los resultados mostraron que las cepas mexicanas de *T. cruzi* presentan diferencias en la activación de la vía dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . La cepa de *T. cruzi* Querétaro movilizó mayor cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular a concentraciones de 50, 70, 100 y 400  $\mu\text{g}$ . En contraste para la cepa Ninoa, sólo se observó variación en el movimiento de  $\text{Ca}^{2+}$  al inducir las células con 400  $\mu\text{g}$  del extracto. También se encontraron diferencias en las vías de invasión que utilizan ambas cepas, esto se observó cuando se realizaron ensayos de infección con células Vero tratadas con las drogas thapsigargin y wortmannin e infectadas con las cepas. Los resultados obtenidos de este estudio mostraron, que las células Vero tratadas con la droga thapsigargin se infectaron menos con la cepa Querétaro y el porcentaje de infección disminuyó significativamente un 15 % con respecto al control. Con la cepa Ninoa no se observó ninguna alteración de su porcentaje de infección. En cuanto a las células tratadas con la droga wortmannin e infectadas con la cepa Ninoa, se observó una disminución del porcentaje de infección significativa de 11 % con respecto al control, en tanto, la cepa Querétaro no vio afectada su infectividad. Los resultados sugieren que la cepa Querétaro estaría utilizando la vía de invasión dependiente de lisosomas, indicando que requiere de movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos del retículo endoplasmático y no estaría utilizando la vía de invasión de PI3 cinasa. Por su parte, la cepa Ninoa estaría utilizando la vía de invasión de PI3 cinasa y no la vía dependiente de movilización de  $\text{Ca}^{2+}$ . Se recomienda un estudio más exhaustivo de las vías de invasión utilizadas por las cepas de *T. cruzi* Querétaro y Ninoa para llegar a comprender en su totalidad los mecanismos que utilizan estas cepas mexicanas.

### III. ABSTRACT

Chagas disease is caused by the flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*. It enters the host cell and it multiplies inside the cytoplasm, to be finally released to the circulation and continue its life cycle. This invasion process starts when the parasite interacts with the host cell through recognition and adhesion of the parasite molecules to host cell receptors; which in turns triggers the activation of signaling cascades. The most common invasion pathway used by *T. cruzi* is calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) dependent.  $\text{Ca}^{2+}$  is released from the endoplasmic reticulum and generates a rearrangement of actin microfilaments, lysosomes are recruited to the site of parasite entry, for the subsequent internalization. However, *T. cruzi* also uses the lysosomal independent pathway, which uses the PI3 kinases and generates plasma membrane invagination. Mexican strains of *T. cruzi*: Ninoa and Querétaro, differ in the expression of their surface proteins. In addition, they also differ in infectivity; the Querétaro strain is more infective than the Ninoa strain. In order to understand the invasion process of *T. cruzi* the  $\text{Ca}^{2+}$  dependent invasion pathway was studied by stimulating Vero cells with protein extracts from both strains. The results show differences in the activation of the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent pathway. The Querétaro strain mobilizes more intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  at concentrations of 50, 70, 100 y 400  $\mu\text{g}$  than the Ninoa strain. The Ninoa strain only mobilizes intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  at 400  $\mu\text{g}$ . Moreover, host cell invasion assays were carried out. Vero cells were treated with thapsigargin and wortmannin and infected with the strains. Differences were found in the invasion pathway used by both strains. Treatment of Vero cells with thapsigargin reduced by 15 % the invasion of the Querétaro strain; Ninoa strain invasion was not affected. Treatment of Vero cells with wortmannin reduced by 11 % the invasion of the Ninoa strain, but the Querétaro strain did not affect its infectivity. Therefore, the results suggest that, on the one hand, the Querétaro strain uses a lysosomes dependent entry, indicating that it requires mobilization of  $\text{Ca}^{2+}$  from ER deposits and is not using the PI3 kinase pathway. On the other hand, the Ninoa strain is using the PI3 kinase pathway and is not using the calcium dependent pathway. Further study of the invasion pathways used by the strains of *T. cruzi*, Querétaro and Ninoa, are needed to fully understand the mechanisms used by these Mexican strains.

## IV. INTRODUCCIÓN

### IV.1. La enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas tiene importancia epidemiológica principalmente en Latinoamérica, debido a que 15 a 18 millones de personas están afectadas por esta letal enfermedad (Lima et al., 2010). Su distribución geográfica abarca desde el sur de los Estados Unidos hasta el sur de Argentina y Chile (WHO, 2002). Sin embargo, las tasas de prevalencia, las características del parásito, la patología clínica y los vectores difieren ampliamente en estos países. Estimaciones recientes indican, que entre 1 y 6 % de la población en Latinoamérica está infectada con *T. cruzi* y aproximadamente se diagnostican 50, 000 nuevos casos cada año. Adicionalmente, cada año la enfermedad de Chagas es la causante de muerte de más gente en la región comparada con otra enfermedad parasitaria, como la Malaria (Moloney, 2009; The Lancet, 2009; Morris, 2009).

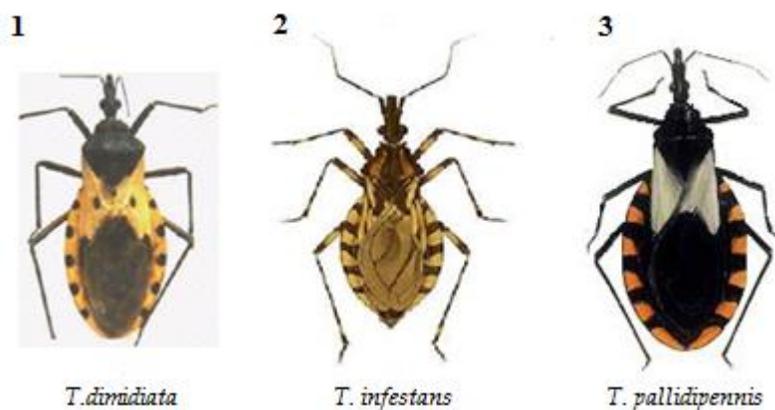


**Figura 1.-** Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas. En color gris se señalan las zonas endémicas. Figura tomada de Coura, 2006.

### IV.2. Agente causante

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana, es causada por el protozoo flagelado llamado *Trypanosoma cruzi*, el cual se transmite principalmente por insectos hematófagos de la familia Reduviidae pertenecientes a los géneros *Triatoma* y *Rhodnius*, entre otros (Espinoza et al., 2012) (Figura 2).

*T. cruzi* es un protozoo altamente pleomórfico con un ciclo de vida complejo. Forma parte de la familia Trypanosomatidae, junto con los parásitos *T. brucei* (agente etiológico de la enfermedad del sueño) y los pertenecientes al género *Leishmania* (causantes de diversas formas clínicas de leishmaniosis). Por tanto, debido a su importancia médica y biológica, este parásito ha sido objeto de diversos estudios.



**Figura 2.-** Imagen de los vectores de *T. cruzi* especies presentes en Centro América y México (1), Sudamérica (2) y especie más abundante en el centro de México y una de las 32 especies encontradas en el país (3). Fuente: <http://new.paho.org/hq/>

### IV.3. La transmisión

La infección por *T. cruzi* se puede llevar acabo de diversas maneras, las cuales son: por medio de vectores, transfusión sanguínea, transmisión oral, la transmisión congénita, trasplante de órganos, menos común, por accidentes de laboratorio.

### IV.4. Manifestaciones clínicas

La enfermedad de Chagas en humanos presenta un cuadro clínico muy variable, que comprende una fase aguda y una fase crónica.

#### IV.4.1. Fase aguda.

La fase aguda de la enfermedad comienza cuando el parásito *T. cruzi* entra en el cuerpo, a través de las heces infectadas del vector. La reacción cutánea que ocurre en la puerta de entrada de los parásitos se llama chagoma, y si ocurre en el párpado puede ser visualizada por el característico signo de Romaña. Adicionalmente, existe una alta parasitemia con síntomas como fiebre, edema, agrandamiento de hígado, bazo. Las lesiones de la fase aguda se caracterizan por ser reacciones inflamatorias, con la presencia de

miocarditis aguda, lesión que se continúa en la fase crónica de la enfermedad (Coura et al., 2002). Algunas veces los síntomas suelen ser muy leves y esto hace difícil el diagnóstico (Rassi y Little, 2000).

#### **IV.4.2. Fase crónica.**

La fase crónica de la enfermedad de Chagas comienza cuando la parasitemia disminuye a niveles generalmente indetectables y los pacientes se encuentran asintomáticos. Esta forma de la fase crónica de la enfermedad se denomina la forma indeterminada o fase crónica asintomática. Sin embargo, varios años o incluso décadas después de la infección inicial, 20 a 30% de los individuos infectados desarrollarán lesiones en varios órganos, principalmente el corazón y el sistema digestivo, como cardiomiopatía, megaesófago, megacolon (Prata, 2001). En el caso de la cardiomiopatía grave, ésta puede cursar con palpitaciones, disnea, dolores cardíacos y/o hepáticos y alteraciones del electrocardiograma que, de permanecer sin tratamiento, suelen tener consecuencias fatales para el paciente. En el caso de los trastornos digestivos como megaesófago y megacolon, hay síntomas como dificultad para deglutir, desnutrición, dolor abdominal y estreñimiento (Reina et al., 2000).

#### **IV.5. Diagnóstico y Tratamiento**

En las etapas tempranas del desarrollo de la enfermedad suelen utilizarse métodos de diagnóstico directo, fundamentalmente, la observación al microscopio óptico de un frotis de sangre periférica ó el xenodiagnóstico (que requiere la disponibilidad de triatomos libres de infección cultivados en laboratorio). El diagnóstico en la fase crónica es algo más complejo, para ello, se suele recurrir a técnicas inmunológicas (que detectan la presencia de anticuerpos contra el parásito) como la IFI o el ELISA, o bioquímicas (que detectan ciertas moléculas del parásito como indicadores de la infección). Otras técnicas más complejas son la prueba de fijación de complemento, la hemaglutinación indirecta y la PCR (Punukollu et al., 2007).

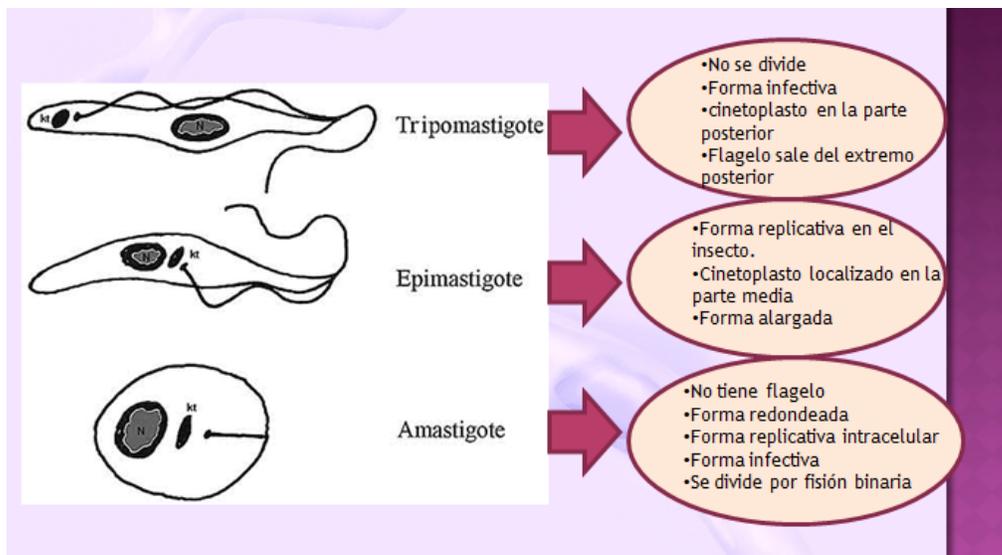
Los fármacos de elección para el tratamiento de la Tripanosomiasis Americana son el nifurtimox (NFX) y el benznidazol (BZN). No obstante, además de presentar numerosos efectos adversos, su eficacia en la fase tardía es baja. En la fase crónica es recomendable realizar un tratamiento sintomático de las alteraciones cardíacas e intestinales (Punukollu et al., 2007).

#### IV.6. Características y ciclo de vida de *T. cruzi*

El parásito *T. cruzi*, se caracteriza por la presencia de diversas formas de desarrollo en su ciclo de vida, las cuales se dividen en: dos fases en el vector (epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos) y dos fases en el hospedero (amastigotes y tripomastigotes sanguíneos).

Los epimastigotes se encuentran en el intestino medio de los vectores y constituyen la forma flagelada replicativa en los insectos vectores. Mientras los tripomastigotes metacíclicos se encuentran en el intestino posterior, las heces y la orina de los vectores.

Los tripomastigotes se encuentran en los tejidos o en la circulación sanguínea (denominándose tripomastigotes sanguíneos) dentro del hospedero. Ésta forma no es capaz de dividirse, pero constituye la forma flagelada infectiva del parásito, en tanto, los amastigotes son las formas replicativas intracelulares de *T. cruzi* en las células del hospedero, donde se multiplican por fisión binaria en el citoplasma de éstas (De Souza et al., 2010).

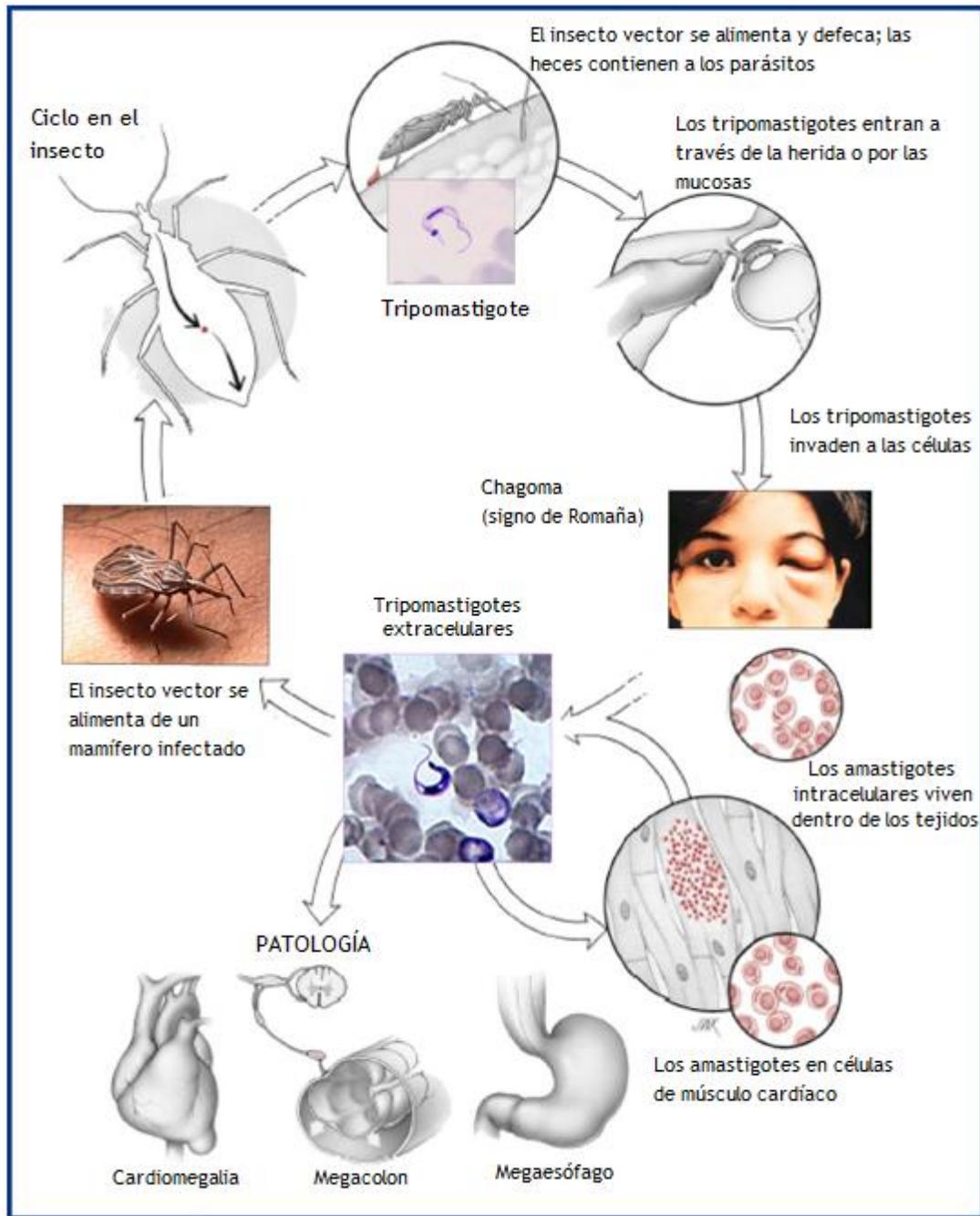


**Figura 3.-** Morfología de *T. cruzi*: Principales características morfológicas de las tres fases del parásito: tripomastigote, epimastigote y amastigote. Estas tres morfologías presentan diferencias en cuanto a su forma, posición del flagelo y cinetoplasto, (De Souza et al., 2010).

El proceso de infección comienza cuando el insecto vector se alimenta de la sangre de un mamífero infectado con *T. cruzi*, ingiere una población de tripomastigotes sanguíneos (hasta 10% de amastigotes). Los parásitos pasan al intestino medio del insecto, donde se transforman en epimastigotes y se dividen repetidamente mediante un proceso de fisión binaria. Los epimastigotes se adhieren a la cutícula de la pared de la parte posterior del intestino para diferenciarse en formas metacíclicas, este proceso es conocido como metacicloogénesis (proceso en el que los epimastigotes, la forma no infectiva, se transforma a tripomastigotes metacíclicos los cuales son infectivos). El proceso de adhesión de los epimastigotes a la pared del intestino involucra la participación de una serie de glicoproteínas y glicoconjugados expuestos en la superficie del parásito (De Souza et al., 2010).

