



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Identificación de glicoproteínas de 4 aislados de *Trypanosoma cruzi***

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**MIGUEL RODRÍGUEZ JULIO CÉSAR**

**DIRECTOR DE TESIS**

**Dra. Margarita Cabrera Bravo**

**Ciudad Universitaria, Cd, Mx, 2018**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**           **Profesor: Abel Gutiérrez Ramos**

**VOCAL:**               **Profesor: Ruth Edith Martin Fuentes**

**SECRETARIO:**       **Profesor: Margarita Cabrera Bravo**

**1er. SUPLENTE:**      **Profesor: José Cordero Hernández**

**2° SUPLENTE:**       **Profesor: Marisol Hernández Salas**

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

LABORATORIO DE BIOLOGÍA DE PARÁSITOS, FACULTAD DE MEDICINA,  
UNAM

### **ASESOR DEL TEMA:**

**Dra. Margarita Cabrera Bravo**

### **SUPERVISOR TÉCNICO:**

**M en C. Elia Torres Gutiérrez**

### **SUSTENTANTE (S):**

**Miguel Rodríguez Julio Cesar**

## Abreviaturas

L.I.T. – Liver Infusion Triptose (medio de cultivo)

M. pallidipennis – *Meccus pallidipennis* (triatomino)

Morelos – Aislado obtenido de *Meccus pallidipennis* proveniente del Estado de Morelos

Mor/Tb – Aislado obtenido del cruce del aislado Morelos con *Triatoma barberi*

Querétaro - Aislado obtenido de *Triatoma barberi* proveniente del Estado de Querétaro

Qro/Mp - Aislado obtenido del cruce del aislado Querétaro con *Meccus pallidipennis*

RIPA - Radio-Immuno-precipitation Assay (amortiguador de lisis celular)

SDS-PAGE - sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico)

*T. barberi* - *Triatoma barberi* (triatomino)

## ÍNDICE

1. RESUMEN .....	1
2. INTRODUCCIÓN .....	2
2.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	3
2.2 Vectores .....	6
2.3 Ciclo Biológico .....	8
2.4 Enfermedad de Chagas .....	9
2.5 Fase crónica asintomática y sintomática.....	9
2.6 Diagnostico.....	10
2.7 Tratamiento .....	10
3. ANTECEDENTES.....	11
3.1 Glicobiología.....	11
3.2 Glicobiología de <i>T.cruzi</i> .....	12
3.3 Diversidad intraespecifica de <i>T.cruzi</i> .....	14
3.4 Diversidad de los aislados mexicanos de <i>T.cruzi</i> .....	15
4 JUSTIFICACIÓN .....	17
5 HIPÓTESIS .....	18
6 OBJETIVOS .....	19
6.1 Obejtivos generales .....	19
6.2 Objetivos particulares.....	19
7 METODOLOGÍA .....	20
7.1 Diseño experimental.....	20
7.2 Aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	21
7.3 Obtención del extracto proteico con buffer de lisis para RIPA .....	21
7.4 Cuantificación de Proteínas .....	21

7.5 Separación de componentes proteicos y determinación de pesos moleculares por electroforesis en poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	22
7.6 Identificación de glicoproteínas por western blot revelado con lectinas.....	22
7.7 Análisis de imágenes.....	22
7.8 Fijación de parásitos .....	23
7.9 Inmunohistoquímica con lectinas .....	23
8 RESULTADOS .....	24
8.1 Concentración proteica de los aislados .....	24
8.2 Perfil electroforético de los aislados .....	24
8.3 Identificación de glicoproteínas en el aislado Querétaro reveladas con lectinas.....	25
8.4 Perfil de glicoproteínas de cuatro aislados de <i>T. cruzi</i> con la lectina WGA .....	26
8.5 Perfil de glicoproteínas de cuatro aislados de <i>T.cruzi</i> con la lectina PNA .....	27
8.6 Perfil de glicoproteínas de cuatro aislados de <i>T.cruzi</i> con la lectina UEA-I .....	28
8.7 Perfil de glicoproteínas de cuatro aislados de <i>T.cruzi</i> con la lectina ConA .....	29
8.8 Perfil de glicoproteínas de cuatro aislados de <i>T.cruzi</i> con la lectina MAA .....	30
8.9 Identificación de glicoproteínas mediante inmunohistoquímica .....	31
9. DISCUSIÓN .....	33
10. CONCLUSIONES .....	38
11. PERPECTIVAS .....	38
12. BIBLIOGRAFÍA.....	39

## 1. RESUMEN

La enfermedad de Chagas es causada por el parásito flagelado *Trypanosoma cruzi*, esta enfermedad es endémica de Latinoamérica. Se estima que a nivel mundial existen aproximadamente 10 millones de personas infectadas y más de 25 millones están en riesgo de adquirir la infección. (OMS, 2013). Las cepas de *T. cruzi* muestran variabilidad biológica y molecular, debido probablemente a factores ambientales y de sus hospederos. Actualmente se busca determinar el papel que desempeña el vector en la patogenicidad, virulencia, tropismo de los aislados, así como en la evolución de la infección-enfermedad. En este contexto, las glicoproteínas son candidatos atractivos ya que median procesos clave en la interacción parásito-vector-mamífero tales como reconocimiento, adhesión y evasión de la respuesta inmune. En el presente trabajo se cultivaron 4 aislados de *T. cruzi*: Q, Q/Mp, Mor y Mor/Tb hasta llegar a su fase exponencial, se realizó extracción proteica y cuantificación de proteínas para la electroforesis con la cual se determinaron los perfiles proteicos. Se realizó western- blot con afinidad a las lectinas ConA, WGA, MAA, PNA y UEA-1 para la identificación de componentes glicoproteicos. La inmunohistoquímica se llevó a cabo con la fijación de epimastigotes de *T. cruzi* en las laminillas seguida de la incubación con las lectinas-FITC para verificar la presencia de glicoproteínas por observación de la reacción en microscopía de fluorescencia.

## 2. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es causada por el parásito flagelado *Trypanosoma cruzi*. Esta enfermedad es endémica de Latinoamérica, la OMS estima que entre 6 y 7 millones de personas están infectadas por *T. cruzi* en los 21 países de América Latina (Figura 1) y 13 % de la población está en riesgo de adquirir la enfermedad teniendo en cuenta la distribución geográfica de los insectos vectores y los múltiples reservorios involucrados en los diversos ciclos de transmisión (OMS, 2013). Aun cuando Argentina, Brasil y México presenta gran número de infectados, en Bolivia el problema con la enfermedad es mayor (OMS, 2007).

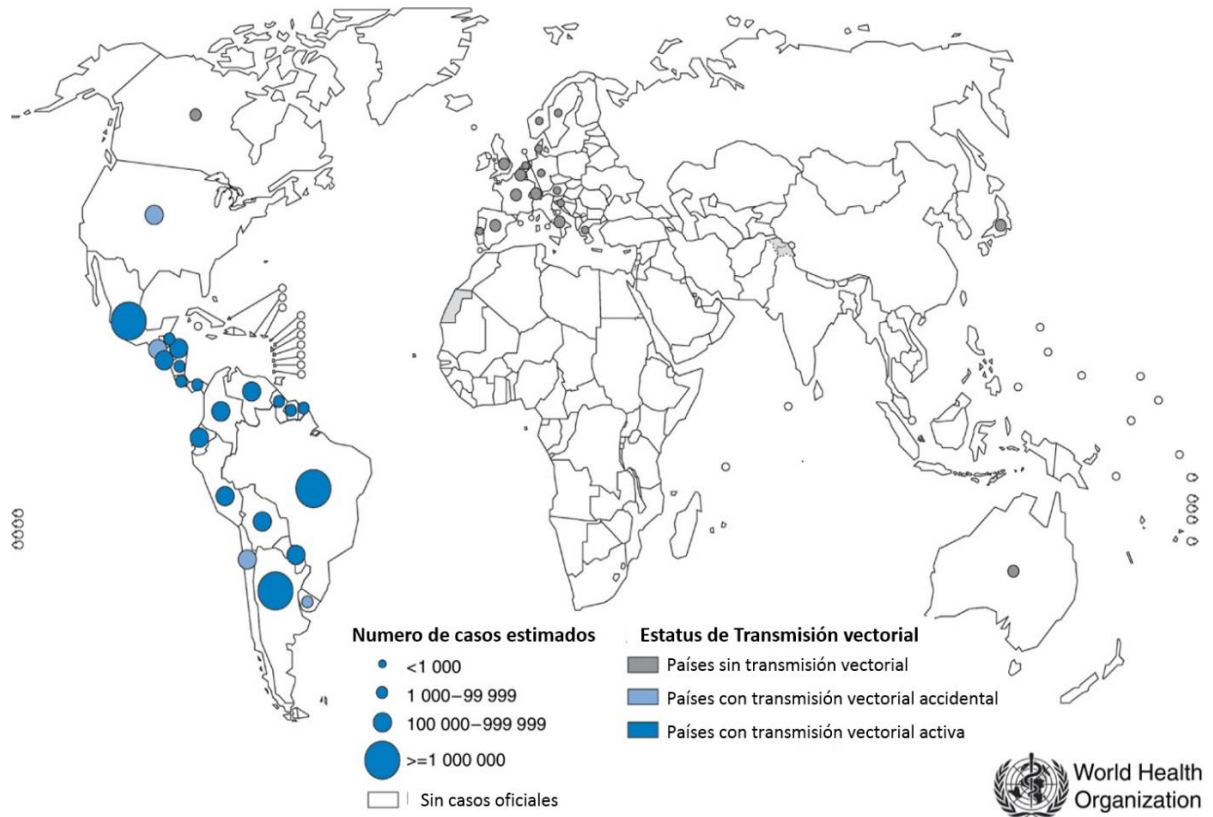


Figura 1: Distribución de la enfermedad de Chagas.

(Recuperado de <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/app/searchResults.aspx>)



## 2.1 *Trypanosoma cruzi*

*Trypanosoma cruzi* es un protozooario parásito que pertenece a la clase Kinetoplastida y al orden Trypanosomatida, durante su ciclo de vida se presentan diferentes estadios morfológicos Figura 2.

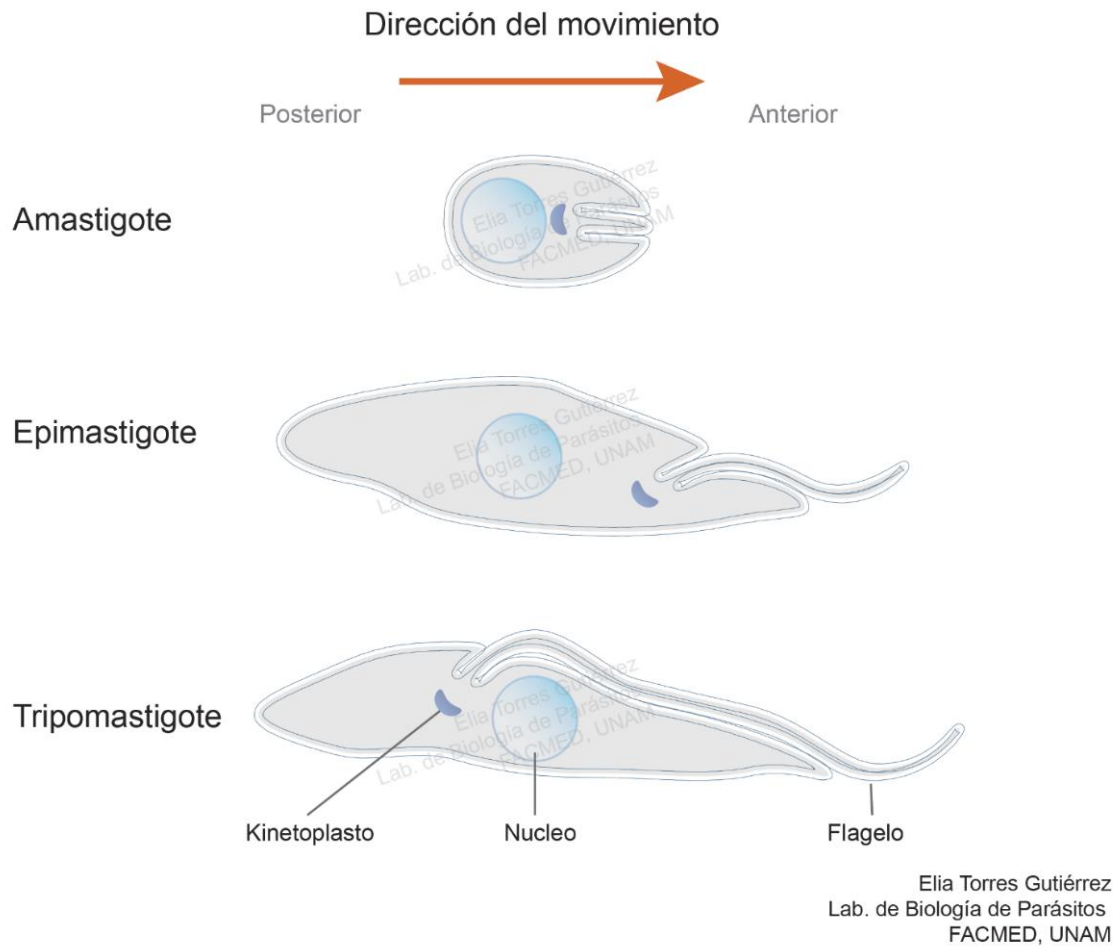


Figura 2. Estadios morfológicos de *T. cruzi*.

