

76  
21



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

CARACTERIZACION DE PROTEASAS DE *Trypanosoma cruzi*,  
CEPA QUERETARO.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**

P R E S E N T A :

**GEORGINA NIETO CASTAÑEDA.**



MEXICO, D.F.

1997

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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	Prof. Gutiérrez Ramos Abel.
Vocal	Prof. Rodríguez Sotres Rogelio.
Secretario	Prof. Espinoza Gutiérrez Bertha.
1er. suplente	Prof. Romero Avila Maria Teresa.
2do. suplente	Prof. Becerril Flores Marco Antonio.

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas.  
Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Asesor

---

Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez

Sustentante

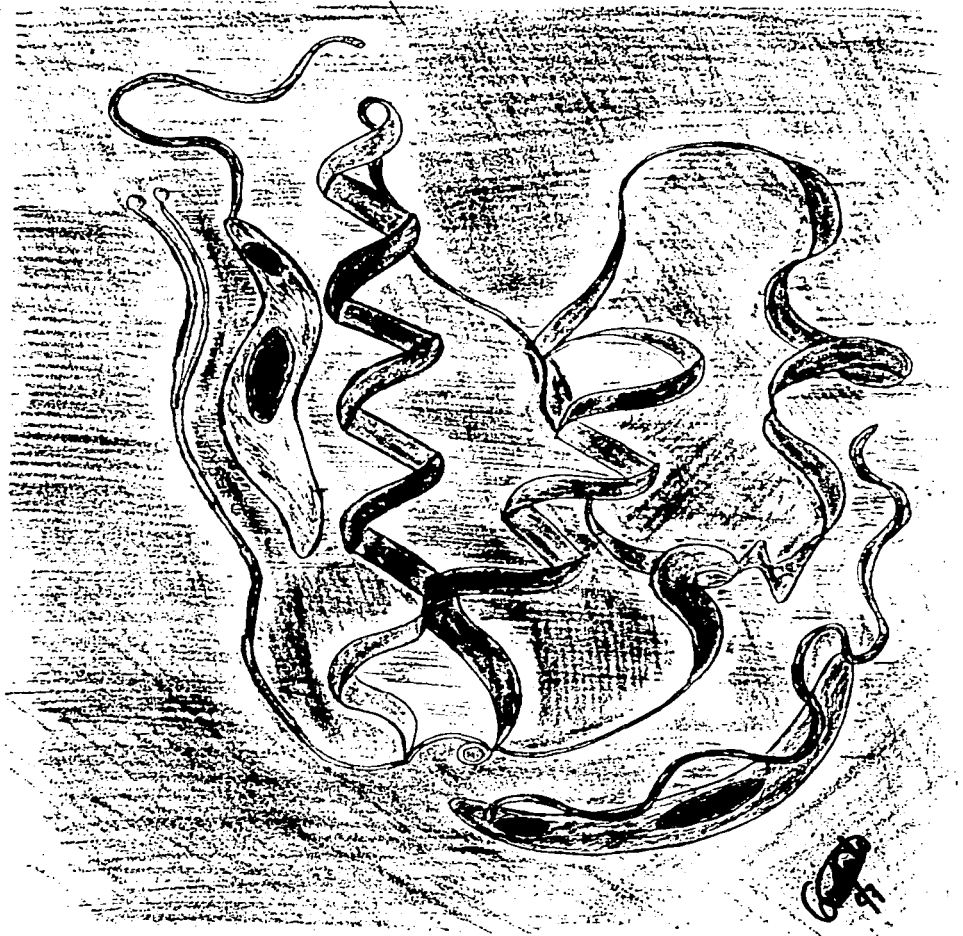
  

---

Georgina Nieto Castañeda

**Este proyecto estuvo financiado parcialmente por DGAPA, UNAM proyecto IN 211794 y por el proyecto de CONACyT No. 2235 PM. Agradezco además la beca que me fue otorgada dentro del mismo proyecto de CONACyT.**

Quiero agradecer de manera muy especial al M en C Julio César Carrero, por haberme asesorado en el manejo del equipo ROTOFOR, empleado durante el enfoque isoelectrico de proteasas de *T. cruzi*, a la Dra Tzipi Govezensky, por haberme asesorado en el manejo del programa RFLP-scan empleado en el análisis densitométrico de los geles de electroforesis y a la P. de Q.F.B. Dolores Aguilar C. por haber llevado a cabo el análisis estadístico de algunos de los experimentos de este trabajo



## **DEDICATORIA.**

*A Dios, por la vida que me regaló para vivir y por toda la gente maravillosa que puso en ella.*

*A mis padres con todo mi amor y agradecimiento por todos los sacrificios que tuvieron que hacer para ver hechos realidad no solo este, sino muchos de mis sueños.*

*A la mujer que me dió la vida... porque también es mi madre.*

*A mi pequeña Gisela con todo mi amor, no solo por ser una de mis mejores amigas y mi confidente, sino que también por aguantarme tanto y por estar ahí siempre.*

*A mi hermana Gilda por todo su cariño, su ayuda en todos los sentidos y por haberse constituido en mi más firme soporte en estos últimos meses.*

*A mi hermano Jorge, por estar también siempre ahí, aunque fuera muy a su manera.*

*A la memoria de mi hermano Julito...*

*También de alguna manera quisiera dedicar esto a mis hermanos Angélica y Armando.*

*A mis abuelos, en especial a la mujer más noble que he conocido en mi vida... mi abuelita Queta, gracias por tanto amor.*

*A todos mis primos y mis tíos.*

## AGRADECIMIENTOS.

A mi querida Universidad Nacional Autónoma de México por la suerte que tengo de ser orgullosamente universitaria

A la Facultad de Química que me brindó no solo una muy buena formación en el plano profesional, sino también en mi vida personal

Quiero agradecer a la Dra Bertha Espinoza por haberme dado la oportunidad de realizar mi tesis bajo su dirección, por haberme enseñado a trabajar como se debe hacer en investigación y por animarme cuando lo necesite

A los sinodales que con tanta gentileza revisaron este trabajo, gracias por sus atinadas observaciones

A Olga Claudia Godínez, donde quiera que este por ser la primer gran amiga que tuve en mi vida

A mis amigos de la secundaria José Luis, Carmen, Paula, Isabel y Georgina

A mis amigas del CCH Elena, Myriam, Mary, Rebeca, Aurora y Ulianova

A Maru y Memo por haber sido mis mejores amigos en la Fac de Química

Y por su puesto a todos los que me acompañaron con su cariño y su amistad a lo largo de la carrera Lety, Sandra, Clara, Claus ( y a su mamá con todo mi agradecimiento), Guille, Arturo, Xóchitl, Anita, Vero, Nancy, Cinthya, Ivett, Chayo, Elena, Maribel, Chio, Laura, Ivonne, Viri, Rita, Luisa, Sandra C., Amalia, Lore, Cris, Gaby (también a Dianita y Javier), Greta, Dulce, Caty, Gerardo, Sergio, Eiko, Tere G y Elsa y a todos los demás cuates de la facultad de Química

A las que son más que mis amigas *Vicky, Lulu* (quien además diseñó el dibujo de la portada y a su mamá también), *Betty y Lolita*, por haberme ayudado tanto en el laboratorio, por sus consejos y por preocuparse tanto por mí. También quiero agradecer de manera muy especial a *Almita* por haberme ayudado con muchos de los experimentos de este trabajo, a *Mariana, Marianita* ( y al niño *Erick* ), *Elba y Diana*.

Al que no está en el laboratorio pero que también es mi amigo Julio César, gracias por todo

A todos mis demás vecinos del departamento de inmunología por las veces que me ayudaron, en especial a Martha, Pavel y Marco

Finalmente quiero agradecer a los que no solo han sido mis amigos, sino que compartieron también mi amor a Dios, gracias a todos mis amigos del grupo *Nazareo Shelom*, en especial a Rafa por haber corregido el estilo literario de una partecita de este trabajo



*Con todo mi amor a Carlos, por la  
parte tan importante que ocupa en mi vida.*

*Si sobrevives, si persistes, canta,  
sueña, emborráchate.  
Es el tiempo del frío: A mi  
apresúrate. El viento de las horas  
barre las calles, los caminos.*

*Los árboles esperan, tú no esperes,  
éste es el tiempo de vivir, el único.*

*Jaime Sabines.*

## INDICE.

	página
Resumen	3
I. Introducción	5
1.1. Enfermedad de Chagas en México	7
1.2. Biología de <i>Trypanosoma cruzi</i>	10
1.2.1. Clasificación Taxonómica	10
1.2.2. Morfología de <i>Trypanosoma cruzi</i>	10
1.2.3. Ciclo Biológico	11
1.3. Algunas moléculas involucradas en la interacción célula huésped- <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
1.4. Proteasas	14
1.4.1. Inhibidores de proteasas	19
1.4.1.1. Inhibidores No-Específicos	20
1.4.1.2. Inhibidores Específicos	21
1.5. Proteasas en Parásitos	23
1.6. Proteasas en <i>Trypanosoma cruzi</i>	25
II. Objetivos	29
III. Material y Métodos	30
III.1. Material biológico	30
III.2. Cultivo de parásitos	30
III.3. Obtención de extractos y sobrenadantes	31
III.3.1. Obtención de extractos de epimastigotes y tripomastigotes	31
III.3.2. Obtención de sobrenadantes de tripomastigotes y epimastigotes	32
III.4. Cuantificación de proteínas	32
III.5. Determinación de Actividad Proteolítica por el Método de Azocaseína (Método Colorimétrico)	32