Una vez formados los tripomastigotes metacíclicos se desprenden de la cutícula y son eliminados con las heces durante la ingesta de sangre. Las formas metacíclicas presentes en las heces y orina ingresan al hospedero por la picadura del insecto, sobre la cual el hospedero se rasguña la piel haciendo que los tripomastigotes metacíclicos penetren en la herida.

Dentro del hospedador los tripomastigotes metacíclicos son capaces de parasitar una gran cantidad de células de mamífero nucleadas, incluyendo macrófagos; donde se diferencian en amastigotes que se multiplican intracelularmente, también por fisión binaria. En el citoplasma de las células, los amastigotes se transforman en tripomastigotes sanguíneos que son liberados a la circulación junto con algunos amastigotes durante la ruptura celular. Los amastigotes liberados infectan nuevas células y los tripomastigotes vuelven a entrar en el torrente sanguíneo, donde pueden ser ingeridos por otro insecto, infectándolo y completando el ciclo, como se observa en la figura 4 (Stuart et al., 2008).



**Figura 4-** Ciclo de vida de *T. cruzi*. Se inicia cuando el insecto vector se alimenta de la sangre de una persona o mamífero infectado, los parásitos viajan al intestino medio del insecto, donde se transforman en epimastigotes, los cuales se reproducen y viajan al intestino posterior donde se diferencian en tripomastigotes metacíclicos (forma infectiva), estos van a salir con las heces del insecto cuando este se alimenta y a través de la herida de la picadura penetran llegando al sistema circulatorio del hospedero, donde el parásito va invadir a las células para poder replicarse en forma de amastigotes, posteriormente estos van a salir de las células después de la ruptura celular y van a invadir otras células. El ciclo se cierra cuando otro insecto vector se alimenta de un mamífero infectado.

Diagrama modificado de Enfermedades parasitarias (Despommier et al., 2000)

#### **IV.7. Proceso de invasión celular por *T. cruzi***

A pesar del desarrollo de una respuesta inmune robusta durante la fase aguda de la infección con *T. cruzi*, está documentado que los huéspedes humanos no logran eliminar por completo a los parásitos intracelulares (Tarleton y Zhang, 1999; Zhang y Tarleton, 1999), a éstos se les puede observar replicándose en los tejidos del huésped, particularmente en el músculo cardíaco (Brener, 1973; Macedo y Peña, 1998; Zhang y Tarleton, 1999). Existe un consenso de que la persistencia *in vivo* de *T. cruzi*, durante muchas décadas está intrínsecamente relacionado con la capacidad que tiene el parásito en invadir un gran número de células de diferentes tipos en sus hospederos (Burleigh y Andrews, 1995).

El proceso de internalización del parásito en la célula hospedera, conlleva a una serie de cambios fisiológicos necesarios para el establecimiento y multiplicación en el citoplasma celular. Este proceso se inicia con la interacción del parásito con la célula hospedera y se puede dividir en tres fases: adhesión y reconocimiento, señalización e invasión (Yoshida y Cortez, 2008); las cuales serán descritas a continuación.

##### **IV.7.1. Adhesión y reconocimiento durante el proceso de invasión de *T. cruzi***

El primer paso para el proceso de invasión, se da cuando el parásito se une a la membrana de la célula hospedera. Muchas moléculas de *T. cruzi* y receptores de la célula hospedero están involucradas en esta etapa (Burleigh y Woolsey, 2002). Diferentes grupos de investigación, han identificado varias de estas moléculas del parásito, lo que ha permitido ir conociendo los mecanismos moleculares que emplea el parásito para unirse a la célula hospedero y con ello se ha llegado a concluir que el fenómeno de adhesión precede a la invasión. Los tripomastigotes de *T. cruzi* son altamente invasivos, son largos (20µm), delgados y altamente móviles lo que hace que se adhieran e invadan a las células de una forma dependiente de energía (Martins et al., 2009; Schenkman et al., 1991).

Observaciones de células vivas infectadas, revelaron que los tripomastigotes pueden pasar varios minutos en una zona en particular de la superficie celular, aparentemente se encuentran buscando adherirse o esperando recibir alguna señal antes de iniciar la invasión, esto nos indica, que una serie compleja de condiciones se deben generar en la superficie de la célula para que los tripomastigotes inicien la adhesión y el proceso de invasión. Este comportamiento complica el estudio de los primeros eventos asociados con la penetración de la célula del hospedero por los tripomastigotes, sólo las imágenes de células vivas han proporcionado indicios de los primeros eventos del proceso de invasión (Burleigh y Caradonna, 2011).

## **IV.7.2. Cascadas de señalización celular durante el proceso de invasión de *T. cruzi***

Los receptores, moléculas y vías de señalización de la célula del hospedero que han sido identificados y caracterizados como participantes en el proceso de la invasión del parásito, se describen a continuación:

### **IV.7.2.1. Vía de señalización para la movilización de calcio**

El calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) es un segundo mensajero importante para la cascada de señalización que regula la secreción de proteínas, la movilidad, la expresión de genes y el desarrollo celular en células eucariotas. Mientras el  $\text{Ca}^{2+}$  es un catión abundante en el medio ambiente, en el citosol de las células eucariotas se mantiene en un nivel muy bajo. La salida rápida de  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado en los depósitos es una potente señal para el control de una variedad de efectos desencadenados dentro de la célula, ya que muchas proteínas citosólicas claves tienen motivos de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  como, por ejemplo, la calmodulina, permitiendo que esta señal sea propagada en diferentes vías (Clapham, 2007).

El  $\text{Ca}^{2+}$  es una señal potente intracelular, que si no es absorbido con rapidez se convierte en altamente tóxico para las células; por tal razón, éstas han desarrollado formas para controlar la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a estímulos ambientales.

La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en las células hospederas es 10.000 veces más baja que en el medio extracelular. El mantenimiento de este gradiente de  $\text{Ca}^{2+}$  requiere la operación de varios mecanismos presentes en la membrana plasmática y organelos intracelulares. El  $\text{Ca}^{2+}$  entra a la membrana plasmática a través de una serie de canales de membrana, algunos de los cuales están bajo el control de receptores y del potencial eléctrico de la membrana. El contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en los depósitos está también regulado por proteínas de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Berridge et al., 2000).

Los organelos intracelulares que contienen transportadores, canales y bombas que contribuyen a la homeostasis para la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  o para secuestrarlo, de acuerdo a los requerimientos celulares, son: las mitocondrias y el retículo endoplasmático (RE) en la célula hospedera y los acidocalcisomas en el parásito. Las mitocondrias son importantes para controlar las grandes fluctuaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. Los acidocalcinomas son importantes para el almacenamiento de  $\text{Ca}^{2+}$  en el parásito. El RE es la principal fuente de  $\text{Ca}^{2+}$  móvil para la señalización (Moreno y Docampo, 2003).

La liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE es muy importante para el proceso de invasión del parásito *T. cruzi* a la célula hospedera, ya que promueve en ella un reordenamiento de los microfilamentos de actina, reclutamiento de lisosomas al sitio de entrada y su posterior internalización. El incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, es consecuencia de una cascada de señalización que empieza con la adhesión de moléculas de

superficie del parásito a receptores de la célula hospedero. Este fenómeno induce la activación de la enzima Fosfolipasa C (PLC) de la célula hospedadora, que a la vez hidroliza al fosfolípido de membrana fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (IP<sub>2</sub>) y genera dos productos diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5 trifosfato (IP<sub>3</sub>), éste compuesto actúa como segundo mensajero, enviando esta señal a un receptor para IP<sub>3</sub> que se encuentra en la membrana del RE y hace que se libere Ca<sup>2+</sup> al citoplasma (Yoshida y Cortez, 2008).

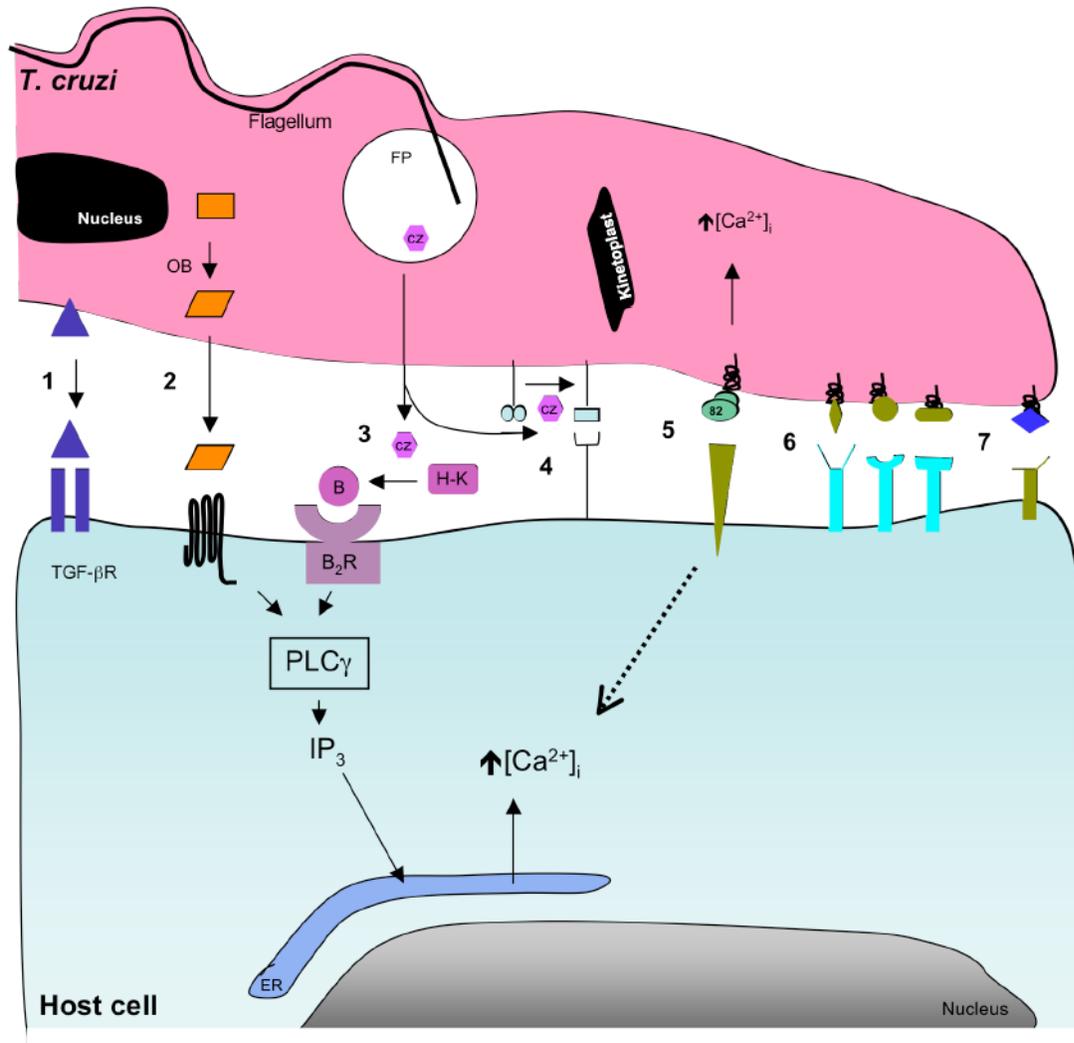
Son al menos 3 moléculas de *T. cruzi* las que han sido implicadas en la vía de señalización de Ca<sup>2+</sup>: dos proteasas; la Oligopeptidasa B, la Cruzipaína y una glicoproteína la gp82.

La Oligopeptidasa B de 80 kDa es una proteasa de serina, que se une a un precursor no determinado presente en el citosol del parásito, y este a su vez se une a un antagonista. La molécula activa se une a una proteína G receptora, que activa la PLC que produce IP<sub>3</sub>, que a su vez activa la movilización Ca<sup>2+</sup> de la bomba SERCA (Ca<sup>2+</sup>/ATPasa del retículo endoplasmático) del R.E que es sensible a thapsigargin (Burleigh y Woolse, 2002).

La Cruzipaína es una proteasa de cisteína, secretada por la bolsa flagelar de los tripomastigotes y rompe al Kininógeno de alto peso molecular para generar Kininas de corto tiempo de vida. Estas kininas se unen a receptores de la Bradikinina situados en la membrana de la célula hospedera para estimular la salida de Ca<sup>2+</sup> dependiente de IP<sub>3</sub> (Scharfstein et al., 2000).

La glicoproteína gp82 se expresa por tripomastigotes metacíclicos, pero no por los tripomastigotes derivados del torrente sanguíneo, sugiriendo que esta proteína juega un papel en la fase inicial de entrada en las células del hospedero. La Gp82 reconoce un receptor no identificado en la superficie de la membrana e induce una cascada de señalización de Ca<sup>2+</sup> bidireccional que induce un incremento de la salida Ca<sup>2+</sup> citoplasmático por la vía de generación de IP<sub>3</sub> en el parásito. Otra glicoproteína que tiene la misma función de la gp82 es la gp85-transialidasa que también se une a la superficie de la célula (Yoshida, 2006).

Las principales moléculas de *T. cruzi*, implicadas en activar las vías de señalización para invadir a las células del hospedero se resumen en la figura 5.



**Figura 5.-** Principales vías de señalización inducidas por moléculas de *T. cruzi* para la invasión de la célula del hospedero. Las vías de señalización son las siguientes:

- (1) Activación de TGF- $\beta$ R por moléculas secretadas por *T. cruzi* (Hall and Pereira, 2000; Ming et al., 1995).
- (2) Oligopeptidasa B citosólica unida a un precursor el cual lo activa y se une a proteína G (receptor) enviando una señal a IP<sub>3</sub> para la salida de Ca<sup>2+</sup> de los depósitos del retículo endoplasmático (Burleigh et al, 2002).
- (3) Cruzipaina (Cz) es liberada del bolsillo flagelar de *T. cruzi* para unirse a los kimogenos y convertirlos en Bradikininas (B), que se unen a su receptor de B<sub>2</sub>R que envía una señal a través de IP<sub>3</sub> para la salida de Ca<sup>2+</sup>. (Scharfstein et al., 2000).
- (4) Cz procesa una molécula que está asociada a la membrana y lo convierte en un ligando activo que reconoce un receptor no determinado en la célula del hospedero (Aparicio et al, 2004).
- (5) Vía de señalización bi-direccional mediada por la proteína gp82 unida un receptor no determinado (Yoshida, 2006).
- (6) Moléculas indeterminadas de *T. cruzi* unidas a galactina-3 como potenciales receptores en la célula hospedero (Kleshchenko et al, 2004).
- (7) Mucina de 45-kDa unida a un receptor no determinado (Turner et al, 2002).

Tomada de Melo y Pereira, 2008

#### **IV.7.2.2. Vía de señalización de TFG- $\beta$**

Se demostró, que la vía de señalización de TFG- $\beta$  (factor de crecimiento TFG-  $\beta$ ) en la célula del hospedero es importante para la invasión del parásito a la célula, porque se comprobó que, al bloquear esta vía, las células eran menos susceptibles a ser infectadas por el parásito (Ming et al., 1995). Estos experimentos, demostraron que *T. cruzi* secreta una molécula que activa esta vía (Hall et al., 2000; Ming et al., 1995).

También se descubrió que la activación de la vía TFG- $\beta$  facilita la invasión de *T. cruzi* a las células epiteliales (Hall et al., 2000; Ming et al., 1995).

#### **IV.7.2.3. Otras moléculas de invasión de *T. cruzi***

Existen otras proteínas que participan en el proceso de invasión a las células hospederas, dentro de estas están la familia de las Trans-sialidasas (TS). Estas proteínas están unidas a motivos GPI presentes en la superficie de *T. cruzi*, también aparecen en la superficie de *T. brucei*. Su función principal consiste en transferir residuos de ácido siálico (AS) desde los glicoconjugados de la célula hospedera y unirlos a los residuos  $\beta$ -Gal de las mucinas del parásito, dado que el parásito no es capaz de sintetizar el AS de novo (Buscaglia et al., 2006).

La participación de las TS en el proceso de invasión, incluye la activación de las vías de señalización como las MAPK y PI3K/Akt en células dendríticas, epiteliales y neuronales, por una región no catalítica de la TS (Chuenkova y Pereira, 2000; Melo y Pereira, 2007). También la TS recombinante inactiva se une a la superficie de células endoteliales activando la vía de NF- $\kappa$ B, induciendo la expresión de moléculas de adhesión E-selectin, VCAM-1 e ICAM-1, que bloquean la apoptosis al suprimir un factor de crecimiento, sugiriendo que esta familia de las TS juega un papel importante en la respuesta celular frente a la infección por *T. cruzi* (Dias et al., 2008).

Las mucinas (TcMUC) son otras proteínas que se encuentran en la capa externa de *T. cruzi* en sus diferentes estadios. Las TcMUC son los componentes expresados en mayor cantidad en la superficie de *T. cruzi*, siendo una de las familias génicas con mayor expansión en el genoma del parásito (863 genes) (El-Sayed et al., 2005, Acosta-Serrano et al., 2001). Estas proteínas, poseen dos funciones principales: proveer al parásito de protección contra el vector y/o mecanismos defensivos del hospedador, asegurar el anclaje y la invasión en células y tejidos específicos (Buscaglia et al., 2006). Las mucinas poseen azúcares *O*- glicosilados que representan hasta un 60% del peso total de la glicoproteína, se anclan a la

cubierta lipídica externa de la membrana plasmática mediante uniones Glicofosfatidilinositol (GPI) (Buscaglia et al., 2006). Los motivos de unión GPI de estas moléculas son los responsables de esta propiedad al unirse específicamente a los receptores “Toll-like receptor 2” (TLR2) de la superficie de los macrófagos, o de unirse a otros receptores y activar las vías de las MAPK y NF- $\kappa$ B (Robert et al., 2002; Campos y Gazzinelli, 2004).

También existen las proteínas de superficie asociadas a mucinas (MASPs) (El-Sayed et al., 2005). Recientemente, se ha descrito una proteína MASP de 52 kDa, que es secretada por el parásito y participa en el proceso de invasión (Osuna et al., 2011). La proteína caracterizada en nuestro laboratorio llamada MASP 49 kDa que se expresa en la superficie del parásito, se considera muy importante, ya que en una investigación reciente en este laboratorio se descubrió que esta proteína está involucrada en el proceso de infección (Martínez et al., datos no publicados).