(Elia Torres Gutiérrez. Lab. Biología de Parásitos. Fac. Medicina, UNAM)

Amastigote. Mide 2 a 4  $\mu\text{m}$ , es redondo u oval presenta cinetoplasto en la parte anterior al núcleo, sin flagelo, se multiplican por fisión binaria y forman nidos, se encuentran en las células del huésped y/o cultivos celulares (Rassi, Rassi and Marin-Neto, 2010).

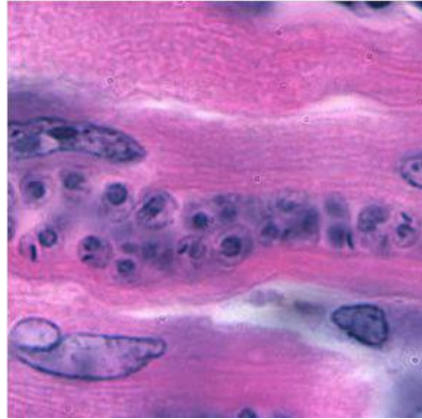


Figura 3. Amastigotes en tejido cardiaco. Tinción de hematoxilina y eosina. Recuperado de <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html>

Epimastigote. Mide 18 -20  $\mu\text{m}$ , tiene forma fusiforme, presenta un flagelo que está localizado entre el núcleo y la parte anterior, va a todo lo largo formando una membrana ondulante corta y el cinetoplasto se encuentra cercano a la parte anterior del núcleo que está localizado en el centro; presenta división binaria longitudinal. Se encuentra en el intestino del vector y en cultivos (Guzmán-Marín *et al.*, 1999; Garcia *et al.*, 2010).



Figura 4. Epimastigote de *T. cruzi* (flecha) en heces de triatómico (40x).

Lab. Biología de Parásitos. Fac. Medicina, UNAM.

Tripomastigote metacíclico. Mide de 18 a 21  $\mu\text{m}$  de largo, tiene forma alargada en forma de “C” ó “S”, presenta un flagelo que corre hacia la parte anterior en una membrana ondulante, un núcleo central y un cinetoplasto grande localizado en su extremo posterior (Guzmán-Marín *et al.*, 1999).

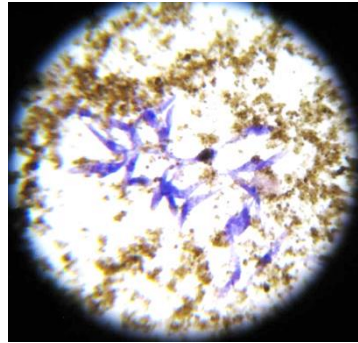


Figura 5. Tripomastigote metacíclico de *T. cruzi*  
Lab.Biología de Parásitos Facultad Medicina, UNAM

Tripomastigote sanguíneo. Mide de 18 a 21  $\mu\text{m}$  de largo, su forma es similar al tripomastigote metacíclico con un núcleo central y un cinetoplasto en su extremo posterior. No es replicativo, se encuentra en la sangre de humanos o ratones infectados experimentalmente (Carrada-Bravo, 2004).

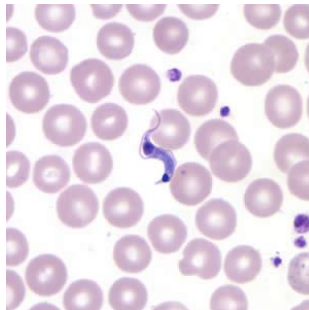


Figura 6. Tripomastigote sanguíneo Tinción de Giemsa.  
Recuperado de <http://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAmericana/>

## 2.2 Vectores

En el mundo se han identificado más de 130 especies de insectos vectores que pertenecen al orden Hemiptera, Familia Reduviidae y subfamilia *Triatominae* (Tabla 1). En la república mexicana se ha reportado 32 especies, de las cuales 13 son de importancia epidemiológica, por su distribución geográfica, localización doméstica e infección natural con *T. cruzi*. Los vectores con mayor índice de infección se encuentran sobre todo en la parte centro y sur del país (Salazar-Schettino *et al.*, 2010).

Genero	Especies
<i>Triatoma</i> 19	* <i>T. dimidiata</i> , * <i>T. barberi</i> , * <i>T. mexicana</i> , * <i>T. rubida</i> <i>T. Bolivari</i> , <i>T. brailovskyi</i> , * <i>T. gerstaeckeri</i> , <i>T. gomeznunezi</i> , <i>T. hegneri</i> , <i>T. incrassata</i> , <i>T. indictiva</i> , <i>T. infestans</i> , <i>T. lecticularia</i> , <i>T. lenti</i> , <i>T. mexicana</i> , <i>T. neotomae</i> , <i>T. nítida</i> , <i>T. peninsularis</i>
<i>Meccus</i> 6	* <i>M. Pallidipennis</i> , * <i>M longipennis</i> , * <i>M.phyllosomus</i> , * <i>M. picturatus</i> ,* <i>M. mazzottii</i> , <i>M. bassolsae</i>
<i>Pastrongilus</i> 2	* <i>P. rufotuberculatus</i> <i>P. geniculatus</i>
<i>Belminus</i>	<i>B.costaricensis</i>
<i>Dipetalogaster</i>	* <i>D. Máxima</i>
<i>Eratyrus</i>	<i>E. cuspidatus</i>
<i>Paratriatoma</i>	<i>P. hirsuta</i>
<i>Rhodnius</i>	* <i>R.prolixus</i>

Tabla 1. Tabla de los transmisores de *T. cruzi* en México.(\*) Especies de importancia epidemiológica (GALVÃO, 2001).

*Triatoma barberi* y *Meccus pallidipennis* presentan características biológicas y distribución geográfica (Tabla 2).



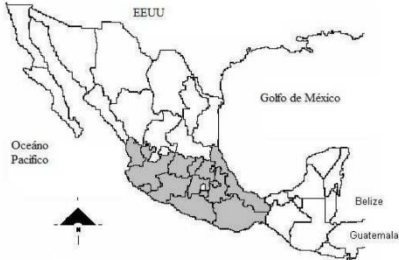
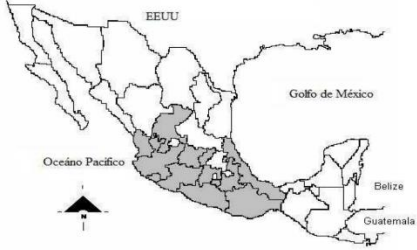
	<i>Triatoma barberi</i>	<i>Meccus pallidipennis</i>
<b>Especie</b>		
<b>Características</b>	<p>Hembra: 18.5-20mm Macho: 16-18mm</p> <p>Intradomiciliado Defecación durante la alimentación Atracción con luz artificial</p> <p>Aislados con mayor virulencia</p>	<p>Hembra: 32-35mm Macho: 31-34mm</p> <p>Predominio en el peridomicilio. Defecación a 20-30min posterior a la alimentación No se alteran por la presencia de la luz</p> <p>Aislados con menor virulencia</p>
<b>Distribución Geográfica</b>	<p>Altitud: ~2000 msnm</p>  <p>Colima, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Tlaxcala, y Veracruz</p>	<p>Altitud: 200-1850 msnm</p>  <p>Colima, Edo.Mex, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Veracruz y Zacatecas</p>

Tabla 2. Variables biológicas de dos especies de triatominos (Modificado de Salazar-Schettino *et al.*, 2010).

## 2.3 Ciclo biológico

El ciclo de vida de *T. cruzi* es complejo, se observan diferentes formas de desarrollo en los insectos vectores y los mamíferos (Figura 7). El ciclo inicia cuando el triatomino se alimenta de la sangre de un mamífero infectado e ingiere tripomastigotes. En el insecto pasan al intestino medio anterior e intestino medio posterior, donde se transforman en epimastigotes y se replican por fisión binaria, se adhieren a la cutícula rectal y se diferencian en tripomastigotes metacíclicos, los cuáles son la forma infectante y se eliminan junto con las heces y orina del triatomino (Garcia *et al.*, 2007). La forma infectante penetra al huésped, donde los tripomastigotes metacíclicos invaden células nucleadas, transformándose en amastigotes para replicarse por fisión binaria. Los amastigotes posteriormente se transforman en tripomastigotes sanguíneos y lisan la célula huésped para circular por el torrente sanguíneo e infectar nuevas células (Garcia *et al.*, 2010; Bern, 2011).

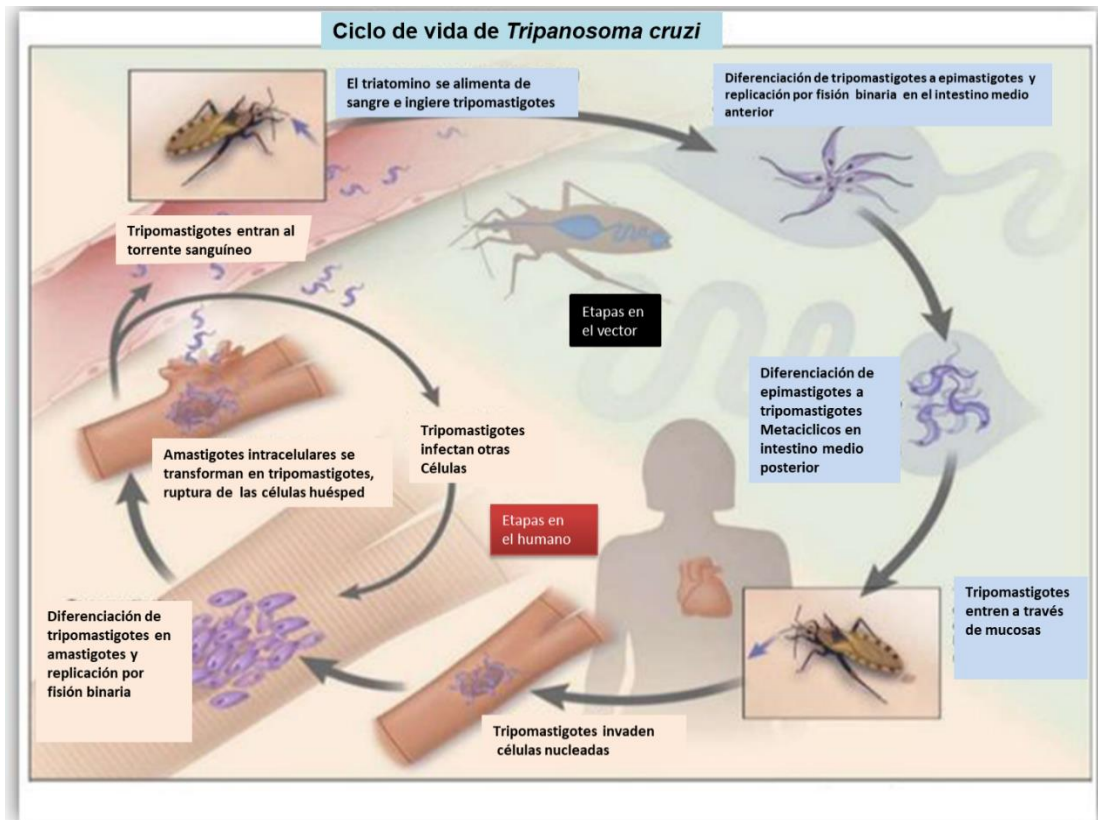


Figura 7. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*, en mamíferos y vectores. Modificado de (Bern, 2011).

## 2.4 Enfermedad de Chagas

Le enfermedad de Chagas es una infección crónica, sistémica y parasitaria causada por el protozooario *Tripanosoma cruzi* se divide en fase aguda y fase crónica. El periodo de incubación es de 14 días aproximadamente y la duración de la fase aguda oscila entre 4 semanas y hasta 4 meses. Clínicamente se reportan síntomas leves e inespecíficos que se asemejan a un cuadro gripal. El único síntoma específico y observable en esta fase es un edema inflamatorio que se presenta en el sitio de entrada del parásito en el huésped, si entra en la zona del ojo se desarrolla una hinchazón periorbital unilateral conocido como signo de Romaña (Figura 8); si el parásito entra por cualquier zona del cuerpo se produce una induración, conocida como chagoma de inoculación (Figura 9) (Garcia *et al.*, 2010; Bern, 2015)



Figura 8. Signo de Romaña

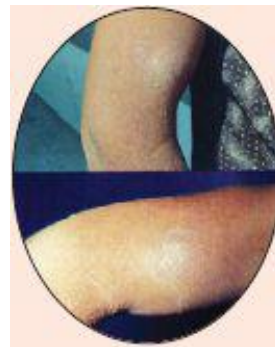


Figura 9. Chagoma de inoculación.

