



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

USO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES
MURINOS, PARA LA CARACTERIZACIÓN DE
PROTEÍNAS DE *Trypanosoma cruzi*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

Julia Mariana Benítez García

DIRECTOR DE TESIS:
Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez

México D.F.

2014





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno

Benítez
García
Julia Mariana
54457345
Universidad Nacional Autónoma de México
México
Facultad de Ciencias
Biología
306049143

2. Datos del Tutor

Dra.
Bertha Josefina
Espinoza
Gutiérrez

3. Datos del Sinodal 1

Dr.
José Luis
Molinari
Soriano

4. Datos del Sinodal 2

Dr.
Bernardo
Pérez
Zamorano

5. Datos del Sinodal 3

Dra.
Bertha Josefina
Espinoza
Gutiérrez

6. Datos del Sinodal 4

Dra.
Verónica
Monroy
Martínez

7. Datos del Sinodal 5

M. en C.
Ignacio
Martínez
Martínez

8. Datos del trabajo escrito

Uso de anticuerpos monoclonales murinos, para la caracterización de proteínas de *Trypanosoma cruzi*
52p
2014

Agradecimientos

A la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez por darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo e introducirme al mundo de la investigación.

Al M. en C. Ignacio Martínez M. por su asesoría técnica a lo largo de mi estancia en el laboratorio y por su ayuda en la preparación de los extractos de parásitos.

A la Dra. Silvia Ivonne Mora Herrera por realizar los ensayos de Espectrometría de Masas, para la identificación de las proteínas de *T. cruzi*.

A la M. en I.B.B. Victoria López Olmos por la producción de los anticuerpos monoclonales que se usaron en este trabajo.

.

A la Q.F.B Alejandra Cervantes Landín por su asesoría en el uso de la técnica de Lectin blot

El proyecto fue apoyado por PAPIIT de la DGAPA IN206512-3.

También se agradece el apoyo de la Fundación Miguel Alemán por el proyecto “Clonación y caracterización de proteínas de superficie del parásito *Trypanosoma cruzi* y su papel en el proceso de infección a la célula hospedera”.

Nothing in life is worth doing without passion, and a career in science is an exemplary case.

Leonardo Almeida-Souza

Índice

Abreviaturas	1
Resumen	2
I. Introducción	3
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
1.1.1 Taxonomía	3
1.1.2 Morfología	3
1.1.3 Genética	5
1.1.4 Ciclo de vida	5
1.2 Mal de Chagas	7
1.2.1 Distribución de la Enfermedad de Chagas	8
1.3 Anticuerpos monoclonales y <i>T.cruzi</i>	10
II. Antecedentes	13
III. Justificación	15
IV. Hipótesis	15
V. Objetivos	15
VI. Material y métodos	16
6.1 Parásitos	16
6.2 Extracción proteica por sonicación	16
6.3 Extracción proteica Total con Buffer de lisis Tiourea-Urea	16
6.4 Métodos de purificación de las proteínas reconocidas por los MABs	17
6.5 Preparación de fracciones proteicas de epimastigotes	17
6.6 Cuantificación proteínas método Lowry	18
6.7 Cuantificación de proteínas 2-D Quant kit	18
6.8 Anticuerpos monoclonales	18
6.8.1 Descongelación de sobrenadantes	18
6.8.2 Ensayo de ELISA para la detección de anticuerpos monoclonales	18
6.8.3 Precipitación de anticuerpos monoclonales con Sulfato de Amonio	19
6.8.4 Anticuerpos monoclonales purificados	19
6.9 Electroforesis de proteínas	19
6.10 Western blot	20
6.10.2 Lectin blot	20
6.11 Espectrometría de Masas	21
6.12 Identificación de proteínas	22
6.13 Captura y análisis de imágenes	23
VII. Resultados	24
7.1 Selección y precipitación de anticuerpos monoclonales	24
7.1.2 Western blot de Anticuerpos monoclonales	25
7.2 Purificación de proteínas reconocidas por los MABs	25
7.3 Fraccionamiento de extracto proteico de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	26
7.3.1 Análisis de fracciones proteicas de epimastigotes	27
7.4 Western blot con extracto lisado por Tiourea-Urea	28
7.5 Proteínas reconocidas por los MABs en condiciones nativas	30
7.6 Proteínas glicosiladas reconocidas por los MABs	30
7.7 Western blot de MABs en doble dimensión	31
7.8 Identificación de proteínas de fracciones por Espectrometría de Masas	33
7.8.1 Identificación de proteínas reconocidas por los MABs	39
7.9 Ensayo con Enolasa	40
VIII. Discusión	42
IX. Conclusiones	46
X. Perspectivas	46
XI. Bibliografía	47

Abreviaturas

2D-PAGE	Electroforesis bidimensional (<i>2D-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
ACN	Acetonitrilo
BSA	Albúmina sérica bovina (<i>Bovine serum albumin</i>)
C	Extracto proteico de Cisticercos
CHAPS	3-[(3-Colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanesulfonato
Con A	Concavalina A
DTUs	Unidades Tipificadoras Discretas (<i>Discrete Typing Units</i>)
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético (<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>)
ELISA	Ensayo Inmunoabsorbente enzimático (<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
ESI-Q-TOF	Ionización por electrospray Quad en Tiempo de Vuelo (<i>Electrospray Inoization Quad Time of Flight</i>)
ET	Extracto Total (<i>Trypanosoma cruzi</i>)
FA	Ácido Fórmico
F1	Fracción 1
F2.1	Fracción 2.1
F2.2	Fracción 2.2
gp	glicoproteína
HRP	Peroxidasa de Rábano (<i>Horseradish Peroxidase</i>)
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
kDa	Kilodalton
Lit	Medio de Infusión de hígado y triptosa (<i>Liver infusion Tryptose</i>)
Mab	Anticuerpo monoclonal (<i>Monoclonal Antibody</i>)
MP	Marcador de Peso
MS	Espectometría de Masas (<i>Mass Spectrometry</i>)
PBS	Amortiguador de Fosfato de Sodio (<i>Phosphate Buffer Saline</i>)
pI	Punto isoeléctrico
PLGS	ProteinLynx Global SERVER
PM	Peso Molecular
PMSF	Floururo fenilmetilsulfonil (<i>Phenylmethysulphonyl fluoride</i>)
PNA	<i>Arachis hypogaea</i>
PT	<i>Psophocarpus tetragonolobus</i>
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (<i>Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
TEMED	N, N, N', N'-tetrametilen-diamina
T-U	Tiourea Urea
UPLC	Cromatografía Líquida de Ultra desempeño (<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>)
WB	Western Blot
WGA	<i>Triticum vulgare</i>

Resumen

Trypanosoma cruzi es un parásito hemoflagelado protozoario, causante de la Enfermedad de Chagas, la cual es transmitida a humanos por insectos triatomíneos. En el estudio de *T. cruzi*, los anticuerpos monoclonales han sido de gran importancia, principalmente en la identificación y aislamiento de antígenos del parásito. Estos antígenos han sido usados tanto para conocer la biología de este, como con fines terapéuticos, de diagnóstico y en el estudio de la progresión de la enfermedad. Muchas de las proteínas de importancia de *T. cruzi* han sido identificadas mediante anticuerpos monoclonales. En el laboratorio se produjeron anticuerpos monoclonales (MAbs) contra parásitos de la cepa Querétaro, entre ellos los MAbs C16D y F14B de isotipo IgM e ID5 y B106E los cuales son IgG1 e IgG respectivamente. El primero reconoce epítomos de 41, 55 y 70 kDa, el MAb F14B identifica un par de proteínas de 29 y 37 kDa, el MAb ID5 reacciona con un antígeno de 44 kDa y B106E con una proteína de 180 kDa. En este trabajo se realizó la caracterización y se intentó llevar a cabo el aislamiento e identificación de las proteínas reconocidas por estos MAbs. La caracterización se realizó por medio de lectinas para identificar azúcares presentes en estas proteínas, en la cual se determinó que la mayoría de los antígenos reconocidos eran mayormente de naturaleza proteica. Se trabajó con extractos del parásito sometidos a diferentes procesos de extracción, esto con el objetivo de saber si habría otros epítomos no reconocidos anteriormente, donde se observó que el MAb F14B además de reconocer las antígenos anteriormente identificados, reconoció uno de 60 y un doblete de 110 kDa. También con geles sin agentes desnaturizantes y reductores con el fin de determinar el peso molecular de estos antígenos en condiciones nativas, en estos ensayos se pudo observar que sólo la proteína reconocida por el MAb F14B cambió de peso molecular a 66 kDa. Para realizar el aislamiento de estas proteínas, se llevaron a cabo las técnicas de cromatografía con anticuerpos e inmunoprecipitación, con resultados negativos. Debido a lo anterior, se decidieron hacer fracciones proteicas del parásito, a partir de un extracto total, en las cuales se encontrarán las proteínas reconocidas por los MAbs. Las fracciones resultantes fueron F1 (56-72 kDa), F2.1 (28-35 kDa) y F2.2 (36-55 kDa). Posteriormente se realizó la identificación de las proteínas de las fracciones por medio de espectrometría de masas, en las que se encontraron en total 27 proteínas del parásito, con las que se llevó a cabo un posterior análisis para identificar cuáles de estas eran reconocidas por los MAbs. Se logró identificar que el MAb C16D probablemente reconoce a la proteína Prostaglandina F2 α -sintasa y a la Transaldolasa e ID5 reconoce a eIF4a, aunque se tienen que realizar más análisis.

I.Introducción

1.1 *Trypanosoma cruzi*

1.1.1 Taxonomía

Trypanosoma cruzi es un parásito protozoario, unicelular, hemoflagelado, que pertenece al Phylum Sarcomastigophora; Subphylum Mastigophora; Clase Zoomastigophora; Orden Kinetoplastida (el cual comprende a los organismos flagelados con cinetoplasto); Suborden Trypanosomatina; Familia Trypanosomatidae; Género *Trypanosoma* y Subgénero *Schizotrypanum* (WHO, 2002).

Phylum	Sarcomastigophora
Subphylum	Mastigophora
Clase	Zoomastigophora
Orden	Kinetoplastida
Suborden	Trypanosomatina
Familia	Trypanosomatidae
Género	<i>Trypanosoma</i>
Subgénero	<i>Schizotrypanum</i>
Especie	<i>Trypanosoma cruzi</i>

1.1.2 Morfología

Como otros miembros de la familia Trypanosomatidae, *T. cruzi* posee sólo una mitocondria que se extiende a través del soma celular. Además tienen un arreglo complejo de fibrillas de ADN mitocondrial que forma el cinetoplasto (figura 1); esta es una estructura diagnóstica de la familia de microorganismos (De Souza, 2002).

Existen tres principales estadios de desarrollo en este parásito; amastigote, epimastigote y tripomastigote (Figura 1). Los cuales están definidos por la forma celular, la posición del flagelo, del cinetoplasto y del núcleo (Vargas-Parada, 2010).

El amastigote (Figura 2A), es la forma intracelular en el hospedero vertebrado. En esta fase del desarrollo los parásitos son ovoides, miden entre 2.4 y 6.5 μm y se dividen por fisión binaria. Se caracterizan por presentar un flagelo muy corto, el cual no es libre; el cinetoplasto se encuentra cerca del núcleo, que en esta etapa es prominente (Bogitsh et al, 2005).

Los epimastigotes (Figura 2B), se encuentran en el intestino del hospedero invertebrado. Son organismos en forma de huso, miden de 20-40 μ m de largo y están en fase de replicación (De Souza, 2002). En esta etapa el flagelo emerge de la parte media del parásito y está unido a la membrana, produciendo una membrana ondulante; mientras el cinetoplasto está situado anterior al núcleo (Bogitsh et al, 2005).

Los tripomastigotes (Figura 2C), se observan en el torrente sanguíneo del hospedero vertebrado (tripomastigote sanguíneo), en la parte posterior del intestino y en las heces del vector (tripomastigote metacíclico). Estas formas miden alrededor de 25 μ m y no son capaces de dividirse. En este momento el flagelo emerge del extremo posterior y sufre elongación, al igual que la membrana ondulante (De Souza, 2002). En esta etapa el cinetoplasto se encuentra posterior al núcleo.

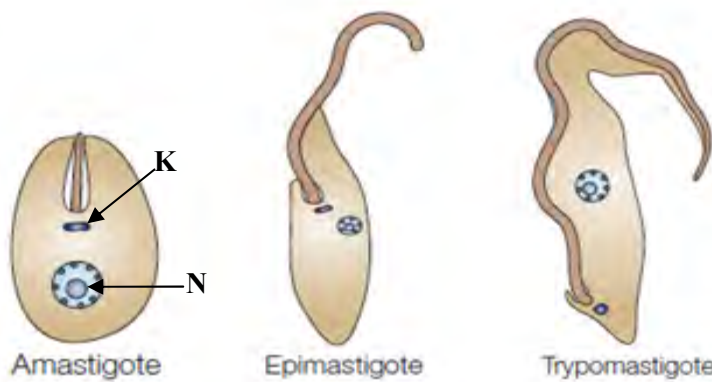


Figura 1. Principales estadios de desarrollo de *T. cruzi*. Las flechas señalan (K) cinetoplasto y (N) núcleo (imágenes modificada de Docampo et al., 2005).

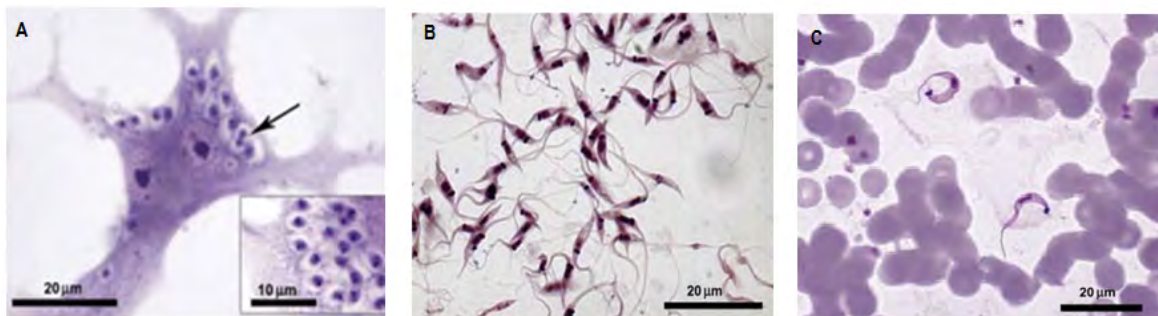


Figura 2. Principales formas del parásito en cultivo, teñidos con Giemsa. En A) Nidos de amastigotes en cultivo celular, en B) epimastigotes y en C) tripomastigotes sanguíneos. (imágenes tomadas De Lana & Marques, 2010).

1.1.3 Genética

Es sabido que el genoma de *T. cruzi* posee una alta variabilidad genética (Zingales et al., 2012). La diversidad del parásito determina el curso de la enfermedad, así como la virulencia, el tropismo a ciertos tejidos y la susceptibilidad a fármacos (Rojas-Ortega 2012). Se ha propuesto que esta gran variabilidad genética en el parásito es resultado del intercambio genético entre parásitos (reproducción parasexual), el cual ha contribuido a la estructura de la población actual, que es mayormente híbrida (Sturm & Campbell, 2009). Hoy en día *T. cruzi* está dividido en seis grupos filogenéticos denominados, unidades tipificadoras discretas (DTU's por sus siglas en inglés), de *Tc I a VI* (Figura 3). En Sudamérica los tipos *Tc II, V y VI*, han estado asociados a la infección en humanos, mientras que otros tipos como *Tc I*, se han ligado al ciclo selvático (Zingales et al., 2009, 2012). En México y otros países de Centroamérica, las cepas del tipo *Tc I* han sido asociadas a la infección en humanos (Bosseno et al., 2002, Martínez et al., 2013).

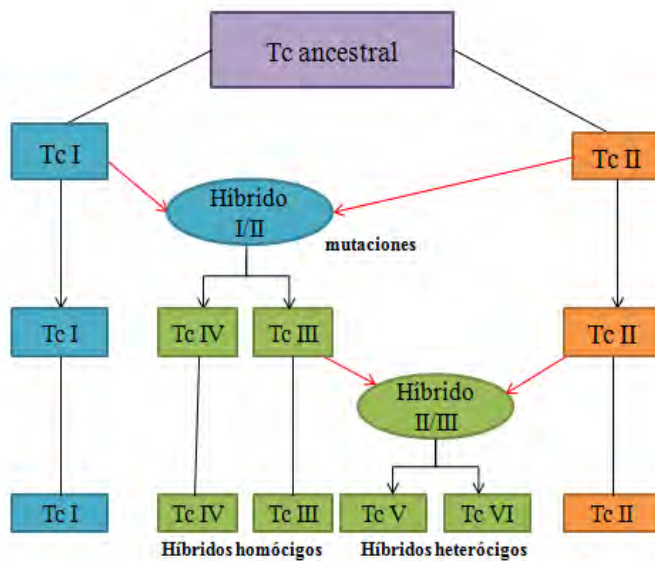


Figura 3. Modelo de evolución de dos ancestros que dio origen a los diferentes grupos genéticos de *T. cruzi*. De dos grupos parentales *Tc I* y *Tc II* hubo un intercambio genético, el cual dio como resultado a *Tc IV* y *Tc III*. Un segundo intercambio genético entre *Tc II* y *Tc III* generó a los híbridos *Tc V* y *Tc VI* (imágenes modificadas de Zingales et al., 2012).