#### **IV.7.3. Mecanismos de invasión de *T. cruzi* en células fagocíticas y no fagocíticas**

La capacidad de invasión de *T. cruzi* es elevada, infectando tanto células fagocíticas como no fagocíticas. Las células carentes de núcleo, son las únicas que son refractarias a la invasión, debido a los altos contenidos de glúcidos dentro de estas células (Osuna et al., 1983). Esta variabilidad en los tipos celulares que infecta, viene determinado por el amplio repertorio de proteínas de superficie y por su complejo genoma (Burleigh y Mott, 2008). La capacidad invasiva del parásito también está dada por el linaje al que pertenezca la cepa.

En células fagocíticas profesionales, como los macrófagos, el proceso de invasión está dado por la activación de proteínas tirosina cinasas, seguido por la formación de PI3K (fosfatidilinositol 3-cinasa), la que lleva a la movilización de filamentos de actina (proceso asociado con el mecanismo de fagocitosis) en la parte inicial de la entrada del tripomastigote. Otro mecanismo de invasión del parásito es mediante el proceso de invaginación de la membrana, en el que no participan los filamentos de actina, y en el que hay una alta inversión de energía.

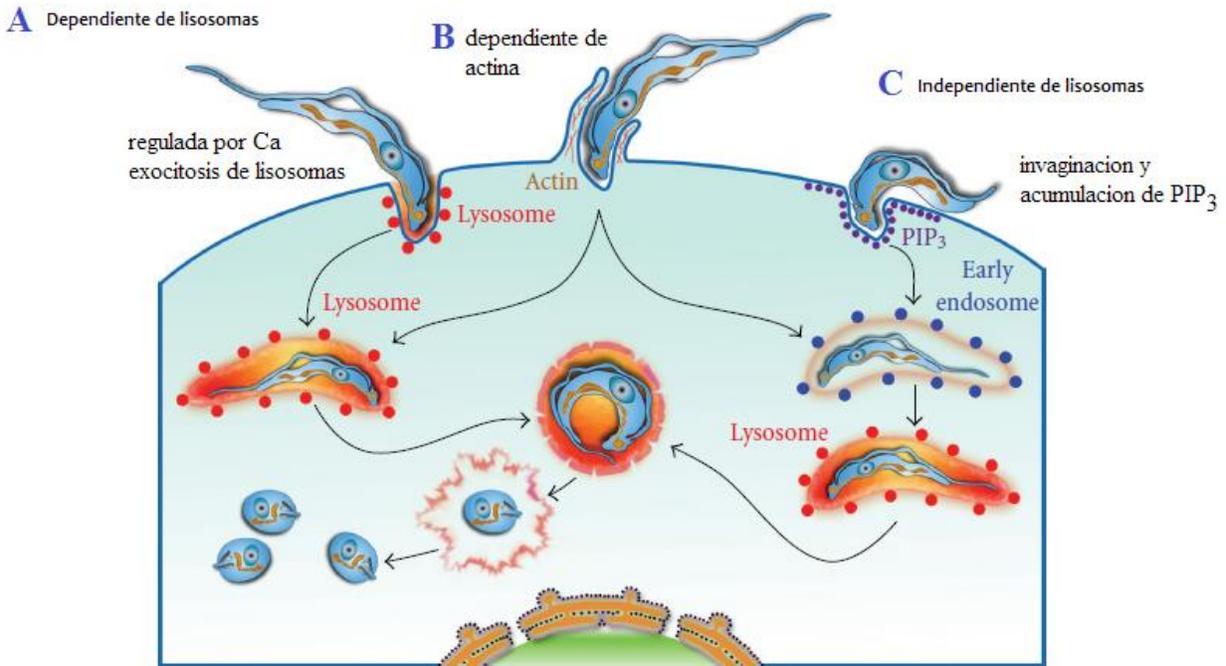
En células fagocíticas no profesionales existen dos mecanismos de entrada del parásito, que son: las vías dependiente e independiente de lisosomas. En la vía dependiente de lisosomas, los parásitos contactan la membrana de la célula con el flagelo libre, donde inducen una serie de señales a la célula, para que se dispare la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo cual va a servir para que se atraigan los lisosomas al punto de unión célula-parásito, fusionándose con la membrana plasmática para crear una vacuola parasitófora que englobará al parásito (Osuna et al., 1986, Osuna et al., 1994). Posteriormente, el parásito ingresa a la

célula por esta invaginación, una vez establecido en el citoplasma celular, parece existir una inhibición de la fusión lisosomal. El parásito escapa de la vacuola parasitófora hacia el citoplasma, donde se diferencia a la forma de amastigote (Burleigh y Woolsey, 2002) y se le reduce el tamaño del flagelo del parásito, en un proceso que dura unas 12 horas. Pasadas 24-48 horas, las formas amastigotas se comienzan a dividir por fisión binaria por el proceso de citoquinesis, que tarda unos 25 minutos para completarse (De Souza, 2002). Pasadas 72 - 96 horas, el citoplasma de las células hospedadoras se muestra repleto de amastigotes, que irán transformándose gradualmente en tripomastigotes. Al final del ciclo intracelular, los parásitos alojados en el citoplasma, a modo de “nidos”, iniciarán la liberación desde la célula al medio externo. El movimiento individualizado de las nuevas formas tripomastigotes, es claramente visible y en unos minutos saldrán a los espacios intercelulares y al espacio extracelular (Figura 6). Los nuevos tripomastigotes contactarán a nuevas células dando lugar a una nueva infección (Espinoza y Manning-Cela, 2007).

El incremento de la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular es fundamental para el proceso de invasión, debido a que se observó una disminución de la invasión en células tratadas con la droga thapsigargin (inhibidor del movimiento de  $Ca^{2+}$  intracelular) (De Souza et al., 2010). Esta droga, actúa uniéndose específicamente al receptor IP3 (bomba de  $Ca^{2+}$ ) del RE, que al ser inhibido depleta el RE, liberando todo el  $Ca^{2+}$  que se encuentra almacenado en su interior y de esta manera, se incrementa la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular (Thastrup et al., 1990).

El mecanismo de invasión dependiente de lisosomas, fue el primer modelo propuesto hace una década. En nuevos estudios enfocados en determinar las señales intracelulares que se producen en el proceso de invasión, se propusieron otros modelos del proceso de invasión de *T. cruzi*, como el modelo independiente de lisosomas (Burleigh, 2005). Este segundo mecanismo de invasión en células fagocíticas no profesionales, está relacionado con la acumulación de PIP3, que es el producto más abundante de la activación de PI3K clase I. Existen 3 clases de cinasas en las células del mamífero, una de esas es la PI3K I, que está relacionada con los procesos celulares como tráfico en la membrana, fusión del endosoma, arreglos del citoesqueleto y crecimiento celular. En esta vía, la acumulación de PIP3 se genera por el proceso de invaginación dependiente de actina (Woolsey et al., 2003), que se da en la membrana cuando el parásito entra en la célula. Como resultado de este mecanismo de invasión, el 50 % del total de parásitos internalizados se encuentran encerrados en vacuolas ricas en marcadores de membrana plasmática y un 20% del total interactúa con endosomas tempranos. Posteriormente, ambos son reclutados por lisosomas y forman, finalmente, la vacuola parasitófora (Burleigh et al., 2008, De Souza et al., 2010).

El papel de la vía de la PI3K es fundamental para la regulación del proceso de invasión, ya que, se demostró que el PIP3 se acumula rápidamente en las células del hospedero en respuesta a la infección por tripomastigotes, el cual es importante para la formación temprana del endosoma y posteriormente la asociación de lisosomas a la vacuola que contiene al parásito. La wortmannin (el inhibidor de PI3K), dificulta la entrada del parásito en las células fagocíticas no profesionales (Wilkowsky et al., 2001).



**Figura 6.-** Proceso de invasión de *T. cruzi* a la célula hospedero por tres mecanismos. (A) La vía dependiente de lisosomas mediada por  $Ca^{2+}$ , (B) la vía dependiente de actina donde los tripomastigotes penetran la célula a través de la membrana plasmática y (C) la vía independiente de lisosomas donde los tripomastigotes invaden por una invaginación de la membrana plasmática que conduce a la acumulación de PIP<sub>3</sub>, formación del endosoma temprano. Tomada de De Souza et al., 2010.

## V. ANTECEDENTES

Estudios realizados en nuestro laboratorio, nos indican que las cepas mexicanas de *T. cruzi*, Ninoa y Querétaro, presentan diferencias en virulencia en el modelo murino y también presentan diferencias en cuanto a su infectividad en el modelo *in vitro* (Espinoza et al., 2010). La cepa Querétaro es un 50 % más infectiva que la cepa Ninoa, e invade más rápidamente a la célula hospedera en comparación con la cepa Ninoa (Jiménez Marín, 2005).

En otro estudio acerca de la interacción de las proteínas de superficie de las cepas Querétaro y Ninoa con células Vero, se encontró una diferencia en la expresión de proteínas de superficie que se unen a la célula hospedera. La cepa Querétaro presenta 86 proteínas de superficie que se unieron a la célula y en el caso de la cepa Ninoa presentó 68 proteínas. Por lo tanto, estas variaciones tendrían relación con la infectividad y la virulencia que presentan (Martínez, 2007).

Como ya se mencionó anteriormente, una serie de estudios han demostrado que el proceso de invasión de *T. cruzi* en la célula hospedero, requiere la activación de una cascada de señalización, que conlleva al incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma (Ruiz et al., 1998). Esta vía de señalización de  $\text{Ca}^{2+}$ , inducida por moléculas de superficie de *T. cruzi*, es una de las vías más estudiadas. El movimiento de  $\text{Ca}^{2+}$  se ha estudiado en tripomastigotes metacíclicos, donde se ha encontrado que la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  es fundamental, ya que es requerida para la invasión del parásito. En el caso de la forma de amastigote se ha visto que también es necesario el movimiento de  $\text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo, los epimastigotes (la forma no infectiva) es incapaz de generar esta respuesta (Yoshida y Cortez, 2008; Conrad et al., 2010).

Un estudio realizado con las cepas G y CL de tripomastigotes metacíclicos (que presentan distinta infectividad), mostraron que ambas cepas inducen un incremento similar en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en células HeLa (Ruiz et al., 1998). Pero este tipo de estudios no se han realizado con cepas mexicanas, ni tampoco se ha asociado este fenómeno con proteínas de bajos pesos moleculares, como las encontradas en estudios previos realizados en este laboratorio.

## **VI. JUSTIFICACIÓN**

Existen diferencias en la infectividad y en la expresión de proteínas de superficie de las cepas mexicanas de *T. cruzi* Querétaro y Ninoa; por lo tanto, es importante estudiar la vía de movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por ambas cepas, ya que se ha descrito que algunas proteínas de superficie y de secreción del parásito, participan de manera diferente en la activación de la vía de señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  que llevan al proceso de invasión del parásito a las células del hospedero.

## **VII. HIPÓTESIS**

Debido a que existen diferencias en la expresión de proteínas de superficie y en la infectividad de las cepas mexicanas de *T. cruzi*, Querétaro y Ninoa, estas cepas inducirán de manera diferente la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

## **VIII. OBJETIVOS**

### **VIII.1. Objetivo general**

- Determinar la participación de la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en células Vero inducido por las cepas mexicanas de *T. cruzi* Querétaro y Ninoa.

### **VIII.2. Objetivos específicos**

- Identificar las proteínas de las cepas Querétaro y Ninoa que se unen a las células Vero mediante ensayos de ligando.
- Determinar el incremento de la concentración  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en células Vero inducida por los extractos protéicos de las cepas Querétaro y Ninoa.
- Analizar la vías de invasión relacionadas con la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  y con PI3 cinasa en células Vero infectadas con las cepas Querétaro y Ninoa.

## **IX. METODOLOGÍA**

### **IX.1. Cepas de *Trypanosoma cruzi***

Se utilizaron para el análisis dos cepas mexicanas de *T. cruzi* denominadas MHOM/MX/1994 (Ninoa) y ITRI/MX/0000 (Querétaro) caracterizadas previamente en este laboratorio. La cepa Ninoa es de origen humano y es avirulenta, la cepa Querétaro proviene de un vector y es virulenta, ambas cepas pertenecen al genotipo TCI (Espinoza et al., 2010).

### **IX.2. Cultivo de tripomastigotes en monocapas de células Vero**

Se mantuvieron en cultivo células Vero (fibroblastos de riñón de mono verde) infectadas con tripomastigotes de las cepas Querétaro y Ninoa en medio DMEM (GIBCO, No. Cat. 12100-046) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10 %, a 37°C con 95% de humedad relativa y 5 % de CO<sub>2</sub>. Los cultivos se mantuvieron resemebrando las células cada tercer día, retirando el sobrenadante de los cultivos y añadiendo 4 ml de EDTA 5 mM por 12 minutos y posteriormente 2 ml de tripsina a 1 mg/ml por 6 minutos para despegar las células. De esta suspensión, se resemebraron 0.5 ml en una caja nueva de 75 cm<sup>2</sup> (Corning 430725) a la que se agregó 25 ml de medio fresco (López-Olmos, 1998). Se recolectaron los tripomastigotes de la siguiente manera: el sobrenadante del cultivo celular infectado de 96 horas, fue centrifugado por 10 minutos a 1200 g y el precipitado fue resuspendido en 1ml de PBS, nuevamente se centrifugó a 1200 g por 10 minutos, se contó el número de parásitos en cámara de Neubauer y el precipitado de parásitos fue almacenado a – 70°C hasta su uso (Nieto Castañeda, 1997).

### **IX.3. Obtención de extracto proteico y proteínas de excreción y secreción de tripomastigotes**

Los parásitos recolectados, se resuspendieron en buffer de lisis (Buffer Tris HCl 10 mM pH 8.2) recién preparado en una relación 5 ml/g de parásitos y se agregaron los inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM, leupeptin 0.1 mM y pepstatin 0.001 mM), para luego ser sometidos a sonicación por 3 periodos (80 W) de 5 minutos cada uno y ser agitados vigorosamente en el vortex por 2 minutos entre cada periodo de sonicación. Finalmente, se centrifugaron a 4000 g durante 25 minutos a 4°C. El sobrenadante se recolectó y se almacenó en alícuotas a -70 °C hasta su uso (Westermeier y Naven, 2002).

Para obtener las proteínas de secreción y excreción, se recolectaron los parásitos de un cultivo celular infectado de 72 horas, se centrifugó por 10 minutos a 1200 g y se contaron los parásitos en cámara Neubauer. Entonces, 200 x 10<sup>6</sup> parásitos fueron resuspendidos en 500 µl en medio de cultivo DMEM sin suero y se colocaron en una placa de cultivo celular de 24 pozos (Costar 3524). Los parásitos se

incubaron una hora a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Después de una hora, se verificó la viabilidad de los parásitos y se recolectó el medio de la caja de cultivo, el cual fue centrifugado a 1200 g, 10 minutos. El sobrenadante fue recolectado y filtrado en una membrana de poro 0,22 µm (Millipore 6VWP025) y se congeló a -70°C.

#### **IX.4. Cuantificación de proteínas de extractos de tripomastigotes**

La cuantificación de proteínas se realizó utilizando el kit DC Protein assay (Bio-Rad 500-0114), que está basado en el método de Lowry. Se preparó una curva estándar con albúmina sérica en concentraciones 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312, 0.156 mg/mL. Las muestras se trataron según las indicaciones del proveedor. Se colocaron 4 µl de las muestras por duplicado en una placa de microtitulación de fondo redondo (Costar 2797), así como las soluciones de albúmina de la curva de calibración. Se adicionaron los reactivos A y B del kit y se incubó la placa a temperatura ambiente por 15 minutos. Después de la incubación, se leyó la absorbancia en un lector de ELISA (Modelo 550 Bio-Rad) a 655 nm. La concentración de proteína del extracto se calculó a partir de la curva de calibración generada a partir de los datos obtenidos.

#### **IX.5. Electroforesis de proteínas en geles de acrilamida (SDS-PAGE).**

Se tomaron 10 µg de extracto de proteínas de tripomastigotes ó 10 µl de proteínas de secreción-excreción y se mezclaron con buffer de carga (0.25 M Tris-Base, 4% SDS, 40% glicerol, 4 % β-mercaptoetanol y 2 mg azul de bromofenol), se hirvieron por 5 minutos y centrifugaron por 3 minutos a 2000 g. Se corrieron las muestras en geles de acrilamida al 12% (Laemmli, 1970), en una cámara electroforética Mini Protean de Bio-Rad, por 50 min a 200 V. Después de la corrida, para visualizar las proteínas en el gel, éste se tiñó con azul de coomassie (metanol 50%, Ac. acético 10%, azul de coomassie R-250 0.25%) por 20 minutos y se utilizó una solución desteñidora (Ac. Acético 5% y metanol 10%) para quitar el exceso de colorante.

#### **IX.6. Western Blot de las proteínas de secreción-excreción de tripomastigotes**

Para identificar las proteínas secretadas por los tripomastigotes de ambas cepas, se corrieron 10 µl (200 x 10<sup>6</sup> parásitos en 500 µl de DMEM) de sobrenadantes de proteínas de secreción-excreción en geles de policrilamida al 12% a 200 V. Después de la corrida electroforética, se realizó una transferencia a membranas de nitrocelulosa a 100 V. Al término de la transferencia las membranas fueron cortadas e incubadas con leche descremada al 10% a 4°C toda la noche. Las tiras de membranas bloqueadas se incubaron con: suero de conejo anti extracto de proteínas totales de tripomastigotes de la cepa Querétaro en una dilución de 1:1000 y también con el anticuerpo anti-cruzipaína hecho en conejo en una dilución 1:2000. Ambos fueron incubados durante 2 horas y posteriormente se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS-Tween al 0.1%, después se le agregó el segundo anticuerpo anti IgG de conejo acoplado a HRP

(Invitrogen A10547) en una dilución de 1:1000 por 2 horas. Transcurrido este tiempo se realizaron 2 lavados de 5 minutos con PBS-Tween y las membranas fueron reveladas con 3-3-diaminobenzidina y peróxido de hidrógeno. Finalmente, se realizaron varios lavados con agua y se dejaron secar las membranas.