III.6. Determinación de Actividad Proteolítica por el Método de SDS/PAGE con Gelatina como sustrato (Método Electroforético)	34
III.7. Enfoque isoelectrico de Proteasas de Extracto de Epimastigotes	35
III.8. Análisis Estadístico	36
IV. Resultados	37
IV.1. Determinación de Actividad Proteolítica en <i>T. cruzi</i> por un Método Colorimétrico	37
IV.1.1 Actividad Proteolítica en Extractos de <i>T. cruzi</i>	37
IV.1.2. Actividad proteolítica en cultivos y sobrenadantes de <i>T. cruzi</i>	41
IV.2. Determinación de Actividad Proteolítica en <i>T. cruzi</i> por un Método Electroforético	49
IV.2.1 Actividad Proteolítica en Extractos de <i>T. cruzi</i>	49
IV.2.2. Actividad Proteolítica en Sobrenadantes de <i>T. cruzi</i>	53
IV.2.3 Inhibición de Proteasas de <i>T. cruzi</i>	58
IV.3. Enfoque isoelectrico de proteasas de extracto de epimastigotes	64
V. Discusión	68
VI. Conclusiones	74
VII. Bibliografía	75
VIII. Apéndice	90

## RESUMEN.

Se sabe que las proteasas de los microorganismos juegan un papel importante durante la patogénesis de enfermedades parasitarias, especialmente las que están involucradas en el proceso de invasión a la célula huésped, además pueden ayudar al parásito para evadir la respuesta inmune. En este trabajo se presenta una caracterización de proteasas de dos estadios de *Trypanosoma cruzi*: tripomastigote y epimastigote y se compara la actividad proteolítica presente en sobrenadantes y extractos de ambos estadios por medio de dos métodos de análisis, uno colorimétrico y otro electroforético. En cuanto al método colorimétrico, en el que se utiliza azocaseína como sustrato, se observó que fue poco sensible para detectar actividad proteolítica en periodos menores a 24 h de incubación del sustrato con el extracto de epimastigotes o tripomastigotes, pero aun así se pudo determinar que la actividad proteolítica en extractos de epimastigotes era mayor que en los extractos de tripomastigotes. Este método también fue empleado en determinaciones con parásitos vivos y con el sobrenadante de los mismos. Se observó que la actividad proteolítica se incrementa con el tiempo de incubación de los parásitos, al menos hasta las 2h de incubación. La actividad proteolítica fue mayor cuando se analizaron los parásitos completos que cuando se hizo la determinación de actividad proteolítica en el sobrenadante únicamente, indicando que podrían existir proteasas asociadas a membrana. Cuatro bandas de actividad proteolítica fueron detectadas en geles de poliacrilamida co-polimerizados con gelatina como sustrato, de 60/45 kDa (en extractos y sobrenadantes de epimastigotes y tripomastigotes), 75/70 kDa (en los sobrenadantes de las dos fases y en extracto de epimastigotes), 112 kDa (sobrenadante y extracto de tripomastigotes) y una mayor a 112 kDa (extracto de tripomastigotes). La actividad de la mayoría de estas fue inhibida con E-64, leupeptina y fluoruro de metilfenil sulfonilo, indicando que pueden tratarse de proteasas de cisteína, otras fueron inhibidas parcialmente por 1,10-fenantrolina y ácido

etilendiamintetracético, por lo que éstas podrían ser metaloproteasas. Por otro lado, las proteasas de extracto de ambos estadios, resultaron más activas a pH's ácidos, mientras que las proteasas de sobrenadante tuvieron más actividad a pH neutro, de nuevo se observó que la actividad proteolítica en extracto de epimastigotes es superior a la de extracto de tripomastigotes, en tanto que para los sobrenadantes sucede al contrario. Al separar las proteasas de extracto de epimastigotes por enfoque isoeléctrico se logró observar que existen proteasas que precipitan a lo largo de un amplio espectro de pI, lo cual sugiere la existencia de isoformas de varias de las proteasas presentes en este extracto o bien la presencia de dos clases de proteasas con el mismo corrimiento electroforético. Algunas de las proteasas halladas podrían estar siendo empleadas por el parásito para facilitar el proceso de invasión al huésped, por lo que caracterizarlas resultaría una herramienta útil para tratar de inhibir la infección por *T. cruzi*.

## I. INTRODUCCION.

La enfermedad de Chagas o Tripanosomosis Americana, es una enfermedad cuyo agente causal es el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*. Fue descubierta en el año de 1909 por el Dr. Carlos Chagas (Chagas, 1909) en Minas Gerais (Brasil), en donde dirigía un programa de profilaxis contra paludismo. El hallazgo de la enfermedad se inició con el de su transmisor, un artrópodo hematófago perteneciente al género *Reduviidae* que llamó la atención de Chagas porque se alimentaba de sangre humana y porque infestaba las paredes de barro de las viviendas de aquella población. Al examinar el contenido intestinal de dichos artrópodos encontró una gran cantidad de flagelados móviles, que supuso fases intermedias de un parásito sanguíneo humano o de animales domésticos. Chagas envió los artrópodos encontrados al Dr. Oswaldo Cruz, quien los hizo picar a un mono, que en un lapso de 20 a 30 días, mostró grandes cantidades de tripanosomas en sangre periférica, de morfología distinta a la de cualquier otra especie del género *Trypanosoma* conocida hasta esa época. El flagelado así observado fue nombrado por Chagas como *Schizotrypanum cruzi*, en honor de su maestro Oswaldo Cruz. (Chagas, 1909)

La enfermedad de Chagas, constituye una amenaza permanente para aproximadamente la cuarta parte de la población de América Latina. Si bien la enfermedad se encuentra presente en casi toda América Central y del Sur (figura 1), sus manifestaciones y características epidemiológicas son altamente variables entre una y otra zona endémica. Existe una gran variabilidad en las tasas de prevalencia, formas de transmisión, características parasitarias, patología clínica, vectores y reservorios. La enfermedad de Chagas representa un problema de salud grave en 17 países latinoamericanos, con un total estimado de 100 millones de personas expuestas a la enfermedad y de 16 a 18 millones de personas infectadas (OMS, 1991)

En México, la Tripanosomosis Americana se conoce desde 1940 (Mazzotti, 1940), pero solo en los últimos 20 años ha crecido el interés en el estudio de la enfermedad





## I.1. LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN MEXICO.

Los primeros antecedentes sobre la enfermedad de Chagas en nuestro país se refieren a los vectores, los cuales fueron conocidos desde época de la colonia. Sahagún en su "Historia General de las Colonias de la Nueva España" les llamó "chinchas de Compostela" y compara su picadura con la de las arañas. Sin embargo, fue hasta este siglo en la década de los 20's cuando Hoffmann inicio estudios sobre triatomíneos y su relación con la enfermedad de Chagas. Fue hasta el año de 1940 cuando se presentaron los dos primeros casos parasitológicamente comprobados de infección por *T. cruzi* (Mazzotti, 1940). En 1949, Mazzotti y Dias dieron un informe sobre diferentes especies de reservorios infectados con *T. cruzi* y el de otros dos casos de infección en humanos en el estado de Yucatán. En 1958 Biagi y col., reportaron otro caso de esta enfermedad en el humano en el estado de México (citado en Tay y col., 1969). Entre 1961 y 1969 diferentes grupos encontraron localidades en las que se hallaron vertebrados no humanos como reservorios de *T. cruzi* y también casos de humanos infectados en los estados de Sonora, Guerrero, Michoacán, Jalisco y Zacatecas, los cuales para 1969 sumaron un total de 72 casos de humanos con enfermedad de Chagas reportados. En este año la existencia de la enfermedad de Chagas en México ya era evidente y se reportaron casos de enfermedad severa en el hombre e incluso muertes por esta causa (Tay y col. 1969). A pesar de todo lo anterior y conociendo que la fase crónica del padecimiento produce con frecuencia miocardiopatía, entre los años de 1944 a 1976 sólo se habían descrito tres casos de cardiopatía chagásica en la revista del Instituto Nacional de Cardiología (I.N.C., citado en Reyes y Marcuschamer, 1978). A partir de junio de 1977 se logró establecer, en el Departamento de Inmunología del I.N.C., un examen serológico muy sensible y, en los meses siguientes, cinco pacientes con miocardiopatía congestiva fueron identificados como casos probables de enfermedad de Chagas (Reyes y Marcuschamer, 1978). En el año de 1988 Salazar y col., en una revisión del tema refirieron los reportes hechos entre los años de 1949 y 1985, sobre casos crónicos detectados serológicamente (inmunofluorescencia indirecta, fijación de complemento y hemaglutinación

indirecta), llevados a cabo en los estados de Zacatecas, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca, en los cuales se describen 398 casos crónicos de esta enfermedad, lo que sugería una prevalencia del 6% en la población de estos estados. En la actualidad, el conocimiento de los vectores de *T. cruzi* es uno de los aspectos sobre los que más se ha trabajado, estas investigaciones han cubierto todo el territorio nacional en búsqueda de la presencia de triatomíneos infectados por *T. cruzi* (Tay y col., 1992).

En los últimos años se han descrito alrededor de 300 casos humanos de infección por *T. cruzi* en nuestro país. La mayoría de los casos han ocurrido en regiones que se encuentran localizadas en la vertiente del Océano Pacífico, desde el Estado de Sonora hasta el de Chiapas. Los estados de la República Mexicana en los que se han encontrado más casos humanos de la Enfermedad de Chagas diagnosticados etiológicamente o por el estudio de biopsias son los de Chiapas, Jalisco, Yucatán y Zacatecas entre otros (Reyes y col., 1983, Salazar y col. 1983, Velasco y Guzmán, 1986, Trujillo y Velasco, 1990, Trujillo y col. 1993, Lozano y col. 1993 y 1995). En algunas regiones del país como Oaxaca, Jalisco, Yucatán, Chiapas y Guerrero, se han reportado índices muy elevados de seropositivos, lo que señala la activa transmisión de la Tripanosomosis en dichas regiones (Tabla 1). Es importante señalar que los individuos infectados, que no presentan sintomatología de la enfermedad, son fuente de diseminación por mecanismos distintos a los naturales, como la donación de sangre (Goldsmith y col., 1978). Sin embargo, se continúa sin datos con respecto al conocimiento de transmisión por hemodonadores y reservorios de *T. cruzi* en la mayor parte del territorio nacional, debido a que no se han realizado estudios que permitan conocer la situación de este problema (Tay y col., 1992).