Modificado de (Rassi, Rassi and Marin-Neto, 2010)

## 2.5 Fase crónica asintomática y sintomática

La fase crónica asintomática puede durar entre 5 y 20 años o más; es clínicamente silenciosa y con baja parasitemia, por lo que los métodos de elección para el diagnóstico son serológicos. Entre el 30 y 40 % de los infectados desarrolla la fase crónica sintomática en la cual se pueden presentar lesiones cardiacas, digestivas (esófago y colon) y del sistema nervioso periférico (Rassi, Rassi and Marin-Neto, 2010).



Figura 10. Corte de un corazón afectado por la enfermedad de Chagas. Se observa adelgazamiento de las paredes y de punta. Recuperado de [www.creces.cl](http://www.creces.cl)

## 2.6 Diagnóstico

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas en la fase aguda se basa en la identificación de *T. cruzi* mediante el examen directo en fresco, frotis y gota gruesa (Salazar-Schettino *et al.*, 1999). El diagnóstico en la fase crónica sin y con patología aparente se realiza con pruebas serológicas para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi*. La OMS señala que para la confirmación se debe demostrar reactividad en dos pruebas serológicas de diferente principio, las técnicas recomendadas son ELISA indirecta (inmunoensayo enzimático), IFI (inmunofluorescencia indirecta), HAI (hemaglutinación indirecta) y en caso de existir discordancia se utiliza una cuarta técnica como el Western-blot (World Health Organization, 2005).

## 2.7 Tratamiento

Respecto al tratamiento farmacológico de esta enfermedad solo hay dos medicamentos disponibles, el Benznidazol producido actualmente por el laboratorio LAFEPE (Laboratorio Farmacéutico do Estado de Pernambuco) en Brasil, el cual tiene una acción antiprotozoaria aumentando la producción de intermediarios que modifican macromoléculas determinando daño a nivel de ADN conduciendo a la destrucción de los parásitos intracelulares y Nifurtimox por Bayer que involucra un metabolito reductivo que lleva a la formación de radicales altamente tóxicos. (González M, 2014).



### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 Glicobiología

El estudio de la interacción carbohidrato –proteína, ha originado la creación de nuevas disciplinas, como la glicobiología ciencia que se encarga del estudio de la estructura y función de los carbohidratos. Una herramienta importante son las lectinas. El término lectina se aplica a proteínas o glicoproteínas de origen no inmune que reconocen de manera específica carbohidratos de la superficie celular o en suspensión, aglutinan células, precipitan glicoconjugados, pero no poseen actividad enzimática; las lectinas poseen por los menos dos sitios de reconocimiento a carbohidrato, de ahí su capacidad para aglutinar células, se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza. Las lectinas aisladas de diversas fuentes vegetales reconocen las porciones glicánicas específicamente (Tabla 3) en diferentes sustratos proteicos y organismos, por lo que han demostrado ser herramientas útiles en la investigación biomédica, en donde se les utiliza para la tipificación de grupos sanguíneos y bacterianos, entre otras funciones (Hernández *et al.*, 2005).

Monosacárido	Organismo de donde proviene la lectina.	Lectina
$\alpha$ -D-manosa, $\alpha$ -D-glucosa	<i>Canavalia ensiformis</i>	Con A
	<i>Lens culinaris</i>	LCA
$\beta$ -galactosa N-acetil – $\alpha$ -D-galactosamina	<i>Racinus communis.</i>	RCA
	<i>Glycine max</i>	SBA
	<i>Arachis hypogaea</i>	PNA
	<i>Amaranthus leucocarpus</i>	ALL
N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina	<i>Triticum vulgare.</i>	WGA
$\alpha$ -D-fucosa	<i>Lotus tetragonolobus.</i>	LTA
	<i>Ulex europeus.</i>	UEA
$\alpha$ -N-acetilneuraminico	<i>Limulus polyphemus.</i>	LPA

Tabla 3. Lectinas vegetales utilizadas para el estudio de glicoproteínas y su clasificación según su especificidad hacia monosacáridos (Hernández *et al.*, 2005)

### 3.2 Glicobiología de *T. cruzi*

La glicosilación proteica es el proceso de adición serial de carbohidratos a una proteína (Voet, D.; Voet, JG.; Pratt, 2007) Existen varios tipos de glicoproteínas, de las cuales dos son las más abundantes: las N-Glicoproteínas y las O-Glicoproteínas. En las N-Glicoproteínas, el carbohidrato (*N*-acetilglucosamina) se une al grupo amino de la cadena lateral del aminoácido asparagina o glutamina de la proteína. En las O-Glicoproteínas el lugar de unión del carbohidrato (*N*-acetilgalactosamina), es el grupo hidroxilo de las cadenas laterales de los aminoácidos serina y treonina de la proteína (Murray *et al.*, 2001).

Los principales glicocoproteínas de *T. cruzi* incluyen N- glicanos y O-Glicanos, las cuales contienen una gran cantidad de residuos de Manosa y N-acetilglucosamina tales como las Transiaidasas y Cistein proteasas por otra parte los O-Glicanos en *T. cruzi*, a diferencia de otros organismos incluyen N-acetilglucosamina, en vez de N-acetilgalactosamina y la presencia de residuos Galactopiranososa y Galactofuranosa (Turnock and Ferguson, 2007).

Muchas de estas estructuras son antigénicas, mientras que otros son factores de virulencia necesarios para la invasión de la células huésped o evasión del sistema inmune (Atella *et al.*, 2005). En la Tabla 4, se describen las principales glicoproteínas de *T. cruzi*.

Atwood y colaboradores reportaron el primer estudio a gran escala de glicoproteoma de tripomastigotes de *T. cruzi*, empleando cromatografía de afinidad a lectinas (Concanavalina A) y espectrometría de masas revelando 36 sitios de N-glicosilación en 35 glicopéptidos, que se asignaron a 29 isoformas de glicoproteínas correspondientes a organelos y fracción soluble. Se han identificado 42 glicoproteínas, de las cuales 11 (26%) fueron asociadas a citoesqueleto y membrana, 6 (14%) trasmembranles, 13 (31%) fueron asociadas dentro de organelo y 7 (17%) a componentes del ribosoma (Atwood *et al.*, 2006).

<b>Glicoproteína</b>	<b>Principales características</b>	<b>Carbohidratos</b>
Trans-sialidasas	Son proteínas unidas a dominios glicofosfatidil inositol(GPI) presentes en la superficie de <i>T.cruzi</i> cuya función principal es transferir ácido sialico de los sialoglicongujados en el huésped a la $\beta$ -galactosa terminal de mucinas altamente O-glicosiladas en el parásito, ya que este es incapaz de sintetizarlo de novo. Proporciona protección ante el sistema inmune.	N-acetil $\alpha$ -D-glucosamina $\alpha$ -D-manosa
Mucinas	Las mucinas poseen azúcares o-glicosilados que representan hasta un 60% del peso total de la glicoproteína, se anclan a la cubierta lipídica externa de la membrana plasmática mediante uniones glicofosfatidilinositol (GPI). Proveen al parásito de protección contra el vector o mecanismos defensivos del hospedero y asegurar el anclaje en células y tejidos específicos	$\alpha$ -D-manosa, N-acetilglucosamina NeuAc, residuos de galactopiranososa o galactofuranosa
MASP	Los miembros de esta familia se caracterizan por poseer dos dominios N-y -C terminal altamente conservado, así como un péptido señal y un sitio de unión a GPI.	$\alpha$ -D-manosa, N-acetilglucosamina
Gp 63	La familia de superficie metalproteasas gp63 ha sido implicada en la virulencia, infección de las células del hospedero y en la liberación de las proteínas de superficie del parásito	N-acetil $\alpha$ -D-glucosamina D-manosa , D galactosa
Gp 82	Se expresa preferencialmente en la fase tripomastigote metacíclico, induce una disrupción dependiente de $Ca^{2+}$ de los microfilamentos de actina proceso necesario para la entrada del parásito en la célula. Es capaz de unirse a las mucinas gástricas.	N-acetil $\alpha$ -D-glucosamina D-manosa, D galactosa

Tabla 4. Características de las principales glicoproteínas de *T. cruzi* en epimastigotes. (Buscaglia *et al.*, 2006; Yoshida, 2006)

En un análisis comparativo de las glicoproteínas y de los sitios específicos de O y N glicosilación en epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi* en donde se muestra un aumento en la glicosilación global en la etapa tripomastigote, con mayor cantidad de proteínas gp85 / trans-sialidasa (gp85 / TS), proteínas de superficie

asociadas a mucinas (MASP), mucinas y proteínas de la familia GP63 que presentan manosas y glicanos complejos. También se demostró que las enzimas relacionadas con el metabolismo de la galactosa se encuentran con mayor abundancia en el tripomastigote (Alves *et al.*, 2017).

### 3.3 Diversidad intraespecífica de *T. cruzi*

La biología, bioquímica y diversidad genética de las cepas de *T. cruzi* han sido reconocidas durante mucho tiempo junto con su complejo epidemiológico, Estos grupos recibieron diferentes designaciones incluyendo Zimodemos (Miles *et al.*, 1977, 1978), esquizodemos, biodemos, linajes y más recientemente unidades discretas de tipificación o DTUs, que se definen como “conjunto de poblaciones genéticamente relacionadas entre sí y que son identificables por marcadores genéticos, moleculares o inmunológicos comunes”. Un análisis genotípico reveló dos DTU: I y II (Tibayrenc, 1998) . Posteriormente, el DTU II se dividió en: IIa, IIb, IIc, IId y IIE (Brisse, Barnabé and Tibayrenc, 2000; Brisse, Verhoef and Tibayrenc, 2001). La clasificación actual de las cepas de *T. cruzi* (Zingales *et al.*, 2009, 2012) es como se muestra en la (Tabla 5)

<b>Designación (DTU)</b>	<b>Abreviación</b>	<b>Equivalencia a los grupos anteriores de <i>T. cruzi</i>.</b>
<b><i>T. cruzi</i> I</b>	TcI	<i>T. cruzi</i> I y DTU I
<b><i>T. cruzi</i> II</b>	TcII	<i>T. cruzi</i> II y DTU IIb
<b><i>T. cruzi</i> III</b>	TcIII	Z3/ZI ASAT Z3-A, DTU IIc y <i>T. cruzi</i> III
<b><i>T. cruzi</i> IV</b>	TcIV	Z3,Z3-B y DTU II a
<b><i>T. cruzi</i> V</b>	TcV	Bolivian Z2, rDNA 1/2, clona 39 y DTU IId
<b><i>T. cruzi</i> VI</b>	TcVI	Paraguayan Z2 ,Zimodemo B y DTU IIE

Tabla 5. Equivalencias en la nomenclatura de los grupos taxonómicos de *T. cruzi* (Zingales *et al.*, 2009)

Las cepas causantes de casos humanos, han sido reportadas principalmente como: el grupo TcII en el Cono Sur y TcI en Colombia, Venezuela y América Central (Ramírez *et al.*, 2012).

En México, la gran mayoría de las cepas de *T. cruzi* que han sido analizadas genéticamente pertenecen al grupo TcI. Entre estas, algunas cepas aisladas en el Laboratorio de Biología de Parásitos que provienen de los transmisores *Triatoma*

*barberi* y *Meccus pallidipennis* son de interés para el presente estudio (Bosseno *et al.*, 2002; Zumaya-Estrada *et al.*, 2012).

### 3.4 Diversidad en los aislados mexicanos de *T cruzi*

*T. cruzi* está conformado por una población muy heterogénea con un comportamiento clonal que da origen a diversas cepas, las cuales manifiestan diferencias en su comportamiento durante la infección experimental como en el número de parásitos en sangre (parasitemia), tropismo a diferentes tejidos, virulencia y antigenicidad, lo que se manifestará en la evolución de la infección (infección-enfermedad-muerte).

La virulencia es una de las características observadas en el modelo murino, mediante la determinación de las parasitemias y tropismos. Tay y colaboradores estudiaron 11 cepas, aisladas de transmisores y humanos, en las cuales reportaron diversos patrones de parasitemia, cardiotropismo y miotropismo (Tay *et al.*, 1981). En otro estudio, de 5 aislados de *T. cruzi* inoculados en un modelo murino, tres poseían baja capacidad para matar al animal en la fase aguda entre 25-30% y los otros dos mataban entre 80 y 90% de los ratones (Espinoza *et al.*, 1998). Otra característica en que se ha encontrado variabilidad en función de la cepa es la susceptibilidad a lisis por complemento y la resistencia contra benznidazol *in vitro* de aislados de *T. cruzi* (Monteón *et al.*, 2009). La metaciclogenesis de las cepas es variable dependiendo del vector, de tal forma que *Triatoma barberi* puede generar hasta 76% de tripomastigotes metacíclicos, *Triatoma pallidipennis* 15% y *Triatoma dimidiata* 26% (Salazar Schettino, de Haro Arteaga and Cabrera Bravo, 2005). Hasta la fecha se desconocen las causas específicas de esta variabilidad en el comportamiento. Se han atribuido a: factores ambientales, interacción con el vector e inmunidad del hospedero.

Debido a esta heterogeneidad del parásito es de gran importancia estudiar el comportamiento de los aislados para determinar sus características biológicas, bioquímicas y moleculares que nos permitan proponer alternativas para el control y vigilancia de la enfermedad.