## **IX.7. Ensayo de ligandos con extractos de tripomastigotes de la cepa Querétaro y Ninoa.**

### **IX.7.1. Fijación de células Vero**

Las células Vero se cultivaron en medio DMEM, suplementado con 10% de SFB, L- Glutamina, vitaminas y aminoácidos no esenciales. Las células se incubaron a 37°C con 95% de humedad relativa y 5 % de CO<sub>2</sub>. Estas células se fijaron de la siguiente manera: Inicialmente, las células fueron despegadas con 10 ml de EDTA 5mM a 37 °C por 1 hora, las células fueron recuperadas y colocadas en tubos de cultivo de 15 ml, posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS pH 7.0 a 800 g por 5 minutos, se recuperó el precipitado y se le agregó glutaraldehído a una concentración de 2.5 % en PBS (las células deben estar en una densidad de 5 x 10<sup>6</sup>/ml) y se mantuvieron por 1 hora a 4°C con agitación manual cada 10 minutos, después se realizaron 5 lavados con PBS, a 800 g por 5 minutos, posteriormente se realizó un bloqueo con Glicina 0.2 M por 1 hora a temperatura ambiente en la misma proporción que el glutaraldehído. Finalmente se lavaron 5 veces con PBS y 3 veces con buffer TDSET (10 mM Tris-Hcl pH 7.0, 10 mM EDTA, 0.2 % deoxicolato, 0.1% SDS y 1% tritón X-100). Las células fueron almacenadas a -20°C en alícuotas de 1x10<sup>6</sup> células en 200 µl de buffer TDSET hasta su uso. Todo el procedimiento de fijación se realizó en material siliconizado (Arroyo y Alderete, 1995).

### **IX.7.2. Ensayo de ligandos con extractos de tripomastigotes.**

Para el ensayo de ligando, 1x10<sup>6</sup> células Vero fijadas previamente fueron puestas a interactuar con 200 µg de extractos de proteína de tripomastigotes, por 18 horas a 4°C en agitación suave. Después de la incubación, las células fueron sometidas a centrifugación 800 g por 10 minutos y se recuperó el sobrenadante (las proteínas que no se unieron). El precipitado obtenido fue lavado 3 veces con 200 µl de buffer TDSET. El precipitado fue eluido con 50 µl de buffer de carga y sometido a 3 minutos de agua en ebullición. Posteriormente, se centrifugó a 2000 g por 10 minutos y el sobrenadante fue cargado en geles de acrilamida al 12% para electroforesis de proteínas SDS-PAGE. Se utilizó un control negativo que fue células Vero sin proteínas.

### **IX.8. Determinación de la concentración de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular en células Vero inducido por extractos de proteínas de tripomastigotes.**

Para medir la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, se utilizó un cultivo confluyente de células Vero que se mantuvo a  $37^\circ\text{C}$  con 95% de humedad relativa y 5 % de  $\text{CO}_2$ . Las células fueron recuperadas y resuspendidas en medio DMEM durante 1 hora a  $37^\circ\text{C}$ . Posteriormente, fueron lavadas a 800 g a  $37^\circ\text{C}$  por 4 minutos con buffer PBS  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  (1.5 mM  $\text{MgCl}_2$  y 1.5 mM  $\text{CaCl}_2$  en PBS), luego se contaron y ajustaron las células a una concentración de final de  $100 \times 10^6$  células/ml. Se incubó la suspensión celular a temperatura ambiente por 5 minutos. Después las células fueron cargadas con 10  $\mu\text{M}$  Fura-2AM (Calbiochem 344905) y se dejó incubar la suspensión celular a temperatura ambiente por 2 horas. Luego ésta suspensión fue diluida con PBS  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  a un volumen 10 veces mayor al inicial. Se realizó una segunda incubación de 20 minutos a temperatura ambiente y posteriormente las células fueron lavadas con 30 ml de PBS  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  a 800 g a  $37^\circ\text{C}$  por 4 minutos. Se resuspendieron las células nuevamente en PBS  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  y fueron incubadas nuevamente por 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se lavaron las células con 30 ml de PBS  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  y se centrifugaron a 800 g a  $37^\circ\text{C}$  por 4 minutos. Se ajustó la concentración de las células a  $1.2 \times 10^6$  células /ml. Se colocaron 2 ml de esta suspensión en la celda y se midió la fluorescencia en un espectrofluorímetro (PerkinElmer LS55) con doble excitación 340 a 380 nm y emisión de 510 nm. A estas células se les agregaron diferentes concentraciones (35 a 400  $\mu\text{g}$ ) de extracto de proteína de tripomastigotes de cada cepa en experimentos independientes, posteriormente, se observó la intensidad de la fluorescencia. Se calibró la lectura con 100  $\mu\text{l}$  Tritón 10% y 500  $\mu\text{l}$  de EDTA 250 mM. Con los datos obtenidos se construyeron gráficas con el programa Prisma Graph Pad 5.0 donde se evaluó las variaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en las células Vero.

### **IX.9. Ensayo de infección con tripomastigotes de las cepas Querétaro y Ninoa en células Vero tratadas con las drogas thapsigargin y wortmannin**

Células Vero en confluencia fueron despegadas y resuspendidas en medio DMEM, para luego ser tratadas con las drogas Thapsigargin 1 $\mu\text{M}$  (Alomone T-650) y Wortmannin 200 nM (Sigma W3144) por 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Posteriormente, las células se colocaron en laminillas de 18 pozos con teflón estériles en una razón de 3000 células en 30  $\mu\text{l}$  por pozo mantenidas en medio DMEM suplementado con 10 % de SFB por 3 horas a  $37^\circ\text{C}$ , 90 % de humedad y 5 % de  $\text{CO}_2$  para permitir la adhesión celular.

Transcurrido este tiempo, las células fueron puestas en contacto con tripomastigotes obtenidos de cultivo en una relación 10:1 parásito-célula para ambas cepas durante 6 horas en las mismas condiciones de temperatura y  $\text{CO}_2$  antes mencionadas. Se utilizó como control positivo células Vero sin ningún pre-

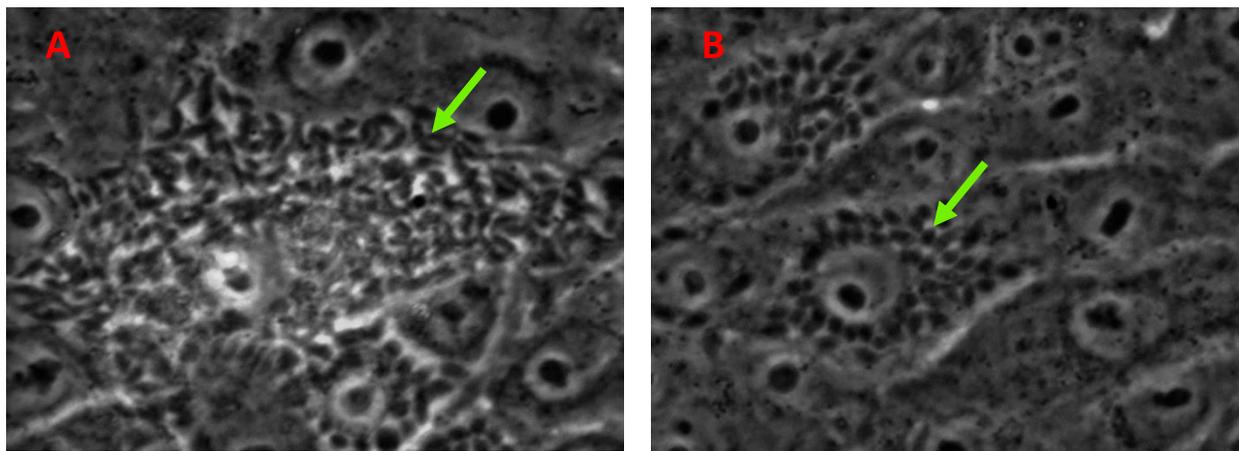
tratamiento. También, se utilizó DMSO al 1% como segundo control debido a que ambas drogas se disolvieron en DMSO. Una vez transcurridos el tiempo de incubación, las laminillas fueron lavadas 3 veces, sumergiéndolas en una caja de Coplin con PBS y posteriormente, sumergidas en 50 ml de metanol absoluto durante 3 minutos. Finalmente, fueron teñidas con la solución de Giemsa (Anexo 1) por un lapso de 15 minutos para su posterior análisis microscópico, donde fueron contados los parásitos intracelulares en 300 células, para calcular el porcentaje de invasión celular y el número de amastigotes intracelulares (Fernandes et al, 2006). Posteriormente, se realizó un análisis estadístico de T-student con los datos obtenidos en el programa Graph Pad Prism 5.0.

## X. RESULTADOS

### X.1. Características de los cultivos de células Vero infectados con tripomastigotes de las cepas Querétaro y Ninoa.

Para la obtención de tripomastigotes a partir del cultivo celular, se recolectó el sobrenadante celular a las 72 horas de cultivo, con un 90 % de movilidad de los parásitos. Los cultivos se encontraron con células en confluencia y en buenas condiciones. En promedio, se obtuvieron 25 millones de parásitos en un volumen de sobrenadante de 40 ml.

Los cultivos de la cepa Querétaro, mostraron las siguientes características: gran cantidad de células infectadas con amastigotes en su interior y muchos parásitos en el sobrenadante, ésta cepa, es muy infectiva, como se observa en la figura 7A. En cuanto a la cepa Ninoa, los cultivos mostraron las siguientes características: células menos infectadas, con pocos amastigotes en su interior; como se observa en la figura 7B. A partir de estos cultivos, se recolectaron los parásitos, los cuales se lavaron con PBS y se congelaron a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  para, posteriormente, hacer el extracto proteico.



**Figura 7.-**Fotografía de células Vero infectadas con cepa Querétaro y Ninoa después de 72 horas de cultivo. (A) Cepa Querétaro, donde se observa una célula muy infectada y con muchos amastigotes intracelulares. (B) Cepa Ninoa. Las fotografías fueron tomadas en un microscopio invertido a 40 x. Las flechas verdes señalan los parásitos.

## X.2. Análisis de las proteínas de los extractos totales y de proteínas de secreción-excreción de tripomastigotes de la cepa Querétaro y Ninoa.

### X.2.1. Obtención y cuantificación de extracto proteico total de tripomastigotes.

Para las cepas Querétaro y Ninoa, se utilizaron entre 500 a 1000 x 10<sup>6</sup> tripomastigotes, para hacer los extractos protéicos. Se tomó una alícuota de cada extracto y se cuantificó la cantidad de proteína, para lo cual, se realizó una curva de calibración con diferentes concentraciones de albumina sérica. Con la curva de calibración, calculamos la cantidad de proteína en los extractos protéicos de tripomastigotes de las cepas Querétaro y Ninoa. Los extractos, presentaron diferentes concentraciones de proteína, como se muestran en la Tabla 1. Algunos extractos, presentaron mayor concentración total de proteína, debido a que se tuvo más experiencia con las condiciones y manejo del material. Con este material, realizamos la electroforesis de proteínas (SDS-PAGE), los ensayos de ligandos y los ensayos de movilización de Ca<sup>2+</sup>.

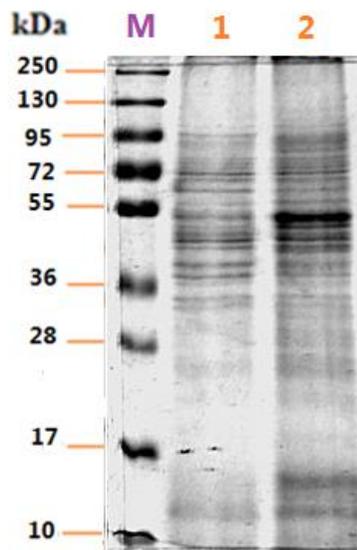
**Tabla 1.-** Cantidad total de proteína (mg/ml) de los extractos protéicos de tripomastigotes de las cepas Querétaro y Ninoa.

Extractos		Concentración total de proteína mg/ml	Concentración total de proteína mg
1	Tripomastigotes Querétaro * 100 x 10 <sup>7</sup>	1.15	2.3
2	Tripomastigotes Querétaro * 600 x 10 <sup>6</sup>	8.38	4.19
3	Tripomastigotes Ninoa * 500 x 10 <sup>6</sup>	2.63	1.32
4	Tripomastigotes Ninoa * 700 x 10 <sup>6</sup>	8.04	4.02

(\*) Cantidad de parásitos utilizados para cada extracto

### X.2.2. Análisis de las proteínas de los extractos totales y de proteínas de secreción-excreción de tripomastigotes mediante electroforesis de proteínas (SDS-PAGE).

Para observar el perfil proteico de los extractos de tripomastigotes de ambas cepas, se realizó una electroforesis de proteínas (SDS-PAGE) en geles de acrilamida al 12%. En la figura 8, se muestran los perfiles protéicos de los extractos de tripomastigotes de las cepas Querétaro y Ninoa. Se observan, unos patrones protéicos similares en los dos experimentos independientes que se realizaron y la presencia de proteínas de diferentes pesos moleculares, que van desde 12 hasta más de 130 kDa; las más evidentes se detallan en la Tabla 2.



**Figura 8.-** Gel de acrilamida al 12% que muestra las proteínas del extracto proteico de tripomastigotes de la cepa Querétaro y Ninoa. Los extractos de proteínas fueron obtenidos por sonicación y se cargó 10  $\mu$ g de cada extracto en la corrida electroforética. En la imagen se muestra: (M) marcadores de peso molecular, (1) extracto de Querétaro, (2) extracto de Ninoa. La imagen es representativa de 2 experimentos independientes.

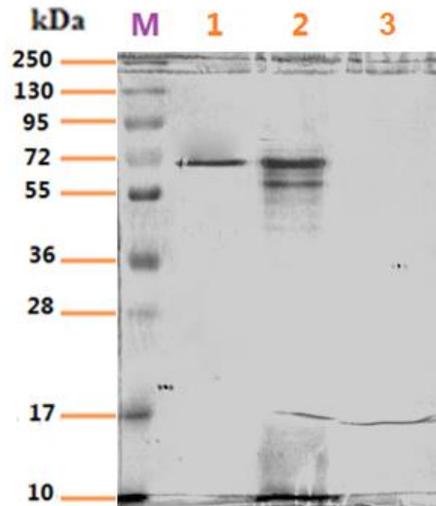
**Tabla 2.-** Proteínas de los extractos protéicos de tripomastigotes de las cepas Querétaro y Ninoa.

	<b>Proteínas de tripomastigotes Ceba Querétaro</b>	<b>Proteínas de tripomastigotes Ceba Ninoa</b>
	<b>kDa</b>	<b>kDa</b>
1	80-95	80-95
2	72-78	72-78
3	* 72	* 72
4	* 70	* 70
5	* 68	68
6	* 65	65
7	-	58
8	*54	*54
9	-	*52
10	50	50
11	*46-48	*46-48
12	-	* 43
13	* 42	42
14	40	40
15	* 38	38
16	-	36
17	*34	*34
18	*33	*33
19	-	30
20	-	24-27
21	-	*14
22	12	*12

(\*) Indicativo de proteína más abundante

Al realizar un análisis de los de los extractos de tripomastigotes de las cepas Querétaro y Ninoa, se identificaron las proteínas más abundantes, siendo estas las de 72, 70, 54, 46-48, 34 y 33 kDa en ambas cepas, también se observaron diferencias en los perfiles protéicos, ya que algunas proteínas como las de 68, 65, 42 y 38 kDa se encuentran más abundantes en la cepa Querétaro que en la cepa Ninoa, por otro lado, las proteínas de 58, 52, 43, 36, 30, 24-27 y 14 kDa son proteínas que sólo se encuentran en la cepa Ninoa.

Para visualizar las proteínas de secreción-excreción de tripomastigotes de ambas cepas, se realizó una electroforesis de proteínas en geles de acrilamida al 12% (figura 9). Las proteínas que conforman el sobrenadante de proteínas de secreción-excreción de las cepas Querétaro y Ninoa, se mencionan en la Tabla 3.



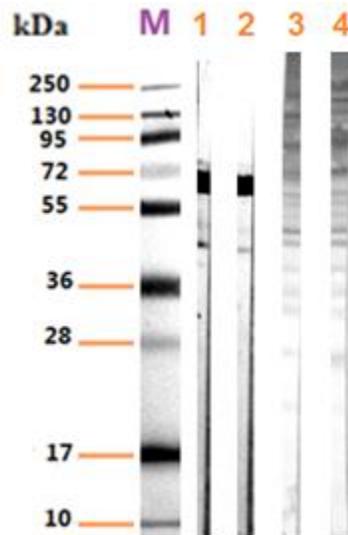
**Figura 9.-** Gel de acrilamida al 12% que muestra las proteínas de secreción-excreción de tripomastigotes de las cepas Ninoa y Querétaro. Los sobrenadantes fueron obtenidos al incubar  $200 \times 10^6$  de parásitos en medio DMEM sin suero durante 1 hora. Se cargaron, 10  $\mu$ l de cada sobrenadante en la corrida electroforética y 10  $\mu$ l de DMEM sin suero como control. En la imagen se muestra: (M) marcadores de peso molecular, (1) Proteínas de secreción - excreción cepa Ninoa, (2) Proteínas de secreción-excreción cepa Querétaro, (3) DMEM control sin suero. Gel teñido con nitrato de plata. La imagen es representativa de 4 experimentos independientes.