**TABLA 1. Relación por estados de casos humanos de infección por *Trypanosoma cruzi***

NO. DE CASOS	ESTADO	INVESTIGADORES	PERIODO
52	Oaxaca	Salazar y col. +, CNEP*, 30 74, 95, 80, 47, 90, Aceves y col. *, Biagi y Arce *, Goldsmith *, 73	1940-1988
47	Jalisco	CNEP^, Cuartero y col. ^, CNEP y Tallachee^, Velasco y col. ^, +, CNEP y Tallachee^, 92, 93, CNEP y Velasco ^, Departamento de Salud Pública*, 103, 99, 44	1965-1995
13	Yucatán	Palomo*, Zavala*, 107, Quimal y col. *, Barrera y col. *	1946-1988
12	Chiapas	Otega y col. *, 73	1976-1978
9	Guerrero	Rodríguez y col. *, 7, 74, Matadamas y col. *	1961-1990
6	Zacatecas	Cuarteto y col. ^, 91, Martínez y col. *, 103	
5	Michoacán	90, 73, 74, 103, Gutiérrez y Tay *	1966-1987
5	Tabasco	73, 74, 103	1978-1986
5	Veracruz	74	1989
3	Edo de México	Biagi y col. * 74	1958 y 1983
2	Morelos	González y col. *, 74	1962 y 1983
2	Nayarit	Pérez y Reyes *, 74	1964 y 1983
2	Sn Luis Potosí	103, 74	1983 y 1986
1	Sonora	64	1959
1	Campeche	74	1983
1	Tamaulipas	80	1988

CNEP: Comisión Nacional de Erradicación del Paludismo

+ Referido en Salazar y col., 1984

^ Referido en Trujillo y col., 1989

\* Referido en Tay y col., 1992

## 1.2. BIOLOGIA DE *T. cruzi*.

### 1.2.1. Clasificación taxonómica (tomado de OMS, 1986).

Reino:	Protista
Subreino:	Protozoa
Phylum:	Sarcomastigophora
Subphylum:	Mastigophora
Clase:	Zoomastigophorea
Orden:	Kinetoplastida
Suborden:	Trypanosomatida
Familia:	Trypanosomatidae
Género:	<i>Trypanosoma</i>
Subgénero:	<i>Schizotrypanum</i>
Especie:	<i>Trypanosoma (S.) cruzi</i>

### 1.2.2. Morfología de *Trypanosoma cruzi*.

*T. cruzi*, pertenece a la orden kinetoplastida, cuyos miembros se caracterizan por poseer un cinetoplasto. El cinetoplasto es un organelo localizado en la mitocondria de la célula que contiene una red fibrosa de DNA (Noble y col., 1989). La identificación de los estadios de desarrollo del parásito se basan en el criterio morfológico referente a la forma general de la célula, la posición que guarda el cinetoplasto con respecto al núcleo y la región de donde emerge el flagelo. De acuerdo a estos criterios se distinguen tres diferentes estadios:

*Tripomastigote*: tiene el cinetoplasto localizado en la parte posterior al núcleo, un flagelo y una membrana ondulante que se extiende a lo largo del organismo. Mide aproximadamente 20  $\mu\text{m}$  de largo y 2  $\mu\text{m}$  de ancho. En los hospederos mamíferos se encuentra en los tejidos localizado intracelularmente y en circulación se encuentran alojado de manera extracelular. En los hospederos invertebrados (chinche de la familia *Reduviidae*) siempre se encuentra extracelularmente y localizado en la parte posterior del intestino. Debido a que los investigadores asumen que la infección comienza en mamíferos y termina en los insectos, se nombra a los tripomastigotes hallados en los invertebrados tripomastigotes metacíclicos.

*Amastigote*: es la forma de replicación intracelular de *T. cruzi* en las células de mamíferos. Esta forma es circular, posee un flagelo corto y se multiplica por fisión binaria en un tiempo que oscila entre 7 y 14 horas.

*Epimastigote*: tiene el cinetoplasto localizado en la parte anterior al núcleo, es fusiforme, su flagelo es libre y mide aproximadamente de 20 a 40  $\mu\text{m}$  de longitud. Se encuentra localizado en el intestino medio de los hospederos invertebrados, donde se multiplica y mantiene la infección por un tiempo tan largo como el de la vida de los insectos (Pereira, 1990).

### 1.2.3. Ciclo biológico.

Una vez que los tripomastigotes metacíclicos (liberados con las deyecciones del triatoma al momento de alimentarse) penetran en la piel del vertebrado hospedero a través de punciones o abrasiones cutáneas, se introducen en las células de tejido laxo vecino al sitio de la penetración y adquieren la forma de amastigote. Los amastigotes se multiplican por fisión binaria, repletan la célula, que termina por romperse, y los parásitos salen a circulación como tripomastigotes y se diseminan por todo el organismo; estos tripomastigotes penetran a nuevas células y se transforman a amastigotes, continuando este proceso, que otra vez finalizará con la liberación de nuevos tripomastigotes que repetirán el ciclo de infección. El ciclo biológico se completa cuando los tripomastigotes son ingeridos por los triatomas hematófagos (Athias y Neghme, 1984), figura 2.

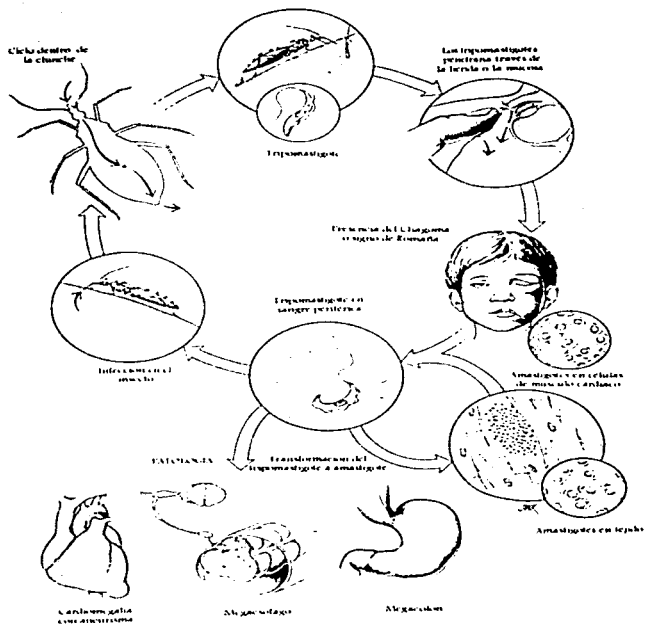


FIGURA 2. Ciclo de vida de *T. cruzi*. (Tomado de Katz, 1988).

### 1.3. ALGUNAS MOLÉCULAS INVOLUCRADAS EN LA INTERACCIÓN CÉLULA HUESPED-*Trypanosoma cruzi*

Se sabe que existen moléculas de superficie en muchos microorganismos patógenos que juegan un papel importante en la interacción célula huésped-parásito. Si bien es cierto que estas moléculas se comportan como potentes inmunógenos durante la infección a mamíferos y que pueden ser empleadas en ensayos inmunológicos como herramientas para pruebas de diagnóstico, no todas las moléculas presentes en forma mayoritaria generan una fuerte respuesta inmune humoral y celular, y por ello, su uso para protección (vacunas) no resulta adecuado. En estos casos se dirige el interés de tratamiento y/o profilaxis de estas enfermedades hacia moléculas que no se encuentren tan ampliamente expresadas como las anteriores, y que, ya sea por su importancia en el metabolismo del parásito o bien por desempeñar funciones importantes en la interacción huésped-parásito, el bloqueo de su actividad podría detener el progreso de la enfermedad o prevenirla (Pereira, 1990).

Algunas moléculas de superficie y de secreción han sido descritas en *T. cruzi*, como la gp 72, que está presente en la superficie de epimastigotes y tripomastigotes provenientes de medio de cultivo. Esta molécula fue identificada y purificada por medio del anticuerpo monoclonal WIC29 26, y se encontró que éste era útil para el estudio de variaciones genéticas en la bioquímica, fisiología y patogenicidad de *T. cruzi* debidas a las diferencias en la superficie de una cepa a otra. También, se sabe que la gp 71 está involucrada en la diferenciación de epimastigotes a tripomastigotes en el vector. Además, se sabe que, durante la activación del complemento en el huésped, la gp 72 actúa como el principal aceptor de C3 (Joiner y col., 1985).

Otra molécula bien estudiada es la gp 85 presente en la superficie de tripomastigotes pero no de amastigotes ni epimastigotes. El papel de esta glicoproteína no es bien conocido pero, algunos estudios sugieren que es necesaria durante el proceso de invasión para que la interacción huésped-parásito sea eficiente. Por coincidencia, se ha encontrado que existe un supuesto receptor para gp85 en la membrana de tripomastigotes, el cual actúa

como receptor para fibronectina, mediando de esta manera la asociación de *T. cruzi* a las células huésped, ya que si se bloquea este receptor, se inhibe la infección por *T. cruzi* "in vitro" (Villarta y col 1990)

Al respecto del contacto mediado por receptores en la superficie de la célula huésped para *T. cruzi*, es posible que enzimas tales como las proteasas (Takle y Snary, 1993) y glicosidasas (Pereira, 1983 y Harth y col 1987) puedan jugar un papel importante, ya que pueden facilitar la entrada del parásito al huésped. Muchas proteasas (algunas estadio específicas) con afinidad para una amplia gama de sustratos ya han sido identificadas. Sin embargo, no hay evidencia de que las proteínas del huésped sean digeridas durante el proceso de penetración parasitaria y, por lo tanto, es posible que, si estas enzimas se encuentran en la superficie del parásito, usen su sitio activo para enlazarse a la superficie de la célula huésped (Takle y Snary, 1993)

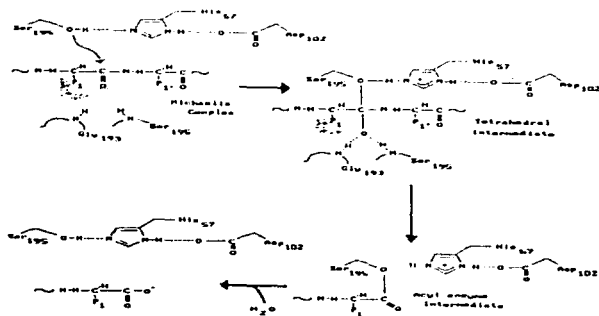
#### 1.4. PROTEASAS.

Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos. Las proteasas que degradan el extremo terminal de un polipéptido son llamadas peptidasas o exopeptidasas, mientras que, aquellas que rompen un enlace peptídico interno son llamadas endopeptidasas o proteinasas (McKerrow, 1989). Tales enzimas se encuentran en muchas especies, que van desde los virus hasta el hombre. Catalizan además un amplio espectro de importantes reacciones biológicas, incluyendo el procesamiento de prohormonas, la coagulación sanguínea, la fibrinólisis, el metabolismo proteico, las reacciones inmunes y la remodelación tisular. Por otra parte, no es sorprendente que las proteasas jueguen un papel importante en la patogénesis de las parasitosis. Las proteasas de parásitos facilitan la invasión a los tejidos del hospedero, permiten al parásito la digestión de proteínas del hospedero y les ayudan a evadir la respuesta inmune. Debido a lo anterior, las proteasas provenientes de parásitos pueden ser usadas como blanco de la inmunoterapia y de agentes quimioterapéuticos específicos. En algunos casos se han empleado como indicadores en la detección de enfermedades parasitarias en suero de pacientes infectados.



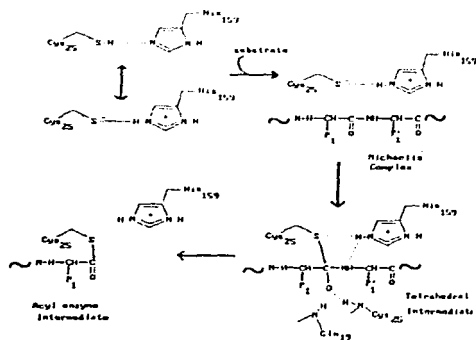
Las proteasas pueden clasificarse con base a los grupos funcionales encontrados en su sitio activo, en cuatro grupos principales: proteasas de serina, metaloproteasas, proteasas de tiol (cisteína) y proteasas de ácido aspártico (McKerrow, 1989).

La familia de proteasas mejor caracterizada y con mayor versatilidad fisiológica es la de las proteasas de serina presentes en mamíferos, como ejemplos, tenemos a la tripsina pancreática, la quimiotripsina, la elastasa y la kaliceína. Su sitio activo está conformado por la triada Asp 102, His 57, Ser 195 (esta numeración corresponde a la quimiotripsina). La catálisis se lleva a cabo vía un estado de transición tetraédrico intermediario, tanto durante el proceso de formación del intermediario covalente de enzima acilada, como en el proceso de desacilación (Referido en Beynon y Bond). A continuación se muestra el mecanismo general de reacción para las proteasas de serina.



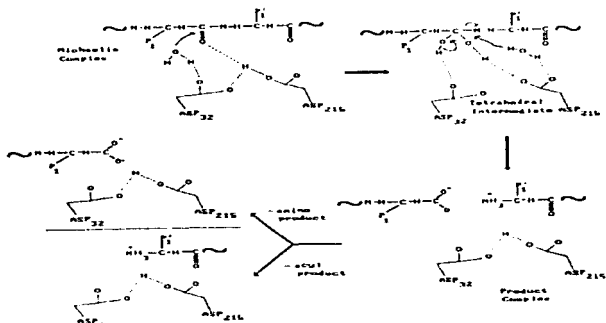
**MECANISMO DE REACCION PARA PROTEASAS DE SERINA** (Tomado de Beynon & Bond, 1989)

Las proteasas de cisteína incluyen a muchas catepsinas lisosomales de mamíferos, proteasas activadas por calcio en el citosol (calpainas) y proteasas de plantas como la papaina y actinidina. El principal residuo aminoacídico que interviene en la catálisis es la cisteína, que actúa de manera similar a la serina 195 en la quimi tripsina. La catálisis procede via un intermediario tioéster y es facilitado por las cadenas de la histidina 159 adyacente y por el ácido aspártico 158 (Referido en Beynon y Bond, 1990). A continuación se muestra el mecanismo general de reacción para las proteasas de cisteína.



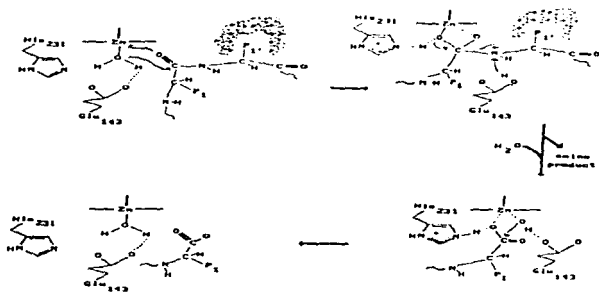
**MECANISMO DE REACCIÓN PARA PROTEASAS DE CISTEÍNA** (Tomado de Beynon & Bond, 1989)

Las proteasas de aspártico incluyen a la penicillopepsina bacteriana, la cual ha servido como modelo. La característica del sitio activo es que posee residuos de ácido aspártico 33 y 213 (esta numeración corresponde a la penicillopepsina), los cuales geoméricamente se encuentran muy próximos el uno del otro. En el rango de pH enzimáticamente óptimo 2-3, uno de estos aminoácidos se encuentra ionizado y el otro desionizado (Referido en Beynon y Bond, 1990). A continuación se muestra el mecanismo general de reacción para las proteasas de ácido aspártico.



**MECANISMO DE REACCIÓN PARA PROTEASAS DE ÁCIDO ASPÁRTICO** (Tomado de Beynon & Bond, 1989)

Las metalo proteasas, como las carboxipeptidasas A y B son exopeptidasas homólogas de estructura y sitio activo similares. La carboxipeptidasa A, tiene mayor afinidad por la cadena aromática C-terminal y las cadenas alifáticas de naturaleza hidrofóbica, mientras que la acción de la carboxipeptidasa B está dirigida sobre los residuos de arginina y lisina. El sitio activo de las metalo proteasas incluye al zinc, con dos de sus tres posiciones de coordinación ocupados por dos restos de ácido glutámico y uno de histidina. Otra cadena de ácido glutámico actúa como nucleófilo directamente o con la participación de una molécula de agua (Referido en Beynon y Bond, 1990). A continuación se muestra el mecanismo general de reacción para las metaloproteasas



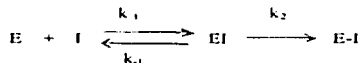
*MECANISMO DE REACCIÓN PARA METALOPROTEASAS (Tomado de Beynon & Bond, 1989)*

### I.4.1 Inhibidores de Proteasas.

Cualquier compuesto que provoque una disminución sobre la actividad catalítica de una enzima es, en principio, un inhibidor enzimático. Esta definición puede extenderse a aquellos sustratos que compiten por un mismo sitio activo, es decir, si dos sustratos son incubados con una proteasa cada uno disminuye la velocidad efectiva de hidrólisis del otro sustrato y entonces parece que inhibe la enzima. Los inhibidores de proteasas son frecuentemente agrupados con base en su mecanismo de acción, su origen o su estructura. Se han designado tres clases de inhibidores: aquellos que actúan sobre más de una clase de proteasa, los que son específicos para una sola clase y los que son selectivos de una sola proteasa (Salvensen y Nagase, 1989).

La mayoría de los inhibidores de proteasas actúan directamente sobre el sitio activo, los inhibidores sintéticos o naturales mimetizan al sustrato, por lo tanto, compiten con el sustrato y su unión es muy estrecha. Muchos inhibidores de proteasas forman complejos irreversibles con ellas, por lo cual provocan que el número de sitios activos disponibles para el sustrato disminuyan.

El mecanismo más general de inhibición para las proteasas puede describirse mediante una reacción bimolecular entre la proteasa (E) y el inhibidor (I) que resulta en la formación de una forma de la enzima unida al inhibidor (EI, esquema I). Si el inhibidor es irreversible este complejo dará lugar a una enzima modificada inactiva E-I que presenta un enlace covalente con el inhibidor, mismo que permanece con frecuencia aún después de desnaturalizar a la enzima. Si el último paso no ocurre el inhibidor se clasifica como reversible (Salvensen y Nagase, 1989).



Las velocidades de reacción son descritas por las constantes de velocidad  $k_1$  (bimolecular, segundo orden) y  $k_1$  y  $k_2$  (unimolecular, primer orden).

#### 1.4.1.1 Inhibidores No-Específicos

*$\alpha$ -Macroglobulinas.* Esta clase de inhibidores se refiere a los que no discriminan entre las diferentes clases de proteasas y el ejemplo más clásico, que ilustra este tipo de inhibidores, es la  $\alpha_2$ -macroglobulina ( $\alpha_2M$ ), que es una proteína de alto peso molecular presente en el plasma humano que inhibe a la mayoría de las proteasas. La manera en que actúa es alterando la conformación de la enzima disminuyendo, de esta manera, la actividad proteolítica. La unión de la  $\alpha_2M$  a la proteasa es irreversible aunque la inhibición no se manifiesta cuando la proteasa actúa sobre sustratos pequeños (peptidos), se observa una inhibición total cuando se trata de sustratos grandes (proteínas de más de 30kDa).