1.1.4 Ciclo de Vida

El ciclo de vida del parásito comienza cuando los tripomastigotes sanguíneos son ingeridos por los triatomíneos, al alimentarse de sangre del mamífero infectado. Una vez dentro del intestino del triatomino, los tripomastigotes se transforman en epimastigotes, se replican y al pasar a la ámpula rectal se transforman en tripomastigotes metacíclicos. Los parásitos salen del insecto a través de las heces, después de que el triatomino se ha alimentado con la sangre del vertebrado. El parásito penetra la piel del mamífero por la herida que deja el insecto, se introducen en las células del tejido,

tales como macrófagos, fibroblastos, los epitelios y células musculares (Epting et al., 2010). Una vez dentro de la célula, los tripomastigotes secretan la proteína TcTOX, la cual a un pH bajo destruirá la membrana de la vacuola parasitófora, y lleva al parásito al citosol donde adquieren la forma de amastigotes y se duplican por fisión binaria (Andrews et al., 1990). Los amastigotes repletan las células que terminan por lisarse y los parásitos salen a la circulación como tripomastigotes sanguíneos, diseminándose por todo el organismo a través de la sangre (Figura 4). El ciclo se completa cuando los tripomastigotes son ingeridos por nuevos triatominos (WHO, 2010).

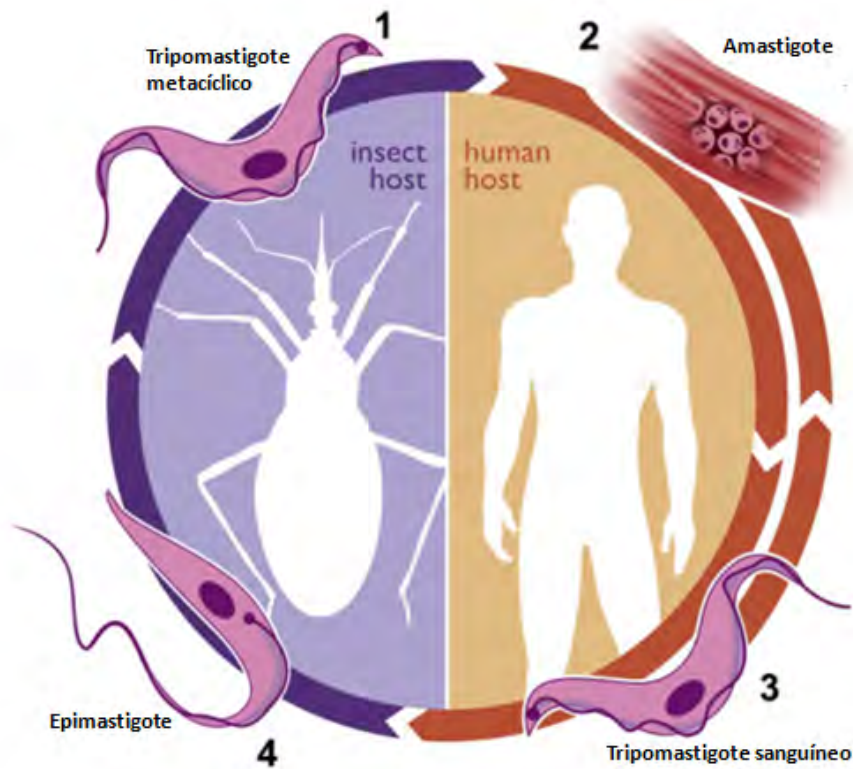


Figura 4. Ciclo de vida de *T. cruzi*. En 1) los tripomastigotes metacíclicos salen del insecto a través de las heces y entran al hospedero vertebrado por medio de la herida que deja el insecto. 2) Los parásitos invaden las células, donde se transforman en amastigotes y se dividen por fisión binaria. 3) Los amastigotes se diferencian en tripomastigotes, los cuales son liberados al torrente sanguíneo y son ingeridos por el vector al alimentarse de la sangre de este. 4) En el insecto, los tripomastigotes se convierten en epimastigotes, los cuales se dividen en el intestino medio. Por último migran a la ámpula rectal donde se transforman a tripomastigotes metacíclicos, continuando el ciclo (Figura tomada de Cuervo et al., 2010).

1.2 Mal de Chagas

La Tripanosomiasis Americana ó Mal de Chagas, es la enfermedad causada por *T. cruzi*, la cual fue descrita en 1909 por Carlos Chagas. Esta infección se transmite principalmente por el contacto con heces de insectos triatominos (Figura 5), aunque otros modos de transmisión incluyen; transfusiones sanguíneas, transmisión congénita, trasplantes de órganos y transmisión oral a través de comida contaminada (WHO, 2010).

La Enfermedad de Chagas se manifiesta en dos etapas; la fase aguda y la fase crónica. La primera fase dura de 6-8 semanas, en este periodo hay un gran número de parásitos en sangre; en la mayoría de los casos esta es asintomática ó sintomática inespecífica. Se caracteriza por presentar en el sitio de entrada del parásito una inflamación ó lesión en la piel llamada chagoma y en algunos casos la inflamación de un sólo párpado, cuando la entrada del parásito es vía conjuntival. Esta inflamación conocida como Signo de Romaña (Figura 6).

Figura 5. *Triatoma dimidiata*. Vector transmisor de la Enfermedad de Chagas de gran distribución en México (Foto del laboratorio de estudios sobre la Tripanosomiasis Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM)



La fase aguda, es seguida de la crónica, la cual se divide en: crónica asintomática ó indeterminada, que puede durar de 10-20 años y fase crónica sintomática, en la cual se presentan las manifestaciones clínicas de la enfermedad (no todos los infectados con *T. cruzi* presentan un cuadro clínico), como cardiomiopatías en un 30% de los casos, mega-esófago, megacolon y alteraciones neurológicas en sólo el 10% de los casos. Se estima que anualmente 10 mil personas mueren a causa de la Enfermedad de Chagas (OMS, 2010).



Figura 6. Niño del Estado de México con signo de Romaña. (Fotografía del laboratorio de estudios sobre la Tripanosomiasis Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM)

1.2.1 Distribución de la Enfermedad de Chagas

Se estima que en todo el mundo hay 10 millones de personas infectadas con *T. cruzi* (Figura 7). La mayoría de los cuales se encuentran en áreas endémicas, desde Argentina hasta el sur de Estados Unidos. Aunque esta zoonosis es endémica de Latinoamérica, en las últimas décadas se han detectado casos en zonas no endémicas como Estados Unidos y Canadá en el continente Americano; Australia y Japón en el pacífico y en algunos países europeos. La presencia de la enfermedad en estos países se debe principalmente a la migración de poblaciones (WHO, 2010).

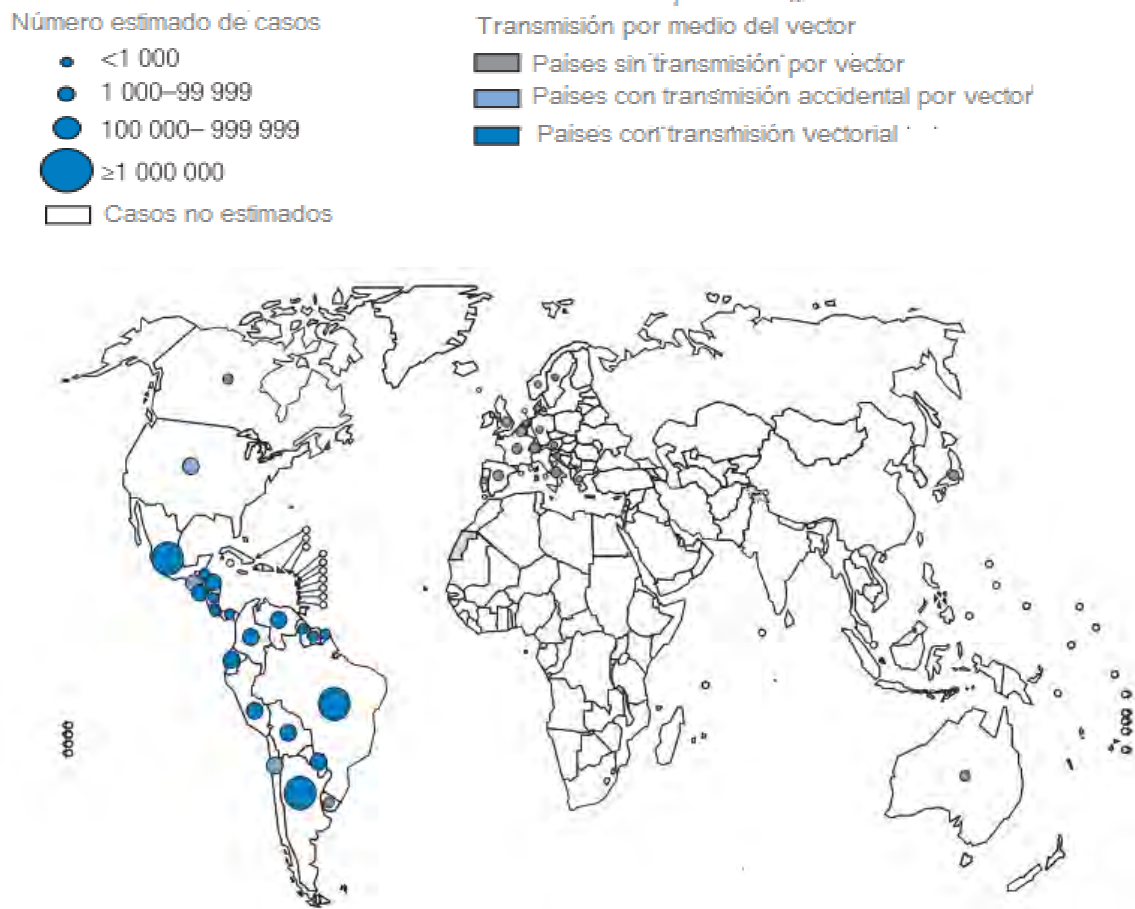


Figura 7. Distribución y prevalencia de la Enfermedad de Chagas a nivel mundial (Modificado de WHO, 2010).

En México esta parasitosis, fue descrita por primera vez en 1936 por el Dr. Luis Mazzotti en dos casos provenientes de Oaxaca. En el año 2000 se estimaba que existían aproximadamente 1.6 millones de personas infectadas con *T. cruzi* a nivel nacional (Guzmán-Bracho, 2001). Posteriormente en el año 2009, se realizó un estudio serológico con 230,074 muestras de diferentes

1.3 Anticuerpos monoclonales y *T. cruzi*

Desde el descubrimiento de la técnica para producir anticuerpos monoclonales (MAbs), en la primera mitad de los años setenta por Milstein y Kohler, estos se volvieron una herramienta muy importante en la investigación, debido a las características únicas que poseen como: especificidad, homogeneidad y la capacidad de ser producidos en cantidades prácticamente ilimitadas (García-Merino, 2011).

En el estudio de *T. cruzi*, los anticuerpos monoclonales han sido de gran importancia, ya que permiten la identificación, caracterización y aislamiento de antígenos del parásito; tanto para conocer la biología del parásito, con fines terapéuticos (Vázquez-Chagoyán et al., 2011), de diagnóstico y en la progresión de la enfermedad (Martínez & Espinoza, 2010).

En el año de 1981 se publicó uno de los primeros artículos utilizando los anticuerpos monoclonales por Snary et al. En ese trabajo se pudo identificar individualmente un antígeno de superficie de 72 kDa por parte del anticuerpo monoclonal WIC29.26, lo que en ese momento ayudó a una mejor caracterización de dicha proteína, mediante métodos más sencillos; aunque posteriormente se supo que este anticuerpo en realidad reconocía dos glicoproteínas de 72 y 75 kDa, que diferían debido a modificaciones post-traduccionales (Cooper et al., 1991). Esta proteína después fue conocida como gp72, la cual es una importante glicoproteína involucrada en el mantenimiento de la morfología normal del parásito; esta molécula funciona como un aceptor para el factor del complemento C3, el cual desencadena la lisis de epimastigotes, por medio de la vía alterna y además tiene un importante papel en la diferenciación, ya que al incubar a epimastigotes con el MAb WIC29.26 se inhibe la metaciclologénesis (Haynes et al., 1996).

Posteriormente, se realizaron numerosas investigaciones empleando la tecnología de los anticuerpos monoclonales. Entre estos trabajos se encuentra el de Alves et al., (1986), en el que el MAb H1A10 se unió a una glicoproteína de 85 kDa en tripomastigotes. Al pre-incubar a las formas metacíclicas con este anticuerpo disminuía la infección entre un 50 y 70%; este grupo de proteínas del mismo peso molecular y diferente carga eléctrica fueron identificadas previamente como Tc-85 (Pereira et al., 1980; Katzin & Colli, 1983) y posteriormente conocidas como Trans-sialidasas (TS). Existen otros anticuerpos monoclonales contra epítomos de esta familia de proteínas. Tales como el MAb 3C9, que reconoce un epítomo exclusivo de tripomastigotes denominado Ssp3 (Andrews et al., 1987); el cual se vio que se formaba después de que la enzima, transfiriera ácido siálico extrínseco y posteriormente al incubar a los parásitos con este MAb se inhibía la unión a la célula hospedera (Schenkman et al., 1991). Estas enzimas tienen características únicas, ya que promueven tanto la

adquisición, como la remoción de ácido siálico en los tejidos del hospedero, por lo que son de importancia en la invasión a la célula hospedera (Goldenberg & Ávila, 2011).

Texeira & Yoshida (1986) identificaron una proteína de 90 kDA, de superficie y específica de tripomastigotes metacíclicos, usando los MAbs IG7 y 5E7 producidos por ellos (Figura 9). Esta proteína correspondía a la gp90, descubierta previamente (Snary & Hudson, 1979). En la actualidad se sabe que esta molécula es un regulador negativo de la invasión, ya que las cepas que expresan esta glicoproteína a altos niveles son menos infectivas que las cepas que no la presentan (Cortez et al., 2006)

En este mismo trabajo (Texeira & Yoshida 1986), identificaron una proteína e 82 kDa, reconocida por el MAb 3F6 (Figura 9). Posteriormente, se supo que se trataba de la gp82; importante molécula involucrada en la invasión a la célula hospedera (Ramírez et al., 1993), la cual se une a la mucina gástrica y facilita la señalización con Ca^{2+} , necesaria para la internalización del parásito a la célula hospedera. El anticuerpo 3F6 inhibe la infección in vitro de las células epiteliales, lo que significaría una protección en contra de la invasión del parásito (Eickhoff et al., 2010).

Otro trabajo importante, cuya finalidad fue la caracterización de los componentes membranales del parásito, fue en el que se produjo el MAb 10D8, que reconocía dos antígenos altamente glicosilados de 35 y 50 kDA (Figura 9). En este estudio al igual que en el anterior, se demostró que la infectividad de las formas metacíclicas de *T. cruzi* se afectaba hasta en un 67%, cuando estas eran pre-tratadas con el anticuerpo (Yoshida et al., 1989). Posteriormente, este par de proteínas se denominaron como glicoproteínas tipo mucinas gp 35/50, que son codificadas por una gran familia de genes (Maeda et al., 2012). Al igual que gp82, la gp35/50 se une a la célula blanco mediado por un receptor, que actúa como activador de la señalización de Ca^{2+} . El MAb 10D8 reconoce a las mucinas 35/50 de cepas poco invasivas, como lo son la G y Tulahuen, y reacciona con epítomos que contienen galactofuranosa. Existe otro anticuerpo monoclonal denominado 2B10, el cual también reconoce a gp 35/50, sólo que éste las reconoce en todas las cepas y reacciona con galactopyranosa (Yoshida, 2006).

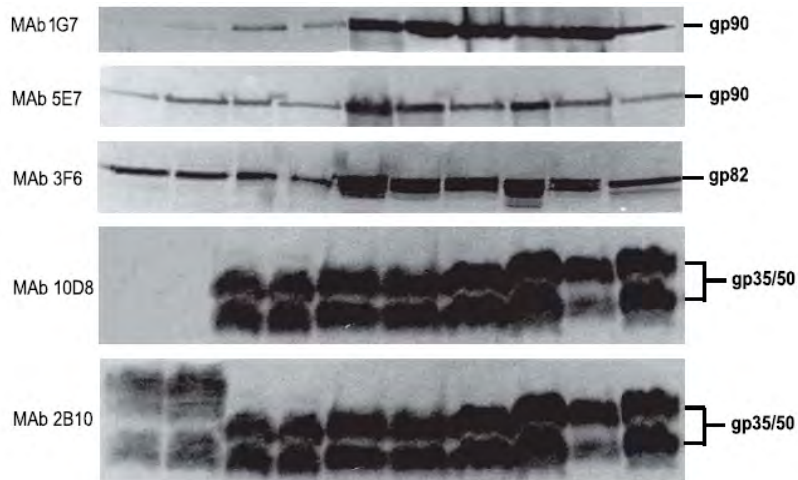


Figura 9. Diferentes moléculas de *T. cruzi* identificadas por anticuerpos monoclonales. MAbs contra gp90, 82 y 35/50 (Imagen tomada de Yoshida, 2006).