**Tabla 3.-** Proteínas de secreción y excreción de tripomastigotes de las cepas Querétaro y Ninoa.

	Proteínas de secreción y excreción	
	Ninoa	Querétaro
	kDa	kDa
1	-	74
2	* 70	*70
3	-	*65
4	-	60
5	-	53
6	-	50

(\*) Indicativo de proteína más abundante

Los sobrenadantes obtenidos, muestran diferencias en su composición. La cepa Querétaro, presenta dos proteínas abundantes de 70 y 65 kDa y las menos abundantes son: 74, 60, 53 y 50 kDa. La cepa Ninoa, presenta sólo una proteína abundante de 70 kDa, la cual; es la más abundante para ambas cepas. Posteriormente, se realizó un ensayo de western blot, para poder detectar mediante anticuerpos a las proteínas de los sobrenadantes. Para esto, la membrana fue incubada con un suero de conejo anti extracto total de proteínas de tripomastigotes de la cepa Querétaro, con la posibilidad de identificar las proteínas antigénicas que están presentes en estos sobrenadantes. En la figura 10, se muestran los resultados obtenidos de un experimento, donde se puede observar una gran cantidad de proteínas antigénicas en ambos sobrenadantes; las más abundantes se mencionan en la Tabla 3. Algunas proteínas como las de 178 y 74 kDa, fueron reconocidas sólo en el sobrenadante de la cepa Querétaro. La membrana se incubó, con el anticuerpo anti-cruzipaína, el cual reconoció una proteína muy intensa de un peso de 70 kDa en ambas cepas.



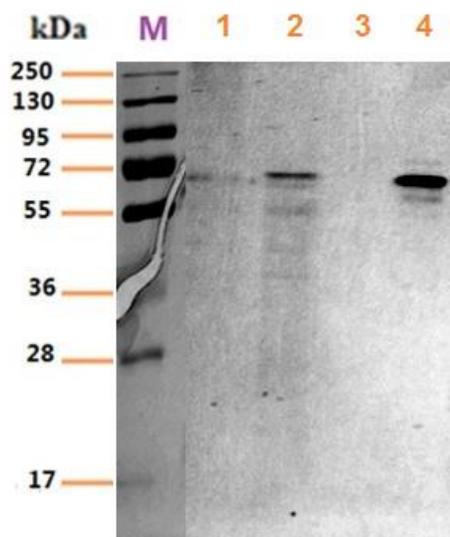
**Figura 10.-** Western blot para detectar cruzipaína y proteínas antigénicas en productos de excreción-secreción de tripomastigotes de la cepa Querétaro y Ninoa. Se cargó en un gel 10  $\mu$ l de sobrenadantes de proteínas de excreción-excreción de tripomastigotes y se transferido a membrana de nitrocelulosa. En la imagen se muestra: (M) marcadores de peso molecular, (1) Proteínas de secreción-excreción cepa Ninoa y anticuerpo anti-cruzipaína, (2) Proteínas de secreción-excreción cepa Querétaro y anticuerpo anti-cruzipaína, (3) Proteínas de secreción-excreción cepa Ninoa y suero anti-tripomastigote total, (4) Proteínas de secreción-excreción cepa Querétaro y suero anti-tripomastigote total. En todos los casos se utilizó como segundo anticuerpo un anti-Ig G de conejo asociado a HRP.

**Tabla 4.-** Proteínas antigénicas de secreción y excreción de tripomastigotes de las cepas Querétaro y Ninoa

	<b>Proteínas antigénicas de secreción y excreción</b>	
	<b>Ninoa</b>	<b>Querétaro</b>
	<b>kDa</b>	<b>kDa</b>
<b>1</b>	250	250
<b>2</b>	-	178
<b>3</b>	100	100
<b>4</b>	-	74
<b>5</b>	60	60
<b>6</b>	53	53
<b>7</b>	50	50
<b>8</b>	42	42
<b>9</b>	39	39
<b>10</b>	36	36
<b>11</b>	34	34
<b>12</b>	21	21

**X.3. Proteínas del extracto proteico total de tripomastigotes de las cepas Querétaro y Ninoa que interactúan con la superficie de las células Vero.**

Realizamos los ensayos de ligandos, para saber que proteínas de los extractos de tripomastigotes estaban interactuando con las células del hospedero. Se pusieron a interactuar 200 µg de extractos protéicos de tripomastigotes ó 50 µl de sobrenadante de proteínas de excreción y secreción de las cepas Querétaro y Ninoa, con  $1 \times 10^6$  de células Vero previamente fijadas. Las proteínas que se unieron a las células fueron eluidas con buffer de carga y cargadas en un gel de acrilamida al 12%. Para observar los resultados, los geles fueron teñidos con nitrato de plata. Posteriormente, se analizaron los geles de 4 experimentos independientes. Las proteínas del extracto total de las cepas Querétaro y Ninoa que interactúan con las células Vero, se pueden observar en la figura 11 y figura 12.

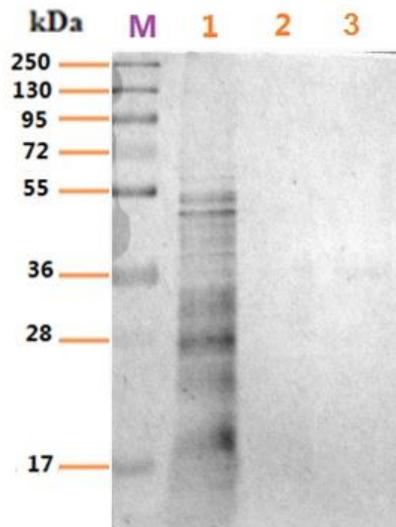


**Figura 11.** - Gel de acrilamida al 12 % teñido con plata donde se muestran los resultados del ensayo de ligandos de extracto de tripomastigote y proteínas de excreción-secreción de la cepa Querétaro con células Vero. Se cargó en el gel 15  $\mu$ l de cada elución. En la imagen se muestra: (M) marcadores de peso molecular, (1) control de ligado de células Vero sin proteína, (2) ligando de células Vero con extracto de tripomastigotes cepa Querétaro, (3) carril vacío (4) ligado de células Vero con proteínas de secreción y excreción cepa Querétaro. Gel teñido con nitrato de plata. La imagen es representativa de 4 experimentos independientes.

Las proteínas de tripomastigotes de la cepa Querétaro que se unieron a las células Vero, tienen los siguientes pesos moleculares 70, 65, 54, 50 y 40 kDa, la proteína de 70 kDa, es la que se observa con mayor intensidad (figura 11, carril 2). En el caso de las proteínas de excreción-secreción se unieron las siguientes proteínas 74, 70 y 65 kDa.

Las proteínas del extracto total de tripomastigote de la cepa Ninoa que se unieron a las células Vero, fueron 54, 52, 50, 48, 40, 36 y 30 kDa como se observa en la figura 12, carril 1. Sólo se consideraron las proteínas que se ligaron a las células en al menos 3 experimentos de 4 experimentos independientes en total. Las proteínas más abundantes fueron 54 y 52 kDa. Las proteínas de 40 y 50 kDa se encuentran en ambas cepas. En el caso de los experimentos de ligandos con sobrenadantes de excreción y secreción de la cepa Ninoa, no se unió ninguna proteína.

Es posible que las proteínas que se unieron a las células activen vías de señalización al interactuar con la célula hospedero; estas señales intracelulares podrían llevar a la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$ , para la posterior internalización del parásito a la célula hospedero.



**Figura 12.-** Gel de acrilamida al 12 % se muestran los resultados del ensayo de ligandos de extracto de tripomastigote y proteínas de excreción y secreción de la cepa Ninoa con células Vero. Se cargó en el gel 15  $\mu$ l de cada elución. En la imagen se muestra: (M) marcadores de peso molecular, (1) ligado de células Vero con extracto de tripomastigotes cepa Ninoa, (2) ligado de células Vero con proteínas de secreción y excreción cepa Ninoa. (3) ligando de células sin proteína. Gel teñido con nitrato de plata. La imagen es representativa de 4 experimentos independientes.

#### **X.4. Movilización de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular en células Vero inducido por diferentes concentraciones de proteínas de extractos totales de tripomastigotes de las cepas Querétaro y Ninoa.**

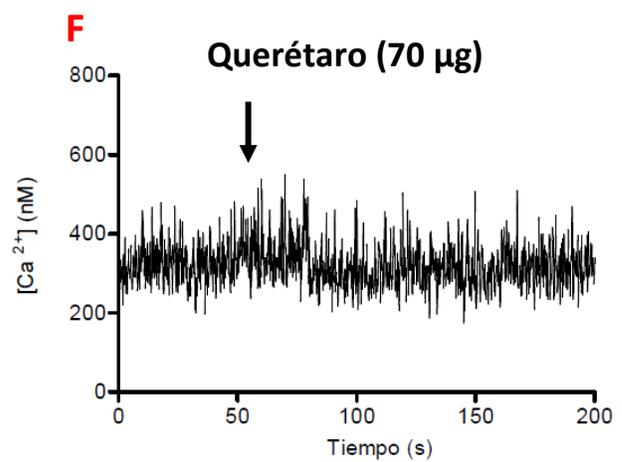
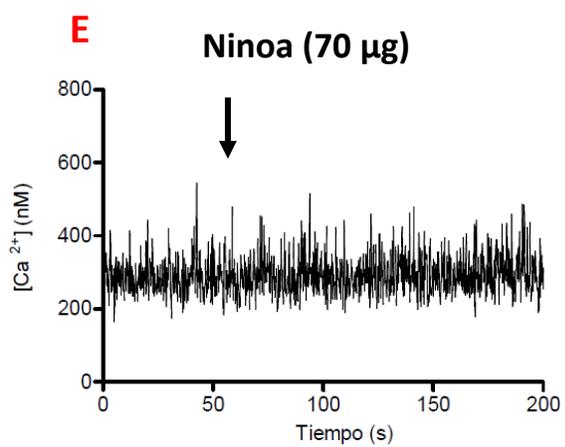
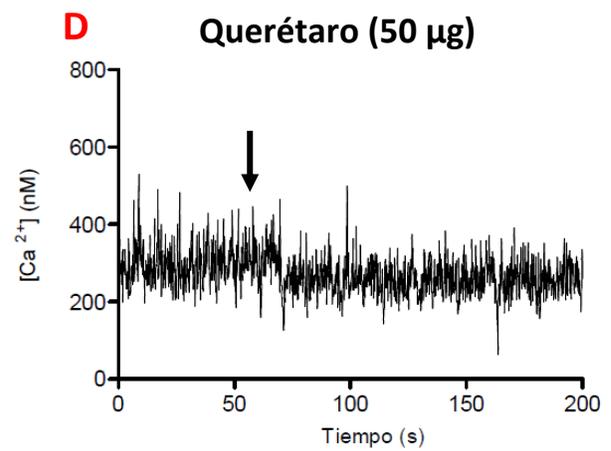
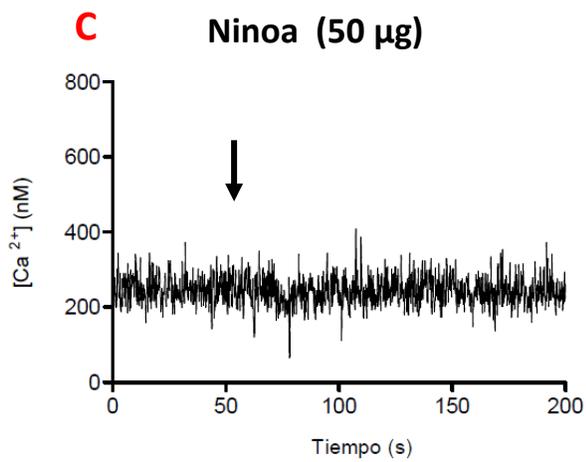
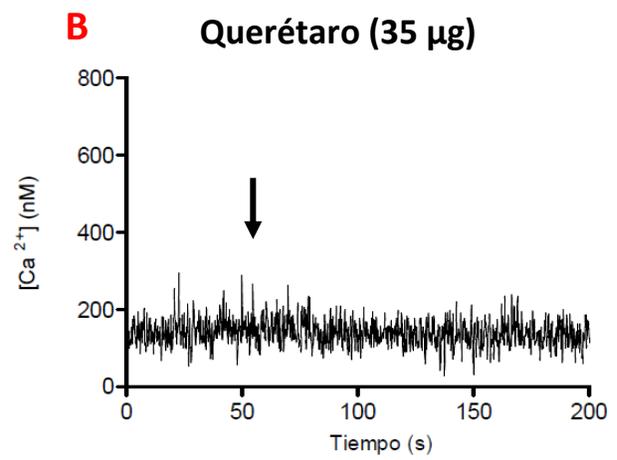
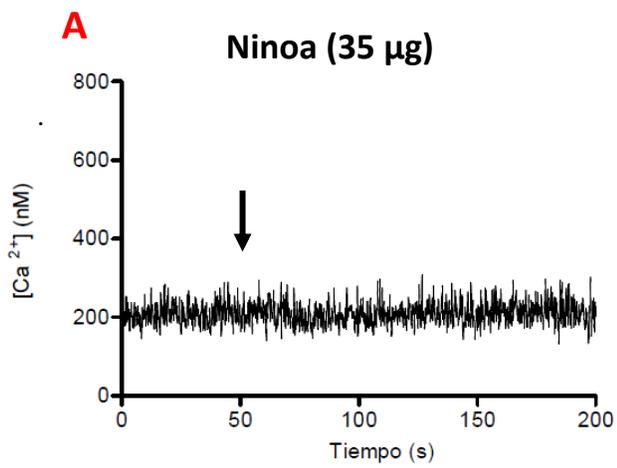
Para realizar los ensayos de movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, se realizó en una primera etapa una estandarización del ensayo para el cargado del indicador Fura 2-AM en las células Vero, ya que las condiciones de cargado y de incubación del Fura 2-AM, varían entre líneas celulares. Se realizaron varios ensayos a diferentes temperaturas y tiempos, siendo las condiciones óptimas de calibración del ensayo las siguientes: 2 horas de incubación con Fura 2-AM a temperatura ambiente (22 °C).

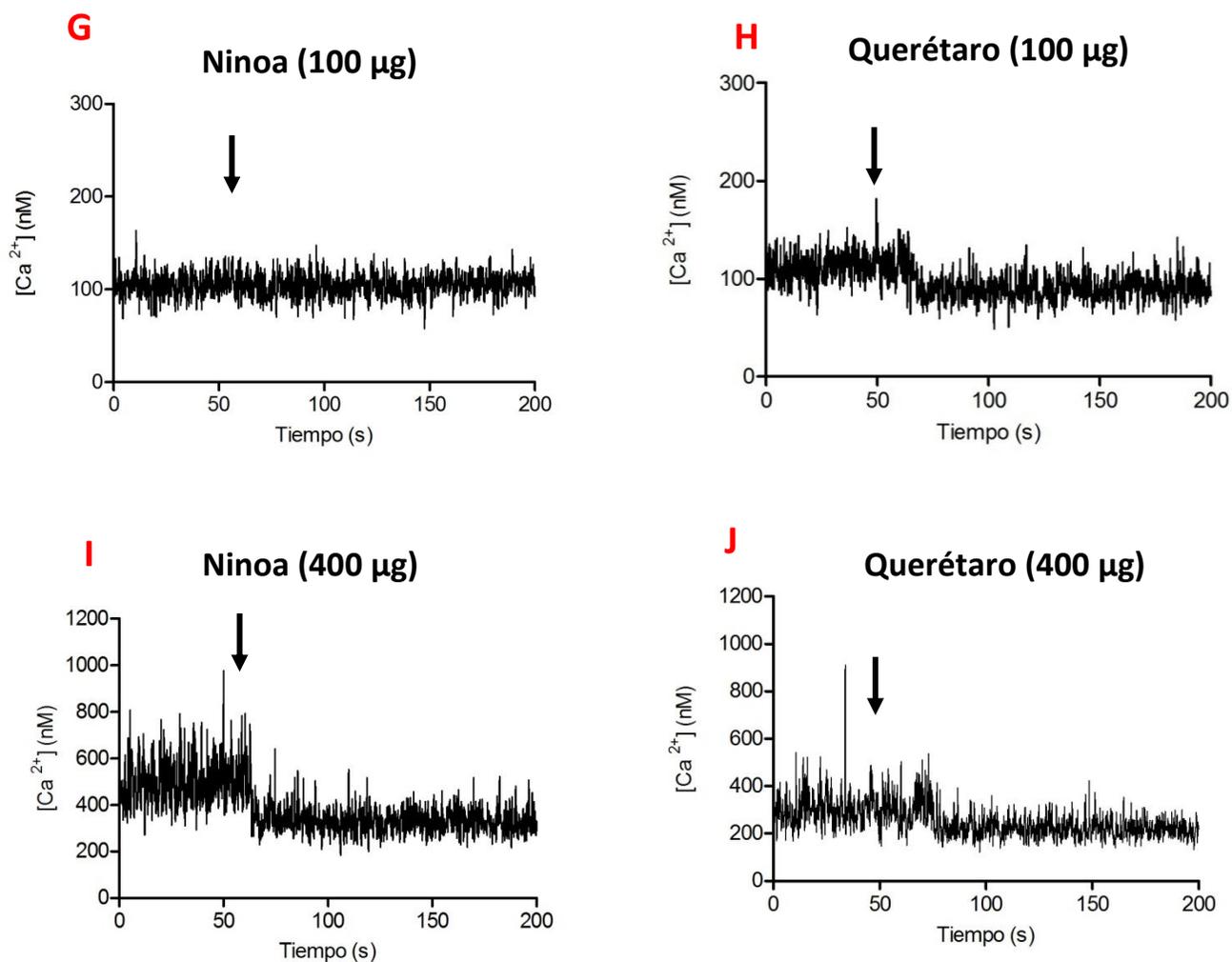
Con las condiciones ya establecidas, se realizaron ensayos comparativos, con diferentes concentraciones de los extractos protéicos obtenidos de tripomastigotes de ambas cepas. Las primeras concentraciones que se usaron fueron las de 10, 15, 20 y 35  $\mu$ g, donde no se observó ninguna alteración en la concentración basal de  $\text{Ca}^{2+}$  al inducir con los extractos de ambas cepas, por lo que se decidió aumentar la concentración de extracto. Los resultados obtenidos del estudio comparativo nos indicaron, que con 50, 70 y 100  $\mu$ g de extracto de tripomastigotes de la cepa Querétaro, se logró observar un aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular de  $60 \text{ nM} \pm 5.5$ ,  $72 \text{ nM} \pm 3.2$  y  $74 \text{ nM} \pm 2.8$ , respectivamente; sobre la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  basal, no se observó ninguna variación de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  basal, cuando se utilizaron las mismas concentraciones de extracto de la cepa Ninoa.