*Aldehidos peptídicos.* Estos inhibidores, formados por di-, tri- o tetrapeptidos, contienen un grupo aldehído en vez del carboxilo en la posición  $\alpha$ . Este tipo de inhibidores son reversibles y se les refiere frecuentemente como "análogos del estado de transición", pues actúan mimetizando el intermediario tetraédrico formado durante la hidrólisis del enlace peptídico.

*Peptidilclorometilcetonas.* Estos inhibidores actúan de manera irreversible uniéndose primero en la misma forma que el sustrato a la proteasa y dando lugar a la alquilación de la histidina presente en el sitio activo de las proteasas de serina, gracias al grupo clorometil presente en el inhibidor. Las clorometilcetonas pueden inactivar a las proteasas de cisteína empleando un mecanismo similar al empleado para inhibir a las proteasas de serina, por lo cual su uso no es recomendado para el análisis de mecanismos de catálisis.

*Quelantes de metales:* Estos inhibidores pueden actuar de dos maneras, por una parte están actuando inactivando a las proteasas dependientes de metales desestabilizando a aquellas proteasas que son estabilizadas en presencia de calcio. Por otro lado, hay proteasas dependientes de zinc, que son inhibidas por este catión en altas concentraciones, por lo que el uso de quelantes restablece la actividad proteolítica.

#### 1.4.1.2 Inhibidores Especificos

##### *Inhibidores que actúan sobre proteasas de serina.*

*Organofosforados.* Uno de los compuestos organofosforados más ampliamente usado es el diisopropilfosfluoridato (DFP), que es un compuesto tóxico, ya que inactiva la acetilesterasa lo que provoca la pérdida de su carácter inhibitorio sobre proteasas de serina. En general, DFP actúa mejor sobre las proteasas con homología a la tripsina que con las de quimi tripsina

*Sulfonilfluoruros.* Un inhibidor irreversible de proteasas de serina ampliamente conocido es el fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF), que actúa de manera relativamente débil, sobre tales proteasas. Este inhibidor puede además actuar sobre algunas proteasas de cisteína.

### *Inhibidores que actúan sobre proteasas de cisteína.*

*Peptidildiazometanos.* Este es un grupo de oligopéptidos en los que el OH del carboxilo terminal es reemplazado por un grupo diazometil CH-N-N. La inhibición es de tipo irreversible y procede vía un intermediario tiohemiacetal, dando lugar a un sitio activo alquilado. Estos compuestos son totalmente específicos para proteasas de cisteína, a excepción de Z-Phe-Arg-CHN<sub>2</sub>, que puede inhibir kalieireina

*Peptidepóxidos.* Este es un grupo de inhibidores que actúan de manera irreversible sobre el sitio activo de proteasas de cisteína, alquilando el sitio activo vía el grupo *trans* epóxido. El más representativo de estos compuestos es el E-64 [N-(L-3-*trans*-carboxioxiran-2-carbonil)-L-leucil]-amido(4-guanidino)butano]. Este compuesto es completamente específico para proteasas de cisteína y es relativamente no-toxico

*Inhibidores que actúan sobre metalo-proteasas.* La mayoría de los inhibidores específicos para este tipo de enzimas, se designan basándose en la capacidad para enlazarse a átomos de zinc, por lo tanto los inhibidores sintéticos de esta clase, están cargados negativamente y poseen otros grupos diseñados específicamente para interactuar con un grupo de proteasas particular.

*Inhibidores que actúan sobre proteasas de ácido aspártico.* Las proteasas de esta clase, mejor caracterizadas son la pepsina, quimi tripsina, catepsina D y la renina, y todas son inhibidas por pepstatina A, un compuesto parecido a un pentapéptido que es secretado por las especies de *Streptomyces*, el cual posee dos residuos de aminoácidos β (Salvensen y Nagase, 1989). En la tabla II se muestran los inhibidores de bajo peso molecular y su modo de acción.



**TABLA II.** Inhibidores de proteasas de bajo peso molecular. *Tomado de Beynon-Bowd (1989).*

NOOMBRE	CLASE	MODO DE ACCION	COMENTARIOS
Amastatina	Metalo	Rev	Inhibidor de aminopeptidasas
Autipaina	Serina/cisteina	Rev	Proteasas similares a tripsina y de cisteina
APMSF	Serina	Irr	Inestable-preparar en fresco
Bentatina	Metalo	Rev	Aminopeptidasas
Onimostatin	Serina/cisteina	Rev	Proteasas de cisteina y similares a quimiotripsina
3,4-DLCl	Serina	Irr	Inhibidor fuerte de proteasas de serina
DPP	Serina	Irr	Muy toxico; requiere de manejo especial
Diprotin A	Metalo	Rev	Inhibidor de aminopeptidasas
Diprotin B	Metalo	Rev	Inhibidor de aminopeptidasas
E-64	Cisteina	Irr	Muy especifico
EDTA	Metalo	Rev	Quelante
Elastinal	Serina	Rev	Proteasas de serina similares a elastasa
Ac. indaco, Nucco/	Cisteina	Irr	No especifico-puede comprometer otros sistemas
Leupeptin	Serina/cisteina	Rev	Muchas proteasas de cisteina y similares a tripsina
Peptastatin	Aspartico	Rev	De union debil-recomendado
1,10-Fenantrolina	Metalo	Rev	Quelante-recomendado
Fosforamidon	Metalo	Rev	No inhibe todas las metalo-endopeptidasas
PMSI	Serina	Irr	Muy lento que el DLCl
Ti-CK	Serina	Irr	Proteasas de serina y similares a tripsina
TPCK	Serina	Irr	Proteasas de serina y similares a quimiotripsina
Z-Ala-Ala-CHN <sub>2</sub>	Cisteina	Irr	Cisteina II.L. y papaina

## 1.5. PROTEASAS EN PARÁSITOS.

Muchas proteasas han sido estudiadas en una gran variedad de parásitos. Se han llevado a cabo estudios que van, desde aquellos que reportan si los diferentes estadios de los parásitos presentan o no este tipo de enzimas, de que tipo son estas proteasas, donde se localizan celularmente y en que eventos proteolíticos podrían estar interviniendo, hasta aquellos en los que se investiga si están involucradas en la interacción huésped-parásito.

A la fecha, se tiene conocimiento del papel que juegan algunas proteasas en muchos parásitos; por ejemplo, se ha encontrado que el principal antígeno de superficie de *L. major* es la gp63, una proteasa activa que se encuentra anclada a la superficie de la membrana del parásito a través de un complejo glicolipídico (Bordier, 1987, Chang, 1986). Se ha sugerido que un posible papel de esta proteasa podría ser el de romper factores del complemento como C3b a C3bi permitiendo además, que el parásito se una a la superficie del macrófago via C3bi (Bordier, 1987). Por su parte el trofozoito de *P. falciparum* posee una proteasa similar a la catepsina I, que hidroliza la molécula de hemoglobina y la usa como fuente de nutrición cuando se encuentra dentro del eritrocito, si se usa un inhibidor irreversible de esta proteasa se origina la muerte del parásito (Rosenthal y col., 1988). Keene y col. (1986) han demostrado que una proteasa, purificada de trofozoitos de *E. histolytica* y que presenta homología con la catepsina B, puede producir el efecto citopático asociado a la virulencia de *E. histolytica*. *Leishmania mexicana* posee una proteinasa de cisteína, proveniente del estadio de amastigote, que es responsable de la activación de ésteres aminoacídicos en el parásito, además, probablemente el parásito requiera esta proteasa para sobrevivir en el macrófago. En *Trichomonas vaginalis* se ha descrito otra proteinasa de cisteína que está involucrada en el proceso de citoadherencia y citotoxicidad al huésped. Por su parte *Giardia lamblia* posee una proteasa de origen lisosomal que hidroliza inmunoglobulina humana (North y col., 1990).

En cuanto a la relación que guardan las proteasas con la respuesta inmune, se conoce que la schistosomula de *S. mansoni* libera una proteasa que puede incrementar la actividad de eosinófilos y la síntesis de IgE y, por otra parte, rompe el enlace parásito-IgG (Verwaerde y col., 1988). Otro aspecto importante de las proteasas y la respuesta inmune es que la proteasa de schistosoma, la proteasa de cisteína de *E. histolytica* y la metaloproteasa de *A. caninum* pueden ser empleadas para diferenciar huéspedes infectados de aquellos que no lo están (Toy y col., 1987).

## 1.6 PROTEASAS EN *Trypanosoma cruzi*.

Actualmente el estudio de proteasas en *T. cruzi* es llevada a cabo por varios grupos en el mundo. Tales estudios incluyen aquellos que han reportado la presencia de estas enzimas en los diferentes estadios de parásito con el fin de encontrar similitudes y diferencia entre cada uno. Otros grupos las han estudiado como antígenos para diagnóstico, y otros más, han llegado a caracterizar perfectamente a la proteasa que presenta la mayor actividad proteolítica en *T. cruzi*, la "cruzaina o cruzipaina" (anteriormente gp57/51). Algunos estudios están principalmente dirigidos hacia la búsqueda de un inhibidor específico de tal enzima, que pueda ser utilizado en el tratamiento y/o profilaxis de la enfermedad de Chagas.

La actividad proteolítica en extractos crudos de *T. cruzi* fue determinada inicialmente en 1958 (referido en Bongertz y Hungerer, 1978), pero por mucho tiempo no se llevaron a cabo más estudios al respecto. Debido a que *T. cruzi* se multiplica intracelularmente y penetra activamente al huésped (Meyer y col. 1958, Dvorak y Hyde 1973) se pensó que una enzima proteolítica podría ayudar al parásito a penetrar a la célula y a migrar de un tejido a otro en el huésped (Brand 1973). En 1978, tomando en cuenta lo anterior, Bongertz y Hungerer encontraron una enzima de aproximadamente 200 kDa proveniente de extractos de *T. cruzi* que era específica para enlaces peptídicos y que poseía grupos tiol activos.