La proteína gp57/51 fue descrita por Scharfstein et al., (1986), mediante el MAb SC11G10. Posteriormente a esta glicoproteína con propiedades enzimáticas, se le conoció como Cruzipaina, la cual es la mayor cisteína proteasa del parásito. Esta enzima se expresa diferencialmente en los 3 estadios de desarrollo del parásito (Cazzulo et al., 2001). La participación de la Cruzipaina en la invasión a la célula hospedera, está relacionada con la capacidad de esta proteína de generar bradiquinina, ya que al pre-incubar tripomastigotes metacíclicos con un MAb α -bradiquinina, se inhibió la entrada de los parásitos a la célula hospedera (Scharfstein et al., 2000).

Otras moléculas de importancia caracterizadas con ayuda de anticuerpos monoclonales son: algunos polipéptidos flagelares, como las proteínas PAR1 de 70 y PAR2 de 68 kDa, reconocidas por los MAbs PAR 1 y 2 respectivamente. Estas proteínas fueron localizadas exclusivamente en los filamentos paraflagelares, de los que no existe contraparte en las células mamíferas (Saborios et al., 1989).

Al igual que las proteínas paraflagelares, la tubulina es una molécula fundamental en la constitución de los microtúbulos; el mayor componente del citoesqueleto en los trypanosomatidos (De Lima et al., 2006). El uso de anticuerpos α -tubulina como lo es el MAb TAT1 (Tyler et al., 2005) ó DMA1A han permitido el estudio del citoesqueleto del parásito (Paulin et al., 1988) y han ayudado a determinar la importancia de los microtúbulos en la infección a la célula hospedera (Epting et al., 2010).

En la actualidad los trabajos usando anticuerpos monoclonales son más específicos. Un ejemplo de lo anterior es el MAb 17.2, el cual está dirigido contra el extremo c-terminal de la proteína

ribosomal P2 β o péptido R13 de *T. cruzi*. Este anticuerpo encontrado en altos niveles en pacientes chagásicos, presenta reacción cruzada con el receptor β -1 adrenérgico, lo que se ha visto induce apoptosis en células murinas cardiacas HL-1. Esto podría significar un alto nivel de apoptosis en los cardiomiocitos de los pacientes con Tripanosomiasis. Se cree que estos anticuerpos son una de las causas del desarrollo de cardiopatías típicas de esta patología (Levy et al., 2011).

Uno de los mecanismos más efectivos de *T. cruzi* para evadir la respuesta inmune, es el recubrimiento con ácido siálico, de algunas proteínas. Esto es realizado por medio de la enzima Trans-sialidasa (TS), el parásito transfiere residuos de ácido siálico de glico-conjugados del hospedero a las mucinas del parásito (Buscaglia, et al 2006), ya que éste no es capaz de sintetizar ácido siálico de novo. En el año 2012, se publicó un trabajo en el cual produjeron un anticuerpo α -Trans-sialidasa neutralizante (13G19). Este MAb es un poderoso inhibidor de la actividad catalítica de esta cisteína proteasa; por lo tanto la incubación con este anticuerpo inhibe en un alto porcentaje la infección de los cultivos celulares y confiere protección a ratones infectados en contra de los efectos deletéreos inducidos por esta enzima al sistema inmune. La protección con el anticuerpo 13G19, es prometedora para su uso terapéutico (Buschiazzo et al., 2012).

II. Antecedentes

En nuestro laboratorio, López Olmos (1999) produjo anticuerpos monoclonales contra la cepa Querétaro, entre ellos los MAbs C16D y F14B de isotipo IgM e ID5 y B106E los cuales son IgG1 y 2a respectivamente. El primero reconoce un epítipo de aproximadamente 65 kDa solo en epimastigotes, el MAb F14B identifica un par de proteínas de 29 y 37 kDa en los tres estadios de desarrollo, el MAb ID5 reacciona con un antígeno de 44 kDa únicamente en epimastigotes y B106E con un doblete de 180 kDa en los tres estadios de desarrollo. Los anticuerpos C16D y F14B muestran reacción cruzada con proteínas de otros parásitos como *Leishmania sp.*, *T. rangelii* y *M. tuberculosis*, mientras que ID5 y B106E no tuvieron reacción con otros parásitos, además que estos y F14B reconocen proteínas que se encuentran en la superficie del parásito (Tabla 1).

Tabla 1. Características de los MAbs producidos en el laboratorio

Anticuerpo	Isotipo	Proteína reconocida	Estadio de desarrollo	de Epítipo	Localización
ID5	IgG1	44 kDa	epimastigote	proteico	superficie
F14B	IgM	29 y 37 kDa	amastigote epimastigote tripomastigote	proteico	superficie
C16D	IgM	41, 55 y 70kDa	epimastigote	proteico	desconocida
B106E	IgG	180 kDa	amastigote epimastigote tripomastigote	proteico	superficie

Además, estos anticuerpos monoclonales reaccionaron con antígenos de las cepas de *T. cruzi* Z10, JAL, JFA, JBE, H5, Ninoa, Silvio y Esmeraldo, con variaciones en el peso, número e intensidad de las proteínas reconocidas por estos. Los MAbs ID5 y C16D podrían ser específicos de estadio, ya que sólo identificaron antígenos en epimastigotes.

En ensayos de infección *in vitro* de células Vero con el parásito, el MAb F14B inhibió parcialmente la infección de las células. Además se evaluó el efecto de los MAbs como agente protector en los ratones. Para evaluar este efecto, se realizó una infección de éstos con la forma infectiva del parásito, pre-incubada con los MAbs y se contó el número de parásitos en sangre a los 42 días postinfección, en la cual sólo se observó disminución en el número de tripomastigotes por parte de los ratones que habían sido infectados con los parásitos incubados con el MAb B106E. En cuanto a los ratones infectados con parásitos pre- incubados, con B106E tuvieron una sobrevida del 50% y con el MAb F14B del 17%, mientras que los demás anticuerpos no mostraron ningún efecto protector.

III. Justificación

La caracterización de las proteínas de epimastigote y tripomastigote, que reconocen los MAbs F14B, ID5 y C16D podrían ser una herramienta útil en el entendimiento de la biología del parásito, ayudar a la caracterización de la cepa mexicana Querétaro, así como las interacciones con sus hospederos, dado que algunos de los antígenos reconocidos por estos MAbs son estadio específico y otros son de superficie.

IV. Hipótesis

Si se realiza la caracterización de algunas proteínas de *T. cruzi* que reconocen los MAbs F14B, ID5 y C16D, entonces se podrá a conocer mejor la biología del parásito.

V. Objetivo

Caracterizar las proteínas que reconocen los MAbs F14B, ID5 y C16D determinando la composición glicosídica y el punto isoelectrico de las proteínas reconocidas por los MAbs. Así como identificar por medio de secuenciación las proteínas reconocidas por los MAbs.

VI. Material y Métodos

6.1 Parásitos

Se utilizó la cepa Querétaro de *T. cruzi* (TBAR/MX/0000/Querétaro), aislada del vector *Triatoma barberi*, obtenida en el estado de Querétaro y donada por el Dr. Rubén del Muro. En este proyecto se trabajó con el estadio de desarrollo epimastigotes. Los parásitos fueron cultivados en el medio Liver Infusion Triptose (LIT) a pH 7.2, complementado con 25µg/ml de hemina y 10% de suero fetal bovino, previamente desactivado a 56° por 30 minutos. Los cultivos se sembraron semanalmente a una densidad de 1×10^6 parásitos/ml, se incubaron a 28 C° en botellas de cultivo de 25cm².

6.2 Extracción proteica por sonicación

Los epimastigotes de cultivo fueron colectados por centrifugación a 1000xg 10 minutos a 4°C. Después se lavaron y centrifugaron 2 veces en PBS pH 7.2. La pastilla se suspendió en 5 ml de 10mM Tris- HCl, pH 8.2 (1g de peso húmedo/5ml de buffer Tris-HCl) y se añadió EDTA 12mM (inhibidor de metalo-proteasas), fenilsulfonifluoruro 1mM (PMSF, inhibidor de proteasas de serina), leupeptin 0.1Mm (inhibidor de proteasas cisteína/serina) y pepsatin 0.001mM (inhibidor de proteasas de ácido aspártico). Posteriormente, los parásitos fueron lisados por sonicación (Sonicador Vibra Cell) a 100 watts, 3 veces por 3 minutos y la mezcla fue centrifugada a 10,000xg 30 minutos a 4°C. El sobrenadante (extracto total de epimastigotes) fue recuperado y almacenado a -20°C hasta su uso (Sánchez et al., 2001).

6.3 Extracción proteica total con buffer de lisis Tiourea-Urea

Los epimastigotes fueron colectados por centrifugación a 1000xg 10 minutos a 4°C. Después se lavaron y centrifugaron 2 veces en PBS pH 7.2. El pellet se suspendió en 3 ml de buffer lisis/ gramo de peso húmedo, compuesto de urea 7M (Plus One 17-1319-01), tiourea 2M (Sigma T7875), CHAPS 4% (Sigma C5070-5G) y tris 10mM (Sigma161-0719). Al extracto proteico total se le añadieron los inhibidores de proteasas descritas en la extracción proteica por sonicación. Posteriormente se agitó en Vortex y se dejó en hielo durante 10 minutos. Se centrifugó la mezcla a 16000 xg 15 minutos a 4°C. Finalmente se recuperó el sobrenadante (extracto proteico T-U) y se almacenó a -20°C.

6.4 Métodos de purificación de las proteínas reconocidas por los MAbs

Se realizaron ensayos de Cromatografía de Afinidad con CNBR-activated Sefarosa 4 Fast Flow acoplada al MAb ID5. Se mezcló el MAb ID5 purificado, con el amortiguador de acoplamiento NaHCO_3 0.1M, NaCl 0.5M pH 8.3. Se mezcló la sefarosa 4 Fast Flow (17-0981-01 General Electric Health Care) con la solución previamente acoplada y se dejó incubar toda la noche a 4°C en agitación. Se lavó el exceso de ligando con amortiguador de acoplamiento y se bloqueo con 3 volúmenes de Tris-HCl 0.1M pH 8 durante 2 hrs a temperatura ambiente y en agitación. Posteriormente, se lavó 3 veces con amortiguador de pH alcalino (Tris-HCl 0.1M, NaCl 0.5M pH 8.5) y pH ácido (amortiguador de acetato de sodio 0.1M pH 3.5). La sefarosa ya acoplada con el MAb ID5, se re-suspendió en 240µl de hepes 0.1M pH 8. Posteriormente, en 4 tubos eppendorf se agregaron 60µl de la sefarosa acoplada, en 2 de ellos se agregaron 150µg de extracto total de epimastigotes (en los otros 2 sólo se agregó PBS). Se añadieron otros 60µl de hepes a los 4 tubos y se incubaron toda la noche a 4°C en agitación. Los tubos se centrifugaron a 3421xg por 2 minutos y se eliminó el sobrenadante. Después se realizaron 3 lavados con hepes, se colectaron los lavados y se leyó la absorbancia a 280nm. Posteriormente se adicionaron 100µl de amortiguador de elución (acetato de sodio 0.1 M y Urea 8M) se incubó por 10 minutos en agitación lenta. Finalmente se centrifugó a 12,800xg durante 5 minutos y se recuperó el sobrenadante. Los eluidos fueron separados mediante SDS PAGE al 12%, transferidos a nitrocelulosa y se realizó un Western blot como está descrito en la sección 6. 10.

Se intentaron purificar las proteínas por el método de inmunoprecipitación, con Proteína A-agarosa y G-agarosa (Nogueira de Melo et al., 2010), donde se añadió el MAb F14B e ID5 respectivamente, después antígeno total de epimastigote de *T. cruzi* y se precipitó con un amortiguador de Glicina pH 3, los eluidos obtenidos se corrieron en un gel de acrilamida al 12%.

6.5 Preparación de fracciones proteicas de epimastigotes

Con el extracto total de epimastigotes sonicados, se corrió un gel de acrilamida (SDS-PAGE) al 12%, en el cual se cortaron 3 fracciones del gel que contenían las proteínas reconocidas por los MAbs. La primera fracción (F1) fue de 55-72 kDa y la segunda (F2) de 28-54 kDa. La F2 a su vez fue sub-dividida en dos partes; la fracción denominada 2.1 (28-35 kDa) y la 2.2 (36-55 kDa). Ya cortadas las fracciones del gel, se eluyeron con agua milli-Q por 18 hrs a 4°C. Se recuperó el sobrenadante, el cual contenía las fracciones proteicas y se concentró en un speed vac (Eppendorf Vacufuge) de 2 a 3 veces, las fracciones fueron cuantificadas y posteriormente almacenadas a -20°C hasta su uso.

6.6 Cuantificación de proteínas método Lowry

Se determinó la concentración proteica, tanto del extracto proteico total sonificado y de las fracciones proteicas mediante el método de Lowry. Se usó el kit DC Protein Assay BIO-RAD (Reactivo A Cat 23223, Reactivo B Cat 23224 y Reactivo S Cat 500-0115). Se realizó una curva estándar con concentraciones conocidas de BSA (albúmina sérica bovina), así como las muestras. Se agregaron los reactivos A, S y B, y se dejó incubar por 15 minutos. Se leyó a una D.O. de 655nm.

6.7 Cuantificación de proteínas 2-D Quant kit.

El extracto proteico total T-U se cuantificó por medio del kit comercial 2-D Quant kit (80-6483-56 Amershan G.E.). Se preparó una curva estándar de BSA y el extracto que se cuantificó. Se separó la proteína con los reactivos de precipitación incluidos en el kit y posteriormente se agregó la solución de cobre y el reactivo de color. Las muestras se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente y se leyó a una D.O. de 480nm.

6.8 Anticuerpos Monoclonales

6.8.1 Descongelación de sobrenadantes.

Los sobrenadantes de hibridoma de anticuerpos monoclonales, elaborados previamente en el laboratorio, los cuales estaban en congelación; fueron transferidos a un cuarto frío a 4°C, para su descongelación y posterior uso.

6.8.2 Ensayo de ELISA para la detección de anticuerpos monoclonales

Se realizaron ensayos inmunoenzimáticos (ELISA por sus siglas en inglés), para determinar la presencia de los MAbs ID5, C16D, F14B y B106E en los sobrenadantes de hibridomas. Se sensibilizaron placas de 96 pozos (RIA/IEA COSTAR 3590) con 1µg de extracto proteico de epimastigotes en amortiguador de carbonatos pH 9.6 por pozo. Las placas se incubaron durante 2 horas a 37°C, después se lavaron 3 veces con PBS Tween 20 al 0.05%. Posteriormente, se bloquearon las placas con BSA al 1% en PBS, se incubaron por 2 horas a 37°C y se realizaron 3 lavados. Se agregaron 100µl/pozo de sobrenadante de hibridoma y se incubó a 4°C por 16 hrs. Se realizaron nuevamente 3 lavados y se agregaron los anticuerpos secundarios, α-mouse IgM HRP (Santa Cruz SC-2973), α-ratón IgG HRP (Sigma A-9044) o α-mouse IgGAM HRP (Sigma Cat-0412), en una dilución 1:1000 en PBS-Tween y se incubó durante 2 hrs a 37°C. Se volvieron a realizar lavados y se agregó la mezcla de reacción, la cual contiene el sustrato ortofenil diamina a una concentración de 0.4mg/ml, en amortiguador de citratos-fosfatos pH 5. La reacción se detuvo

con ácido sulfúrico al 2.5N, cuando los controles positivos se tornaron amarillos. Se leyó la D.O. a 490nm (Sánchez et al., 2001).

6.8.3 Precipitación de anticuerpos monoclonales con Sulfato de Amonio

Se determinó el volumen de los sobrenadante de hibridomas a usar y se centrifugaron a 3000xg por 30 minutos para eliminar detritus del medio de cultivo. Posteriormente, se puso el sobrenadante en agitación lenta y se añadió lentamente con un embudo de decantación, la solución saturada de Sulfato de Amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, para llegar a una concentración final de 50%. Se dejó incubar a 4°C durante toda la noche y se centrifugó el precipitado a 3000xg por 30 minutos. Cuidadosamente se descartó el sobrenadante y después se añadió el otro 50% de la solución de sulfato de amonio saturada a la solución con los anticuerpos y se incubó toda la noche a 4°C en agitación. Se centrifugó a 3000xg por 30 minutos y se re-suspendió la pastilla en 10% del volumen inicial en PBS. La solución con anticuerpos se dializó contra PBS, se dejó incubar durante toda la noche a 4°C, esto se llevó a cabo en 3 ocasiones. Se centrifugó la solución con el anticuerpo a 12800xg durante 5 minutos, para remover cualquier partícula. Los anticuerpos se cuantificaron mediante el método Lowry como lo indica en la sección 6.6. Se observó la integridad de los anticuerpos por medio de electroforesis y se almacenaron a -20°C (Harlow, 1988).