En un trabajo previo realizado en el Laboratorio de Biología de Parásitos se estableció el comportamiento biológico de 4 aislados provenientes de dos especies de triatomino naturalmente infectados: Querétaro obtenido de *Triatoma barberi* (Qro) y Morelos obtenido de *Meccus pallidipennis* (Mor) y dos provenientes de cruces experimentales: Querétaro pasada por *M. pallidipennis* (Qro/Mp) y Morelos pasada por *Triatoma barberi* (Mor/Tb). Como se resume en la Tabla 6, el aumento en la parasitemia y mortalidad de los ratones infectados con Mor/Tb, respecto a Mor; por otra parte los ratones infectados con Qro/Mp mantuvieron valores de parasitemia y sobrevivencia media similar a Qro (Mendoza-Rodriguez, 2015). Estos hallazgos permitieron evidenciar que la interacción de los parásitos con el triatomino vector juega un papel importante en el comportamiento de las cepas, sin embargo, aún se desconocen los factores de la interacción parasito-insecto vector. En este contexto, las glicoproteínas son candidatos atractivos para su estudio debido a su abundancia en el parásito y a su conocido papel en interacciones celulares.

Aislado	Periodo Prepatente (día)*	Mortalidad **	Sobrevivencia media (día)***	Parasitemia Máxima****	Parasitemia Máxima Promedio*****	Observaciones *****
Morelos	18	30% (D-59)	82	7.7x10 <sup>6</sup>	1.08 x10 <sup>6</sup>	Poca afectación en los cuartos traseros
Mor/Tb	17	60% (D-59)	32	17x10 <sup>6</sup>	3.9 x10 <sup>6</sup>	Poca afectación en los cuartos traseros, aumento de tamaño en hígado y bazo
Querétaro	3	100% (D-17)	16	44x10 <sup>6</sup>	29.8 x10 <sup>6</sup>	Pelo erizado, parálisis de cuartos traseros
Qro/Mp	3	100% (D-29)	15	49x10 <sup>6</sup>	31 x10 <sup>6</sup>	Pelo erizado, parálisis de cuartos traseros

\*Periodo prepatente: día donde se observaron por primera vez los parásitos en sangre después de la inoculación. \*\*Mortalidad: Día en que se presentó el 100% de muertes o sacrificio. \*\*\*Sobrevivencia media: día al cual se produce el 50% de mortalidad en los ratones. \*\*\*\*Parasitemia máxima: la mayor parasitemia de un ratón infectado por ese aislado. \*\*\*\*\*Parasitemia máxima promedio: parásitos por mililitro (promedio de 10 ratones) en el día con mayor parasitemia. \*\*\*\*\*Observaciones: se realizaron al comparar los infectados con el ratón testigo. Información obtenida de Mendoza Rodríguez, 2015.

Tabla 6. Características biológicas de 4 aislados de *T. cruzi*.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Las cepas de *T. cruzi* muestran variabilidad biológica y molecular, debido a factores ambientales y de sus hospederos. En México, las infecciones asociadas al vector *T. barberi* se relacionan con la presencia de cuadros clínicos con miocardiopatía y megacolon (Salazar-Schettino PM, Tay J, Ontiveros A, Jiménez J, Haro I de, Bucio MI, 1983; Salazar-Schettino PM, Tay J, Bucio MI, Haro I de, Anzures ME, 1984). En un estudio previo, se evidenció cambios en el comportamiento biológico de los aislados en ratón al realizar cruces experimentales en diferentes especies de triatomíneos. Actualmente se busca determinar el papel que desempeña el vector en la patogenicidad, virulencia, tropismo de los aislados, así como en la evolución de la infección-enfermedad. En este contexto, las glicoproteínas son candidatos atractivos ya que median procesos clave en la interacción parásito-vector-mamífero tales como reconocimiento, adhesión y evasión de la respuesta inmune.

## 5. HIPÓTESIS

Las glicoproteínas forman parte de la estructura celular de *T.cruzi* y participan en la interacción insecto–vector, por lo que es posible observar variaciones en la expresión de los diferentes aislados.



## 6. OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo General

Comparar el perfil glicoproteico en 4 aislados de *T cruzi*.

### 6.2 Objetivos Particulares

Determinar la concentración proteica de cuatro aislados de *T cruzi*.

Determinar el perfil proteico de cuatro aislados de *T. cruzi* mediante Electroforesis.

Determinar el perfil glicoproteico de 4 aislados por afinidad a lectinas, mediante Western-blot.

Identificar glicoproteínas por afinidad a lectinas, mediante inmunohistoquímica.

## 7. METODOLOGÍA

### 7.1 Diseño experimental

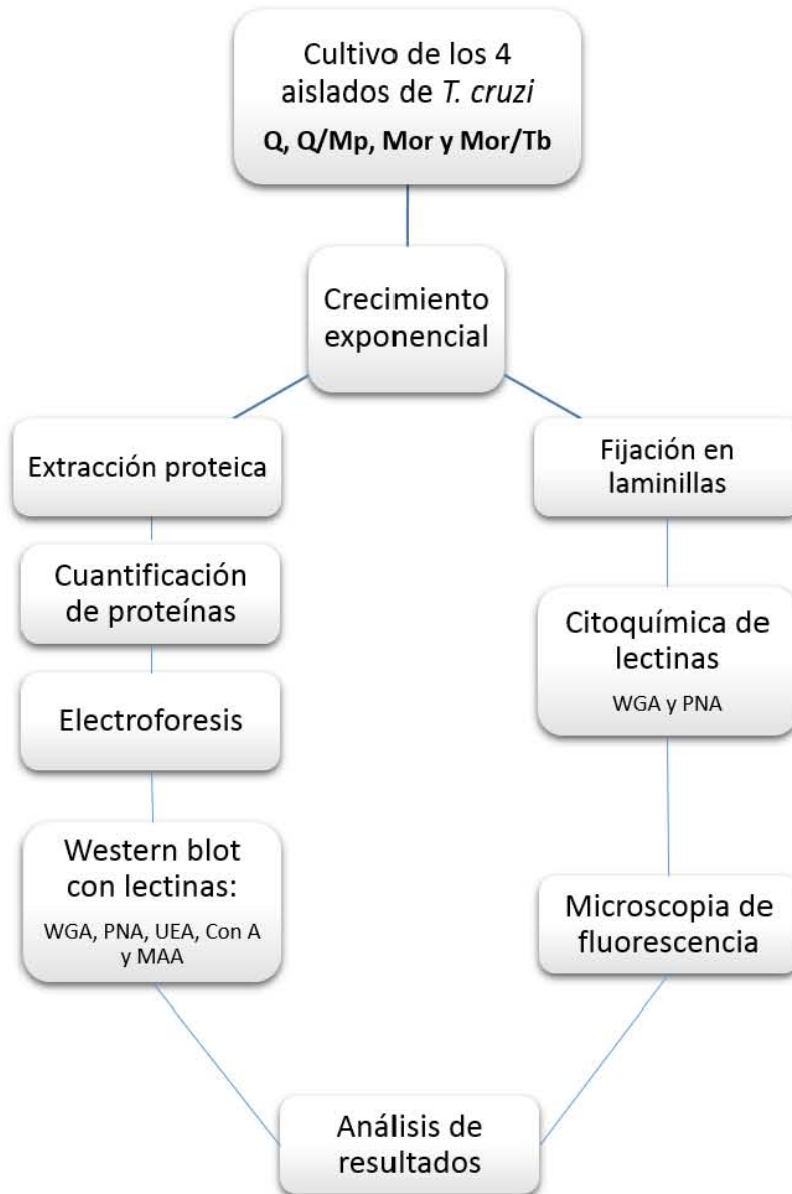


Figura 11. Diagrama de flujo de la metodología empleada.

## 7.2 Aislados de *Trypanosoma cruzi*

Los aislados estudiados fueron obtenidos de las deyecciones de *Meccus pallidipennis* y *Triatoma barberi* infectados con *T. cruzi* y los productos de la infección experimental entre estas especies (Tabla 7).

Identificación del aislado	Especie triatomino	del Aislados estudiados
<b>Morelos (ITRI/12/MX/Morelos)</b>	<i>Meccus pallidipennis</i>	Obtenido originalmente de <i>Meccus pallidipennis</i> del Estado de Morelos
<b>Mor/Tb (ITRI/14/MX/Mor/Tb)</b>	<i>Triatoma barberi</i>	Producto de la infección de <i>Triatoma barberi</i> con el aislado proveniente de <i>Meccus pallidipennis</i> (Morelos)
<b>Querétaro (ITRI/13/MX/Querétaro)</b>	<i>Triatoma barberi</i>	Obtenido originalmente de <i>Triatoma barberi</i> del Estado de Querétaro
<b>Qro/Mp (ITRI/14/MX/Qro/Mp)</b>	<i>Meccus pallidipennis</i>	Producto de la infección de <i>Meccus pallidipennis</i> con el aislado proveniente de <i>Triatoma barberi</i> (Querétaro)

Tabla 7. Identificación y procedencia de aislados de *T. cruzi*.

**7.3 Obtención del extracto proteico con buffer de lisis para RIPA** (ensayo de radio inmuno precipitación). Se crecieron los 4 aislados parasitarios en medio LIT (Liver Infusión Tryptose) y se cosecharon los epimastigotes al final de la fase estacionaria. Los parásitos se concentraron por centrifugación y se lavaron en 5 ocasiones con PBS pH 7.2 para ser lisados con buffer de lisis para RIPA, Tris HCl 10mM, NaCl 150 m, EDTA 1 mM, Triton X-100 1%, deoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1% e inhibidores de proteasas. Se centrifugó a 20 000 rpm por 10 min que constituye el extracto proteico, se almacenó en tubos de 1 ml a -20°C.

**7.4 Cuantificación de proteínas.** Se realizó por el método de ácido bicinconínico, empleando el kit comercial BCA Protein Assay Kit de Pierce (23225) con una

curva patrón de albúmina sérica bovina en diferentes diluciones con PBS pH 7.2 con un rango de 0 a 2000 µg/mL. La curva patrón y las muestras problema (extractos proteicos) se colocaron por triplicado en una microplaca de poliestireno de 96 pozos, se agregaron 200 µl por pozo de la mezcla de reactivos del kit, se incubó durante 30 minutos y se realizó la lectura a 562nm en un espectrofotómetro para microplacas Epoch de Biotek. Las concentraciones finales se obtuvieron al aplicar a los valores obtenidos la ecuación de la recta.

**7.5 Separación de componentes proteicos y determinación de pesos moleculares por electroforesis en poliacrilamida (SDS-PAGE).** La electroforesis de los extractos se realizó en condiciones reductoras por electroforesis en geles de poliacrilamida, en presencia de dodecil-sulfato de sodio (SDS-12.5%) (Laemmli, 1970). Los geles separadores se prepararon con acrilamida/bis acrilamida al 12.5%. Se colocaron 20µg de proteína en cada pozo. La electroforesis se llevó a cabo con una diferencia de potencial constante de 150V/≈1.5 h en un equipo Mini-Protean II Electrophoresis Cell (Bio-Rad). Al finaliza, los geles fueron fijados y teñidos con azul de Coomassie.

**7.6 Identificación de glicoproteínas por western blot revelado con lectinas.** Las proteínas separadas por electroforesis se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham) a 15 Volts durante 30 minutos en el Equipo Trans-blot Turbo de BioRad; las membranas se bloquearon con PBS 1X pH 7.2- Tween 20 al 0.05% durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron con las lectinas conjugadas a peroxidasa WGA- *Triticum vulgare*, Con-A - Concanavalina A, PNA *Arachis hypogaea*, UEA *Ulex europeus*, y MAA- *Mackia amurensis* a una concentración de 2.5 µg/ml. Se lavaron 5 veces y se revelaron con 3´3 diaminobencidina (DAB) en PBS pH 7.2 y peróxido de hidrógeno.

**7.7 Análisis de imágenes.** Para medir los pesos moleculares, los geles de la electroforesis se capturaron en un foto-documentador (Gel Doc™ EZ Imager Bio Rad) y se calcularon los pesos moleculares con el software Image Lab de BioRad.

Para determinar la intensidad/área de los componentes glicoproteicos en el western-blot se utilizó el programa myImage Analysis de Thermo Fisher Scientific el cual determina la intensidad de los pixeles / cm<sup>2</sup>. Los criterios para determinar mayor, media y baja intensidad fueron:

Intensidad mayor: Igual o mayor ( $\geq$ ) a 30000/intensidad de pixeles/ cm<sup>2</sup>

Intensidad media: Menor ( $<$ ) a 30000 y mayor ( $>$ ) de 20000 /intensidad de pixeles/ cm<sup>2</sup>

Intensidad baja: Menor ( $<$ ) a 20000/ intensidad de pixeles/ cm<sup>2</sup>

**7.8 Fijación de parásitos** Los cultivos con epimastigotes de cada aislado se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se lavó con PBS pH 7.2, se cuantificó la masa húmeda y se agregaron 9 mL de PBS-formol al 1% por cada gramo. Y después de 24 horas, se agregó PBS en proporción 2:1. Posteriormente, en portaobjetos para inmunofluorescencia se agregaron 10  $\mu$ l de la solución en cada pozo, se dejaron secar a 37°C por 90 minutos, se pasaron tres veces sobre la flama y enseguida se colocaron en un vaso Coplin con agua destilada. Se lavaron durante 5 minutos en agitación rotatoria, se secaron a temperatura ambiente y almacenaron a 4°C hasta su uso.