Por otra parte, la invasión de *T. cruzi* a células de mamífero puede ser facilitada por el mecanismo de proteólisis implicado en este proceso (Piras y col. 1985). Además se encontró que la adición de  $\alpha$ -2-macroglobulina al medio actuaba como inhibidor de proteinasas e inhibía marcadamente la infección a macrófagos y fibroblastos (Araújo-Jorge y col. 1986). Así mismo en 1990 Souto-Padrón y col. dan a conocer que la proteasa de cisteína que se localiza en los lisosomas de epimastigotes y que además se encuentra expresada en la superficie de los mismos y en la forma transicional de amastigote tripomastigote y que la adición de anticuerpos anti-proteinasas al medio, inhibía significativamente la ingestión del parásito por el macrófago.

En 1985 Scharfstein y col emplean un antígeno, denominado gp25, para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas el cual, más tarde, resultó ser un producto de degradación del antígeno gp57/51, que es una glicoproteína expresada por los epimastigotes y tripomastigotes sanguíneos y que fue purificada y caracterizada por el mismo grupo (Scharfstein y col., 1986). Esta última resultó ser una molécula altamente inmunogénica que podía también ser empleada en las pruebas serológicas de la enfermedad de Chagas. El hallazgo de la degradación de gp57/51 fue apoyado más tarde por Hellman y col. en 1991, quienes encontraron que la principal proteínasa de epimastigotes catalizaba su propia lisis. Otros estudios demostraron que se trataba de una proteasa de cisteína debido a que su actividad era inhibida por E-64 (Murta y col., 1990). Además se había encontrado que esta proteasa de cisteína, ahora llamada cruzipaina (Cazzulo y col., 1990a), además de autodegradarse, degrada IgG humana por medio de la hidrólisis del Fc y dando lugar a pequeños péptidos (Bonetempi y Cazzulo, 1990). También se sabía ya que esta proteasa es clave en el metabolismo del parásito (Bonetempi y col., 1984, 1989) y es blanco de la respuesta inmune del huésped (Murta y col., 1990). Estudios llevados a cabo en la década de los 80's demuestran que la proteasa de cisteína purificada de epimastigotes se encuentra localizada lisosomalmente (Bonetempi y col., 1989), que es una glicoproteína monomérica de aproximadamente 60 kDa (Scharfstein y col., 1986) y que mostraba homología en su extremo amino terminal con la papaina y catepsina L (Cazzulo y col., 1989).

En 1990 Campetella y col. encontraron que los niveles de actividad proteolítica en amastigotes y tripomastigotes son 10 veces menores que los hallados en epimastigotes, y de nuevo comprobaron que la mayor actividad proteolítica, ahora en los tres estadios, está dada por una proteínasa de aproximadamente 60kDa.

También en el año de 1990 Greig y Ashall detectaron al menos cinco peptidasas, en extractos de epimastigotes cepa Y, cuatro de las cuales eran proteasas de cisteína con un pH óptimo ácido. Para 1992 Meirelles y col. demostraron que los inhibidores específicos de proteinasas de cisteína, inhiben el desarrollo intracelular de *T. cruzi in vitro*. En el año de

1993 Harth y col. probaron inhibidores de proteasas pegados a péptidos que le permiten al inhibidor penetrar a las células infectadas y encontraron que estos péptidos inhiben la replicación intracelular de *T. cruzi* y con ello se inhibe también la transmisión del parásito

En los últimos años el equipo de Scharfstein ( Lima y col , 1994) ha identificado nuevas isoformas de la proteasa de cisteína de *T. cruzi* y en colaboración con otros grupos se continua investigando inhibidores específicos de esta importante enzima (McKerrow y col., 1995) En 1996, Lowndes y col. estudiaron las metaloproteasas de diferentes cepas de *T. cruzi* y hallaron que la expresión de estas enzimas se presenta de manera heterogenea entre las cepas que ellos analizaron, en contraste con las expresión de proteasas de cisteína que se encuentra muy conservada Además, se caracterizó a todas estas metaloproteasas como proteasas asociadas a membrana. A la fecha, se ha purificado una de las metaloproteasas que se expresa constitutivamente en los tres estadios de *T. cruzi* (Sales y col 1996) Por su parte, Serveau y col en 1996 probaron sustratos específicos para la cruzipaina y encontraron que ciertos derivados de cistatina son efectivos, ya que fueron capaces de discriminar entre las proteasas del huésped y aquellas específicas del parásito. Interesantemente, Monteiro y col (1996) han logrado clonar un inhibidor endogeno de *T. cruzi* que regula la actividad proteolítica intracelular, dando así una nueva herramienta más para el diseño de inhibidores contra la cruzipaina En cuanto al papel putativo de las proteasas de *T. cruzi* durante la interacción con el tejido blanco, Andrade y col (1996) encontraron que el tratamiento a células de tejido cardiaco con 1,10-fenantrolina inhibe la infección por *T. cruzi* hasta en un 60 % Otra proteasa estudiada en *T. cruzi* es la proteasa alcalina de 120 kDa ( proteinasa Tc 120), que ya se sabía que se expresaba en todos los estadios del parásito y que muestra un amplio espectro de actividad proteolítica (Santana y col. 1992) Esta enzima parece estar involucrada en la liberación de  $Ca^{2+}$  como factor importante en la invasión a la célula huésped (Burleigh y Andrews, 1995) Al analizar la respuesta inmune humoral generada por esta proteasa y otra de 30 kDa cuya activación es dependiente de ATP, hubo reconocimiento de ambas proteasas por el 95 % de los sueros provenientes de pacientes con enfermedad de Chagas crónica, en tanto que los sueros de pacientes leishmaniácicos viscerales y de individuos sanos no las reconocieron, por lo que,

la respuesta inmune generada contra estas enzimas podría ser un mecanismo eficiente para prevenir la invasión por *T. cruzi* al huésped (Fernandes y col. 1996). La proteasa de 30 kDa dependiente de ATP ha sido clonada y secuenciada indicando y se ha deducido que se trataba de una proteasa de cisteína homologa a la catepsina B (la primera descrita en *T. cruzi*). Su posible papel en la diferenciación del parásito y su participación en el catabolismo proteico de la forma intracelular del parásito están siendo investigadas actualmente (Nóbrega y col. 1996). Por último, Santana y col (1996) también han encontrado una proteasa de 80 kDa que es secretada por *T. cruzi* (proteína Tc 80) y cuyo sustrato específico es colagenasa, lo cual, sugiere que Tc 80 podría facilitar la invasión a la célula huésped por *T. cruzi* por medio de la degradación de colagenas presentes en la matriz extracelular; por lo anterior, esta también podría ser un buen blanco para quimioterapia (Santana y col. 1996).

## **II. OBJETIVOS.**

### **Objetivo General.**

- Estudiar y caracterizar proteasas constitutivas y de secreción de *Trypanosoma cruzi* de la cepa Querétaro

### **Objetivos Particulares.**

- Comparar dos métodos para el estudio de proteasas de *T. cruzi*, uno colorimétrico y otro electroforético.
- Caracterizar y comparar las proteasas en sobrenadantes y extractos tanto de epimastigotes como de tripomastigotes

### III. MATERIAL Y MÉTODOS.

#### III. 1. Material Biológico.

Se trabajó con tripomastigotes y epimastigotes del aislado mexicano de *T. cruzi* Querétaro, obtenido a partir de *Triatoma barberi* muestreado en el estado de Querétaro. La cepa es mantenida en ratones.

#### III.2. Cultivo de Parásitos.

- Cultivo de epimastigotes. Los parásitos se cultivaron a 28°C en medio LIT (Liver Infusion Tryptose), suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (GIBCO) inactivado a 56°C durante 30 minutos y 25 µg/ml de hemina (SIGMA) a pH 7.2. Los parásitos se incubaron en frascos Erlenmeyer de 250 ml o en botellas de plástico de 25 cm<sup>2</sup> y volumen de 50 ml, conteniendo 5 ml de medio LIT y un total aproximado de 5X10<sup>6</sup> parásitos por ml. Se siguieron subcultivando cada semana tomándose 1ml del cultivo original más 5ml de LIT fresco.

- Cultivo de tripomastigotes. Se siguió el método citado en Andrews y Colli, 1982 con las siguientes modificaciones.

Se utilizaron monocapas de células Vero cultivadas en D-MEM ( Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO), suplementado con 10% de SFB (GIBCO) inactivado, 1% de vitaminas 100x (GIBCO), 1% de aminoácidos no-esenciales 10mM (GIBCO), 1% de piruvato de sodio 100 mM (SIGMA), 1% de L-glutamina 2mM (GIBCO) y 1% de penicilina-estreptomicina (10,000 unidades-10,000 unidades). Al momento de infectar las células con los tripomastigotes sanguíneos se cambió el medio al 10% por medio al 5% de SFB y se agregó medio nuevo aproximadamente cada tercer día.

La sangre de ratones BALB/c infectados se diluyó 1:2 en solución de fosfatos glucosada (PSG) y se llevó a cabo la separación de los tripomastigotes en un gradiente de Ficoll-Paque (Pharmacia) centrifugando a 400g durante 45 minutos a 4°C. La capa de



mononucleares que contenía a los parásitos se separó y se agregó al cultivo de células Vero en botellas de 25 cm<sup>2</sup> de plástico (COSTAR) que estaban en D-MEM al 5% y se dejaron 48 horas a 37°C (5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad) como tiempo de infección y entonces se cambió el medio de cultivo al mismo porcentaje cada vez que fuera necesario

Para expandir los cultivos infectados se retiró el sobrenadante de los cultivos celulares infectados con *T. cruzi* y las células se despegaron usando 1.5 ml de EDTA 5 mM (para cajas de 25 cm<sup>2</sup> y 3 ml para las de 75 cm<sup>2</sup>) por 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se adicionó 500 µl de tripsina que tenía una concentración de 1mg/ml (SIGMA) para las cajas de 25 cm<sup>2</sup> (1 ml para las de 75 cm<sup>2</sup>) durante aproximadamente en 1 minuto. Las células se colocaron en 2 o 3 cajas aparte y se puso medio al 5% de SFB. La máxima cantidad de parásitos se obtuvo aproximadamente a los 15 días postinfección (aproximadamente 2X10<sup>6</sup> parásitos/ml). Los parásitos se retiraron cada tercer día y se agregó medio nuevo.