6.8.4 Anticuerpos monoclonales Purificados

Además de la precipitación con sulfato de amonio, se usó el MAb ID5 purificado previamente por Cromatografía de Afinidad (López-Olmos, 1999).

6.9 Electroforesis de proteínas

Se realizó la separación del extracto total y/o de las fracciones proteicas de epimastigote y los anticuerpos monoclonales por medio de electroforesis en geles de acrilamida (acrilamida 30%, bisacrilamida 0.8%) al 10, 12 y 15%. Esta separación se realizó en condiciones reductoras, en presencia de duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés). Fueron separados 150µg de proteína, en cada mini gel. Las muestras se disolvieron en amortiguador de muestra, el cual contenía Base Tris 200mM, β -mercaptoetanol al 0.002%, SDS 0.01M, azul de bromofenol al 0.4% y glicerol al 40% a un pH de 6.8; posteriormente la muestra se hirvió por 5 minutos a 100°C. La corrida se realizó con de buffer de corrida (Base Tris 0.12M, glicina 1M y SDS 0.01M) a 200 volts por 1 hora (Laemmli, 1970).

Además se llevó a cabo electroforesis en estado nativo. Se realizó la separación del extracto total de epimastigotes mediante electroforesis en geles de acrilamida (acrilamida 30%, bisacrilamida 0.8%).

Los geles se realizaron con Gel buffer (Tris base 3M, HCl al 4.2% pH 8.8), glicerol, persulfato de amonio al 10% y TEMED. Se separaron 20µg de muestra en cada carril. Las muestras se disolvieron en buffer de muestra no desnaturizante (Tris-HCl 0.187M, glicerol al 30% y azul de bromofenol al 0.4%), la muestra fue cargada sin hervir. El corrimiento se realizó con amortiguador de corrida nativo (Base Tris 0.12M, glicina 1M) a 100 volts por 6 horas.

6.10 Western blot

150 µg de las fracciones proteicas de epimastigote fueron separadas en geles de acrilamida mediante electroforesis (SDS-PAGE) y transferidas a membranas de nitrocelulosa mediante electro-transferencia húmeda, la cual se llevó a cabo en presencia de amortiguador de transferencia (Tris HCl, glicina y metanol al 20%) a 110 volts durante 70 minutos. Las membranas con el antígeno, se cortaron en tiras de 0.3cm (aprox. 10 µg de Ag por tira). Se bloquearon las tiras toda la noche a 4°C en agitación lenta en leche descremada al 10% en PBS. Posteriormente, se incubó con 10µg de los MAbs F14B, ID5 ó C16D con leche descremada al 10% en PBS. Se incubaron 2 hrs a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con 1ml de PBS Tween 20 al 0.01% en agitación. Se agregó el anticuerpo secundario α -mouse IgM HRP (Santa Cruz SC-2973) ó α -mouse IgG HRP (Sigma A-9044), en una dilución 1:1000 (1ml) en PBS Tween. Se incubó 2 hrs a temperatura ambiente y posteriormente se realizaron 3 lavados como se describió antes. Se reveló con del sustrato 3,3-diaminobenzidina (0.05mg/ml) en PBS y peróxido de hidrógeno al 0.02%. La reacción se detuvo con agua destilada (Sánchez et al., 2001). El western blot en doble dimensión y en condiciones nativas, se llevaron a cabo de esta misma forma.

Además fueron realizados ensayos de WB con un anticuerpo policlonal α -enolasa. El inmunoblot se hizo como se indica anteriormente con las siguientes modificaciones; Se bloqueo con BSA al 3% en PBS Tween. Posteriormente se incubó el anticuerpo goat α -enolasa (Santa Cruz C19) en una dilución 1:500 en BSA al 3% en PBS Tween. Se realizaron 3 lavados y se incubó el anticuerpo secundario goat α -IgG HRP en una dilución 1:2000 en BSA PBS Tween. Como control positivo se usó el MAb ID5.

6.10.1 Lectin blot

Las fracciones de antígeno fueron separadas mediante electroforesis (SDS-PAGE) en un gel de acrilamida y transferidas a membranas de nitrocelulosa como se describió anteriormente. Las membranas se cortaron en tiras de 0.3 cm (aprox. 10µg de fracción proteica por tira) y se bloquearon con PBS Tween 20 al 0.1% por 16 horas a 4°C en agitación lenta. El procedimiento para Lectin blot fue similar al descrito para Western blot, pero en vez de usar anticuerpos

monoclonales, se agregaron 3.5µg de la Lectina *Canavalia ensiformes* (Con-A) que reconoce a los carbohidratos α -manosa y α -glucosa (Pierce 39302) y *Artocarpus integrifolia* (Jacalina) que reconoce a α -galactosa-O Metil (Sigma L-4650), 5µg de *Arachis hypogaea* (PNA) que se une a β -galactosa (1-3) y N-acetilgalactosamina (Sigma L-6135), *Psophocarpus tetragonolobus* (PT) a N-acetilgalactosamina y galactosa (Sigma L- 3014) y *Triticum vulgare* (WGA) a N-acetilglucosamina y al ácido N-acetilneuramínico (Sigma L-5142). Las lectinas estaban biotinizadas. Después se adicionó el conjugado estreptavidina-peroxidasa (Amershan RPN123 IV), en una dilución 1: 2000 en PBS Tween y se realizó el procedimiento como se indicó en la sección 6.10.

6.11 Espectrometría de Masas

Se denomina Shotgun Proteomics, a aquellas técnicas con un enfoque de alto rendimiento en el análisis de proteomas. Una mezcla compleja de proteínas es digerida usando proteasas y los péptidos resultantes son separados mediante cromatografía líquida de alta eficacia ó High Performance Liquid Chromatography (HPLC), posteriormente secuenciados en tándem por Espectrometría de Masas ó MS por sus siglas en inglés (Ye et al., 2007) y finalmente se emplean algoritmos computacionales como SEQUEST ó Mascot con el objetivo de comparar el espectro con las secuencias y así identificar a las proteínas (Motoyama & Yates III, 2008).

Para estos ensayos, 40µg de extracto total de epimastigotes por carril, fueron separados por electroforesis SDS-PAGE al 12%. Posteriormente se cortaron tres fracciones del gel; la fracción 1 (56-72 kDa), fracción 2.2 (36-55 kDa) y fracción 2.1 (28-35 kDa). Las muestras se digirieron in-gel con tripsina y los péptidos ya digeridos se extrajeron con acetonitrilo (ACN) y Ácido Formico (FA). 4µl de cada muestra se cargaron en una de columna Fase reversa C18 UPLC-BEH C18 2.1 x 100 mm (Waters 176001604), equilibrada con 3% de ACN, 0.1 FA. El equipo UPLC (ultra performance liquid chromatography) estába acoplado al espectrómetro de masas ESI-QUAD-TOF con ionización de la muestra por electrospray. El análisis de los espectros se realizó con el paquete ProteinLynx Global SERVER (PLGS) utilizando la base de datos Uniprot exclusiva para Trypanosoma y con el algoritmo MASCOT en la red http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS (Figura 10), la búsqueda con ambos se realizó con los siguientes parámetros: other eukaryota de la base de datos NCBI, 2 missed cleavages, carbamidometil C como modificación fija, oxidación (M) como modificación variable, tolerancia del péptido 150 pmm, 0.2 de tolerancia MS/MS, cargas +2 y +3, con una $p=0.05$. Todos los resultados se corroboraron manualmente.

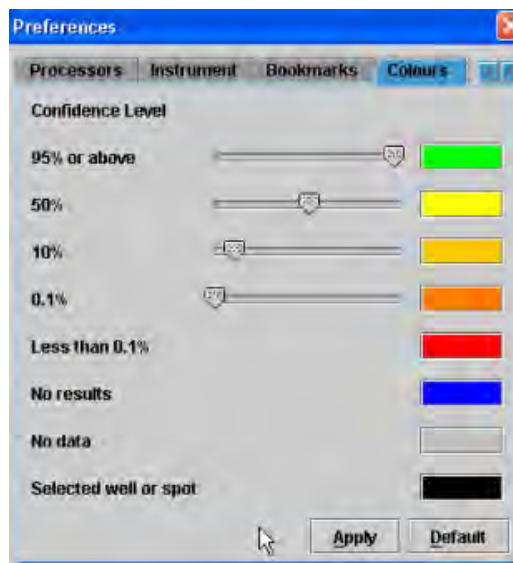
6.12 Identificación de proteínas

Después de realizar el análisis de los espectros con los programas PLGS y MASCOT, se llevó a cabo el análisis de las proteínas identificadas. En el caso de las proteínas reconocidas con PLGS, la probabilidad que se trate de dicha molécula, está dada por colores (Figura 11); sólo se incluyeron en el análisis las proteínas con un nivel de confianza de 95% (verde) y 50% (amarillo). Por su parte en Mascot, el ion score de los péptidos identificados en una búsqueda, está basado en la probabilidad calculada (P), que es el apareamiento de los péptidos (match) entre los datos experimentales y la base de datos. El score es $-10\log(P)$. Esto es traducido en un score de la proteína, el cual es la suma de los ion scores más altos de todas las secuencias identificadas en la búsqueda. En el caso de las búsquedas hechas para este trabajo, los ion scores > 44 indican identidad u homología extensa ($p < 0.05$).



Figura 11. Niveles de confianza en la identificación de proteínas, del servidor PLGS.

Figura 10. Pasos en un ensayo de de identificación de proteínas en *T. cruzi*. Se cultivan los parásitos, posteriormente se realiza un extracto proteico el cual es fraccionado mediante electroforesis. Las proteínas del parásito son digeridas enzimáticamente, usualmente con tripsina. Los péptidos son separados por Cromatografía Líquida, ó directamente eluidos hacia la fuente de ionización (ESI ó MALDI). Los péptidos protonados entran al espectrómetro de masas y sus masas se obtienen en forma de espectros. Después estos espectros son sometidos a búsquedas en bases de datos y finalmente las proteínas son identificadas mediante las masas de los péptidos (Imagen modificada de Cuervo et al., 2010).



6.13 Captura y análisis de imágenes.

La captura de imágenes de los geles, se hizo en el sistema Gel Logic 200 Imaging System de Kodak. Las proteínas de las fracciones se analizaron con el programa Molecular Imaging Kodak.

VII. Resultados

7.1 Selección y precipitación de anticuerpos monoclonales.

Se realizaron ensayos de ELISA, con la finalidad de cuantificar la presencia de MAbs en los sobrenadantes de hibridomas almacenados previamente en el laboratorio. En total se analizaron 66 diferentes muestras de sobrenadantes, en seis ensayos. En la tabla 2 se observan las muestras positivas a la presencia de anticuerpos. Como control positivo se uso suero de ratón infectado con *T. cruzi* de 18 días postinfección y como control negativo no se añadió el primer anticuerpo. Para tomar una muestra como positiva, el valor de absorbancia tenía que ser al menos dos veces mayor que el control negativo. Posteriormente, se precipitaron por medio de Sulfato de Amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ las inmunoglobulinas de las muestras positivas. Los precipitados se cuantificaron con el kit DC Protein Assay BIO-RAD y se separaron por medio de electroforesis (SDS-PAGE al 12%), con el objetivo de observar la disminución de la albúmina. En la electroforesis se observaron las cadenas pesadas y ligeras de los MAbs, así como la reducción de la banda de 68 kDa correspondiente a BSA. Los anticuerpos se etiquetaron y almacenaron a -20° .

Tabla 2. Sobrenadantes de hibridomas con presencia de anticuerpos.

Ensayo	Número de muestras analizadas / positivas	Sobrenadante de Hibridoma de anticuerpos monoclonales	D.O. 490nm	Control positivo	Control negativo
I	10/1	C16D	0.71	2.002	0.015
II	12/1	B106E	0.35	0.610	0.067
III	15/2	B106E	1.4	1.69	0.033
V	15/5	ID5	1.3	1.50	0.072
		ID5	1.2		
		B106E	1.1		
		B106E	0.60		
VI	11/7	B106E	0.58	1.103	0.070
		B106E	1.07		
		C16D	0.26		
		C16D	0.80		
		C16D	0.40		
		C16D	0.72		
		C16D	0.41		
F14B	0.73				
		F14B	0.30		

*No se muestra el ensayo IV, ya que no hubo ninguna muestra positiva.

El anticuerpo B106E no fue utilizado en los posteriores ensayos, debido a que no hubo reconocimiento aparente por parte de éste en los extractos del parásito empleados en este trabajo.

Aunque el anticuerpo se visualizó mediante electroforesis, en la que se observaron las cadenas pesadas y ligeras correspondientes a esta inmunoglobulina (datos no mostrados).

7.1.2 Western blot de Anticuerpos monoclonales

Con el objetivo de observar las proteínas reconocidas por los diferentes MAbs, se realizaron ensayos de Western blot, con los anticuerpos monoclonales precipitados ó previamente purificados (ID5); se separó el extracto total de epimastigotes por medio de electroforesis, posteriormente se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y fue realizado el inmunoblot. El MAb ID5 reconoció una proteína de 44k Da, F14B dos antígenos de 29 y 37 kDa y C16D tres proteínas de 41, 70 kDa y débilmente una de 55 kDa (figura 12).

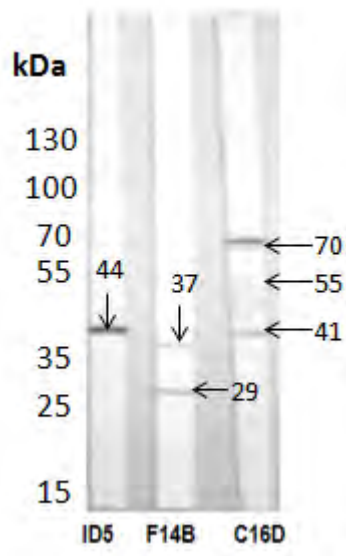


Figura 12. Reconocimiento por parte de los MAbs. 10µg de extracto total de epimastigotes por carril, fueron separados mediante (SDS-PAGE) al 12% y transferidos a membrana de nitrocelulosa, posteriormente se realizó el Western blot con 10µg de los MAbs ID5, F14B y C16D, como segundo anticuerpo se agregó α - IgG HRP revelados con el sustrato 3-3, diaminobenzidina.

7.2 Purificación de proteínas reconocidas por los MAbs.

Con el fin de purificar las proteínas reconocidas por los MAbs, se llevaron a cabo un par de ensayos de cromatografía de afinidad con CNBR-activated Sepharose 4 Fast Flow acoplada al MAb ID5. La elución se hizo con amortiguador de Urea 8M y de Acetato de Sodio 0.1N. El producto de la elución se separó mediante electroforesis al 12%, se transfirió a nitrocelulosa y se realizó un inmunoblot con el MAb ID5. En cuanto al eluido con el amortiguador de Acetatos, no se logró recuperar ninguna proteína y con el amortiguador Urea 8M el MAb ID5 se desprendió de la resina de sefarosa, por lo tanto no se recuperó el antígeno de interés. Posteriormente, con el mismo fin se

llevó a cabo la inmunoprecipitación con Proteína A-agarosa, la cual se conjugó con el MAb F14B utilizando extracto total de epimastigotes de *T. cruzi*. Se precipitó con un amortiguador de Glicina pH 3. No se logró inmunoprecipitar el polipéptido reconocido por el MAb.

7.3 Fraccionamiento de extracto proteico de epimastigotes de *T. cruzi*

Debido a los resultados obtenidos por los métodos tradicionales para purificar los antígenos reconocidos por los MAbs; se decidió realizar fraccionamientos a partir de un extracto total de epimastigotes, se eligieron las regiones donde se localizaban los antígenos reconocidos por los diferentes monoclonales. Con el fin de acotar la búsqueda de estos antígenos de interés. El extracto total de epimastigotes se separó por medio de electroforesis, posteriormente se cortaron las fracciones por peso molecular, se eluyeron con agua milli-Q, se concentraron de 2 a 3 veces y se cuantificaron. La fracción F1 comprende proteínas entre 56 y 72 kDa (Figura 13B), la F2 de 28-55 kDa (Figura 13A), que a su vez se dividió en la F2.1 de 28-35 kDa y F2.2 de 36-55 kDa (Figura 13B). Se realizaron 3 fraccionamientos con resultados similares.