**7.9 Inmunohistoquímica con lectinas.** Los portaobjetos con los parásitos adheridos, se enjuagaron con PBS pH 7.2 y se bloquearon con albumina libre de IgG al 2% en PBS por 30 min en cámara húmeda cerrada a temperatura ambiente. Se lavó con PBS pH 7.2. La permeabilización de los parásitos se realizó con una solución de Triton X-100 al 0.02%, por 10 min en cámara húmeda a temperatura ambiente. Se incubaron las lectinas WGA y PNA conjugadas a Isotiocianato de fluoresceína (FITC) en dilución 1:80 (PBS Ca<sup>2+</sup>1mM) toda la noche a 4°C en cámara húmeda y se lavó con PBS pH 7.2 seguido de Tritón X-100 1% y nuevamente PBS pH 7.2. Se montaron las laminillas con VectaShield-DAPI, se selló con barniz y se almacenaron en cámara húmeda a 4°C hasta su observación en el microscopio confocal.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Concentración proteica de los aislados

Las concentraciones proteicas obtenidas fluctuaron entre 4641.21 y 3888.69  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , la más elevada fue la del aislado Morelos (Tabla 7).

Tabla 7. Concentración proteica de los 4 aislados de *T. cruzi*.

Aislado	Concentración proteica ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )
Querétaro	3641.21
Qro/Mp	3889.69
Morelos	4647.29
Mor/Tb	4301.81

**8.2 Perfil electroforético de los aislados.** En el perfil proteico de los 4 aislados de *T. cruzi*, se encuentran componentes con pesos moleculares que van desde 12 a más de 250 kDa. Se observan los componentes con peso de 110, 90, 70, 50, 45, 40, 38, 34, 32, 25, 22, 18, 14, 13 y 12 kDa. No se observan diferencias entre los aislados (Figura 12).

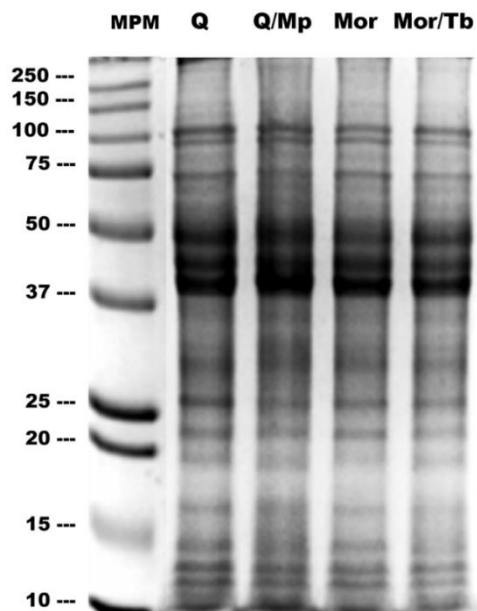


Figura 12. Perfil electroforético de 4 aislados de *T. cruzi* con 20  $\mu\text{g}$  de proteína en gel de acrilamida al 12.5 % con tinción de Coomassie (Coom). MPM: marcador de pesos moleculares; Q: Querétaro; Q/Mp: Querétaro obtenido de *Meccus pallidipennis*; Mor: Morelos y Mor/Tb: Morelos obtenido de *Triatoma barberi*.

**8.3 Identificación de glicoproteínas en el aislado Querétaro reveladas con lectinas.** El perfil de proteínas y glicoproteínas muestra un patrón diferente de reconocimiento con cada lectina, se identifican glicoproteínas que van desde los 188 kDa hasta los 12 kDa (Figura 13).

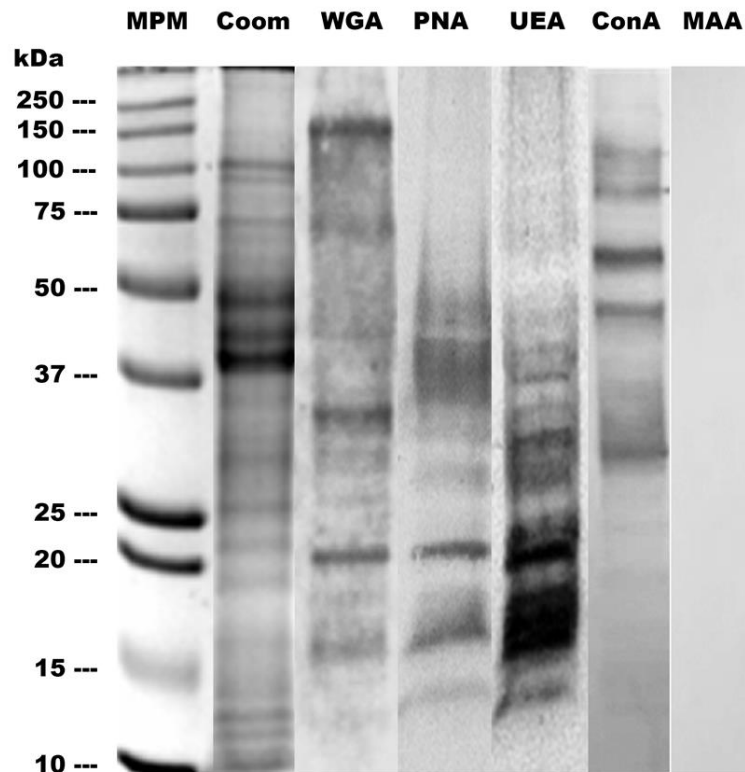


Figura 13. Comparación del perfil proteico y glicoproteico del aislado Querétaro de *T. cruzi* con lectinas. MPM: marcador de pesos moleculares; COOM: perfil proteico del aislado Querétaro teñido con Coomassie; Perfil glicoprotéico por Western Blot con las lectinas conjugadas a peroxidasa: WGA, PNA, UEA, Con A y MAA, revelados con DAB.

**8.4 Perfil de glicoproteínas de cuatro aislados de *T. cruzi* con la lectina WGA.** Se observaron glicoproteínas con pesos entre 188 y 12 kDa. En el aislado Querétaro las glicoproteínas de mayor intensidad fueron 12, 15, 17, 19, 72 y 90 kDa. En el Q/Mp fueron las de 12, 15, 17, 19, 90 y 94 kDa. En el aislado Morelos fueron 12 y 15. En el Mor/Tb fueron las de 12, 13, 15, 16 y 19 kDa; el patrón es similar en los cuatro aislados, en los aislados Querétaro no se identificó el componente de 13, 16, 21 y 50 kDa; en el aislado Qro/Mp el de 13 y 16 kDa; en el aislado Morelos el de 13, 17, 21 y 50 kDa y en el aislado Mor/Tb el de 50 kDa (Figura 14).

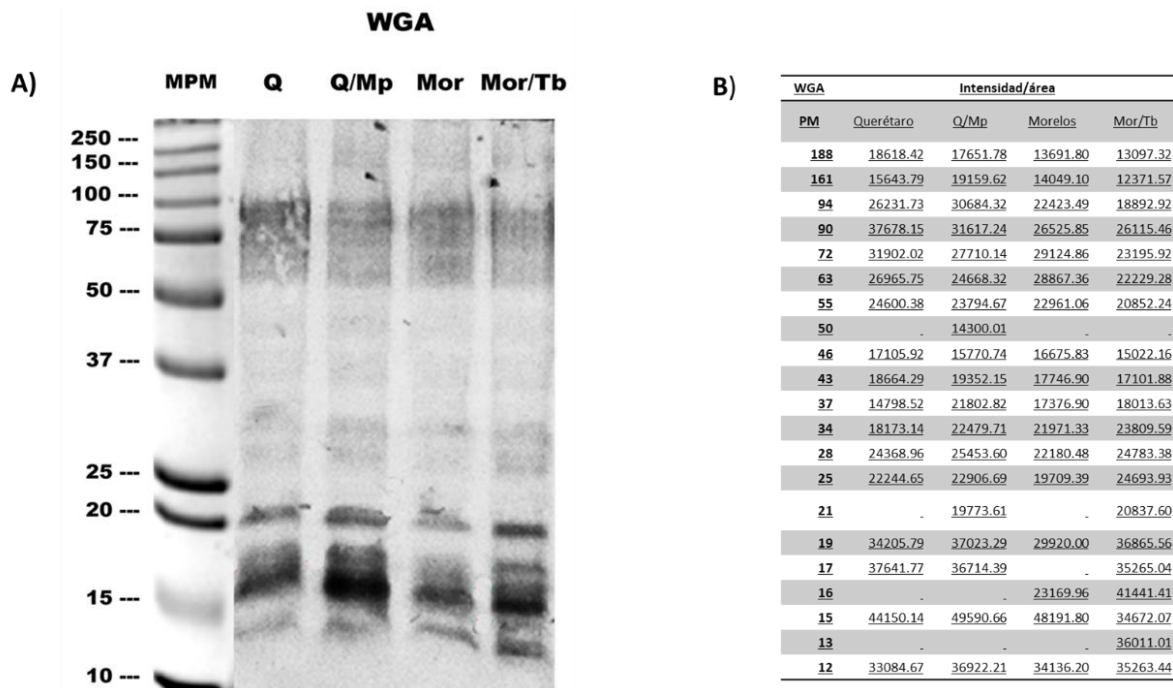


Figura 14 . Perfil glicoproteico de cuatro aislados de *T. cruzi* por afinidad a la lectina WGA. **A)** Western blot con la lectina WGA conjugada a peroxidasa, revelada con DAB. Querétaro (Q), Querétaro obtenida de *Meccus pallidipennis* (Q/Mp), Morelos (Mor) y Morelos obtenida de *Triatoma barberi* (Mor/Tb) **B)** Valores de intensidad/área (píxeles/ cm<sup>2</sup>) de los componentes glicoproteicos afines a la lectina.



**8.5 Perfil de glicoproteínas de cuatro aislados con la lectina PNA.** La lectina PNA en los extractos proteicos de *T. cruzi*, evidencio 20 componentes con pesos moleculares entre 13 y 95 kDa. En el aislado Querétaro los componentes de mayor intensidad fueron los de 13, 15, 17, 19, 20, 28, 33, 38 y 40 kDa; en Q/Mp fueron los de 13, 15, 17 y 19 kDa; en Morelos fueron los de 13, 15, 16, 17 19, 38 y 40 kDa y los de Mor/Tb fueron los de 13, 14, 15, 16, 17 19, 28, 33, 38 y 40. Aun cuando el patrón es similar en los cuatro aislados, se observa que el componente de 14, 16 y 26 kDa no se identifican en los aislados Querétaro y Q/Mp y, en Morelos solo el de 26 kDa (Figura 15).

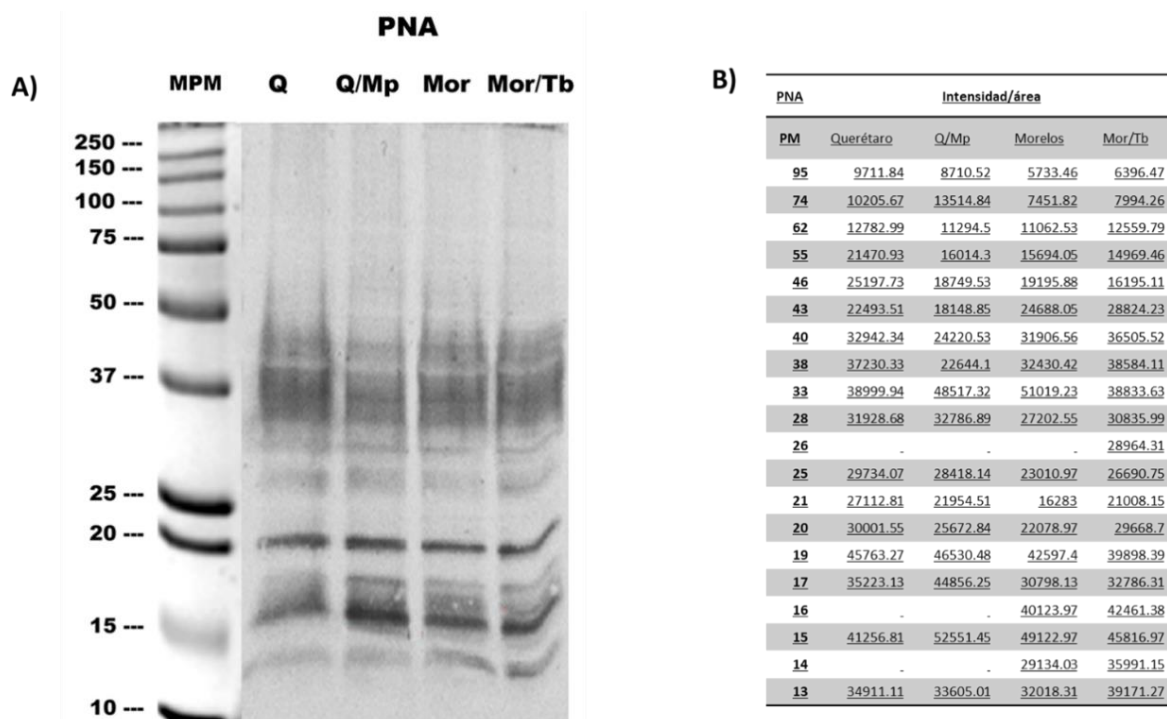


Figura 15. Perfil glicoproteico de cuatro aislados de *T. cruzi* por afinidad a la lectina PNA. **A)** Western blot con la lectina PNA conjugada a peroxidasa, revelada con DAB. Querétaro (Q), Querétaro obtenida de *Meccus pallidipennis* (Q/Mp), Morelos (Mor) y Morelos obtenida de *Triatoma barberi* (Mor/Tb) **B)** Valores de intensidad/área (píxeles/ cm<sup>2</sup>) de los componentes glicoproteicos afines a la lectina.