Las gráficas donde se observan estas variaciones, son representativas de 3 ensayos independientes, las cuales se muestran a continuación en la figura 13 A-H.

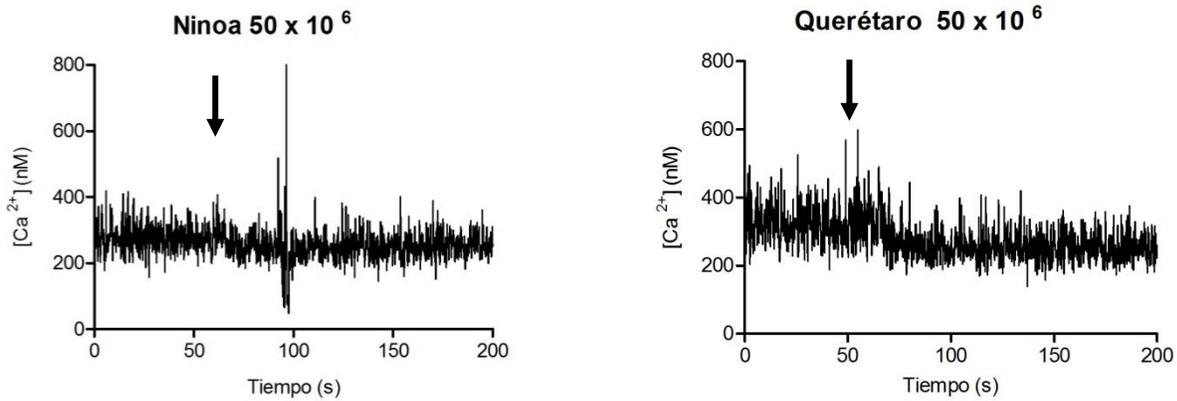
Posteriormente, se decidió incrementar la concentración de los extractos, para llegar a determinar si a mayor concentración de las proteínas presentes en los extractos, podríamos observar un mayor incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, por lo que se decidió utilizar una concentración de 400  $\mu\text{g}$ . Los resultados nos indicaron que con esta concentración de extracto se llegó a observar una elevación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular mayor de hasta 120 nM sobre la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  basal en el caso de cepa Querétaro. En el caso de la cepa Ninoa, se observó una elevación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular de hasta 100 nM con respecto a la concentración basal, al aumentar la concentración de extracto a 400  $\mu\text{g}$ , como se observa en la figura 13 I-J.

La concentración de 400  $\mu\text{g}$  con ambas cepas, indujo en las células un aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, que se asemeja a los incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular reportados para otras cepas de *T. cruzi* sudamericanas, los cuales indicaban que, con un extracto de  $50 \times 10^6$  de parásitos, logran observar un incremento de la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular de hasta 150 nM; en estos reportes no mencionan una concentración específica. Por lo que decidimos realizar un ensayo similar con las cepas mexicanas. Se obtuvieron  $50 \times 10^6$  de parásitos para ambas cepas, los cuales fueron resuspendidos en un volumen de 50 a 60  $\mu\text{l}$  de buffer Tris y sometidos a sonicación en las condiciones mencionadas en materiales y métodos para preparar extracto de tripomastigotes. Los extractos de  $50 \times 10^6$  de parásitos, fueron agregados a células cargadas con Fura 2-AM y se observó un incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  de hasta 130 nM en las células que fueron inducidas con el extracto de la cepa Querétaro. En cuanto al experimento con el extracto de la cepa Ninoa, no se observó ninguna alteración de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  basal, como se observa en la figura 14. Estas diferencias observadas con ambas cepas nos indican que estas presentan diferencias en cuanto a la vía de invasión dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y que la cepa Querétaro está más involucrada con la vía de  $\text{Ca}^{2+}$  en comparación con la cepa Ninoa (Tabla 5).



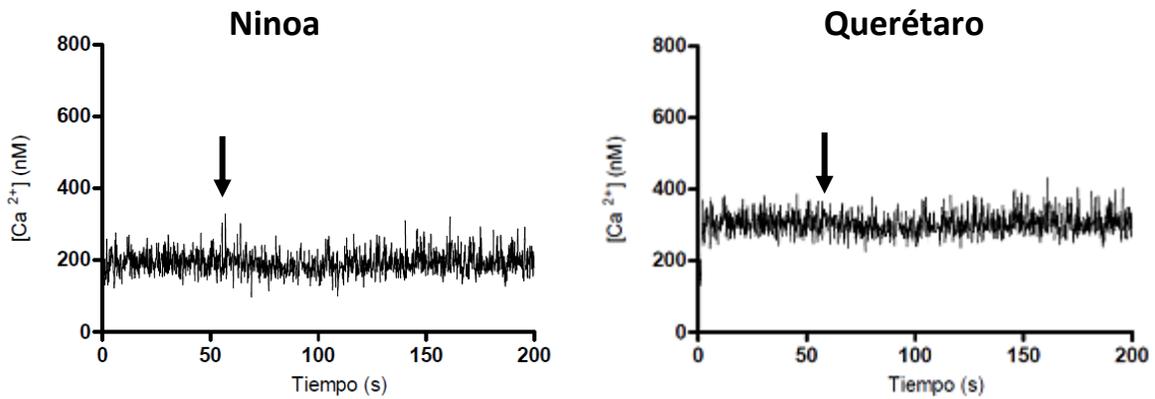


**Figura 13.-** Gráfica del movimiento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular inducido por extracto de tripomastigotes de la cepa Querétaro y Ninoa en células Vero. Diferentes cantidades de extracto proteico total (35, 50, 70, 100 y 400 µg) de ambas cepas fueron añadidos a células Vero vivas cargadas con Fura 2 AM. En las gráficas: (A y B) Células Vero inducidas con 35 µg de extractos de ambas cepas, (C y D) Células Vero inducidas con 50 µg de extracto de ambas cepas, (E y F) Células Vero inducidas con 70 µg de extracto de ambas cepas, (G-H) Células Vero inducidas con 100 µg de extracto de ambas cepas, (I-J) Células Vero inducidas con 400 µg de extracto de ambas cepas. Las gráficas son representativas de 3 experimentos independientes. Las flechas indican el momento cuando se agregó el extracto.

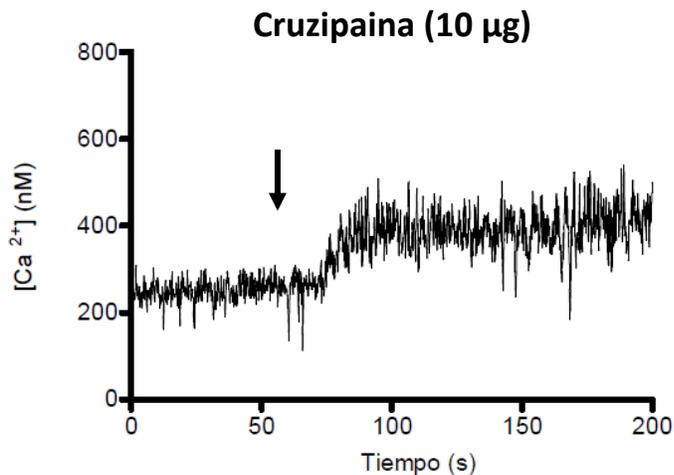


**Figura 14.-** Gráfica del movimiento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular inducido por extracto de  $50 \times 10^6$  de tripomastigotes de la cepa Querétaro y Ninoa en células Vero. El extracto de  $50 \times 10^6$  parásitos fue añadido a las células Vero vivas cargadas con Fura 2 AM. Las flechas indican el momento cuando se agregó el extracto.

Para comprobar que el incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular era inducido por los extractos de tripomastigotes, se realizaron ensayos de movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  con extractos de epimastigotes, con los cuales no se observó ninguna alteración de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  basal, al inducir con  $50 \mu\text{g}$  de extracto de epimastigote para ambas cepas. Esta respuesta era de esperarse, debido a que, se ha reportado que los epimastigotes por ser la fase no infectiva, no mueven  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en la célula hospedero (figura 15). El control positivo que se usó en los ensayos fue la cruzipaína; hay reportes que indican que ésta proteína, participa en el proceso de invasión y está involucrada en la activación de la vía de señalización que lleva a la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en la célula del hospedero. Al realizar ensayos con esta proteína, se observó un aumento significativo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular de hasta  $200 \text{ nM}$  con respecto a la concentración basal, cuando se indujo a las células vero con  $10 \mu\text{g}$  de proteína, como se muestra en la figura 16.



**Figura 15.-** Gráfica del movimiento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular inducido por extracto de epimastigotes de la cepa Querétaro y Ninoa en células Vero. Una cantidad de 50  $\mu\text{g}$  de extracto sonicado de epimastigotes de ambas cepas fue añadido a células Vero vivas cargadas con Fura 2 AM. La grafica es representativa de 3 experimentos independientes. Las flechas indican el momento cuando se agregó el extracto.



**Figura 16.-** Gráfica del movimiento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular inducido por la proteína Cruzipaina en células Vero. Una cantidad de 10  $\mu\text{g}$  de proteína purificada de la cepa Querétaro fueron añadidos a células Vero vivas cargadas con Fura 2 AM. La grafica es representativa de 2 experimentos independientes. Las flechas indican el momento cuando se agregó el extracto.

En otro ensayo de movimiento de  $\text{Ca}^{2+}$ , las células Vero fueron inducidas con proteínas de secreción y excreción de tripomastigotes los cuales generaron unas variaciones en las señales de longitud de onda del espectrofluorímetro cuando se les agregaron 50  $\mu\text{l}$  de los sobrenadantes. Estas variaciones hicieron imposible la calibración del ensayo de  $\text{Ca}^{2+}$  y por tal motivo no se pudo construir una gráfica.

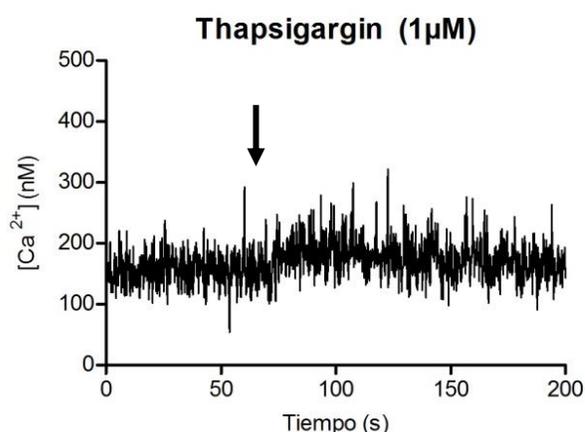
**Tabla 5.-** Concentraciones máximas de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular inducidas por extractos de tripomastigotes

Extractos	Concentraciones de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular (nM)	
	Ninoa	Querétaro
35 $\mu\text{g}$	-	-
50 $\mu\text{g}$	-	$60 \pm 5.5$
70 $\mu\text{g}$	-	$72 \pm 3.2$
100 $\mu\text{g}$	-	$74 \pm 2.8$
400 $\mu\text{g}$	* 100	* 120
$50 \times 10^6$	-	* 130

(-) No se observó ninguna variación de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  basal. (\*) Datos de un sólo experimento realizado.

#### **X.5. Ensayo de infección con tripomastigotes de las cepas Querétaro y Ninoa en células Vero tratadas con las drogas thapsigargin y wortmannin**

Se analizaron mediante ensayos de infección con tripomastigotes de las cepas Querétaro y Ninoa, las vías de invasión relacionadas con la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  y con PI3 cinasa en células Vero, las cuales fueron incubadas con dos drogas que han sido reportadas como inhibidores de dos de las principales vías de invasión de *T. cruzi* a la célula del hospedero. Se utilizó la droga thapsigargin, porque ha sido ampliamente usada como inhibidor de la vía de  $\text{Ca}^{2+}$ . Su actividad se pudo comprobar al realizar un ensayo de movimiento de  $\text{Ca}^{2+}$ , en el cual a células cargadas con Fura 2 AM, se les añadió la droga thapsigargin a una concentración de  $1\mu\text{M}$  y se observó un incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ , como se observa en la figura 17.



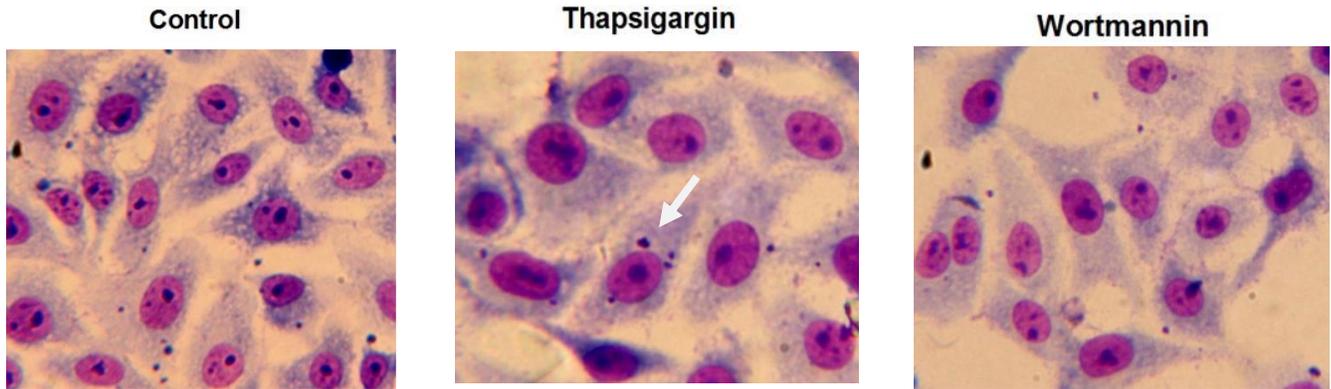
**Figura 17.-** Gráfica del movimiento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular inducido por la droga thapsigargin  $1\mu\text{M}$  en células Vero.  $2\mu\text{l}$  de la droga thapsigargin a  $1\mu\text{M}$  fue añadido a células Vero vivas cargadas con Fura 2 AM.

También utilizamos la droga wortmannin que esta reportada como inhibidor de la vía independiente de lisosomas inhibiendo la formación de PI3 cinasa en el sitio de entrada del parásito.

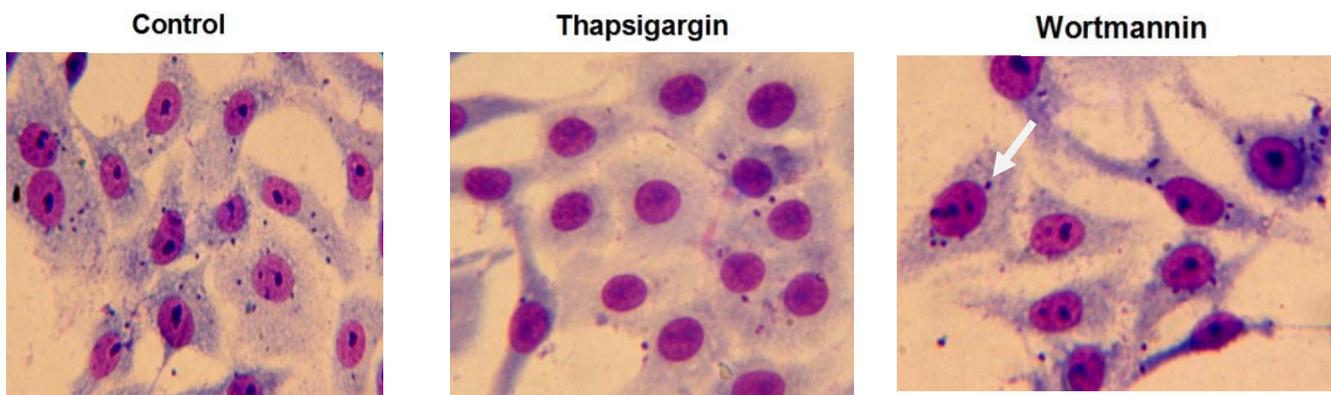
Los ensayos de invasión fueron realizados con tiempos de incubación de 6 horas post-infección, ya que a ese tiempo el porcentaje de infección es mayor y podríamos observar alguna diferencia significativa si este porcentaje disminuye por acción de las drogas. Después de la incubación de 6 horas, las células fueron fijadas y teñidas para posteriormente, contar el número de células infectadas y el número de parásitos intracelulares en 300 células. Se realizaron 6 ensayos independientes con la droga thapsigargin y 3 ensayos con la droga wortmannin, los resultados obtenidos de este estudio mostraron, que las células Vero tratadas con la droga thapsigargin se infectaron menos con la cepa Querétaro y el porcentaje de infección disminuyó significativamente un 15 % con respecto al control. Con la cepa Ninoa no se observó ninguna alteración de su porcentaje de infección. En cuanto a las células tratadas con la droga wortmannin e infectadas con la cepa Ninoa, se observó una disminución del porcentaje de infección significativa de 11 % con respecto al control, en tanto, la cepa Querétaro no vio afectada su infectividad como se observa en las figuras 18 y 19.

El número de amastigotes intracelulares, también se vio afectado de diferente manera para ambas cepas como se observa en las figuras 18 y 19. El número de amastigotes intracelulares de la cepa Querétaro, disminuyó en las células tratadas con la droga thapsigargin, pero no se observaron cambios significativos en las células tratadas con la droga wortmannin. Contrario a este comportamiento, en las células tratadas con la droga wortmannin e infectadas con la cepa Ninoa, se observó una leve disminución de los parásitos intracelulares, pero esta disminución no fue significativa. No se observaron cambios significativos en el número de amastigotes de la cepa Ninoa, en células tratadas con la droga thapsigargin.