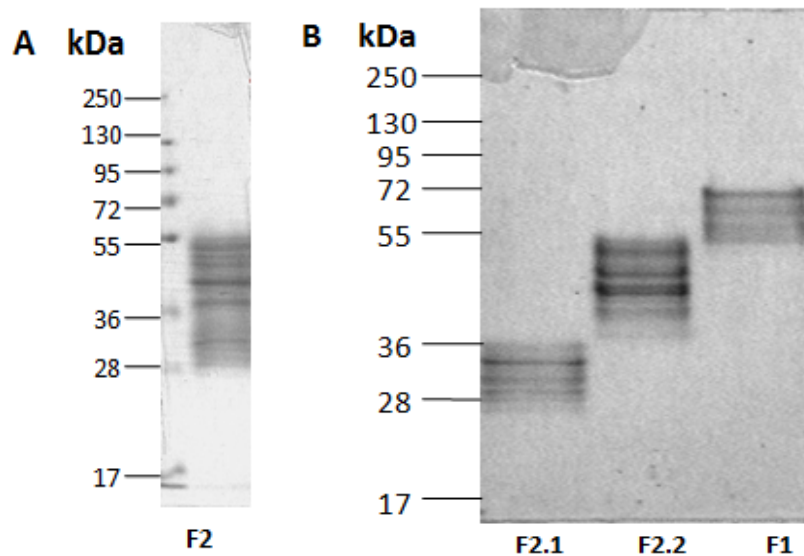


Figura 13. Gel de acrilamida, representativo de las fracciones proteicas de epimastigotes de *T. cruzi*. Las fracciones eluidas, concentradas y cuantificadas, fueron separadas mediante SDS-PAGE al 12%. En A) F2 y en B) F2.1, F2.2 y F1. Se cargaron 10µg de proteína por muestra y el gel se tiño con Azul de Coomassie.

7.3.1 Análisis de las fracciones proteicas de epimastigotes.

Después de haber realizado el fraccionamiento, se llevo a cabo el análisis de las fracciones 1, 2.1 y 2.2. Esto con el objetivo de conocer el peso molecular de las diferentes bandas que forman parte de las fracciones y su posible similitud en peso molecular con los antígenos que se unen a los MAbs. Este análisis fue hecho con el programa Molecular Imaging Kodak. En la Tabla 3, sólo se muestran las bandas identificadas por el software en tres experimentos independientes. En la F1 se identificaron dos antígenos de 70 y 55 kDa, los cuales podrían tratarse de los reconocidos por C16D, en F2.1 a la proteína de 29 kDa, reconocida por el MAb F14B, en F2.2 la proteína de 37 identificada por F14B y la de 44 kDa por ID5, además que en esta última fracción se visualizó el mayor número de proteínas. Posteriormente, estas fracciones se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se realizaron inmunoblots, con el objeto de corroborar que en estas fracciones, se encontraban los antígenos anteriormente mencionados. En la figura 14 se observa el reconocimiento de los MAbs en las diferentes fracciones proteicas, así como en un extracto total. El MAb C16D identificó a las proteínas de 70 y 55 kDa en la F1 (Figura 14C) y al antígeno de 41 kDa en la F2.2. F14B se unió a la proteína de 37 kDa en la F2.2 (Figura 14B) y a la de 29 kDa en la F2.1, además que el fraccionamiento ayudó a separar a las moléculas que contienen el epítipo reconocido por F14B en dos fracciones. Por último ID5 identificó a la proteína de 44 kDa (14A) en la F.2.2.

Tabla 3. Pesos moleculares (kDa) de las proteínas identificadas en las fracciones proteicas.

Fracción 1	Fracción 2.1	Fracción 2.2
**70	33	52
65	**31	50
59	29	47
55	28	**44
		**41
		37

** Proteínas más abundantes

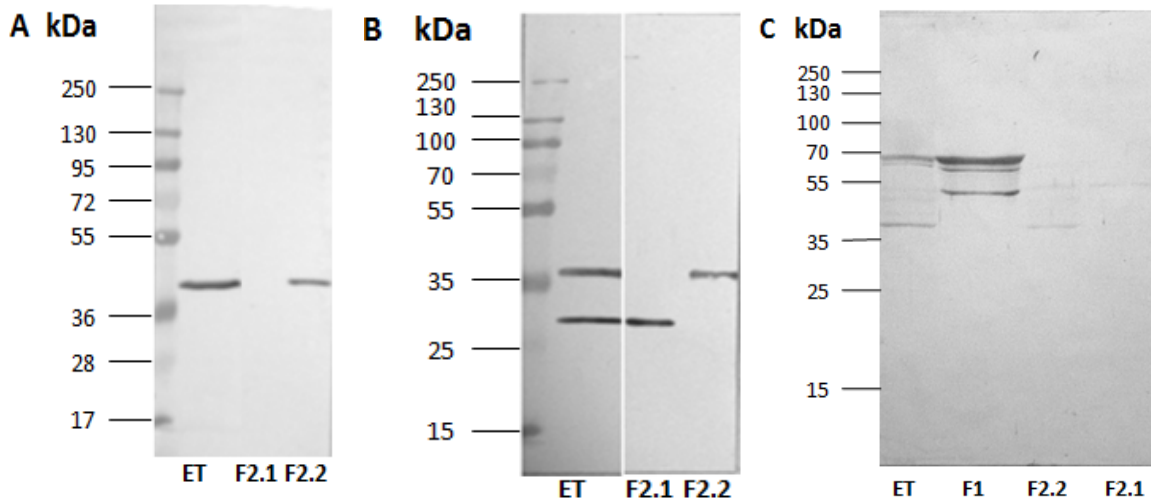


Figura 14. Reconocimiento de las proteínas reconocidas por los MAbs, en las fracciones. 10µg de Extracto Total (ET) y fracciones 1, 2.1 y 2.2, fueron separadas mediante SDS-PAGE al 12%, transferidas a nitrocelulosa y retadas con los MAbs. En A) MAb, en B) F14B y en C) C16D

7.4 Western blot con extracto obtenido por tratamiento con Tiourea-Urea

Como parte de la caracterización de las proteínas reconocidas por estos anticuerpos, se realizaron inmunoblots con un extracto proteico sometido a una forma diferente de extracción. Se quería saber si los MAbs reconocían más epítomos, los cuales por sonicación no se logran extraer o recuperar. En la Figura 15A se muestra el patrón proteico, tanto del extracto sonicado, como del sometido a extracción con buffer Tiourea Urea (T-U); donde se puede observar claramente que el bandeo proteico de los extractos difiere. Tal es el caso del doblete de aproximadamente 55 kDa que se observa abundantemente en el extracto T-U, el cual no se aprecia en el extracto ET, o la proteína de 44 kDa que se encuentra en el extracto ET, pero no está presente en T-U.

En la Figura 15B se observa el reconocimiento por parte de los MAbs tanto en el extracto sonicado, como en el extracto T-U. La mayor diferencia se pudo observar por parte de F14B, que además de las proteínas ya identificadas, reconoció un antígeno de 60 kDa y muy débilmente a un doblete de 110 kDa. Mientras que los otros MAbs tuvieron un patrón de reconocimiento similar al previamente observado en un extracto sonicado.

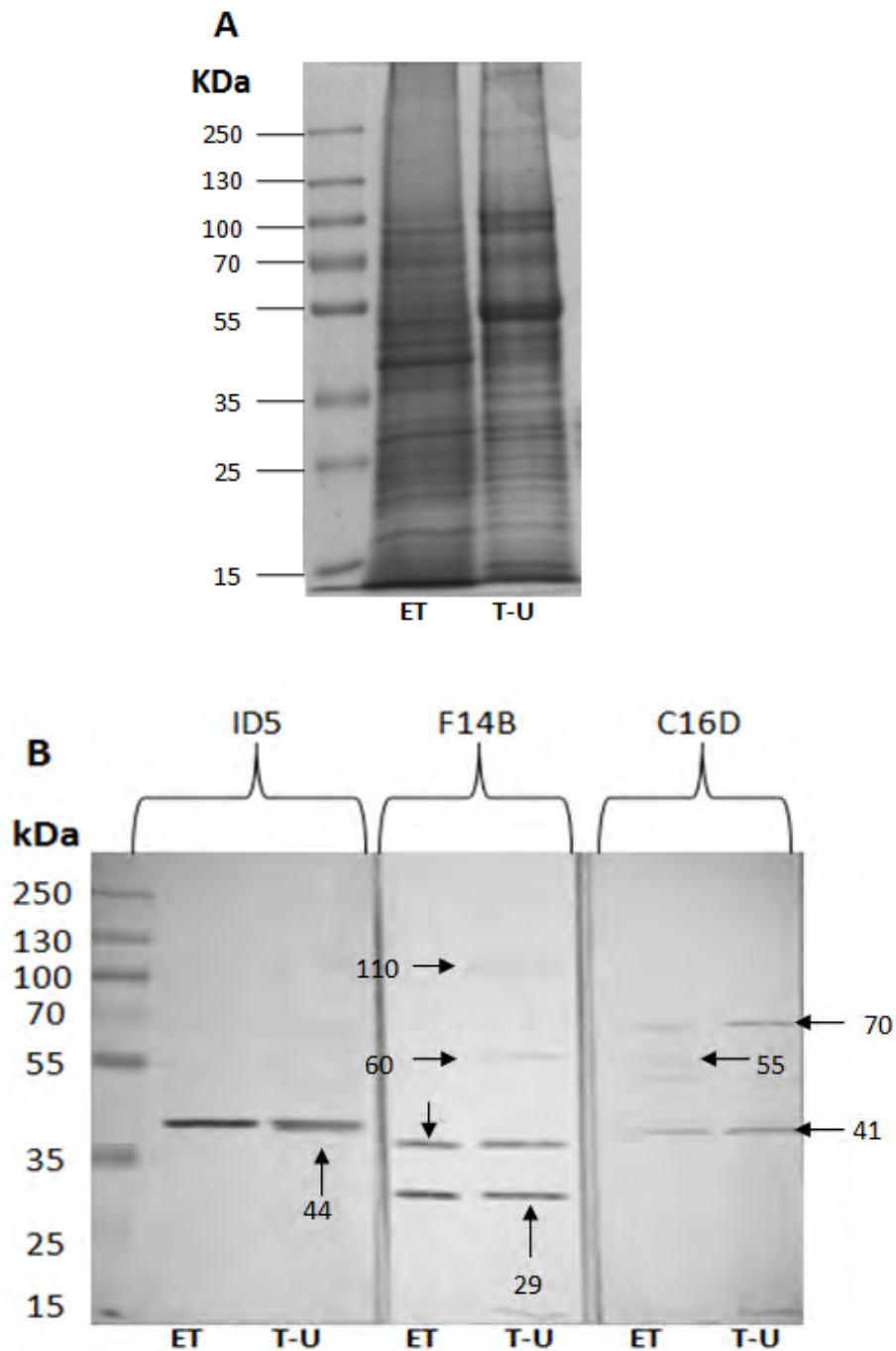


Figura 15. Comparación de antígenos reconocidos en dos extractos obtenidos por diferentes métodos. En A patrón proteico de extractos totales: sonicado (ET) y con buffer de extracción Tiourea Urea (T-U). 10 μ g de extracto en cada carril, separados por electroforesis SDS-PAGE al 12% y teñidos con azul de Coomassie. En B Western blot de MAbs ID5, F14B y C16D contra extracto sonicado (ET) y Tiourea Urea (T-U). 10 μ g de extracto por carril fueron separados por electroforesis SDS-PAGE al 12%, transferidos a nitrocelulosa y el WB se realizó como se describe en material métodos.

7.5 Proteínas reconocidas por los MAbs en condiciones nativas

Se realizaron inmunoblots con los MAbs, a partir de electroforesis en condiciones nativas, es decir en ausencia de cualquier agente desnaturizante y reductor como los detergentes o agentes caotrópicos. Esto con el fin de conocer si los antígenos reconocidos por los MAbs modificaban su peso molecular, lo que indicaría que lo identificado por los MAbs en condiciones reductoras, se trata de alguna subunidad de estas proteínas.

En la figura 16A, se muestra el patrón proteico del extracto total de epimastigotes en condiciones nativas y como control BSA (68 kDa). En la figura 16B se muestra el Western blot utilizando los MAbs. El anticuerpo ID5 reconoció una banda de aproximadamente 44 kDa, al igual que en condiciones desnaturizantes, F14B sólo reconoció ligeramente un barrido de 66 kDa y C16D al igual que en condiciones desnaturizantes, identificó un antígeno de 41 y un barrido de 70 kDa.

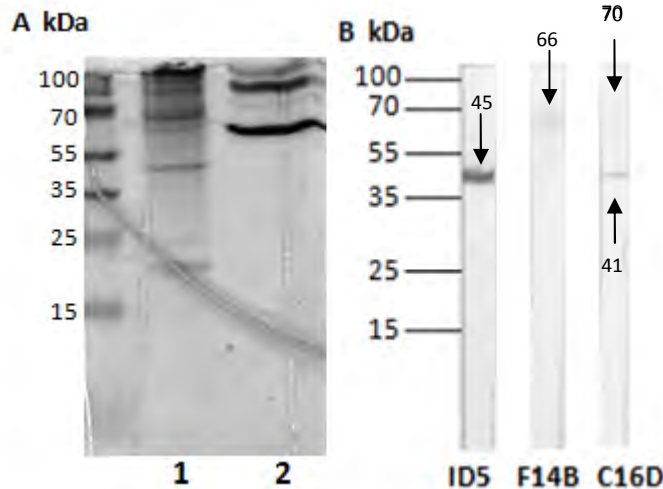


Figura 16. Patrón proteico del extracto total de epimastigotes (ET) y Western blot de MAbs en condiciones nativas. Fueron separados mediante electroforesis 20µg de extracto total sonicado (ET) por carril y como control 10µg de BSA, posteriormente transferidos a nitrocelulosa. En A1) 20µg de ET y en A2) 10µg de BSA. En B) Reconocimiento de MAbs, con el extracto en condiciones nativas, revelado con el sustrato 3-3 diaminobenzidina.

7.6 Proteínas glicosiladas reconocidas por los MAbs

Una herramienta para la identificación de carbohidratos son las lectinas, las cuales son proteínas que se unen a diferentes azúcares. Para conocer si alguna de las proteínas reconocidas por los MAbs ID5, F14B y C16D se encontraban glicosiladas, se usó esta metodología.

Se llevaron a cabo ensayos de Lectin blot con las fracciones 1 y 2 (Figura 17), utilizando las lectinas que se muestran en la Tabla 4. La mayoría de las lectinas no reconocieron antígenos que coincidieran en peso molecular con los identificados por los MAbs, sólo las proteínas de 55 y 70 kDa, reconocidas por el MAb C16D tuvieron concordancia en el bandeo con la lectina PNA y las

proteínas de 29 y 37 kDa reconocidas por F14B con la lectina Con-A. El antígeno de 44 kDa reconocido por ID5, no mostró concordancia con los azúcares identificados por las lectinas empleadas en estos ensayos.

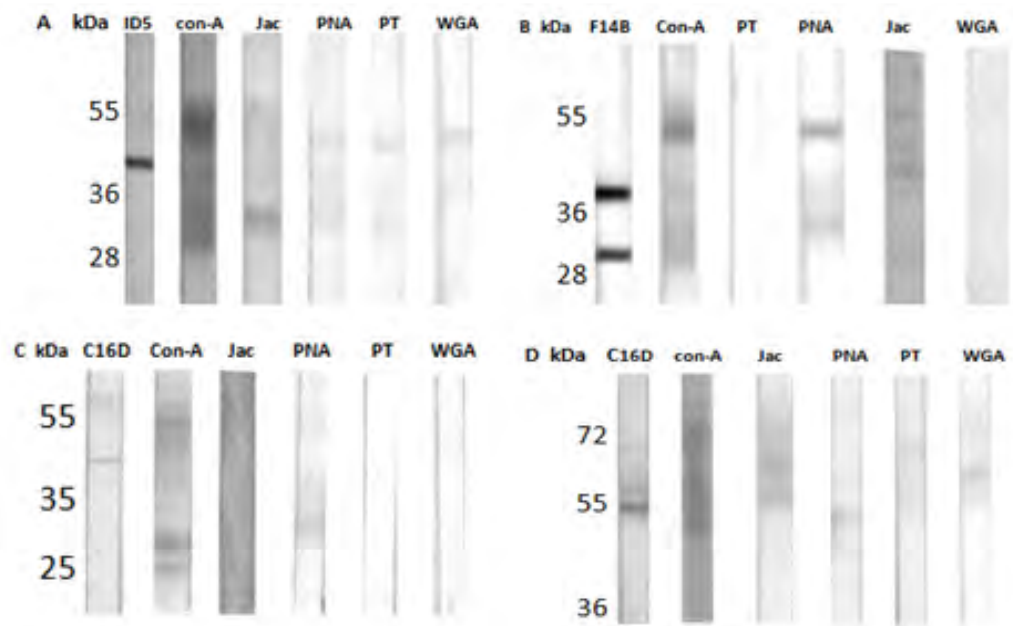


Figura 17. Reconocimiento de azúcares en las fracciones 1 y 2. Se separaron 150µg de las fracciones proteicas por medio de SDS-PAGE al 12%, se transfirieron a nitrocelulosa y se realizó el Lectin blot. En A) F2 revelada con las lectinas *Canavalia ensiformes* (con-A), *Arachis hypogaea* (PNA), *Artocarpus integrifolia* (Jacalina), *Psophocarpus tetragonolobus* (PT), *Triticum vulgare* (WGA) y MAb ID5, en B) F2 con lectinas y MAb F14B, en C) F2 con lectinas y MAb C16D, y D) F1 con lectinas y MAb C16D.