**8.6 Perfil de glicoproteínas de cuatro aislados con la lectina UEA-1.** En el reconocimiento del perfil glicoproteico solo se identificaron 19 componentes con pesos moleculares entre 13 y 120 kDa. Los de mayor intensidad en Querétaro fueron los de 13, 16, 17, 18, 20, 23, 26, 28, 30, 33 y 36 kDa; en Qro/Mp fueron 13, 16, 20, 23, 26, 28, 30, 33, 36 y 41; en Morelos y Mor/Tb fueron los 13, 16, 17, 18, 20, 23, 26, 28, 30, 33, 36 y 41 kDa. En el aislado Q/Mp no se identificaron las de 17 y 18 kDa (Figura 16).

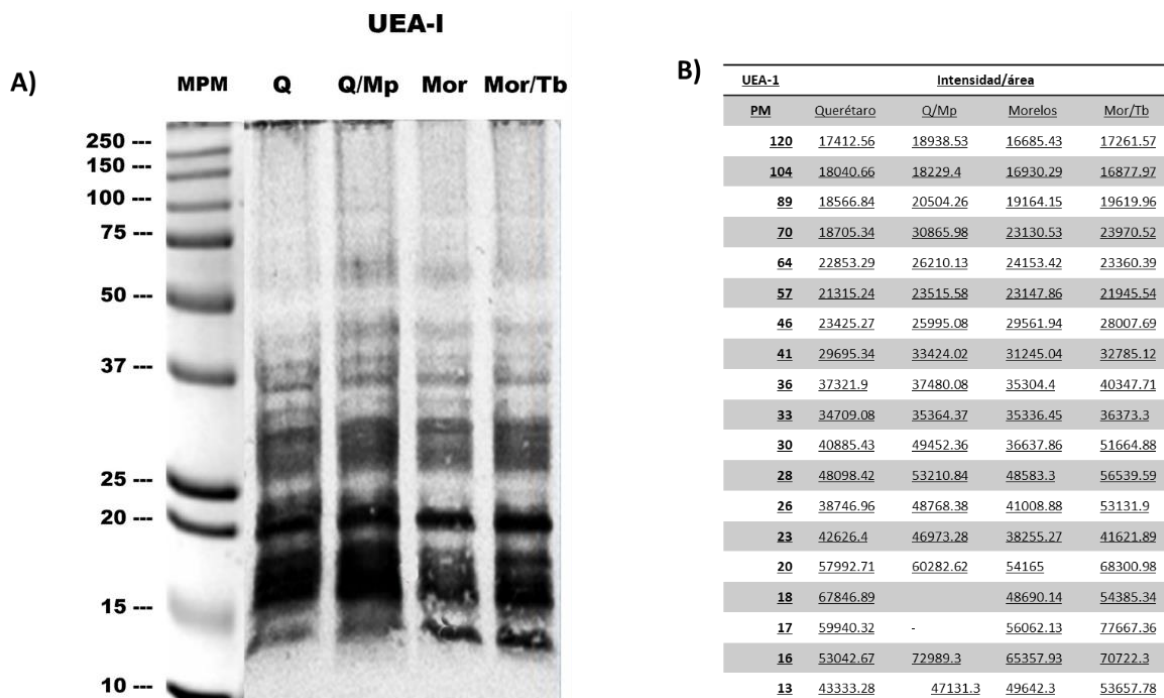


Figura 16. Perfil glicoproteico de cuatro aislados de *T. cruzi* por afinidad a la lectina UEA-I. **A)** Western blot con la lectina UEA-I conjugada a peroxidasa, revelada con DAB. Querétaro (Q), Querétaro obtenida de *Meccus pallidipennis* (Q/Mp), Morelos (Mor) y Morelos obtenida de *Triatoma barberi* (Mor/Tb) **B)** Valores de intensidad/área (píxeles/ cm<sup>2</sup>) de los componentes glicoproteicos afines a la lectina.

## 8.7 Perfil de glicoproteínas de los 4 aislados con la lectina Con A.

En los cuatro extractos proteicos de *T. cruzi*, la lectina Con A permitió observar 18 componentes con pesos moleculares entre 12 y 146 kDa. Los de mayor intensidad en el aislado Querétaro corresponden a los pesos moleculares de 15, 16, 17, 19, 20, 24, 26, 29, 34, 36, 39, 43, 46, 55, 74 y 98 kDa; en Q/Mp fueron los de 12, 15, 16, 17, 19, 24, 26, 29, 34, 36, 43 y 55 kDa; en Morelos los de 12, 15, 16, 17, 19, 20, 24, 26, 29, 34, 36, 43, 46, 55 y 74 kDa y Mor/Tb los de 12, 15, 16, 17, 19, 20, 26, 29, 34, 36, 43, 46, y 55 kDa. No se identificó el de 39 kDa en Qro/Mp, Morelos y Mor/Tb.

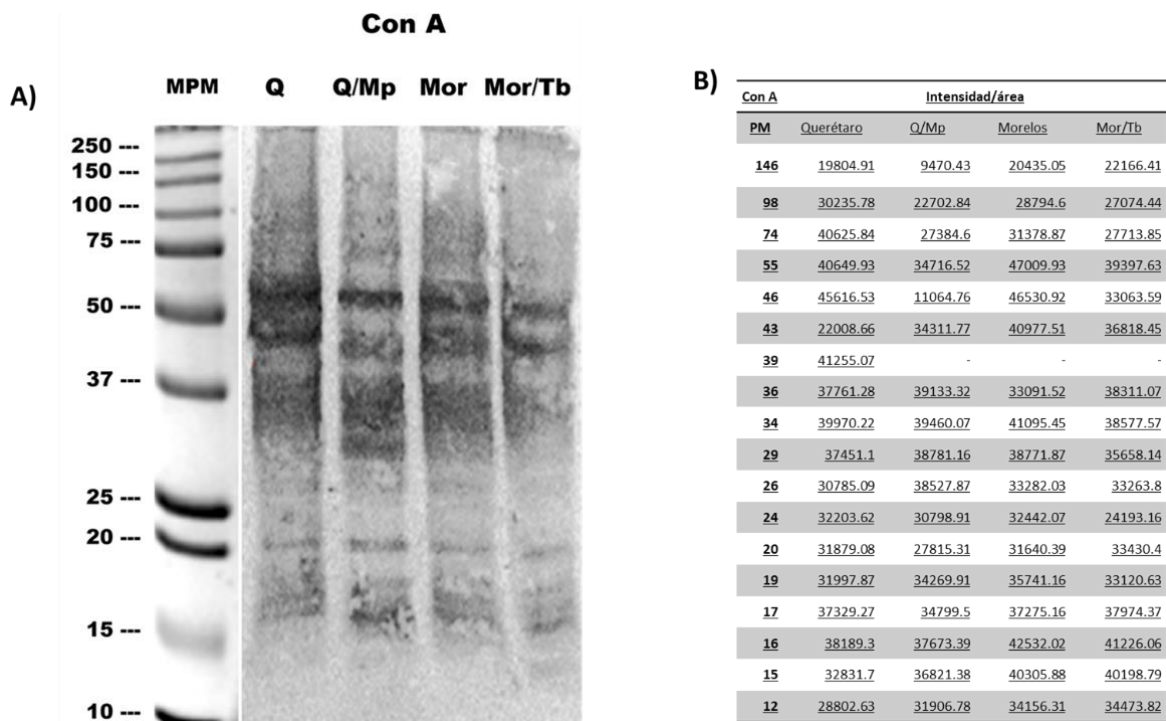


Figura 17. Perfil glicoproteico de cuatro aislados de *T. cruzi* por afinidad a la lectina Con A

**A)** Western blot con la lectina Con A conjugada a peroxidasa, revelada con DAB. Querétaro (Q), Querétaro obtenida de *Meccus pallidipennis* (Q/Mp), Morelos (Mor) y Morelos obtenida de *Triatoma barberi* (Mor/Tb) **B)** Valores de intensidad/área (píxeles/ cm<sup>2</sup>) de los componentes glicoproteicos afines a la lectina.

**8.8 Perfil de glicoproteínas de cuatro aislados de *T. cruzi* con la lectina MAA.** La lectina MAA no mostró reconocimiento de glicoproteínas en los componentes proteicos identificados por electroforesis y teñidos con Coomassie en el aislado Querétaro (Figura 18).

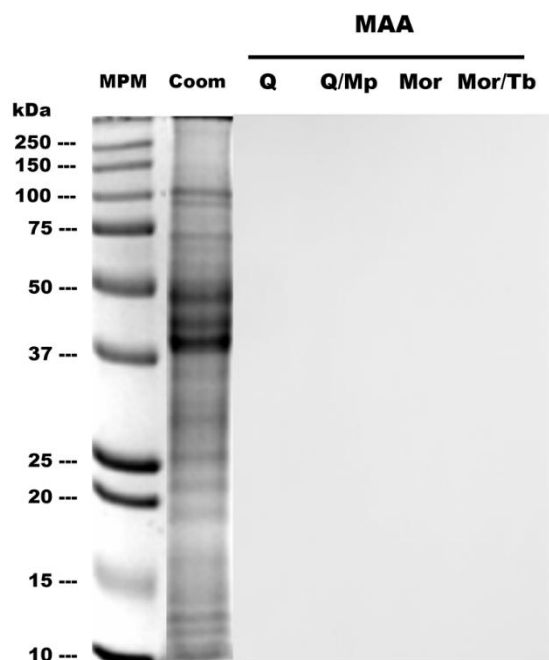


Figura 18 . Perfil glicoproteico de cuatro aislados de *T. cruzi* por afinidad a la lectina MAA. MPM: marcador de peso molecular; Coom: Perfil proteico del aislado Querétaro en SDS PAGE 12.5% con tinción de Coomassie; Perfil glicoproteico de los aislados Querétaro (Q), Querétaro de *Meccus pallidipennis* (Q/Mp), Morelos (Mor) y Morelos de *Triatoma barberi* (Mor/Tb) por Western blot con la lectina MAA conjugada a peroxidasa revelada con DAB.

8.9 **Identificación de glicoproteínas mediante inmunohistoquímica.** El reconocimiento específico de la lectina WGA por epimastigotes de cuatro aislados *T. cruzi* (verde) y la distribución general de los núcleos del parásito (azul) identifica abundantes glicoproteínas ricas en N-acetil glucosamina (Figura 19).