Los parásitos fueron purificados de los cultivos infectados separando el sobrenadante y centrifugando primero a 400g durante 10 min a 4°C de donde se separaron las células Vero y el sobrenadante se volvió a centrifugar a 2,000g durante 20 min a 4°C de donde se obtuvo un botón de parásitos que se usó para obtener extracto o bien para cultivarlos y obtener sobrenadante.

### III.3. Obtención de Extractos y Sobrenadantes de *T. cruzi*.

#### III 3.1. Obtención de extractos de tripomastigotes y epimastigotes

El botón de tripomastigotes se obtuvo como se indicó en la sección anterior y el de epimastigotes se obtuvo centrifugando el cultivo a 1,500g durante 10 min a 4°C, en ambos casos se lavó dos veces con PBS y se resuspendió en una solución de Tris-HCl 10mM pH 8.2 en una relación de aproximadamente 1X10<sup>6</sup> parásitos por cada 0.5 ml de solución.

La suspensión anterior se sonicó con una intensidad de 60 W por 5 veces en periodos de 2 minutos. Posteriormente se centrifugó a 10,000g durante 30 min a 4°C Finalmente, el sobrenadante se separó y se hizo la determinación de proteínas totales por el método de Bradford (ver III.4)

El extracto también se obtuvo en algunas ocasiones a partir de parásitos que se habían mantenido previamente en congelación

### III.3.2. Obtención de Sobrenadantes de tripomastigotes y epimastigotes

El botón de parásitos obtenido como se indicó anteriormente, se lavó dos veces con D-MEM (para el caso de tripomastigotes) ó bien con LIT (para epimastigotes) complementado con todo excepto el SFB. Después se resuspendió en el mismo medio empleado en los lavados, en una relación de  $4 \times 10^7$  parásitos por ml de medio y se incubó durante dos horas a 37°C. Al término de la incubación se centrifugó de nuevo a 2,000 g durante 3 minutos, y el sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0.22  $\mu$  (MILLIPORE) y se usó inmediatamente

Es importante señalar que en este trabajo no se analizaron las proteasas del estadio de amastigote pues es difícil obtenerlos de manera pura y en una cantidad suficiente para la obtención de extractos y sobrenadantes

### III.4. Cuantificación de Proteínas

La determinación de la concentración de proteínas del extracto se llevó a cabo por el método de Bradford (BIO-RAD). Se preparó una curva patrón con una solución estándar de Albumina Sérica Bovina (BSA) con concentraciones de 5,10,15,20 y 25  $\mu$ g/ml en PBS. La lectura se realizó a 595 nm empleando como blanco PBS. Los extractos se leyeron a la misma longitud de onda habiendo sido previamente diluidos 1:100 y 1:50, el resultado se interpoló en la curva patrón y la concentración final de proteínas se obtuvo tomando en cuenta el factor de dilución

### III.5. Determinación de Actividad Proteolítica por el Método de Azocaseína (Método Colorimétrico).

Con este método se midió la actividad proteolítica en extractos, parásitos completos y sobrenadantes de *T. cruzi* empleando como sustrato azocaseína (Eiges y col 1986) Para el estudio en extractos se prepararon tubos de reacción que contenían ~~amortiguador~~ de acetatos con ó sin L-cisteína y EDTA, el sustrato (azocaseína al 2% p/v) y 25, 50, 75, 100 y 200 µg de proteína total de extracto Para ello se necesitó preparar

-Una solución de amortiguador de acetatos pH 5.5, a esta solución la nombramos amortiguador sin estabilizador A otra solución igual que la anterior se le agregó 0.38mg/ml de EDTA (SIGMA) y 4.84 mg/ml de L-cisteína (SIGMA), a esta solución se le llamó amortiguador con estabilizador

- Solución de azocaseína (SIGMA) al 2% (p/v) disolviendo en 2/3 del volumen en regulador sin activar y 1/3 parte del volumen en agua bidestilada estéril Se prosiguió de la siguiente manera:

Se colocó en cada tubo de reacción un volumen de 0.75 ml del amortiguador respectivo que ya llevaba la cantidad de proteína del extracto correspondiente Los tubos fueron pre-incubados durante 10 min a 37°C y entonces se adicionó a cada tubo 0.250 ml de la solución de azocaseína al 2%, tras lo cual se incubó a 37°C durante el intervalo de tiempo deseado (12, 24 ó 48 horas) Al final de este tiempo se detuvo la reacción con ácido tricloroacético al 3% (v/v), se centrifugó durante 20 min a 2,000g a 4°C y se retiró el sobrenadante para la detección de los productos de la degradación del sustrato por medio de la aparición de solutos que absorben a 366 nm

La comparación entre actividad proteolítica entre extractos de epimastigotes y trípomastigotes se hizo de la manera anterior, solo que se ocupó una concentración constante de proteína total de cada extracto y se midió la actividad enzimática a las 3, 24 y 48 horas de incubación

La detección de actividad proteolítica en cultivos de *T. cruzi* se realizó de la siguiente manera: se purificaron los parásitos como se indicó anteriormente y los epimastigotes se incubaron a 37°C en solución de Hanks pH 7.1-7.3 o los tripomastigotes en D-MEM sin SFB (a ambos medios se les agregó solución de azocaseína al 2%) durante 15, 30, 60 y 120 minutos, al término de cada periodo de incubación el cultivo se centrifugó durante 3 minutos (los epimastigotes a 1,500g y los tripomastigotes a 2,000g), entonces se tomó la alícuota correspondiente a la que se agregó TCA al 3% para detener la reacción, al final, se centrifugaron los tubos a 2,000g durante 20 min a 4°C y se leyó el sobrenadante a 366 nm.

En el caso de la detección de actividad proteolítica en sobrenadantes se incubó de la manera descrita en el párrafo anterior, solo que esta vez los epimastigotes se incubaron en LIT sin SFB o los tripomastigotes se incubaron con D-MEM sin SFB, esta vez no se adicionó azocaseína a los cultivos que se incubaron a 37°C. A los 15, 30, 60 y 120 min se centrifugó el cultivo y se retiraron alícuotas del sobrenadante que se filtraron a través de filtros de 13 mm con membrana de 0.22  $\mu$  y este sobrenadante se puso a incubarse con azocaseína al 2% a 37°C durante el mismo tiempo transcurrido hasta el momento en el que se retiró la alícuota del cultivo. Al término de este tiempo, la reacción se detuvo con TCA al 3% y se centrifugó a 2,000g durante 20 minutos a 4°C y el sobrenadante se leyó a 366 nm.

### III.6 Determinación de Actividad Proteolítica por el Método de SDS/PAGE con Gelatina como Sustrato. (Método Electroforético).

Se determinó la actividad proteolítica en geles de acrilamida-bisacrilamida copolimerizados con gelatina como sustrato enzimático, la actividad proteolítica se visualizó por la presencia de bandas claras en el fondo azul del gel (Hesssen y Dowdle, 1980). La técnica se lleva a cabo de la siguiente manera: se preparó un mini-gel de acrilamida-bisacrilamida al 11% con 2% (p/v) de gelatina como sustrato. Las muestras que se obtuvieron el mismo día, se diluyeron en <sup>amoniaco</sup> de muestra 2X sin mercaptoetanol y se corrieron en el gel a 130 volts a 4°C. Al final de la electroforesis se incubó el gel en solución

de Tritón 100X al 2.5 % (v/v), durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. La solución anterior fue retirada y se incubó en una solución de amortiguador de acetatos- DTT 1 mM al pH deseado durante 18 horas para muestras de tripomastigotes y sobrenadante de epimastigotes y 3 horas para extracto de epimastigotes.

Para el estudio de la inhibición de la actividad proteolítica, se cortan las tiras de gel donde se corrieron las muestras y se incubaron en tubos individuales en <sup>amortiguador</sup> de acetatos pH 5.5- 5.6 para extractos ó bien pH 7.1-7.3 para sobrenadantes, adicionando los respectivos inhibidores de proteasas a las siguientes concentraciones.

INHIBIDOR	CONCENTRACION DEL STOCK (mM)	CONCENTRACION FINAL (empleada)
Bovatin	1	10 $\mu$ M
β-G6	1	10 $\mu$ M
Leupeptina	10	10 $\mu$ M
Peptatina	1	1 $\mu$ M
1,10-Fenantrolina	200	10 mM
PMSF	200	1 mM
PLCK	10	100 $\mu$ M
EDTA	500	10 mM

### III.7 Enfoque Isoeléctrico de Proteasas de Extracto de Epimastigotes.

Se puso a expandir un cultivo de aproximadamente 50X10<sup>6</sup> epimastigotes en LIT complementado al 10% dentro de una botella en un volumen final aproximado de 150 ml y se incubó en agitación por rotación radial a 27°C. A los 8 días de crecimiento se agregaron 150 ml más de medio y se continuó con la incubación durante otros 8 días. De este cultivo se preparó el extracto de epimastigotes de la manera que anteriormente se explicó y se emplearon 33 mg de proteína total para el enfoque esoelectrónico. El mismo día se realizó un

enfoque electroforético en un aparato ROTOFOR, con una celda de 60 ml, a 12W durante 6 horas a 4°C, usando anfolitos de 3/9 (BIO-RAD). Después de esta primera corrida se repitió la separación empleando las fracciones con pI alrededor de 7 y usando anfolitos de rango entre 5 y 7 (BIO-RAD) bajo las mismas condiciones. A las 20 fracciones obtenidas en cada caso se les midió el pH con tiras de papel indicadoras y se corrieron en geles de acrilamida-bisacrilamida copolimerizados con gelatina, como se indicó en el punto III 6.