Tabla 4. Antígenos reconocidos por los MABs y carbohidratos específicos identificados con las lectinas

Lectina	con-A	PNA	Jacalina	PT	WGA
MAb ID5 (44kDa)	--	--	--	--	--
MAb F14B (29 y 37 kDa)	29 y 37	--	--	--	--
MAb C16D (41 , 55 y 65 kDa)	--	55 y 70	--	--	--

7.7 Western blot de MABs en doble dimensión

Se realizó un Western blot en doble dimensión (2-D), con el MAb C16D (Figura 18A) y el análisis del peso molecular y punto isoeléctrico de los blots hechos previamente en el laboratorio contra el MAb ID5 (Figura 18B); donde el número de proteínas reconocidas fue mucho mayor a lo observado

en una sola dimensión. En la tabla 5 se muestra el resumen de los diferentes spots encontrados en cada blot. El MAb C16D reconoció una proteína de 48 kDa con 3 isoformas, otra proteína de 41 con 4 isoformas y polipéptidos de 38 y 37 kDa con 2 isoformas cada uno. El MAb ID5 reconoció 6 isoformas de 38 kDa. Los Western blots realizados con el anticuerpo F14B no fueron tomados en cuenta para este análisis y posteriores, debido a que el reconocimiento por parte del MAb en los blots realizados fue variable.

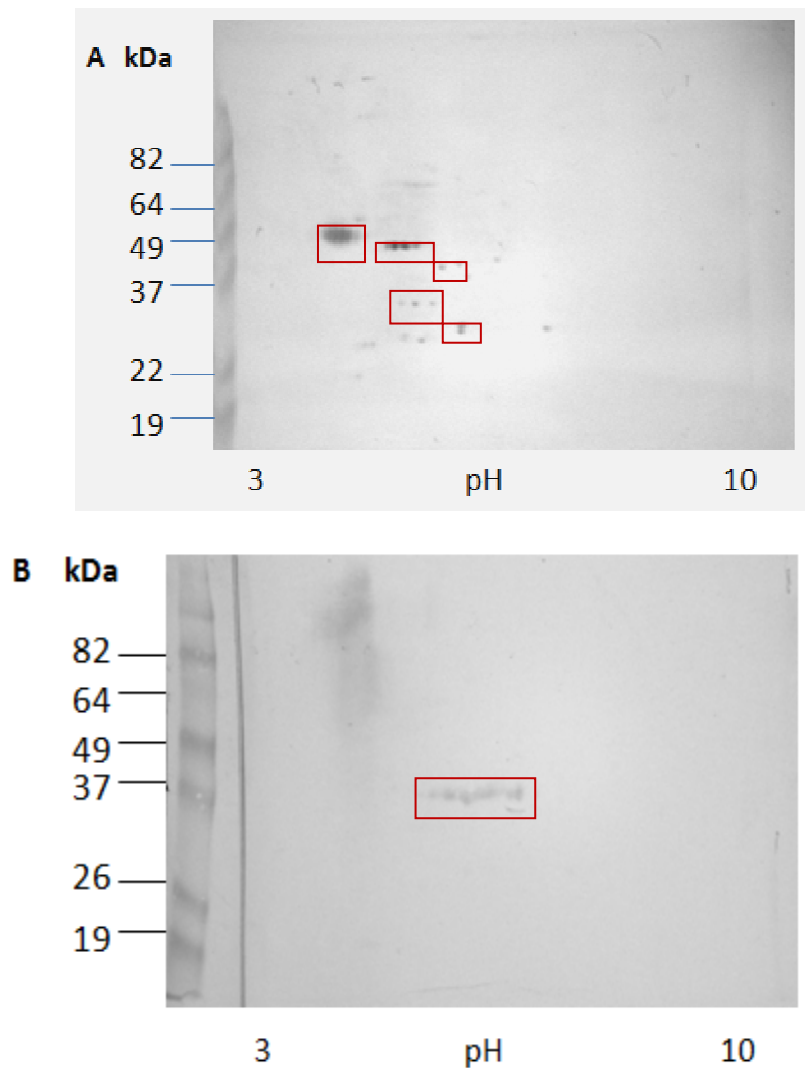


Figura 18. Antígenos reconocidos por los MAb en doble dimensión. En A) MAb C16D y en B) MAb ID5. Se corrieron geles 2-D con 150µg de extracto Tiurea-Urea de epimastigotes en rango de pH de 3 a 10 No Linear y posteriormente transferidos a una membrana de nitrocelulosa, retados frente a los MAb y revelados con el sustrato 3-3 diaminobenzidina.

Tablas 5. Peso Molecular (PM) y Punto isoeléctrico (pI) de los spots reconocidos por los MAbS C16D e ID5

MAb C16D PM 1D (kDa)	PM 2D (kDa)	pI
70	--	--
55	--	--
41	▪48	4.6, 4.7 y 4.8
	41	5.2, 5.3, 5.35 y 5.4
	38	5.6 y 5.8
	37	5.6
	32	5.3, 5.4 y 5.5
	30	6.1
	▪28	6.1

MAb ID5 PM 1D (kDa)	PM 2D (KDa)	pI
44	44	5.4,5.5, 5.6, 5.7 5.8,y 5.9

1D. Pesos moleculares reconocidos por los MAbS en una dimensión
 2D. Pesos moleculares reconocidos por los MAbS en doble dimensión
 ▪ Spots en mayor abundancia

7.8 Identificación de proteínas de fracciones por espectrometría de masas (MS/MS).

Las fracciones proteicas anteriormente mencionadas se digirieron con Tripsina y los péptidos fueron separados por medio de UPLC. El equipo de cromatografía estaba acoplado a un espectrómetro de masas Synapt G2-S con fuente de ionización tipo electro-aspersión. Por último, la identificación de las proteínas se realizó utilizando ProteinLynx Global SERVER (PLGS) con la base de datos de Uniprot específica para *Trypanosoma* y MASCOT (en línea). En total fueron identificadas 61 proteínas de *T. cruzi* (Figura 19), algunas de las cuales se encontraron en más de una fracción. La fracción en la que se identificaron más proteínas fue la F2.1 con 19 moléculas, después F2.2 con 13, mientras que en F1 sólo se lograron reconocer 4 proteínas con MASCOT y 4 con Uniprot. De estas 61 proteínas identificadas hay repeticiones, por lo que en realidad sólo se identificaron 27 polipéptidos diferentes

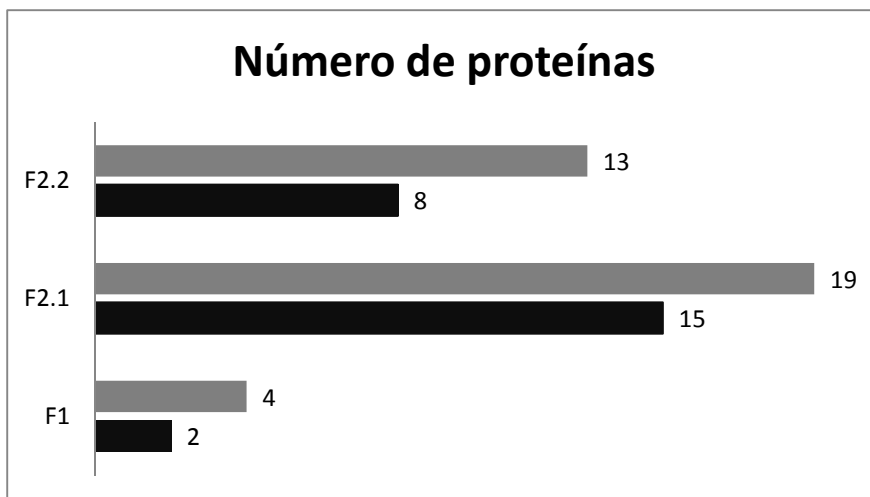


Figura 19. Representación cuantitativa de las proteínas identificadas en cada fracción, con MASCOT (en negro) y PLGS (gris).

Además estas proteínas fueron clasificadas de acuerdo a su función como: proteínas metabólicas, de defensa celular, síntesis proteica, de ciclo celular y estructurales. En la Figura 20 se muestra el número de proteínas identificadas por su función en las 3 fracciones, donde se observa que el mayor número de proteínas identificadas, fueron las metabólicas, seguidas por las de defensa celular.

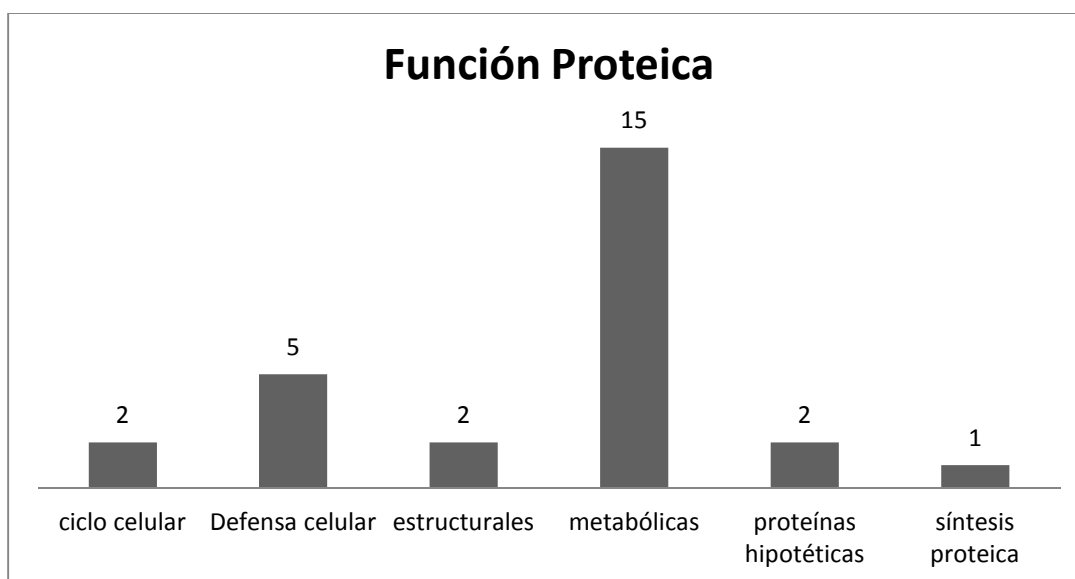


Figura 20. Clasificación funcional de las proteínas identificadas con PLGS y MASCOT.

A continuación, se muestran las diferentes búsquedas realizadas de las secuencias identificadas por espectrometría de masas con el algoritmo de MASCOT y PLGS. En las tablas 6, 7 y 8 se observan las proteínas identificadas con los parámetros mencionados en material y método.

En la tabla 6 se observan las proteínas identificadas de la Fracción 1, en donde tanto con el programa PLGS, como con MASCOT, fueron identificadas las proteínas de choque térmico de 70 y 85 kDa.

Tablas 6. Proteínas identificadas en F1 MASCOT y PLGS








Búsqueda MASCOT							
# de péptidos	Nombre	Cobertura de la secuencia	Score	PM (kDa)	pI	Número NCBI	Función
7	**Proteína de tipo choque térmico 85	25%	229	81.1	5.07	gi 162111	Defensa celular
9	**Proteína de choque térmico HSP 70	33%	111	71.5	5.42	gi 162117	Defensa celular

Búsqueda PLGS								
Color	# de péptidos	Nombre	Cobertura de la secuencia	Score	PM (kDa)	pI	Número Uniprot	Función
verde	26	**Proteína de tipo choque térmico de 85 kDa	35%	16490.7	81.2	5.07	P06660	Defensa celular
verde	29	**Proteína de choque térmico HSP70	42%	10662.7	71.5	5.42	Q26936	Defensa celular
verde	15	Mitocondrial Heat shock	26%	1185.452	71.4	5.87	B5U6T5	Defensa celular
amarillo	9	Piruvato Fosfato dicinasa 1	12%	281.3085	101.6	8.66	Q9GN79	metabolismo

**** Proteínas reconocidas tanto por MASCOT, como con PLGS
Proteínas encontradas en 2 o más fracciones \hat{u}**

En la siguiente tabla (Tabla 7), se pueden ver las todas proteínas identificadas de la Fracción 2.1. En este caso las proteínas glutamato deshidrogenasa, prostaglandina F2 alfa sintasa, transaldolasa, alfa y beta tubulina, el factor eucariote de iniciación 4a, la enolasa y la esterol 24 c metiltransferasa fueron identificadas por los dos programas (PLGS y MASCOT).

Tabla 7. Proteínas identificadas en F2.1 por MASCOT y PLGS.







Búsqueda MASCOT							
# de péptidos	Nombre	Cobertura de la secuencia	Score	PM (kDa)	pI	Número NCBI	Función
10	**Glutamato deshidrogenasa 	50%	181	49	7.99	gi 2981039	metabólica
6	**Prostglandin F2 alfa sintasa 	55%	163	42	5.90	gi 407841693	metabólica
2	L-tyrosina 2 oxoglutaratoaminotransferasa	35%	85	46	5.82	gi 1168606	metabólica
2	**Transaldolasa 	14%	82	36	5.96	gi 71406398	metabólica
3	**Beta tubulina 	13%	58	50	4.75	gi 111115853	estructural
4	**Alfa tubulina 	22%	62	50	4.94	gi 71397525	estructural
1	Proteína hipotética	14%	42	43	6.00	gi 71661567	
1	Receptor de activación de proteína Kinasa C	6%	37	35	5.73	gi 71661426	señalización
1	Proteína hipotética	12%	33	47	7.18	gi 407843748	
1	**Factor de elongación 1 alfa	14%	32	49	8.85	gi 1929445	Ciclo celular
1	**Factor eucariote de iniciación 4a 	8%	30	49	6.29	gi 71666325	Ciclo celular
1	**Enolasa 1 	13%	29	38	5.59	gi 5566209	metabólica
1	3-Fosfoglicerato cinasa	10%	24	13	5.16	gi 16945529	metabólica
1	**Esterol 24-C-metiltransferasa	5%	20	40	6.1	gi 407843552	metabólica
1	Alcohol deshidrogenasa	6%	19	42	6.07	gi 19718723	metabólica

Búsqueda								
PLGS								
Color	# de péptidos	Nombre	Cobertura de la secuencia	Score	PM (kDa)	pI	Número Uniprot	Función
verde	28	**Prostaglandina F2 alpha sintasa ⓘ	74%	12573.67	42	5.9	K4DRH6	metabólica
verde	21	Tyrosina aminotransferasa	74%	11129.86	46	5.8	P33447	metabólica
verde	27	Deshidrogenasa ⓘ	70%	7105.366	42	6.03	Q2TJB7	metabólica
verde	24	**Glutamato deshidrogenasa ⓘ	57%	6841.517	49	7.99	O61083	metabólica
verde	21	**Alfa tubulina ⓘ	57%	4095.542	50	4.94	Q8T9X5	estructural
verde	20	**Beta tubulina ⓘ	45%	3615.92	50	4.74	Q8STF3	estructural
verde	14	**Factor de elongación 1 alfa	30%	1473.818	53	9.11	K4E7S1	Ciclo celular
verde	12	**Enolasa ⓘ	33%	1105.558	46	5.92	K4E1A8	metabólica
Verde	7	**Factor eucariótico de iniciación 4 a ⓘ	17%	946.8907	45	5.98	Q4E162	Ciclo celular
verde	8	Thiol Transferasa Tc52 ⓘ	27%	718.8713	47	5.46	D3JLE6	Defensa celular
Verde	10	Isocitrato deshidrogenasa NADP	23%	614.0311	47	7.19	K4DUK8	metabólica
verde	10	**Transaldolasa ⓘ	37%	482.6682	36	5.8	B6RE15	metabólica
amarillo	6	Reductasa 1 Thiol dependiente	30%	472.6945	32	5.9	G0Z1G1	metabólica
amarillo	7	Arginina cinasa	24%	384.1464	40	6.73	O96507	metabólica
amarillo	4	Fosfoglicerato cinasa ⓘ	9%	279.1212	55	6.69	K2MT43	metabólica
amarillo	5	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa	14%	262.7275	29	8.86	I1XB73	metabólica
amarillo	6	Malato deshidrogenasa	23%	234.3213	33	8.44	K4E1P3	metabólica
amarillo	6	**ESTerol 24 c metiltransferasa	19%	200.0728	40	6.10	D9I8N9	metabólica
amarillo	6	Proteína ribosomal ácida	13%	196.4499	35	4.91	P26796	Síntesis proteínas

** Proteínas reconocidas tanto por MASCOT, como con PLGS
Proteínas encontradas en 2 o más fracciones ⓘ

En la tabla 8, se muestran las proteínas identificadas en la Fracción 2.2, las proteínas identificadas por ambos programas fueron la alfa y la beta tubulina, la glutamato deshidrogenasa, deshidrogenasa, tansaldolasa, factor de elongación 1 y la enolasa.

Tabla 8. Proteínas identificadas en F 2.2 con MASCOT y PLGS.