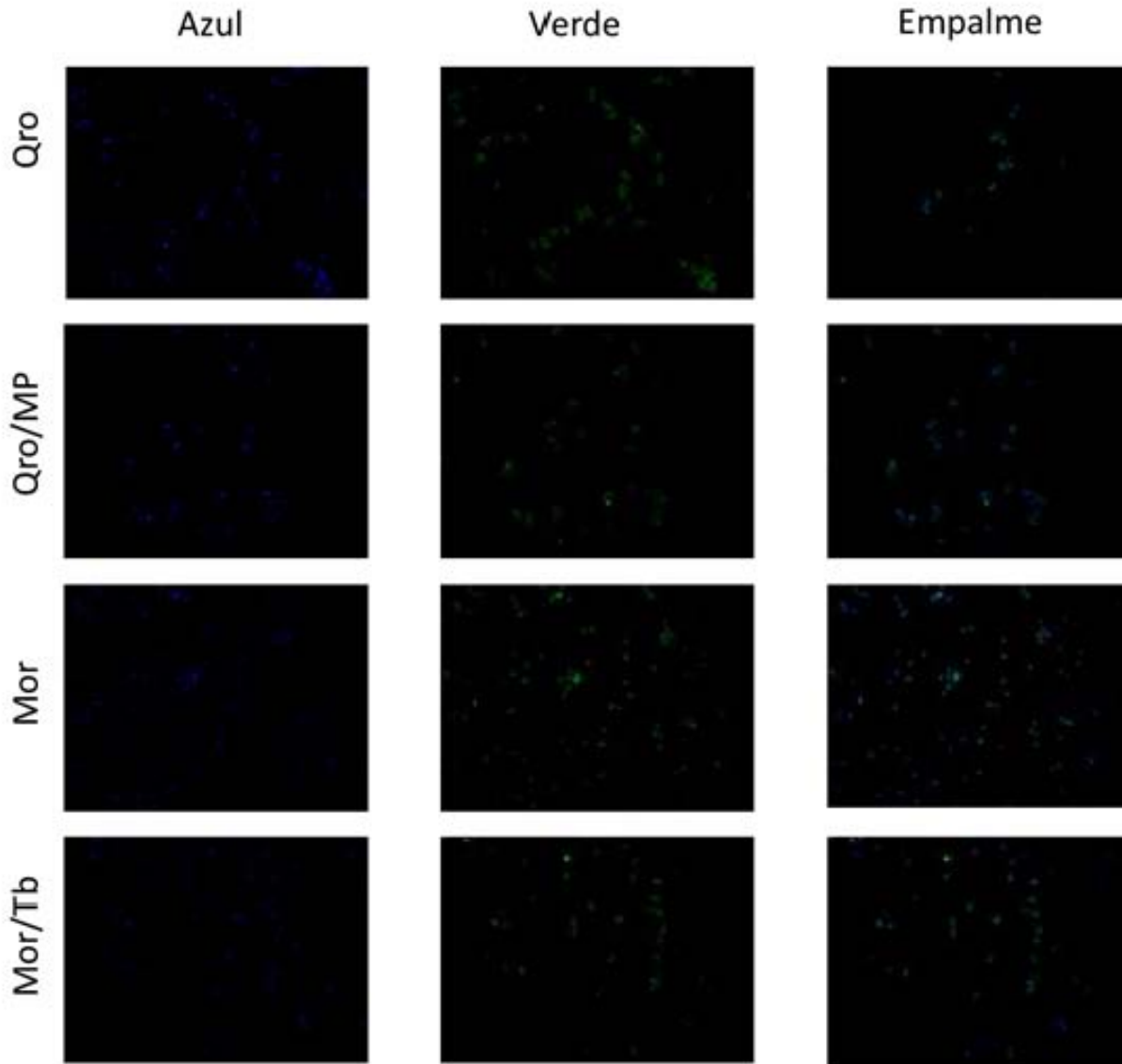


Figura 19. Imagen representativa de epimastigotes de cuatro aislados de *T. cruzi* reconocidos por la lectina WGA-FITC (Verde), núcleos marcados por DAPI (azul) y superposición de ambas fluorescencias (empalme).

Con la lectina PNA se observa el reconocimiento de glicoproteínas ricas en N-acetil  $\alpha$ -D-galactosamina en cuatro aislados *T. cruzi* (Figura 20).

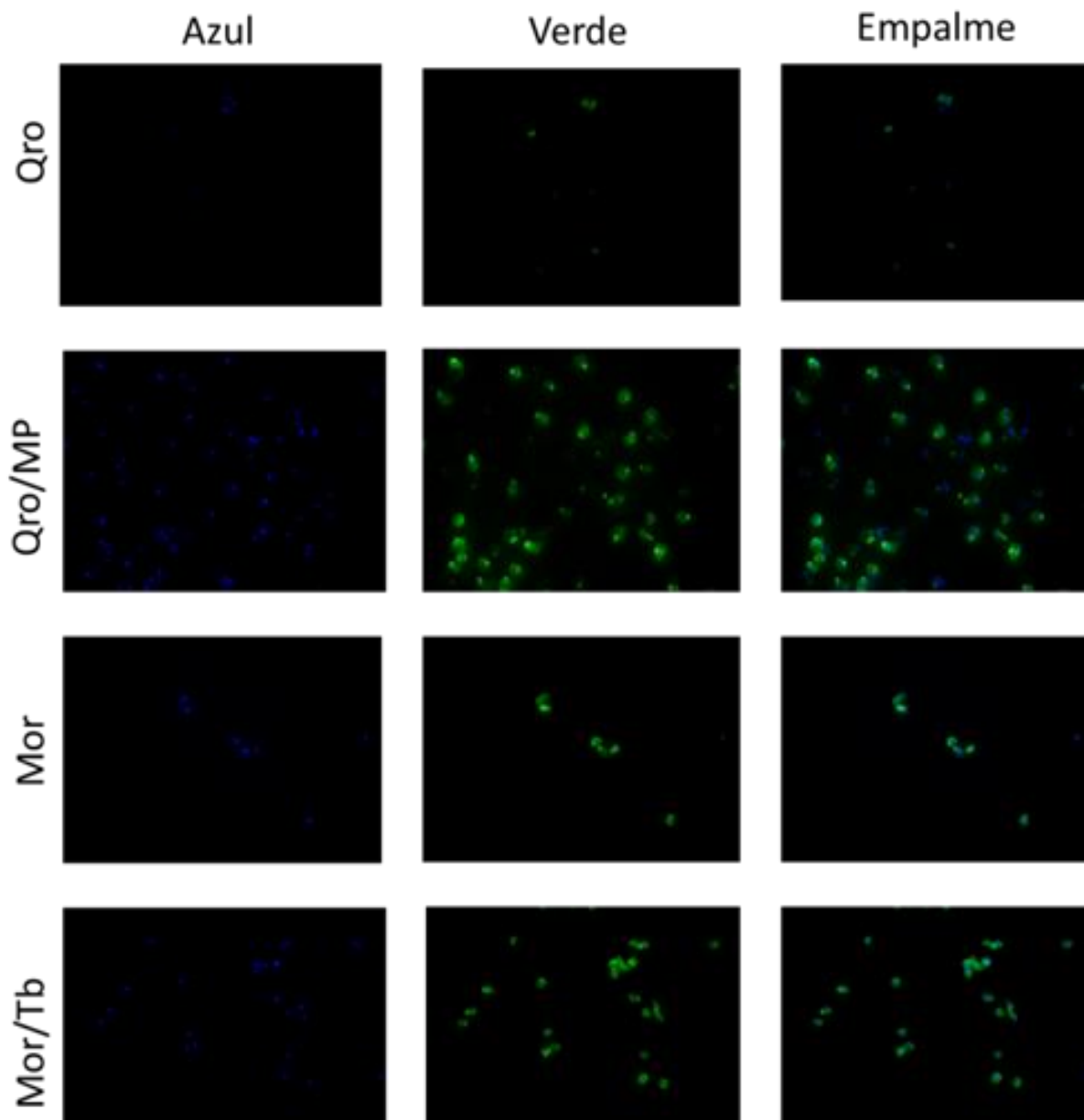


Figura 20. Imagen representativa de los epimastigotes de cuatro aislados de *T. cruzi* reconocidos por la lectina WGA-FITC (Verde), núcleos marcados por DAPI (azul) y superposición de ambas fluorescencias (empalme).

## 9. DISCUSIÓN

*T. cruzi* es el agente causal de la enfermedad de Chagas y se transmite principalmente por medio de insectos vectores. Las cepas del parásito muestran diversidad biológica que puede atribuirse a su interacción con el ambiente y sus hospederos. Se ha comprobado que algunas características como la virulencia se modifican dependiendo del origen, mamíferos e invertebrados y de este último la especie del triatmino. Actualmente se busca determinar el papel que desempeña el vector en la patogenicidad, virulencia, tropismo de los aislados y la evolución de la infección-enfermedad. En este contexto, las glicoproteínas son importantes ya que median procesos claves en la interacción parásito-vector-mamífero tales como reconocimiento, adhesión y evasión de la respuesta inmune.

Existen diferentes glicoproteínas y métodos para la determinación de éstas y las lectinas con afinidad por carbohidratos, monosacáridos o estructuras glucosídicas han mostrado ser una herramienta poderosa para su identificación.

En el presente trabajo, se seleccionaron los dos aislados directos de *Meccus pallidipennis* y *Triatoma barberi* y dos aislados, producto de la infección experimental entre las dos especies de triatóminos. El perfil proteico mostró componentes que van desde 12 hasta 250 kDa, este patrón concuerda con los reportados por Bucio, O Daly, De Lima y Torres (Bucio *et al.*, 1999). Algunos componentes proteicos con pesos moleculares han sido reportados por diversos autores; entre los que destacan el de 50 kDa que fue identificado como tubulina por Paba en 2004, mediante inmunoblot con sueros de pacientes con miocardiopatía Chagásica (O'Daly *et al.*, 1994) y se encontró como inmunodominante en un aislado procedente del estado de Morelos (Torres-Gutiérrez *et al.*, 2015). Los componentes de 38 y 32 kDa se reportaron como inmunodominantes en el trabajo de Bucio en 1999 en aislados obtenidos de *M. pallidipennis*, *T. barberi* y de humano.

*T. cruzi* posee diversas glicoproteínas principalmente de superficie (Tabla 3): con la lectina WGA se identificaron componentes entre 12 y 19 kDa con mayor intensidad en los cuatro aislados. En Querétaro también se identificaron el de 72 y 90 y en Qro/Mp fueron los de 90 y 94 kDa. El aislado Querétaro y Qro/Mp son los que presentan mayor cantidad de N-acetilglucosamina y en la caracterización biológica se comportan con una virulencia elevada de acuerdo a lo reportado por Mendoza Rodríguez en 2015; estos componentes podrían tener un papel de importancia en la infectividad de *T. cruzi*.

Qro/Mp y Mor/Tb (aislados obtenidos de la infección experimental) presentan reconocimiento por WGA en los componentes de 21, 15, 13 y 12 kDa; esto sugiere un posible mecanismo de adaptación que requiere una mayor cantidad de carbohidratos en estos componentes proteicos. Atella y cols consideran que tienen un papel antigénico o bien como factores de virulencia necesarios para la invasión de la células huésped o evasión del sistema inmune (Atella *et al.*, 2005).

*T. cruzi* carece de la capacidad de producir N- acetilgalactosamina (Salto *et al.*, 2000) por lo que la lectina PNA reconoce residuos de galactosa como galactopiranosas y galactofuranosas. En los cuatro aislados, los componentes de 13, 15, 17, 19 y 33 kDa son reconocidos por PNA con mayor intensidad. En los aislados Morelos y Mor/Tb se observó baja virulencia como lo reportó Mendoza Rodríguez en 2015 y en ambos aislados los componentes de 14 y 16 kDa son reconocidos por la lectina a diferencia de Querétaro y Qro/Mp, lo que indica que en estos últimos las proteínas carecen de galactosas, lo que podría influir en que sean menos vulnerables a la respuesta inmune del hospedero, favoreciendo su virulencia. Se ha reportado que la presencia de galactofuranosas en las mucinas de cepas de TcI correlaciona con la inactivación del parásito, posiblemente debido a que GalF funciona como epítopo antigénico provocando una reacción inmunológica que disminuye su capacidad de infección (Salto *et al.*, 2000)

Las mucinas son de las principales proteínas de *T. cruzi* que contienen galactosas, en epimastigotes se reportan principalmente con pesos moleculares entre 30 y 55



kDa (TcSMUG)(Lederkremer, 1994). En los cuatro aislados encontramos seis componentes en este rango de pesos, siendo los de 33, 38 y 40 kDa los que presentan mayor intensidad.

La lectina UEA-I reconoce componentes entre 13 y 120 kDa en los cuatro aislados, la mayor intensidad se observa en los componentes entre 13 hasta y 36 kDa siendo el de 20 kDa el que predomina, indicando una elevada presencia de residuos de fucosa. En Qro /Mp la elevada intensidad del reconocimiento en los componentes entre 16 y 20 kDa no permite diferenciar componentes entre estos valores. Este mismo aislado presente una intensidad mayor en el componente de 70kDa que podría corresponder a la proteína gp 72, la cual posee una estructura inusual de glicosilación y se ha asociado a la zona de adhesión del flagelo y ha sido implicada en la inhibición de la diferenciación a tripomastigote metacíclico (Allen *et al.*, 2013), lo que podría indicar que la mayor expresión de esta disminuiría la metaciclogenia y por lo tanto la infectividad del aislado.

La lectina Con A reconoció componentes entre 12 y 146 kDa, con un patrón muy similar en los cuatro aislados en *T. cruzi*. Gran cantidad de glicoproteínas de *T. cruzi* poseen manosas, por ejemplo, las cruzipainas y transialidasas. En todos los aislados, el componente de 55 kDa presenta elevada intensidad y podría corresponder a cruzipaina ya que corresponde a su rango de peso molecular y ha sido descrita con presencia de oligosacáridos de alta manosa. Al degradarse la cruzipaina, se obtienen fragmentos de 35 kDa que también podemos observar en el patrón revelado con Con A en todos los aislados. Esta proteína es de gran importancia por ser un factor de virulencia ya que destruye la porción Fc de las inmunoglobulinas e inhibe el complemento (Gea and Pellegrini, 2006).

Las transialidasas son importantes para *T. cruzi* debido a que se encargan de transferir ácido siálico del hospedero mamífero a las mucinas del parásito favoreciendo su supervivencia; se han reportado en el rango de pesos

moleculares entre 80 y 200 kDa (Nardy *et al.*, 2016). La lectina Con A reconoció componentes de 74, 98 y 146 que podrían asociarse a estas proteínas.