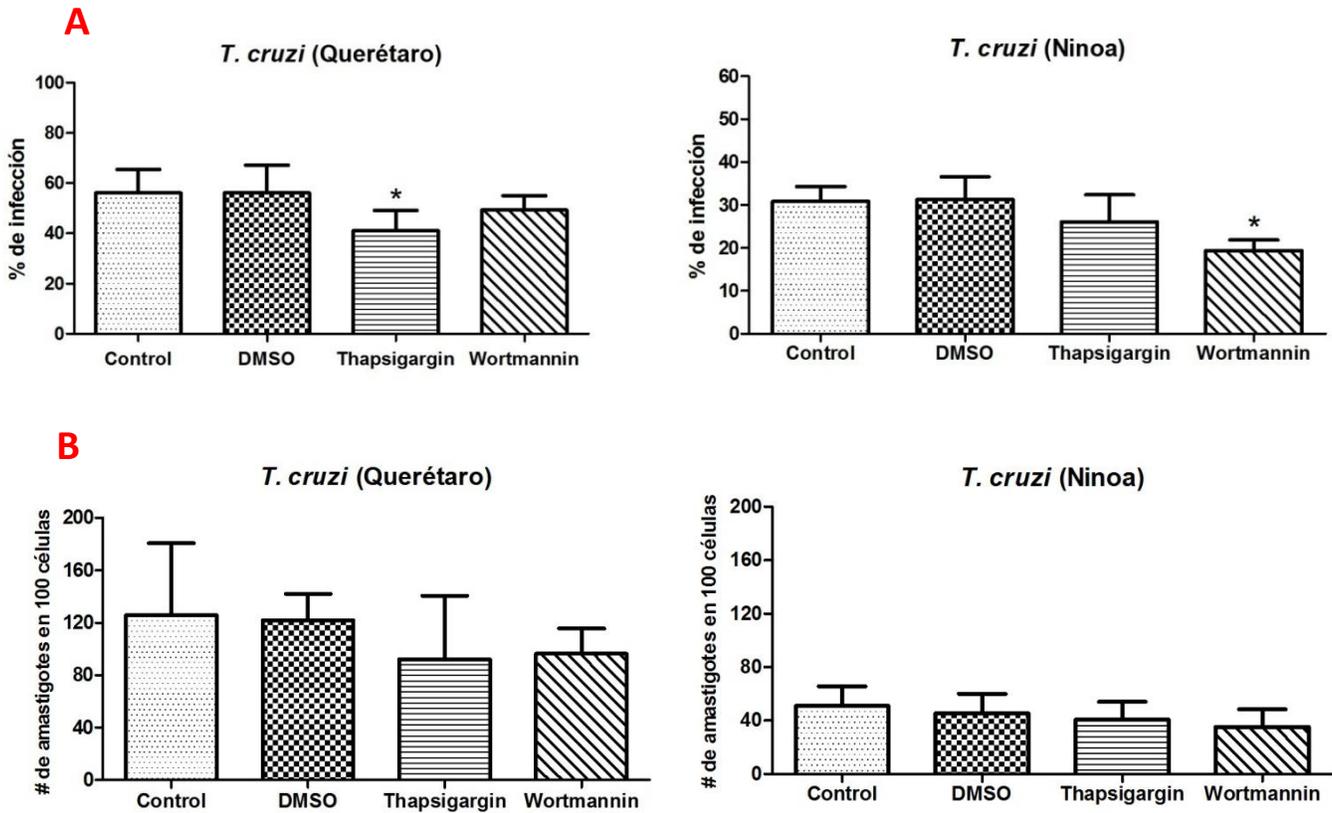
**A** *T. cruzi* (Ninoa)



**B** *T. cruzi* (Querétaro)



**Figura 18.-** Fotografías microscópicas de los ensayos de infección de células Vero tratadas con las drogas thapsigargin y wortmannin e infectadas con la cepas de *T. cruzi* Querétaro y Ninoa. Las células Vero fueron tratadas con  $1\mu\text{M}$  de thapsigargin y  $1\text{nM}$  de wortmannin y puestas en laminillas, a razón de 3000 células por pozo, posteriormente fueron infectadas en una relación 10:1 parásito-célula con tripomastigotes de las cepas Ninoa y Querétaro durante 6 horas. Transcurrido este tiempo las laminillas fueron fijadas y teñidas con Giemsa. (A) Ensayos de invasión con la cepa Ninoa, control DMSO 1%, droga thapsigargin, droga wortmannin, (B) ensayos de invasión con la cepa Querétaro, control DMSO 1%, droga thapsigargin, droga wortmannin. Las fotografías fueron tomadas en microscopio óptico a 32 x. Las flechas blancas señalan los parásitos.



**Figura 19.-** Ensayos de infección de células Vero tratadas con las drogas thapsigargin y wortmannin e infectadas con la cepas de *T. cruzi* Querétaro y Ninoa. Las células Vero fueron tratadas con 1 $\mu$ M de thapsigargin y 1nM de wortmannin. Posteriormente las células fueron infectadas en una relación 10:1 parásito-célula con tripomastigotes de las cepas Ninoa y Querétaro durante 6 horas. El número de células infectadas y el número de parásitos intracelulares fue contado en 100 células teñidas con Giemsa. (A) Porcentaje de infección de las células Vero tratadas con las drogas e infectadas con la cepa Ninoa y Querétaro (B) Número de amastigotes contados en 100 células tratadas con las drogas e infectadas con la cepa Querétaro y Ninoa. Los valores son el promedio  $\pm$  SD de 6 experimentos independientes para la droga thapsigargin y de 3 experimentos independientes para la droga wortmannin. El asterisco indica las diferencias significativas con respecto al control (\* $p < 0.05$ ).

## XI. DISCUSIÓN

Los mecanismos por los cuales el parásito flagelado *T. cruzi* invade a las células hospedero, está tomando gradualmente mayor interés, nuevos descubrimientos están llevando a un mejor entendimiento del proceso de invasión de este parásito intracelular, el cual puede invadir tanto células no fagocíticas como fagocíticas; empleando diferentes vías de invasión.

Una de las vías de invasión más estudiada, es la vía dependiente de lisosomas, la cual, activa la vía de señalización que lleva a la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en la célula del hospedero. Por estas razones, se consideró de interés, realizar un estudio del proceso de invasión dependiente de la activación de la vía de  $\text{Ca}^{2+}$  para las cepas de *T. cruzi* mexicanas Querétaro y Ninoa, las cuales pertenecen al mismo grupo genético TCI, pero presentan características diferentes tanto en su virulencia, en su infectividad como en su expresión de proteínas (Espinoza et al., 2010). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo de investigación fue conocer si el proceso de invasión llevado a cabo por estas dos cepas, depende de la activación de la vía de  $\text{Ca}^{2+}$  y de esta manera, tener un mayor conocimiento acerca del proceso de invasión de estas cepas.

El proceso de invasión se inicia con la adhesión, esto lleva a que muchas moléculas del parásito interactúen con los receptores de la célula hospedero. Para conocer que proteínas de las cepas de *T. cruzi* Querétaro y Ninoa están interactuando con la superficie de las células Vero, se obtuvieron extractos totales de proteínas de tripomastigote de ambas cepas. En éstos extractos se observaron diferencias como la presencia de las proteínas de 58, 52, 43, 36, 30, 24-27 y 14 kDa que se encuentran solamenté en el extracto de la cepa Ninoa y las proteínas 68, 65, 42 y 38 kDa que se encuentran más abundantes en la cepa Querétaro que en la cepa Ninoa. Estos extractos, fueron utilizados para realizar ensayos de ligando con células Vero, los cuales mostraron que 5 proteínas del extracto de la cepa Querétaro de pesos moleculares de 70, 65, 54, 50 y 40 kDa, interactúan con la superficie de la célula hospedero. Para la cepa Ninoa, fueron 7 proteínas de pesos moleculares de 54, 52, 50, 48, 40, 36 y 30 kDa las que interactuaron con la superficie de las células Vero. Estas proteínas, podrían tener un papel importante en el proceso de invasión, ya que al interactuar, con receptores de la célula hospedero podrían activar vías de señalización, como la vía de movilización de  $\text{Ca}^{2+}$ , que lleva al proceso de invasión del parásito a la célula hospedero.

Recientemente se ha prestado atención a las proteínas de excreción y secreción de tripomastigotes, porque al parecer, estas proteínas participan en el proceso de invasión a la célula hospedero; por ejemplo: las proteínas MASP (Osuna et al., 2011). Por tal motivo, se obtuvieron sobrenadantes de proteínas de excreción-secreción de tripomastigotes de ambas cepas. Los sobrenadantes obtenidos de ambas cepas, mostraron diferencias en su composición, la cepa Querétaro presentó dos proteínas abundantes de 70 y

65 kDa y otras menos abundantes de 74, 60, 53 y 50 kDa, mientras que la cepa Ninoa sólo presentó una única proteína abundante de 70 kDa.

Para poder identificar a la cruzipaína en las proteínas de secreción-excreción de ambas cepas, se realizó un western blot utilizando el anticuerpo anti-cruzipaína. Los resultados mostraron que la proteína de 70 kDa (que se encuentra muy abundante en ambas cepas), fue reconocida por este anticuerpo y esta proteína es una de las principales proteínas secretadas por *T. cruzi*; además está implicada en el proceso de invasión mediante la activación de la vía de señalización de  $Ca^{2+}$ .

La cruzipaína, es una cisteín proteasa capaz de romper, mediante hidrólisis, a los kinínogenos, generando kininas, que se unen a receptores de proteínas G y receptores B2 de bradikinas ( $B_2R$ ). Esta activación lleva a un aumento de IP3, por consiguiente, al incremento de  $Ca^{2+}$  en la célula hospedero (Scharfstein et al., 2000). Las proteínas antigénicas presentes en los sobrenadantes de secreción-excreción de ambas cepas, fueron detectadas con un suero anti extracto total de proteínas de tripomastigotes, el cual, reconoció una gran cantidad de proteínas en ambos sobrenadantes. Estas proteínas no aparecen en el gel de acrilamida, esto puede deberse a que la concentración de estas proteínas es muy baja, pero el parásito las está secretando y pudieron ser detectadas con la sensibilidad y especificidad de los anticuerpos en el suero.

Los ensayos de ligando realizados en este trabajo con proteínas de secreción y excreción de la cepa Querétaro, mostraron que las proteína de 74, 70 y 65 kDa están interactuando con la superficie de las células Vero, siendo la proteína de 70 kDa la cruzipaína. Esta proteína, estaría interactuando con algún receptor de la célula hospedero y podría estar activando la vía de  $Ca^{2+}$ . Por tal razón, se utilizó la cruzipaína previamente purificada de la cepa Querétaro en ensayos de movimiento de  $Ca^{2+}$ , observando un incremento significativo de  $Ca^{2+}$  intracelular de 200 nM, cuando se indujo a las células vero con 10  $\mu$ g de cruzipaína. Este incremento de  $Ca^{2+}$ , podría ser inducido por la interacción directa de la cruzipaína o por las kininas que genera.

El incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular inducido por cruzipaína, fue reportado por Scharfstein en el 2000, en donde menciona que las células estarían secretando el sustrato para la generación de Kininas y estas estarían desencadenando la movilización de  $Ca^{2+}$  intracelular, pero a la vez mencionan que podría haber otras formas de interacción de la cruzipaína. No hay reportes de una interacción directa de la cruzipaína con algún receptor de la célula hospedero, pero no se descarta esta posibilidad. Por lo tanto, sería de interés desarrollar una investigación más profunda de la forma en que esta interactuando directamente la cruzipaína de la cepa Querétaro con la célula hospedero, para llegar a comprender mejor este fenómeno. En el caso de la cepa Ninoa, la proteína de secreción y excreción de 70 kDa, que también es cruzipaína,

no se ligó a las células Vero, posiblemente, debido a la presencia de un antagonista en el sobrenadante de la cepa Ninoa, como es el caso del inhibidor chagasin (inhibidor reversible de las cisteín proteasas), que puede afectar la unión y función de la cruzipaina (Scharfstein et al., 2008).

Después de analizar las proteínas que están interaccionando con la superficie de las células Vero y que posiblemente estén activando vías de señalización en la célula hospedero, se investigó la vía de invasión dependiente de lisosomas asociada a la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. En este caso, se ha reportado que extractos de tripomastigotes metacíclicos, amastigotes y tripomastigotes de cultivo incrementan la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en diferentes concentraciones. Esto se debe, a que presentan diferentes proteínas de superficie, como es el caso de la gp82 (que se ha reportado que está implicada en la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  en tripomastigotes metacíclicos) (Neira et al., 2006). También se ha descrito, en otras investigaciones que otras moléculas del parásito inducen la activación de la vía de  $\text{Ca}^{2+}$  como la oligopeptidasa B (Burleight y Woolse, 2002). Por lo tanto, en la presente investigación, se utilizaron diferentes concentraciones de extractos totales de proteínas de las cepas Querétaro y Ninoa de la fase tripomastigote, para realizar ensayos de movilización de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Los ensayos de movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  mostraron que al inducir a las células Vero con bajas concentraciones de 10, 15, 20 y 35  $\mu\text{g}$  de extracto, no se observó ninguna alteración de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  basal de las células con ninguna de las cepas, por lo que, se decidió aumentar la concentración de extracto a 50, 70 y 100  $\mu\text{g}$ . Los resultados obtenidos, nos indicaron que a concentraciones de 50, 70 y 100  $\mu\text{g}$  de extracto de tripomastigotes de la cepa Querétaro, se logró observar un aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en las células Vero de  $60 \text{ nM} \pm 5.5$ ,  $72 \text{ nM} \pm 3.2$ ,  $74 \text{ nM} \pm 2.8$ , respectivamente, sobre la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  basal, pero tal efecto no se observó cuando se utilizaron las mismas concentraciones de extracto de la cepa Ninoa (figura 13, C-H).

Posteriormente, se decidió incrementar la concentración de extracto, e inducir las células con una concentración de 400  $\mu\text{g}$  de extracto de ambas cepas. Los resultados mostraron, una elevación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular de 120 nM en las células Vero, al ser inducidas por el extracto de la cepa Querétaro. En el caso de la cepa Ninoa, se observó una elevación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular de hasta 100 nM con respecto a la concentración basal. Este incremento nos estaría indicando, que las proteínas implicadas en la activación de la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular se encuentran en muy baja concentración en ésta cepa y por este motivo, no se había logrado observar ningún incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  a bajas concentraciones de este extracto.

Los resultados obtenidos de los ensayos previos, nos muestran las diferencias en cuanto a la activación de la vía de  $\text{Ca}^{2+}$  para ambas cepas. La cepa de *T. cruzi* Querétaro, al ser más infectiva, está movilizando mayor cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en las células Vero que la cepa Ninoa.

Finalmente, realizamos un ensayo de movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  utilizando extractos de  $50 \times 10^6$  parásitos de ambas cepas, para comparar nuestros resultados de movimiento de  $\text{Ca}^{2+}$  con los reportados para las cepas sudamericanas G y CL (Ruiz et al., 1998). Debido a que en ese reporte no mencionaron una concentración específica del extracto, se decidió utilizar un extracto de  $50 \times 10^6$  de parásitos de ambas cepas como inductor en los ensayos de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que observamos, fue un incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  de 130 nM en las células cuando fueron inducidas con el extracto de la cepa Querétaro. En cuanto a la cepa Ninoa, no se observó ninguna alteración de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  basal, como se observa en la figura 14.

Este incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  observado para la cepa Querétaro, es similar a los ensayos reportados para las cepas sudamericanas G y CL, lo cual estaría indicando, que esta cepa mexicana moviliza el  $\text{Ca}^{2+}$  de manera similar a las cepas sudamericanas, donde se observó un incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular de 150 nM, al inducir con esta misma cantidad de parásitos. Estos resultados sugieren, que la cepa de *T. cruzi* mexicana Querétaro utiliza la vía dependiente de lisosomas asociada a la señalización, que con lleva al incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en las células. En cuanto a la cepa de *T. cruzi* mexicana Ninoa, no estaría invadiendo a la célula hospedero utilizando la vía de señalización de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estas diferencias observadas indican que, posiblemente, las cepas mexicanas de *T. cruzi* son diferentes en cuanto a los mecanismos de invasión descritos para otros tipos de cepas, en donde se observa un aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  similar en ambas, al inducir con extracto de tripomastigotes de cepas que presentan distinta infectividad en células HeLa (Ruiz et al., 1998). Las cepas mexicanas, podrían estar utilizando distintas vías de invasión, como la vía independiente de lisosomas mediada por la invaginación de la membrana y participación de las PI3 cinasas, o también la vía de autofagia (Burleigh y Caradonna, 2011).

Para poder determinar la vía de invasión utilizada por las cepas mexicanas de *T. cruzi* Ninoa y Querétaro, realizamos ensayos de invasión, en donde incubamos a las células Vero con dos drogas ampliamente utilizadas para identificar las vías de señalización inducidas durante la invasión de las cepas de *T. cruzi*, la droga thapsigargin y la droga wortmannin.

Después de realizar 6 ensayos independientes con la droga thapsigargin y 3 ensayos con la droga wortmannin, los resultados obtenidos de este estudio mostraron, que el porcentaje de infección disminuyó significativamente en un 15 % con respecto al control en células Vero tratadas con la droga thapsigargin e infectadas con la cepa Querétaro, mientras que la cepa Ninoa no se observó ninguna alteración de su

porcentaje de infección frente a esta droga. En cuanto a las células tratadas con la droga wortmannin e infectadas con la cepa Ninoa, se observó una disminución del porcentaje de infección significativa de 11 % con respecto al control, en tanto, la cepa Querétaro, no vio afectada su infectividad, como se observa en la figura 19.