Búsqueda MASCOT							
# de péptidos	Nombre	Cobertura de la secuencia	Score	PM (kDa)	pI	Número NCBI	Función
7	**beta tubulia 	22%	100	50	4.69	gi 1220547	estructural
7	**glutamato deshidrogenasa 	35%	80	49	7.99	gi 2981039	metabólica
3	**Deshidrogenasa 	34%	79	42	6.03	gi 61741938	metabólica
1	**Transaldolasa 	8%	48	36	5.81	gi 71400573	metabólica
2	**Factor de elongación 1 (<i>Leishmania infantum</i>)	10%	45	49	9.03	gi 339897840	Ciclo celular
2	**Alfa tubulina 	28%	35	50	4.94	gi 71397525	estructural
1	Factor de elongación 2	2%	26	95	5.79	gi 47559179	Ciclo celular
1	**Enolasa 1 	11%	16	38	5.59	gi 5566209 1	metabólica

Búsqueda PLGS								
Color	# de péptidos	Nombre	Cobertura de la secuencia	Score	PM (kDa)	pI	Número Uniprot	Función
verde	4	**Beta tubulina	12%	1038.368	50	4.74	Q8STF3	Estructural
Verde	4	**Alfa tubulina	11%	414.8903	47	5.49	Q26973	estructural
verde	2	**Deshidrogenasa	5%	304.8354	42	6.03	Q2TJB7	metabólica
verde	3	Arginina cinasa	11%	276.0844	40	6.73	O96507	metabólica
amarillo	2	**Transaldolasa	8%	203.9244	36	5.8	B6RE15	metabólica
amarillo	2	Prostaglandina F2 alpha sintasa	5%	185.9544	42	5.9	Q4E4V7	metabólica
verde	16	Tyrosina aminotransferasa	44%	6556.247	46	5.82	Q4E4E7	metabólica
verde	22	**Glutamato deshidrogenasa	55%	3734.41	49	7.99	O61083	metabólica
verde	19	**Factor de elongación 1 alfa	44%	2860.452	49	9.11	Q4DYF9	Ciclo celular
verde	8	Thiol Transferasa	21%	740.3386	49	5.4	Q7Z0C8	Defensa celular
amarillo	5	Fosfoglicerato cinasa	14%	591.7554	44	6.24	Q4DNV8	metabólica
amarillo	7	**Enolasa	18%	461.2445	46	5.92	K4E1A8	metabólica
amarillo	6	Isocitrate dehydrogenase NADP	12%	217.5921	47	6.87	K2MRY2	metabólica

**** Proteínas reconocidas tanto por MASCOT, como con PLGS
Proteínas encontradas en 2 o más fracciones**

7.8.1 Identificación de proteínas reconocidas por los MABs

Posteriormente, con la información obtenida de la secuenciación, se identificaron aquellas proteínas cuyo peso molecular y punto isoelectrico fuera igual ó se encontrará más cercano al de las reconocidas por los MABs (Tablas 9 y 10). No todas las proteínas reconocidas por los anticuerpos coincidieron con las identificadas por espectrometría de Masas.

De las proteínas identificadas, las que mostraron mayor concordancia tanto en peso molecular como en punto isoelectrico, fueron los polipéptidos de 41 y 44 kDa reconocidas por los MABs C16D e ID5 respectivamente. La proteína de 41 kDa es similar a la Prostaglandina F2 α -sintasa con un peso molecular de 42 kDa y pI de 5.9.

La proteína de 38 a 44 kDa, podría tratarse de la enolasa de 38 kDa y pI de 5.59 ó el Factor eucariótico de iniciación 4a (eIF4A) de 44 kDa y pI de 5.98.

Tabla 9. Comparación de proteínas reconocidas por el MAb C16D e identificadas mediante MS

PM C16D (kDa) 1D	PM (kDa) 2D	pI	Proteína identificada por MS/MS	PM (kDa)	pI
70	--	--	Heat Shock protein HSP 70	71.5	5.42
55	--	--	Fosfoglicerato cinasa	55	6.69
41	48	4.6, 4.7 y 4.8	--	--	--
	41	5.2, 5.3, 5.35, y 5.4	Prostaglandin F2 α sintasa	42	5.9
	38	5.6 y 5.8	Transaldolasa	36	5.8
	37	5.6	Reductasa 1 Thiol dependiente	32	5.9
	32	5.3, 5.4 y 5.5			
	30	6.1	--	--	--
28	6.1	--	--	--	

Tabla 10. Comparación de proteínas reconocidas por el MAb ID5 e identificadas mediante MS.

PM ID5 (kDa)1D	PM (kDa)2D	pI	Proteína identificada por MS/MS	PM (kDa)	pI
44	38	5.4,5.5, 5.6, 5.7, 5.8y 5.9	Enolasa 1	38	5.59
			Factor eucariótico de iniciación 4 a	44	5.98

7.9 Ensayos con Enolasa.

Como una forma de identificar apropiadamente a la proteína reconocida por el MAb ID5, se planeo un ensayo de competencia con un anticuerpo α -enolasa, ya que en los análisis de MS se encontró una proteína (enolasa 1) con las características tanto en peso molecular, como en punto isoeléctrico a la reconocida por el MAb ID5. Primero se realizó un Western blot, con la finalidad de conocer si la enolasa coincidía en peso molecular, con lo identificado por ID5 (Figura 21), para posteriormente realizar el ensayo de competencia con el anticuerpo policlonal α -enolasa. El inmunoblot se hizo retando diferentes extractos proteicos de *T.cruzi* frente a los anticuerpos anteriormente mencionados y como control positivo extracto de cisticercos de *Taenia solium*, donde se ha demostrado la presencia de la enolasa. El reconocimiento por parte del anticuerpo α -enolasa en los extractos de *T. cruzi* sólo mostró bandas de entre 15 y 25 kDa, lo cual no coincide con lo reconocido por el MAb ID5, debido a esto el experimento de competencia no se llevó a cabo.

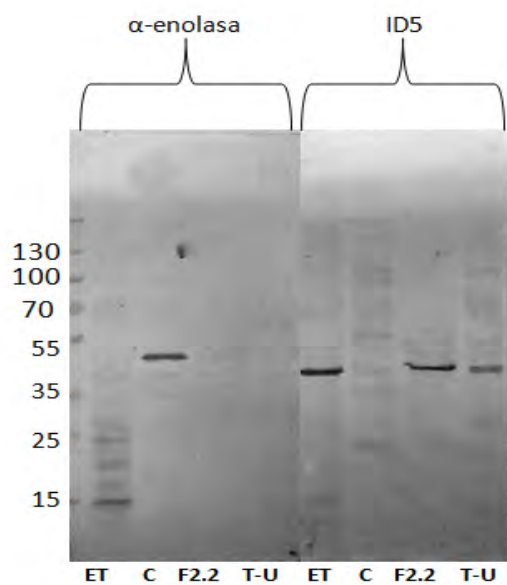


Figura 21. Western blot de diferentes extractos contra anticuerpo α -enolasa e ID5 como control. 20 μ g de extracto total (ET) , de F2.2 y de extracto Tiourea Urea (T-U) y 10 μ g de extracto de Cisticercos (C) se separaron por medio de electroforesis al 12% y transferidos a nitrocelulosa.

VIII. Discusión

Los anticuerpos monoclonales se descubrieron en la primera mitad de los años setentas por Milstein y Kohler en el laboratorio de Biología molecular, en la Universidad de Cambridge. Desde entonces los MAbs se han vuelto herramientas en el diagnóstico y tratamiento de diversas enfermedades (García-Merino 2011). *T. cruzi* posee una gran variabilidad genética, por lo que la expresión antigénica del parásito es diferencial, dependiente de la cepa y estadio de desarrollo (Díaz et al., 2011), debido a esto los anticuerpos monoclonales han sido de vital importancia, para la caracterización de proteínas del parásito.

En este trabajo se intentó realizar la caracterización, identificación y aislamiento de antígenos de *T. cruzi*, reconocidos por los MAbs ID5, F14B y C16D. Los MAbs se produjeron en el laboratorio por López-Olmos (1999). El MAb ID5 reconoció un antígeno de 44kDa, F14B dos de 29 y 37 y C16D tres antígenos de 41, 55 y 65 kDa.

Se realizaron ensayos de Cromatografía de afinidad e inmunoprecipitación con los MAbs, en los que no fue posible separar las proteínas reconocidas por los MAbs. En la cromatografía, el ligando, en este caso el MAb ID5 pudo haberse unido por la porción Fab (la cual es la parte que interacciona directamente con el antígeno) a la matriz de sefarosa, por lo el anticuerpo no unió al antígeno de interés. Además en el caso del amortiguador para eluir de urea, empleado despegó al MAb de la matriz. Posteriormente, se realizó la inmunoprecipitación, en la cual los resultados también fueron negativos.

Posteriormente se llevó a cabo un fraccionamiento del extracto total de *T. cruzi* con la finalidad de acotar las posibilidades de localizar el antígeno reconocido por estos anticuerpos. Esta tuvo un resultado parcialmente positivo, ya que se pudieron identificar algunas proteínas que posiblemente sean las reconocidas por los MAbs. Estas fracciones fueron F1 y F2 formada por F2.1 y F2.2. En la fracción 1 se localizaron dos de los posibles antígenos reconocidos por C16D, el de 55 y 70 kDa; en la fracción 2.1 el antígeno de 29 kDa reconocido por F14B y en la fracción 2.2 los antígenos de 41 kDa reconocido por C16D y de 44 kDa por ID5. Los MAbs reconocen proteínas de diferente peso molecular dependiendo de la cepa de *T. cruzi* con la que sean retados (López-Olmos 1999).

La solubilización de las proteínas es de vital importancia para su aislamiento y estudio (Applichem, 2008). El tipo de extracción proteica y los detergentes se deben escoger por sus propiedades y en especial por el tipo y cantidad de proteínas que se requieren extraer. Se decidieron realizar ensayos de Western blot con antígeno extraído con amortiguador T-U. Se observaron algunas diferencias en comparación con el antígeno normalmente usado, el cual es sonicado. El cambio en el

reconocimiento más notorio fue por parte del MAb F14B; el cual además de identificar las proteínas antes mencionadas, reconoció un antígeno de 60 kDa y un doblete de 110 kDa. En cuanto ID5 y C16D no mostraron diferencias, lo que indica que probablemente con cualquier forma de extracción, se logran extraer todas las proteínas reconocidos por estos.

El hecho de que el MAb F14B haya reconocido más antígenos con este tipo de lisis, es debido a que las propiedades de los agentes caotrópicos como lo son la Tiourea y la Urea, los cuales rompen enlaces no-covalentes (puentes de hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo e hidrofóbicas), facilitando la desnaturalización (Rabilloud, 2009) y a los detergentes como el CHAPS (el cual es un surfactante zwitteriónico), que preserva la estructura de las proteínas (Applichem, 2008), promovió una mejor extracción de proteínas membranales, preservando su estructura. Lo que hizo posible que el MAb se reconociera a más epítomos.

El principal uso de detergentes como SDS o CHAPS, es en el rompimiento de las interacciones entre proteínas y con los lípidos, además de la desnaturalización de estas estructuras (Johnson, 2013). Usualmente las proteínas se separan en presencia de detergentes, en condiciones desnaturalizantes y reductoras (Arndt et al., 2012). La electroforesis en condiciones nativas, se realiza en ausencia de estos detergentes, agentes desnaturalizantes, caotrópicos y reductores. En este estudio se llevo a cabo este tipo de electroforesis, para después transferir y realizar un inmunoblot. Al igual que en los ensayos con buffer T-U, sólo el MAb F14B tuvo cambios en el reconocimiento, ya que identificó un barrido de aproximadamente 66 kDa, lo que indica que está proteína en estado nativo es de este peso molecular y lo observado en otras condiciones, se trata de los dímeros en los que se divide dicha molécula (Nelson & Cox 2008).

A la par del fraccionamiento proteico, se realizó la caracterización de los azúcares en las proteínas reconocidas por los MAbs. Las modificaciones postraduccionales (PTMs) son eventos ó procesos covalentes que cambian las propiedades de una proteína, por adición de un grupo modificante a uno o más aminoácidos. Las PTMs de una proteína pueden determinar su actividad, localización, función e interacción con otras proteínas (Mann & Jensen, 2003). La glicosilación es la modificación en la cual un carbohidrato se une a un polipéptido (N-glicosilación u O-glicosilación). *T. cruzi* cuenta con una densa cubierta de glicoinsitolfosfolípidos (GIPLs) y mucinas. Estos GIPL's, tienen básicamente la misma estructura que otros anclajes GPI, excepto que tienen sustituciones con galactosa, N-acetilglucosamina y ácido siálico. Por su parte las mucinas contienen grandes cantidades de O-glicanos compuestos de N-acetilglucosamina con uno a cinco residuos de galactosa (Varki et al., 2009).

En cuanto el análisis que se realizó, se encontró que las polipéptidos de 55 y 65 kDa reconocidas por el MAb C16D, tuvieron concordancia en el peso molecular con proteínas reconocidas por la lectina PNA, con unión a los azúcares β -galactosa (1-3) y N acetilgalactosamina, mientras que las proteínas de 29 y 37 kDa reconocidas por el MAb F14B tuvieron concordancia con la lectina Con-A que se une a α -manosa y α -glucosa. El antígeno de 44 kDa reconocido por ID5, no mostró concordancia con las glicoproteínas reconocidas por las lectinas empleadas en estos ensayos. La unión por parte de las lectinas Con-A y PNA, con los antígenos de 29, 37, 55 y 70 kDa, podría estar indicando, que se tratan de glicoproteínas que contienen α -manosa, α -glucosa, β -galactosa ó N-acetilgalactosamina. En el caso del antígeno reconocido por el MAb F14B podría tratarse de una glicoproteína de superficie, la cual posiblemente participa en la invasión celular, ya que como fue demostrado en el laboratorio protege parcialmente a los ratones de la infección, e inhibe la entrada del parásito a la célula hospedera (López-Olmos, 1999); mientras que los antígenos reconocidos por los otros MAbs podrían ser de naturaleza proteica.

Como parte del estudio del proteoma, el cual es el estudio de la estructura y comportamiento de todas las proteínas producidas por un genoma, en el laboratorio se han realizado estudios, por medio de electroforesis bidimensional, con cepas circulantes en México: Querétaro, Ninoa y Ver-6. En estos estudios, se observaron diferencias en la expresión proteica entre las distintas cepas; esto debido a los diferentes genotipos, a los cuales pertenecen estas (Martínez-Velasco, 2004).

La electroforesis bidimensional (2-D), es una sucesión de dos electroforesis sobre una misma muestra, en este caso extracto total de *T. cruzi*. En la primera dimensión las proteínas son separadas de acuerdo a su carga eléctrica y en la segunda dimensión por su masa molecular. El spot resultante está orientado de acuerdo al plano Cartesiano, con los puntos isoeléctricos ácidos a la izquierda y los pesos moleculares bajos en la parte inferior (Fichmann & Westermeier 1999).

En 2005 Martínez-Velasco separó extractos totales se separaron en dos dimensiones, posteriormente transferidos a nitrocelulosa y retados frente a los MAbs, donde se observó que estos anticuerpos a diferencia de lo visto en una dimensión, reconocían múltiples isoformas proteicas. En el caso del MAb C16D reconoció proteínas de 48 kDa con 3 isoformas, de 41 kDa con 4 y de 38 kDa con 2 isoformas y el MAb ID5 6 isoformas de una proteína 38 kDa. Estas isoformas son proteínas con actividad similar, pero con diferente secuencia, provenientes de diferentes o un mismo gen generadas por corte y empalme (splicing) alternativo (Lodish et al., 2004).

En este trabajo se identificó que los MAbs reconocen proteínas con múltiples isoformas, lo que indica que los epítomos reconocidos, se encuentran en proteínas con diferentes puntos isoeléctricos. Sin embargo, en el caso de los inmunoblots en doble dimensión del MAb F14B, no fue posible

realizar el análisis de los spots, debido a que se encontró una alta variabilidad en el reconocimiento entre cada uno de los ensayos realizados.

Las proteínas son la clave para determinar funciones celulares y el dinamismo en sus interacciones revelan mucho más sobre las células y sus procesos que una secuencia genómica (Blakeley et al., 2010), por esta razón en este trabajo usando Espectrometría de Masas se realizó un análisis de la fracciones proteicas donde se encontraban los antígenos reconocidos por los MAb. El análisis reveló 61 proteínas, de las cuales 36 fueron encontradas tanto en los análisis con MASCOT, como con PLGS. 27 proteínas fueron diferentes, de las cuales se realizó la clasificación de acuerdo a su función, donde la mayoría se trataron de proteínas metabólicas.