La lectina MAA no reconoció componentes en el perfil proteico de ninguno de los cuatro aislados de *T. cruzi*, esto se debe en parte a la incapacidad del parásito de producir ácido siálico de novo (Amino *et al.*, 1995). Aun cuando éste posee transialidasas, los epimastigotes en el medio de cultivo no requerirán ni dispondrán del ácido siálico como sucede en el huésped mamífero.

La actividad de la sialidasa no solo se encuentra en la saliva de los triatomíneos sino también en el estómago, la enzima quita rápidamente el ácido siálico de las células sanguíneas ingeridas, los epimastigotes a su vez adquieren ácido siálico del intestino del parásito (Amino *et al.*, 1995). Por lo tanto, el ácido siálico en la superficie no es necesario para el desarrollo de epimastigotes como lo observamos con la lectina MAA que no reconoció componentes (Figura 18).

Aislados	Peso molecular de los componentes de importancia evidenciados con las lectinas:				
	WGA (kDa)	PNA (kDa)	UEA-1 (kDa)	Con A (kDa)	MAA (kDa)
Querétaro	72 y 90	40, 38, y 33	70 y 20	146, 98,75 y 55	-
Morelos	21, 15, 13 y 12	14 y 16	20	146, 98,75 y 55	-
Qro/Mp	94 y 90	40, 38, y 33	20	146, 98,75 y 55	-
Mor/tb	21, 15, 13 y 12	40, 38, y 33	20	146, 98,75 y 55	-

Tabla 8. Componentes de importancia encontrados con las lectinas WAG, PNA, UEA-1 y MAA

La técnica de inmunofluorescencia se utilizó para verificar la presencia de glicoproteínas con reconocimiento específico hacia las lectinas WGA y PNA (figuras 19 y 20) debido a que estas reconocen las principales estructuras sacaridas de *T. cruzi* (N-acetilglucosamina y N-Galactosamina). Se observó el reconocimiento de glicoproteínas en los cuatro aislados de *T. cruzi* evidenciando la presencia de mucinas, reportadas como las más abundantes de *T. cruzi* (Buscaglia *et al.*, 2006). PNA reconoce residuos de  $\beta$ -galactosas como galactopiranosas y galactofuranosas. *T. cruzi* no contiene N-Galactosamina debido a mutaciones de la enzima 4-epimerasa (Salto *et al.*, 2000).

## 10. CONCLUSIONES

Los perfiles electroforéticos de los cuatro aislados de *T. cruzi* muestran similitud en los componentes proteicos.

Con las lectinas WGA, Con A, PNA, UEA-I fueron identificados componentes con mayor intensidad en los rangos de mediano y bajo peso molecular.

Existe mayor cantidad de N-acetilglucosamina en los aislados Querétaro y Qro/Mp que se asocia a la virulencia elevada de estos aislados

En los cuatro aislados se observaron diferencias en la glicosilación de los componentes de 14, 16, 20, 70, 72, 90 y 94 kDa.

Se evidenció la ausencia de ácido siálico en epimastigotes de los 4 aislados de *T. cruzi* con la lectina MAA.

Se identificó por inmunohistoquímica con las lectinas WGA y PNA, la presencia de glicoproteínas distribuidas en los epimastigotes de los cuatro aislados.

## 11. PERSPECTIVAS

Continuar con la caracterización glicoproteica de los cuatro aislados de *T. cruzi* para profundizar con los resultados obtenidos específicamente en los rangos de pesos moleculares donde se observan diferencias

Identificar los componentes que se encontraron con diferencias en la glicosilación mediante cromatografía de afinidad y espectrometría de masas.

Analizar estos componentes para su posible utilización como blancos terapéuticos.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

- Allen, S. *et al.* (2013) 'Structure of a complex phosphoglycan epitope from gp72 of *Trypanosoma cruzi*', *Journal of Biological Chemistry*, 288(16), pp. 11093–11105. doi: 10.1074/jbc.M113.452763.
- Alves, M. J. M. *et al.* (2017) 'Comprehensive glycoprofiling of the epimastigote and trypomastigote stages of *Trypanosoma cruzi*', *Journal of Proteomics*, 151, pp. 182–192. doi: 10.1016/j.jprot.2016.05.034.
- Atella, G. C. *et al.* (2005) 'Oogenesis and egg development in triatomines: A biochemical approach', *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 77(3), pp. 405–430.
- Atwood, J. A. *et al.* (2006) 'Glycoproteomics of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes using subcellular fractionation, lectin affinity, and stable isotope labeling', *Journal of Proteome Research*, 5(12), pp. 3376–3384. doi: 10.1021/pr060364b.
- Bern, C. (2011) 'Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease.', *The New England journal of medicine*, 364(June 2011), pp. 2527–2534. doi: 10.1056/NEJMct1014204.
- Bern, C. (2015) 'Chagas' Disease', *New England Journal of Medicine*, 373(5), pp. 456–466. doi: 10.1056/NEJMra1410150.
- Bosseno, M. F. *et al.* (2002) 'Predominance of *Trypanosoma cruzi* lineage I in Mexico', *Journal of Clinical Microbiology*, 40(2), pp. 627–632. doi: 10.1128/JCM.40.2.627-632.2002.
- Brisse, S., Barnabé, C. and Tibayrenc, M. (2000) 'Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis', *International Journal for Parasitology*, 30(1), pp. 35–44. doi: 10.1016/S0020-7519(99)00168-X.
- Brisse, S., Verhoef, J. and Tibayrenc, M. (2001) 'Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages', *International Journal for Parasitology*, 31(11), pp. 1218–1226. doi: 10.1016/S0020-7519(01)00238-7.
- Bucio, M. *et al.* (1999) 'Identification of immunodominant antigens in Mexican strains of *Trypanosoma cruzi*', *Immunol Invest.*, pp. 257–68.
- Buscaglia, C. A. *et al.* (2006) 'Trypanosoma cruzi surface mucins: host-dependent coat diversity.', *Nature reviews. Microbiology*, pp. 229–236. doi: 10.1038/nrmicro1351.
- Carrada-Bravo, T. (2004) 'Trypanosoma cruzi : Historia natural y diagnóstico de la enfermedad de Chagas', *Revista Mexicana de Patología Clínica*, 51(4), pp. 205–219.

Espinoza, B. *et al.* (1998) 'Genotype and virulence correlation within Mexican stocks of *Trypanosoma cruzi* isolated from patients', *Acta Tropica*, 70(1), pp. 63–72. doi: 10.1016/S0001-706X(98)00005-9.

GALVÃO, C. (2001) 'Partial purification and use of *Trypanosoma cruzi* glycosidic fractions for chagas' diseases diagnosis', *Acta Científica Venezolana*, 52(4), pp. 235–247.

Garcia, E. S. *et al.* (2010) 'Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*', *Trends in Parasitology*, pp. 499–505. doi: 10.1016/j.pt.2010.07.003.

Gea, S. and Pellegrini, a (2006) 'Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* cystein protease in the host-parasite interplay', *Inmunología*, 25(4), pp. 225–238. Available at: <http://revista.inmunologia.org/Upload/Articles/6/9/698.pdf>.

González M, C. H. (2014) 'Investigación traslacional en el tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas', *Salud Militar*, 33, pp. 24–31.

Guzmán-Marín, E. *et al.* (1999) 'Importancia de la caracterización de cepas de *Trypanosoma*', *Rev Biomed*, 10(490), pp. 177–184.

Hernández, P. *et al.* (2005) 'Las Lectinas Vegetales Como Modelo De Estudio De Las Interacciones', *Revista de Educación Química*, 24(1), pp. 21–27.

Lederkremer, A. N. C. and R. M. de (1994) 'Different pattern of glycoproteins with unusual Olinked oligosaccharides in two strains of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes', *Ciencia e cultura*, pp. 286–289.

Mendoza-Rodriguez, M. I. (2015) *Caracterizacion Biologica y Bioquimica de 4 aislados de Trypanosoma cruzi.*, Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México.

Miles, M. A. *et al.* (1977) 'The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of brazil', *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 71(3), pp. 217–225. doi: 10.1016/0035-9203(77)90012-8.

Miles, M. A. *et al.* (1978) 'Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil', *Nature*, 272(5656), pp. 819–821. doi: 10.1038/272819a0.

Monteón, V. *et al.* (2009) 'Cruzi : Metaciclologénesis , Parasitemia Y Resistencia Contra Benznidazol', *Rev Biomed*, 20(3), pp. 206–214.

Murray, S. *et al.* (2001) 'Phosphorylation of the RNA Polymerase II Carboxy-Terminal Domain by the Bur1 Cyclin-Dependent Kinase', *Molecular and Cellular Biology*, 21(13), pp. 4089–4096. doi: 10.1128/MCB.21.13.4089-4096.2001.

Nardy, A. F. F. R. *et al.* (2016) 'Role of *Trypanosoma cruzi* Trans-sialidase on the

escape from host immune surveillance', *Frontiers in Microbiology*, 7(MAR), pp. 1–9. doi: 10.3389/fmicb.2016.00348.

O'Daly, J. A. *et al.* (1994) 'Comparison of chagasic and non-chagasic myocardiopathies by ELISA and immunoblotting with antigens of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*', *Acta Tropica*, 56(4), pp. 265–287. doi: 10.1016/0001-706X(94)90099-X.

OMS (2007) 'Reporte sobre la Enfermedad de Chagas del grupo de Trabajo Científico'.

OMS (2013) 'La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana).'

Ramírez, J. D. *et al.* (2012) 'Multilocus PCR-RFLP profiling in *Trypanosoma cruzi* I highlights an intraspecific genetic variation pattern', *Infection, Genetics and Evolution*, 12(8), pp. 1743–1750. doi: 10.1016/j.meegid.2012.06.018.

Rassi, A., Rassi, A. and Marin-Neto, J. A. (2010) 'Chagas disease', *The Lancet*, pp. 1388–1402. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60061-X.

Salazar-Schettino, M. *et al.* (2010) 'Revisión de 13 especies de la familia Triatominae ( Hemiptera : Reduviidae ) vectores de la enfermedad de Chagas , en México A revision of thirteen species of Triatominae ( Hemiptera : Reduviidae ) vectors of Chagas disease in Mexico Resumen Introducción', *Official Journal of the Selva Andina Research Society.*, 1(1), pp. 57–80.

Salazar-Schettino PM, Tay J, Bucio MI, Haro I de, Anzures ME, F. A. (1984) 'Primer caso de megaesófago con serología positiva a *Trypanosoma cruzi*', *Salud Publica Mex*, 26, pp. 452–455.

Salazar-Schettino PM, Tay J, Ontiveros A, Jiménez J, Haro I de, Bucio MI, R. AL (1983) 'Enfermedad de Chagas en México. Presentación de casos clínicos', *Medicina*, 26, pp. 11–51.

Salazar Schettino, P. M., de Haro Arteaga, I. and Cabrera Bravo, M. (2005) 'Tres especies de triatominos y su importancia como vectores de *Trypanosoma cruzi* en Mexico', *Medicina*, 65(1), pp. 63–69.

Salto, M. L. *et al.* (2000) 'Separation of Gal $\beta$ 1→XGlcNAc and Gal $\beta$ 1→XGlcNAc (X = 3, 4, and 6) as the alditols by high-pH anion-exchange chromatography and thin-layer chromatography: Characterization of mucins from *Trypanosoma cruzi*', *Analytical Biochemistry*, 279(1), pp. 79–84. doi: 10.1006/abio.1999.4466.

Tay, J. *et al.* (1981) 'Estado actual de nuestros conocimientos sobre la enfermedad de Chagas en la República Mexicana', *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 14(1), pp. 29–67. doi: S0037-86821981000100004.

Tibayrenc, M. (1998) 'Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach.', *International journal for parasitology*, 28(1), pp. 85–104. doi: 10.1016/S0020-7519(97)00180-X.

Torres-Gutiérrez, E. *et al.* (2015) 'Identificación de componentes inmunodominantes de un aislado de *Trypanosoma cruzi* por inmunoblot y su estandarización con fines diagnósticos', *Gaceta Medica de Mexico*, 151(1), pp. 6–13.

Turnock, D. C. and Ferguson, M. A. J. (2007) 'Sugar nucleotide pools of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, and *Leishmania major*', *Eukaryotic Cell*, 6(8), pp. 1450–1463. doi: 10.1128/EC.00175-07.

Voet, D.; Voet, JG.; Pratt, C. (2007) 'Fundamentals of Biochemistry', pp. 234–281.

World Health Organization (2005) 'Reporte sobre la enfermedad de Chagas'.

Yoshida, N. (2006) 'Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*', *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 78(1), pp. 87–111. doi: 10.1590/S0001-37652006000100010.

Zingales, B. *et al.* (2009) 'A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: Second revision meeting recommends TcI to TcVI', *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(7), pp. 1051–1054. doi: 10.1590/S0074-02762009000700021.

Zingales, B. *et al.* (2012) 'The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications', *Infection, Genetics and Evolution*, pp. 240–253. doi: 10.1016/j.meegid.2011.12.009.

Zumaya-Estrada, F. A. *et al.* (2012) 'North American import? Charting the origins of an enigmatic *Trypanosoma cruzi* domestic genotype', *Parasites & Vectors*, 5(1), p. 226. doi: 10.1186/1756-3305-5-226.