Al comparar nuestros resultados con los reportes para las cepas de *T. cruzi* sudamericanas G y Cl, encontramos diferencias en la disminución de los porcentajes de infección con ambas drogas. En el reporte de Yoshida del 2012, se observó, una disminución del porcentaje de infección significativa de 85 % para la cepa G y de 70 % para la cepa CL, con respecto al control, en células tratadas con la droga thapsigargin. En cuanto a la droga wortmannin, se observó una disminución del porcentaje de infección significativa de 75 % con respecto al control para la cepa CL de un 60 % para la cepa G. Las cepas mexicanas Ninoa y Querétaro, muestran porcentajes de infección menores a los reportados para las cepas G y Cl, por lo que las cepas mexicanas estarían utilizando otros mecanismos de invasión a los ya descritos para estas cepas.

Este trabajo analiza por primera vez las vías de invasión relacionadas con la movilización de  $Ca^{2+}$  y de PI3 cinasa en cepas mexicanas de *T. cruzi*. Los resultados de estos ensayos sugieren, que las cepas mexicanas de *T. cruzi*, muestran diferencias en las vías de invasión. La cepa Querétaro, muy infectiva, estaría utilizando la vía de invasión dependiente de lisosomas, indicando que requiere de la movilización de  $Ca^{2+}$  de los depósitos RE y no estaría utilizando la vía de invasión de PI3 cinasa. Por su parte, la cepa Ninoa, menos infectiva, estaría utilizando la vía de invasión de PI3 cinasa y no la vía de movilización de  $Ca^{2+}$ . Debido a que los porcentajes de invasión, no se vieron afectados con las drogas en su totalidad, es de suponer que ambas cepas, estarían utilizando vías alternas para invadir junto con las vías analizadas de movilización de  $Ca^{2+}$  y PI3 cinasa. Es por ello, que se recomienda un estudio más exhaustivo de las vías de invasión utilizadas por las cepas de *T. cruzi* Querétaro y Ninoa, para llegar a comprender mejor los mecanismos que utilizan estas cepas para poder invadir a las células hospederas.

## XII. CONCLUSIONES

- Las cepas mexicanas de *T. cruzi* Ninoa y Querétaro presentaron diferencias en las proteínas que interactúan con la célula hospedero.
- Se observó un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en las células Vero, al ser inducidas con el extracto de tripomastigote de la cepa Querétaro a concentraciones mayores a 50, 70, 100 y 400  $\mu\text{g}$ . En contraste para la cepa Ninoa, sólo se observó variación en el movimiento de  $\text{Ca}^{2+}$  al inducir las células con 400  $\mu\text{g}$  de extracto de tripomastigotes.
- Las cepas mexicanas de *T. cruzi* muestran diferencias en las vías de invasión a las células hospederas: la cepa Querétaro, muy infectiva, estaría utilizando la vía de invasión dependiente de lisosomas asociado a la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$ , por su parte, la cepa Ninoa, menos infectiva, estaría utilizando la vía de invasión de PI3 cinasa.
- Las cepas mexicanas de *T. cruzi* podrían estar utilizando vías alternas para invadir, además de las vías analizadas de movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  y PI3 cinasa.

### **XIII. PERSPECTIVAS**

- Realizar ensayos de infección con otras drogas para llegar a comprender mejor los mecanismos que utilizan las cepas mexicanas para poder invadir a las células hospederas.
- Realizar una caracterización más detallada de las proteínas implicadas en la señalización de la vía de  $\text{Ca}^{2+}$  para la cepa Querétaro.
- Estudiar las vías de señalización que se llevan a cabo en los parásitos al momento de invadir las células hospederas.
- Analizar la expresión de la proteína cruzipaína en ambas cepas.

#### XIV. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta S.A., Almeida I.C., Freitas-Junior L.H., Yoshida N., Schenkman S. (2001). The mucin-like glycoprotein super-family of *Trypanosoma cruzi*: structure and biological roles. *Mol. Biochem. Parasitol*; **114**: 143-150.
- Arroyo R. and Alderete J.F. (1995). Two trichomonas vaginalis surface proteinases bind to host cell and are related to levels of cytoadherence and cytotoxicity. *Arch. Med. Res.*; **26**:279-285.
- Aparicio I.M., Scharfstein J., Lima A.P. (2004). A new cruzipain-mediated pathway of human cell invasion by *Trypanosoma cruzi* requires trypomastigote membranes. *Infect. Immun.*; **72**: 5892-5902.
- Berridge M.J., Lipp P., Bootman M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **1**:11-21.
- Bestetti R. B. and Muccillo G. (1997). Clinical Course of Chagas' Heart Disease: A Comparison with Dilated Cardiomyopathy. *Int. J. Card.*; **60**: 187–93.
- Brener Z. (1973) Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu. Rev. Microbio.*; **27**: 347–382.
- Brenner Z. and Krettli A. (1990). Immunology of chagas disease. *Modern parasite biology. Cellular immunological and molecular aspects.* Freeman and Company, New York, 247-261.
- Burleigh B.A. and Andrews N.W. (1995). The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annu. Rev. Microbio.*; **49**: 175–200.
- Burleigh B.A. (2005). Host cell signaling and *Trypanosoma cruzi* invasion: Do all roads lead to lysosomes? *Science.*; **293**: 36-37.
- Burleigh B.A. and Mott A.G. (2008). The role of host cell lysosomes in *Trypanosoma cruzi* invasion. *Sub. Cell. Biochem.*; **47**:165-73.
- Burleigh B.A. and Caradonna K.L. (2011). Mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Adv. Parasitol.*; **76**: 33-61.
- Burleigh B.A. and Woolsey A.M. (2002). Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cell Microbio.*; **4**:701-711.
- Buscaglia, C.A., Campo V.A., Frasch A.C., Di Noia J.M. (2006). *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nat. Rev. Microbio.*; **4**: 229-236.
- Campos M. and Gazzinelli R.T. (2004) *Trypanosoma cruzi* and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors. *Mediator. inflame.*; **13**:139-143

- Chuenkova M.V. and Pereira M. (2000). A trypanosomal protein synergizes with the cytokines ciliary neurotrophic factor and leukemia inhibitory factor to prevent apoptosis of neuronal cells. *Mol. Biol. Cell.*; **11**:1487-98
- Clapham D.E. (2007). Calcium Signaling. *Cell.*; **6**: 1047–1058.
- Conrad E. C.L, Coates B.M, Engman D.M. (2010). Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.*; **126**: 283-91
- Coura J.R, Junqueira A.C., Fernandes O., Valente A.S., Miles M.A. (2002). Emerging Chagas disease in Amazonian Brasil. *Trends. Parasitol.*; **18**:171-176.
- Coura J.R. (2006). Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*; **39**:113-117.
- De Souza W. (2002). From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. *Kinetoplastid. Biol. Dis.*; **1**:1-21.
- De Souza W., De Carvalho T.M., Barrias E.S. (2010) Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *Int. J. Cell. Biol.*; 18.
- Despommier, D.D., Gwadz, R.W., Hotez, P.J., Knirsch, C.A. (2000). American Trypanosomiasis: *Trypanosoma cruzi*. In *Parasitic Diseases*, New York, Apple Trees Productions, L.L.C. 345 pp.
- Dias W.B., Fajardo F.D, Graca A.V. (2008) Endothelial cell signaling induced by trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi*. *Cell. Microbio.*; **10**: 88-99.
- El-Sayed N.M., Myler P.J., Bartholomeu D.C., Nilsson D., Aggarwal G., Tran A.N., et al. (2005). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science.*; **309**: 409-415.
- El-Sayed N.M., Myler P.J., Blandin G., Berriman M., Crabtree J., Aggarwal G., Caler E., Renauld H., Worthey E.A., Hertz-Fowler C. (2005). Comparative genomics of Trypanosomatid parasitic protozoa. *Science*; **309**: 404-409.
- Espinoza B. and Manning-Cela R.G. (2007). An overview of mammalian cell infection by *Trypanosoma cruzi*: Cellular and molecular basis. *Ad. Inmun. Kerala, India*, 291-311.
- Espinoza B., Rico T., Sosa S., Oaxaca E., Vizcaino-Castillo A., Caballero M.L., Martínez I. (2010) Mexican *Trypanosoma cruzi* I strains with different degrees of virulence induce diverse humoral and cellular immune responses in a murine experimental infection model. *J. Biomed. Biotech.* Vol.2010, ID:890672, 1-10
- Espinoza B., Martinez-Ibarra J.A., Villalobos G., de la Torre P., Laclette J.P. Martinez F. (2012). Genetic variation of North American *Triatomines* (Insecta: Hemiptera: Reduviidae): Initial divergence between species and populations of Chagas disease vectors. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; **88**:275-84

- Fernandes A.B., Neira I., Ferreira A.T., Mortara R.A. (2006). Cell invasion by *Trypanosoma cruzi* amastigotes of distinct infectivities: studies on signaling pathways. *Parasitol. Res.*; **100**: 59–68.
- Goto Y., Carter D., Reed S.G. (2008). Immunological dominance of *Trypanosoma cruzi* tandem repeat proteins. *Infect. Immun.*; **76**: 3967-3974.
- Hall B.S. and Pereira M.A. (2000). Dual role for transforming growth factor beta dependent signaling in *Trypanosoma cruzi* infection of mammalian cells. *Infect. Immun.*; **68**: 2077-2081.
- Jiménez Marin. 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 Biólogo. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Kleshchenko Y.Y., Moody T.N., Furtak V.A., Ochieng J., Lima M.F., and Villalta F. (2004). Human galectin-3 promotes *Trypanosoma cruzi* adhesion to human coronary artery smooth muscle cells. *Infect. Immun.*; **72**: 6717-6721.
- Laemmli (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; **227**: 680-685.
- Lima F.M., Oliverira P., Mortara R.A, Silverira J.F, Bahia D. (2010). The challenge of Chagas disease: Has the human pathogen, *Trypanosoma cruzi*, learned how to modulate signaling events to subvert host cell? *New. Biotech.*; **27**: 837-842
- Lopez-Olmos V., Perez-Nasser N., Piñero D., Ortega E., Hernandez R., Espinoza B. (1998) Biological Characterization and genetic diversity of Mexican aisolates of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*; **69**: 239-254.
- Macedo A.M and Peña S.D. (1998). Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. *Parasitol. Today*; **14**: 119–124.
- Magdesian M.H., Tonelli R.R., Fessel M.R. (2007). A conserved domain of the pg85/transialidase family activates host cell extracellular signal-regulated kinase and facilitates *Trypanosoma cruzi* infection *Exp. Cell. Res.*; **313**: 210-18.
- Martins R.M., Covarrubias C., Rojas R.G., Silver A.M., Yoshida N. (2009). Use de L-proline and ATP production by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms as requirements for host cell invasion. *Infect. Immun.*; **77**: 3023-3032.
- Martínez M.L. (2007) Proteínas de superficie de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* que interaccionan con células del hospedero. Tesis para obtener el título de Maestro en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, UNAM.

- Martínez M.L., Espinoza B. Datos no publicados. Proteína de superficie asociada a mucinas (MASP) de 49 kDa de *Trypanosoma cruzi*, su papel en el proceso de infección.
- Melo J. M. and Pereira P. M. (2007). The Chagas disease parasite *Trypanosoma cruzi* exploits nerve growth factor receptor TrKAto infect mammalian host. *Cell. Host. Microbio.*; **1**: 251-261.
- Ming M., Ewen M.E., Pereira M.E. (1995). Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF beta signaling pathway. *Cell*; **82**: 287-296.
- Moloney A. (2009). Trial renews interest in Chagas Disease. *Lancet*; **374**: 1490.
- Moreno S.N. and Docampo R. (2003). Calcium regulation in protozoan parasites. *Cur. Opinion Microbio.*; **4**: 359-64.
- Morris K. (2009). After 100 years, the time to break silence on Chagas' disease. *Lancet infect. Dis.*; **9**: 468.
- Neira I., Ferreira A.T., Yoshida N. (2002). Activation of distinct signal transduction pathways in *Trypanosoma cruzi* isolates with differential capacity to invade host cells. *Int. J. Parasitol.*; **32**: 405-414.
- Nieto C.G. (1997). Caracterización de proteasas de *Trypanosoma cruzi* cepa Querétaro. Tesis para obtener el título de química Farmacéutica Bióloga. Facultad de Química. UNAM
- Osuna A., Jiménez-Ortiz A., Mascaro C., Alonso C. (1983). *Trypanosoma cruzi*: arrested division of amastigote forms in enucleated HeLa cells. *J. Parasitol.*; **69**: 629-631.
- Osuna A., Gamarro F., Castanys S., Ruiz-Perez L.M. (1986). Inhibition of lysosomal fusion by *Trypanosoma cruzi* in peritoneal macrophages. *Int. J. Parasitol.*; **16**: 629-632.
- Osuna A., Rodríguez-Cabezas N., Gamarro F., Mascaro C. (1994). The different behavior of diphtheria toxin, modeccin and ricin in HeLa cells infected with *Trypanosoma cruzi*. *J. Eukaryot. Microbio.*; **41**: 231-236.
- Osuna A., De Pablos L.M., González G., Solano P. J., Seco H.V., Díaz I.M., Gómez S.M., Cruz T. (2011). Differential expression and characterization of a member of the mucin-associated surface proteins (MASP) family secreted by *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.*; **79**: 3993-4001.
- Prata A. (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet. Infect. Dis.*; **1**: 92-100.
- Pudukollu G., Gowda R. M., Khan I. A., Navarro V. S. and Vasavada B. C. (2007). Clinical Aspects of the Chagas' Heart Disease. *Int. J. Card.*; **115**: 279- 283
- Rassi A. A. and Little W.C. (2000). Chagas heart disease. Review. *Clin. Card.*; **23**: 883-889
- Reina M. B., Cosson A., Minoprio P. (2000). Lymphocyte Polyclonal Activation: A Pitfall for Vaccine Design against Infectious Agents. *Parasitol.*; **16**: 62-67

- Robert C., Ferreira L.R, Campos M.A. (2002). Macrophage signaling by glycosyl phosphatidylinositol-anchored mucin like glycoproteins derived from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *Microbes. Infect.*; **4**: 41015-41025.
- Ruiz R.C, Farvoretto S., Dorta M.L, Oshiro M.E, Ferreira A.T, Manque P.M, Yoshida N. (1998) Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca<sup>2+</sup> signaling activity. *Biochem. J.*; **330**: 505-511.
- Scharfstein J., Schmitz V., Morandi V., Capella M.M., Lima A.P., Morrot A., Juliano L., Muller-Esterl W. (2000) Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B receptors. *J. Exp. Med.*; **192**: 1289–1300.
- Scharfstein J. and Lima A.P. (2008) Roles of naturally occurring protease inhibitors in the modulation of host cell signaling and cellular invasion by *T. cruzi*. *Sub. Cell. Biochem.*; **47**:140-154
- Schenkman S., Robbins E.S, Nussenzweig V. (1991). Attachment of *Trypanosoma cruzi* to mammalian cells requires parasite energy, and invasion can be independent of the target cell cytoskeleton. *Infect. Immun.*; **59**: 654-654.
- Schmunis G.A (2007). Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*; **102**: 75-85
- Silva J.S., Vespa G.N., Cardoso M.A, Aliberti J.C, Cunha F.Q. (1995). Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide products in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infect. Immun.*; **63**: 4862-4867.
- Stuart K., Brun R., Croft S., Fairlamb A., Gurtler R.E., McKerrow J., Reed S., Tarleton R. (2008). Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J. Clin. Invest.*; **118**: 1301-1310
- Tarleton R.L. and Zhang L. (1999). Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? *Parasitol. Today.*; **15**: 94–99.
- Thastrup O., Cullen P.J., Drobak B.K., Hanley M.R., Dawson A.P. (1990). Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca<sup>2+</sup> stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; **87**: 2466–2470.
- The Lancet Neurology. (2009). Chagas disease: the forgotten American neuroinfection. *Lancet Neurol.*; **8**: 501.
- Turner C.W., Lima M.F., Villalta F. (2002). *Trypanosoma cruzi* uses a 45-kDa mucin for adhesion to mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; **290**: 29-34.
- WHO (2002). Control of Chagas disease. Second report of the WHO Expert Committee. WHO technical report series; 905. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

- Wilkowsky S.E., Barbieri M.A., Stahl P., and Isola E.L. (2001). *Trypanosoma cruzi*: phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B activation is associated with parasite invasion. *Exp. Cell. Res.*; **264**: 211-218.
- Westermeier R. and Naven T. (2002). *Proteomics in practice. A laboratory manual of proteome analysis.* Wiley.Vch. Alemania.; 342.
- Woolsey A.M., Sunwoo L., Petersen, Brachman, Canthey L. C. and Burleigh B.A. (2003). Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of Trypanosome invasion and vacuole maturation. *J. Cell. Science.*; **116**: 3611-3622.
- Yoshida N. and Cortez M. (2002). *Trypanosoma cruzi*: parasite and host cell signaling during the invasion process. *Sub. cell. Biochem.*; **47**: 82-98
- Yoshida N. (2006). Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *An. Acad. Bras. Cienc.*; **78**: 87-111.
- Yoshida N. and Cortez M. (2008). *Trypanosoma cruzi*: parasite and host cell signaling during the invasion process, *Sub. Cell. Biochem.*; **47**: 82-91.
- Yoshida N., Maeda F.Y., Cortez C., Alves R.M. (2012) Mammalian cell invasion by closely related *Trypanosoma* species *Trypanosoma dionisii* and *Trypanosoma cruzi*. *Act. Tropica*; **121**:141-147.
- Zhang L. and Tarleton R.L. (1999) Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. *J. Infect. Dis.* **180**: 480–486.

## **XV. ANEXOS**

### **ANEXO 1**

#### **Preparación del colorante Giemsa**

##### **Solución Madre**

- Disolver 3.8 gr. de colorante Giemsa (Bayer No. Cat 481938) en 250 ml de metanol.
- Poner en agitación y hervir hasta 60 °C
- Añadir 250 ml de glicerol
- Filtrar la solución en papel Whatman de Nro.1
- Guardar en un frasco color ambar hasta su uso

##### **Solución de trabajo**

- Se disuelven 10 ml de la solución madre de Giemsa en 80 ml de agua destilada y 10 ml de metanol .
- Usar al momento.