De estas proteínas identificadas, la mayoría no tuvo coincidencia con las reconocidas por los MAb; esto se pudo deber al hecho de que las proteínas reconocidas por los MAb, se encuentran en un bajo porcentaje dentro del complejo proteico. Sin embargo, los resultados de este análisis arrojaron que el MAb C16D podría reconocer una proteína de 41 kDa que coincide con Prostaglandina F₂ α -sintasa y con la proteína de 37 kDa que tiene concordancia con la Transaldolasa de 36 kDa y pI de 5.8, la cual es una enzima que participa en la vía de las pentosas fosfato (Maugeri & Cazzulo 2004). En el caso del MAb ID5, se tomaron en cuenta proteínas de dos diferentes pesos moleculares (44 y 38 kDa), esto debido a que el reconocimiento en peso varía de acuerdo al método usado (1D o 2D). Este cambio pudo deberse a la variación de los marcadores de peso molecular. Debido a esto, se investigó si el MAb ID5 podría estar dirigido hacia la proteína Enolasa 1, una enzima citosólica que cataliza la conversión de 2-fosfoglicerato a fosfoenol piruvato en la glicólisis, aunque en algunos parásitos protozoarios como *Leishmania mexicana* actúa como una proteína de unión a plasminógeno y por lo tanto se asocia a membrana (Figuera et al., 2013). En ensayos con un anticuerpo comercial policlonal α -enolasa, se demostró que no había el reconocimiento esperado por parte del anticuerpo en el extracto de *T. cruzi*; esto puede deberse a que el anticuerpo usado no era el apropiado para el reconocimiento de la enolasa de *T. cruzi*. El antígeno identificado por ID5, también tuvo concordancia con el Factor eucariótico de iniciación 4 a (eIF4A) de 44 kDa y pI de 5.98 (Svitkin et al., 2001). Es necesario realizar más análisis para corroborar la identidad de estas proteínas reconocidas por los MAb.

IX. Conclusiones

- ✓ El fraccionamiento del extracto total de *T. cruzi* permitió identificar a las principales proteínas que componen dichas fracciones
- ✓ Las proteínas de 55 y 70 kDa reconocidas por C16D y de 29 y 37 kDa identificadas por F14B presentan concordancia con los azúcares identificados por las lectinas empleadas en este estudio.
- ✓ El uso de agentes caotrópicos como la tiurea y la urea para la extracción proteica y la electroforesis en dos dimensiones, permitió identificar más epítomos por parte del MAb F14B.
- ✓ En condiciones nativas las proteínas reconocidas por los MAbs presentan el mismo peso molecular, excepto por la reconocida por el MAb F14B, el cual reconoce una proteína de 66kDa.
- ✓ Los anticuerpos monoclonales reconocen un amplio número de isoformas proteicas. El MAb C16D de 28 a 48 kDa e ID5 6 isoformas de 44 kDa.

X. Perspectivas

- Realizar más ensayos de MS, para la mejor identificación de las proteínas reconocidas por los MAbs.
- Comprobar que el MAb C16D reconoce a la proteína Prostaglandina F2 α -sintasa y el MAb ID5 a eIF4a.
- Estudiar la batería de proteínas identificadas, que forman las fracciones realizadas en este trabajo.

XI Bibliografía

1. Alves M., Abuin G., Kuwajima V., & Colli W. (1986). Partial inhibition of trypomastigote entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 21: 75–82.
2. Andrews N., Abrams C., Slatin S & Griffiths G. (1990). A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. *Cell*. 61: 1277–1287
3. Andrews N., Hong K., Robbins E. & Nussenzweig V. (1987). Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology*. 64: 474-484.
4. Applichem (2008). Detergents. Information raining. Consultado el 20 de agosto de 2013. www.applichem.com.
5. Arndt C., Koristka S., Bartsch H. & Bachmann M. (2012). Protein Electrophoresis. (B. T. Kurien & R. H. Scofield, Eds.), *Methods in Molecular Biology*. 869:49–53.
6. Bogitsh B., Carter C. & Oeltmann T. (2005). *Human Parasitology*. 3rd edition. Elsevier Press.
7. Bosseno M., Barnabé C., Gastélum E., Kasten F., Ramsey J., Espinoza B. & Brenière S. (2002). Predominance of *Trypanosoma cruzi* Lineage I in Mexico. *Society*. 40: 627–632.
8. Blakeley P., Siepen J., Lawless C. & Hubbard S.(2010). Investigating protein isoforms via proteomics: a feasibility study. *Proteomics*.10: 1127–1140.
9. Buscaglia C., Campo V., Frasch A. & Di Noia J. (2006). *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nature reviews. Microbiology*. 4: 229–236.
10. Buschiazzo A., Muiá R., Larrioux N., Pitcovsky T., Mucci J., & Campetella O. (2012). *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase in complex with a neutralizing antibody: structure/function studies towards the rational design of inhibitors. *PLoS Pathogens*. 8: e1002474.
11. Carabarin-Lima A., González-Vázquez M., Rodríguez-Morales O., Baylón-Pacheco L., Rosales-Encina J., Reyes-López P. & Arce-Fonseca M. (2013). Chagas Disease (American trypanosomiasis) in México: An update. *Acta Tropica*. 127:126-135.
12. Cazzulo J., Stoka V. & Turk V. (2001). The major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*: a valid target for chemotherapy of Chagas disease. *Current pharmaceutical design*. 7: 1143–1156.
13. Cooper R., Inverso J., Espinosa M., Nogueira N. & Cross G. (1991). Characterization of a candidate gene for GP72, an insect stage specific antigen of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 49: 45-60.
14. Cortez M., Silva M., Neira I., Ferreira D., Sasso G., Luquetti A., Rassi A., Yoshida N. (2006). *Trypanosoma cruzi* surface molecule gp90 downregulates invasion of gastric mucosal epithelium in orally infected mice. *Microbes and Infection*. 8: 36–44.
15. Cruz-Reyes A. & Pickering-López J. (2005). Chagmex. México DF., UNIBIO, Instituto de Biología, UNAM. Consultado el 21 de enero del 2013. <http://www.unibio.unam.mx/chagmex>.
16. Cruz-Reyes A. & Pickering-López, J. (2006). Chagas disease in Mexico: an analysis of geographical distribution during the past 76 years-a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 101: 345–354.
17. Cuervo P., Domont G. & De Jesus J. (2010). Proteomics of trypanosomatids of human medical importance. *Journal of Proteomics*. 73: 845–867.
18. De Lana M. & Marques de Menezes E. (2010). Biology of *Trypanosoma cruzi* and Biological Diversity. *American Trypanosomiasis: Chagas Disease one hundred years or research*. 339-343.

19. De Lima A., Medina R., Uzcanga G., Noris Suárez K., Contreras V., Navarro M. & Bubis J. (2006). Tight binding between a pool of the heterodimeric alpha/beta tubulin and a protein kinase CK2 in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitology*. 132: 511–523.
20. De Souza W. (2002). Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Clinical Pharmaceutical Design*. 8: 269–285.
21. Díaz M., Solari A. & González C. (2011). Differential expression of *Trypanosoma cruzi* I associated with clinical forms of Chagas disease: overexpression of oxidative stress proteins in acute patient isolate. *Journal of Proteomics*. 74: 1673–82.
22. Docampo R., De Souza W., Miranda K., Rohloff P., & Moreno S. (2005). Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nature reviews, Microbiology*. 3: 251–261.
23. Eickhoff C., Giddings O., Yoshida N. & Hoft D. (2010). Immune responses to gp82 provide protection against mucosal *Trypanosoma cruzi* infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105:687–691.
24. Epting C., Coates B., & Engman D. (2010). Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology*. 126: 283–291.
25. Fichmann J. & Westermeier R. (1999). 2-D Gel electrophoresis an overview. *Methods in Molecular Biology*. 112:1-7.
26. Figuera L., Gómez-Arreaz A. & Avilán L. (2013). Parasitism in optima forma: exploiting the host fibrinolytic system for invasion. *Acta tropica*, 128:116–123.
27. Galavíz-Silva L., Molina-Garza D., González-Santos M., Mercado-Hernández R., González-Galavíz J., Rosales-Encina J. & Molina-Garza Z. (2009). Update on seroprevalence of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies among blood donors in northeast Mexico. *The American Journal of tropical Medicine and hygiene*. 81: 404–406.
28. García Merino A. (2011). Monoclonal antibodies. Basic features. *Neurología (Spain)*. 26: 301–306.
29. Goldenberg S. & Avila A. (2011). Aspects of *Trypanosoma cruzi* stage differentiation. *Advances in Parasitology*. 75:285–305.
30. Guzmán-Bracho C. (2001). Epidemiology of Chagas disease in Mexico: an update. *Trends in Parasitology*. 17: 372–376.
31. Harlow E., Lane D. (1988). *Antibodies a laboratory manual*. New York U.S.A., Cold Spring Harbor Lab. 298-301.
32. Haynes P., Russell D. & Cross G. (1996). Subcellular localization of *Trypanosoma cruzi* glycoprotein Gp72. *Journal of Cell Science*. 109:2979–2988.
33. Johnson M. (2013). Detergents Triton X-100, Tween 20 and more. Labome laboratories. Consultado el 10 de agosto dl 2013. <http://www.labome.com/about/about.html>.
34. Katzin, A., & Colli W. (1983). Lectin receptors in *Trypanosoma cruzi*. An N-acetyl-D-glucosamine-containing surface glycoprotein specific for the trypomastigote stage. *Biochimica et Biophysica Acta*. 727: 403–11.
35. Laemmli U. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
36. Levy G., Tasso, L., Longhi S, Rivello H., Kytö V., Saukko P., Levin M., et al. (2011). Antibodies against the *Trypanosoma cruzi* ribosomal P proteins induce apoptosis in HL-1 cardiac cells. *Int. Journal for Parasitology*. 41: 635–644.
37. Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C., Krieger M., Scott M., Zipursky L. & Darnell J. (2004). *Molecular Cell Biology*. 5th edition. WH Freeman. pp 114.
38. López Olmos M. (1999). Identificación y caracterización de epítomos proteicos de una cepa mexicana de *Trypanosoma cruzi* a través del uso de anticuerpos monoclonales. Tesis Maestría en Investigación Biomédica Básica. Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

39. Maeda F., Cortez C. & Yoshida N. (2012). Cell signaling during *Trypanosoma cruzi* invasion. *Frontiers in Immunology*. 3: 1-7.
40. Mann M. & Jensen O. (2003). Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nature Biotechnology*. 21: 255–261.
41. Martínez I. & Espinoza B. (2010). La importancia del diagnóstico de la Tripanosomiasis Americana o Enfermedad de Chagas. *Pacal Medlab Año 2*: 14-21.
42. Martínez I., Nogueira B., Martínez-Hernández F. & Espinoza B. (2013). Microsatellite and mini-exon analysis of Mexican human DTU I *Trypanosoma cruzi* strains and their susceptibility to nifurtimox and benznidazole. *Vector borne and zoonotic diseases*. 13: 181–187.
43. Martínez-Velasco M. (2004). Estudio del proteoma de *Trypanosoma cruzi*. Identificación de moléculas con importancia biológica. Tesis de Licenciatura Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México.
44. Maugeri D. & Cazzulo J. (2004). The pentose phosphate pathway in *Trypanosoma cruzi*. *FEMS microbiology letters*, 234: 117–123.
45. Monteón V., Guzmán-Rojas L., Negrete-García C., Rosales J. Lopez P. (1997). Serodiagnosis of American Tripanosomiasis by using nonpathogenic trypanosomatid antigen. *Jornal of Clinical. Microbiology*. 35: 3316.
46. Motoyama A. & Yates III J. (2008). Multidimensional LC Separations in Shotgun Proteomics. *Analytical Chemistry*. 80: 7187-7193.
47. Nelson D. & Cox M. (2008). *Lehninger Principles of Biochemistry*. W. H. Freeman and Company. pp157.
48. Nogueira de Melo A., De Souza E., Ramalho E., Souza A., Branquinha M., Masini C., Coehlo F., Cabral A., De Souza M., Ferreira T., Vermehlo A. (2010). Detection of matrix metalloproteinase-9-like proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Experimental parasitology*, 125: 256-263.
49. Novelo-Garza B.A., Benítez-Arvizu G., Peña-Benítez A., Galván-Cervantes J., Morales Rojas A. (2010). Detección de *Trypanosoma cruzi* en donadores de sangre. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 48: 139-144.
50. Osorio L., Ríos I., Gutiérrez B., & González J. (2012). Virulence factors of *Trypanosoma cruzi*: who is who? *Microbes and infections / Institut Pasteur*. 14: 1390–402.
51. Paulin J., Keith C. & Tarleton R. (1988). A monoclonal antibody to Alpha Tubulin recognizes host cell and *Trypanosoma cruzi tubulins*. *Journal of Protozoology*. 35: 123–129.
52. Pereira M., Loures M., Villalta F. & Andrade A. (1980). Developmental stages and a study of the interaction of wheat germ agglutinin with Sialic Acid residues on epimastigote cells. *Journal of Experimental Medicine*. 152: 1375-1392.
53. Quiñones W., Peña P., Domingo-Sananes M., Cáceres A., Michels P., Avilan L. & Concepción J. (2007). *Leishmania mexicana*: molecular cloning and characterization of enolase. *Experimental Parasitology*. 116: 241–51.
54. Rabilloud T. (2009). Detergents and chaotropes for protein solubilization before two dimensional electrophoresis. *Methods of Molecular Biology*. 528: 259-267.
55. Ramírez M., Ruíz R., Araya J., da Silveira J., & Yoshida N. (1993) Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic tripomastigotes in host cell invasion. *Infect Immunology*. 6: 3636-3641.
56. Rojas Ortega E. (2012). Estudio de la diversidad genética de *Trypanosoma cruzi* en la República Mexicana. Tesis Maestría en Ciencias Bioquímicas. Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.
57. Saborios J., Hernandez J., Narayanswamill S., Wrightsmanll R. & Manningl J. (1989). Isolation and characterization of paraflagellar proteins from *Trypanosoma cruzi*. *The Jorunal of Biological Chemistry*. 264:4071–4075.

58. Sánchez B., Monteón V., Reyes P. & Espinoza B. (2001). Standardization of Micro-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Western Blot for detection of *Trypanosoma cruzi* antibodies using extracts from Mexican strains as antigens. *Archives of Medical Research*. 32: 382-388.
59. Scharfstein J., Schechter M., Senna M., Peralta J. & Mendonca-Previato L. (1986). Surface glycoprotein (gp57/51) expressed by epimastigotes and bloodstream trypomastigotes. *Journal of Immunology*. 21:1336-1341.
60. Scharfstein J., Schmitz V., Morandi V., Capella M., Lima A., Morrot A. & Müller-Esterl W. (2000). Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B(2) receptors. *The Journal of Experimental Medicine*. 192:1289-300.
61. Schenkman S., Jiang M., Hart G. & Nussenzweig V. (1991). A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. *Cell*. 65: 1117-1125.
62. Snary D., Hudson L. (1979). *Trypanosoma cruzi* cell surface proteins: identification of one major glycoprotein. *FEBS Letters*. 100: 166-170.
63. Sturm N. & Campbell D. (2009). Alternative lifestyles: The population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*. 115: 35-43.
64. Svitkin, Y. V., Pause, A., Haghighat, A., & Pyronnet, S. (2001). The requirement for eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A) in translation is in direct proportion to the degree of mRNA 5' secondary structure. *RNA*, 7:382-394.
65. Texeira M. & Yoshida N. (1986). Stage-specific surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* identified by monoclonal antibodies. *Molecular Biochemical Parasitology*. 18: 271-282.
66. Tyler K., Luxton G., Applewhite D., Murphy S. & Engman D. (2005). Responsive microtubule dynamics promote cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Cellular microbiology*. 7: 1579-1591.
67. Vargas-Parada L. (2010). Kinetoplastids and Their Networks of Interlocked DNA. *Nature Education*. 3:63
68. Varki A., Cummings R., Esko J., Freeze H., Stanley P., Bertozzi C., Hart G. & Etzler M. (2009). *Essentials of Glycobiology*. New York. Cold Spring Harbor Laboratory. 143-161.
69. Vázquez-Chagoyán J., Gupta S. & Garg N. (2011). Vaccine development against *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease. *Advances in Parasitology*. 75:121-146.
70. Verissimo G., Lery L., da Silva M., Moura H., Peralta R., von Krüger W., Peralta, J. (2012). The identification and characterization of epitopes in the 30-34kDa *Trypanosoma cruzi* proteins recognized by antibodies in the serum samples of Chagasic patients. *Journal of Proteomics*. 80: 34-42.
71. World Health Organization (2002). Control of Chagas disease: a second report of the WHO expert committee. Technical Report Series 905. Geneva. ISBN 9241209054.
72. World Health Organization (2010). First WHO report on neglected tropical diseases 2010: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. ISBN 978 92 4 156 4090, Geneva Switzerland
73. Ye M., Jiang X., Feng S., Tian R. & Zou H. (2007). Advances in chromatographic techniques and methods in shotgun proteome analysis. *Trends in Analytical Chemistry*. 26: 80-84.
74. Yoshida N. (2006). Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 78: 87-111.
75. Yoshida N., Mortara R., Araguth M., Gonzalez J., & Russo M. (1989). Metacyclic neutralizing effect of monoclonal antibody 10D8 directed to the 35 and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*. *Infection and immunity*. 57: 1663-1667.
76. Zingales B., Andrade S. G., Briones M., Campbell D., Chiari E., Fernandes O., Guhl F., Lages-Silva E., Macedo A., Machado C., Miles M., Romanha A., Sturm N., Tibayrenc M. & Schijman A. (2009). A new consensus for *Trypanosoma*

cruzi intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 104:1051–1054.

77. Zingales B, Miles M. , Campbell D. , Tibayrenc M., Macedo A, Teixeira M., Schijman A., Lewellyn M., Lages-Silva E., Machado C., Andrade S. & Sturm N. (2012). The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases. 12: 240–253.