### III.8 Análisis Estadístico.

Se utilizó la prueba de ANOVA por medio del programa JUMP con un  $\alpha = 0.05$ , para comparar las posibles diferencias significativas entre los datos de actividad proteolítica en extractos y sobrenadantes sometidos a diferentes condiciones de incubación (activadores, tiempos de incubación, temperaturas) y entre el estadio de tripomastigote y epimastigote de *T. cruzi*.

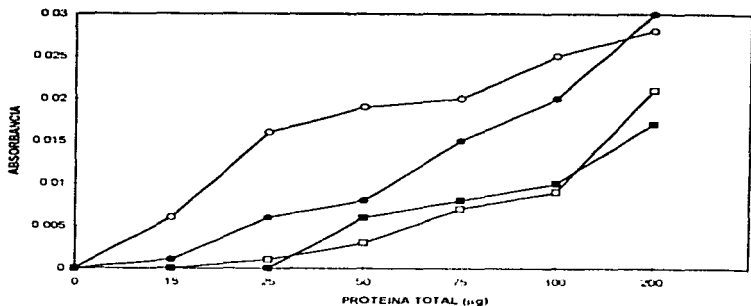
#### IV. RESULTADOS.

##### IV.1 Determinación de Actividad Proteolítica en *Trypanosoma cruzi* por un Método Colorimétrico.

###### IV.1.1. Actividad Proteolítica en Extractos de *T. cruzi*.

En este ensayo se midió la actividad proteolítica en extractos de tripomastigotes y de epimastigotes. Se emplearon en ambos casos, extractos frescos preparados sin inhibidores de proteasas. También se determinó la actividad enzimática con epimastigotes y tripomastigotes vivos, así como en sobrenadante de ambos estadios.

Para determinar la actividad proteolítica en extractos de *T. cruzi* por el método colorimétrico se utilizó azocaseína como sustrato, la cual fue incubada con diferentes concentraciones de proteína total de los extractos de epimastigotes y tripomastigotes durante dos tiempos de incubación (24 y 48 horas), además, se compararon dos condiciones de reacción (ausencia y presencia de EDTA y L-cisteína) con el fin de ver si se comportaban de la misma manera las proteasas de los extractos y ver bajo que condiciones se veía favorecida la degradación del sustrato empleado. En la figura 1 se observa la gráfica que representa la actividad proteolítica en extracto de tripomastigotes fresco preparado sin inhibidores de proteasas. Se midió el incremento en la degradación de azocaseína al ir aumentando la cantidad de proteína total para lo cual se utilizaron 15, 25, 50, 75, 100 y 200 µg de proteína total del extracto y se analizó la actividad enzimática tanto en presencia como en ausencia de EDTA y L-cisteína. Además, se compararon dos tiempos de incubación con el sustrato a 37°C, 24 y 48 h. Lo que se observó fue que la degradación de azocaseína aumenta proporcionalmente al incrementar la concentración de proteína total del extracto a ambos tiempos de incubación, siendo mayor a las 48 horas, tanto en ausencia como en presencia de EDTA y L-cisteína. Debido a que este experimento no fue hecho por triplicado, no se pueden comparar los resultados obtenidos bajo las diferentes condiciones de incubación.

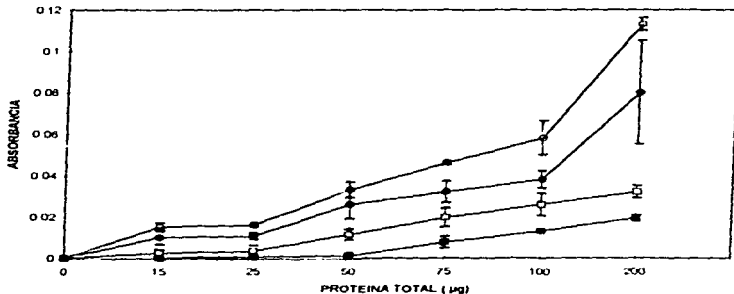


**FIGURA 1.** Actividad proteolítica en extracto de tripomastigotes. En la gráfica se representa la dependencia de degradación de azocaseína con respecto a la concentración de proteína total en el extracto de tripomastigotes empleada en el ensayo. Se incubó a 37°C en amortiguador de acetatos pH 5.5-5.6 durante 24 y 48 horas, en ausencia y presencia de EDTA y L-cisteína.  $\bullet$  representa el extracto incubado con el sustrato durante 24 h en presencia de EDTA y L-cisteína y  $\blacksquare$  representa lo mismo solo que en ausencia de éstos.  $\circ$  representa el extracto incubado con el sustrato durante 48 h en presencia de EDTA y L-cisteína y  $\circ$  representa lo mismo solo que en ausencia de éstos. La degradación de azocaseína se midió a 366 nm. La gráfica anterior representa un solo experimento.

Se analizó también el extracto de epimastigotes en fase estacionaria que aparece en la figura 2, ahí se representa la degradación de azocaseína generada por proteasas presentes en extracto de epimastigotes fresco preparado sin inhibidores de proteasas; se graficó el producto de la degradación de azocaseína para diferentes concentraciones de proteína total del extracto incubado con el sustrato durante 24 y 48 horas a 37°C, usando dos condiciones de incubación presencia y ausencia de EDTA y L-cisteína. Aquí, al igual que en el extracto de tripomastigotes, se observa que la actividad proteolítica se incrementa al ir

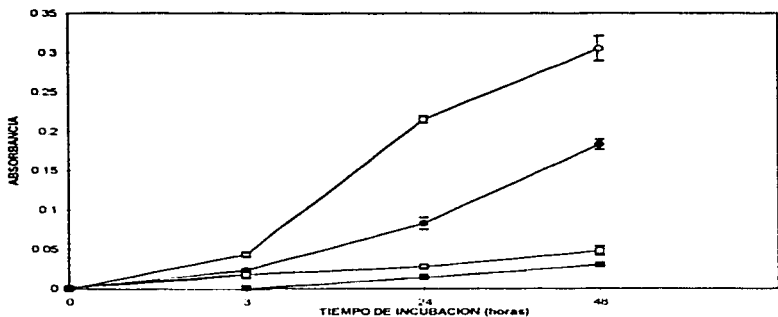


aumentando la concentración de proteína total del extracto y es de aproximadamente 0.2 a 1.5 veces mayor cuando se incubó durante 48h que durante 24 h. Por otra parte, al agregar EDTA y L-cisteína al sistema se inhibe la actividad proteolítica en el extracto de manera significativa, tanto a las 24 como a las 48 horas de incubación a 37°C.



**FIGURA 2.** Degradación de azocaseína en extracto de epimastigotes usando 15,25,50,75, 100 y 200 µg de proteína total en el ensayo a 37°C durante 24 y 48 horas en amortiguador de acetatos pH 5.5-6, en ausencia y presencia de EDTA y L-cisteína. **▲**— representa el extracto incubado con el sustrato durante 48 h en presencia de EDTA y L-cisteína y **▼**— representa lo mismo solo que en ausencia de éstos últimos. **■**— representa el extracto incubado con el sustrato durante 24 h en presencia de EDTA y L-cisteína y **●**— representa lo mismo solo que en ausencia de EDTA y L-cisteína. La degradación de azocaseína se midió a 366 nm. En la gráfica se representa el experimento más representativo hecho por triplicado

El siguiente experimento se diseñó para comparar la actividad proteolítica en extractos de uno y otro estadio, con el fin de conocer si en uno había mayor actividad proteolítica que en el otro o bien si la actividad era igual en ambos. Previamente se había observado que mientras mayor fuera la cantidad de proteína total del extracto, más evidente era la degradación del sustrato, para llevar a cabo la comparación de actividad proteolítica de los dos estadios se necesitaba haber empleado entre 75 y 200  $\mu\text{g}$  de proteína total para cada extracto (pues fue aquí donde se observó la diferencia más evidentemente) y debido a que es muy difícil obtener cantidades muy grandes de proteína total de extracto de tripomastigotes, para realizar el experimento se decidió emplear 75  $\mu\text{g}$  de proteína total para los dos extractos. En la figura 3, se representa la cinética de degradación de azocaseína cuando se utilizó una cantidad constante de 75  $\mu\text{g}$  de proteína total de extractos frescos de epimastigotes y de tripomastigotes. En cada caso los extractos fueron incubados bajo las mismas condiciones anteriormente empleadas, solo que ahora los tiempos de incubación fueron 3, 24 y 48 horas en ausencia y presencia de EDTA y L-cisteína. Como se puede notar al incrementar el tiempo de incubación del extracto con la azocaseína hubo mayor degradación de esta. Por otra parte, al comparar la reacción en presencia de L-cisteína y EDTA, se vio que había una inhibición sobre la actividad proteolítica con el extracto de epimastigotes con respecto a la reacción llevada a cabo en ausencia de aquellos, lo mismo sucedió en el extracto de tripomastigotes, en ambos casos hubo diferencia significativa desde las 3 h de incubación. Por otro lado, si se compara la actividad proteolítica entre el extracto de epimastigotes y tripomastigotes en ausencia de EDTA y L-cisteína, se observa que la actividad proteolítica presente en el extracto de tripomastigotes es siempre menor a la del extracto de epimastigotes y que hay una diferencia significativa de aproximadamente 10 veces. Ahora bien, comparando la actividad proteolítica de ambos extractos en presencia de EDTA y L-cisteína, se ve que de nuevo existen diferencias significativas, pues el extracto de epimastigotes a las 24 y 48 horas presenta mayor actividad (aproximadamente 8 veces) con respecto al extracto de tripomastigotes.



**FIGURA 3.** Actividad proteolítica en extractos de epimastigotes y tripomastigotes. En la gráfica se representa la cinética de degradación de azocaseína a las 3, 24 y 48h de incubación, cuando se empleó en cada caso 75  $\mu$ g de proteína total de cada extracto.  $\square$  representa el extracto de epimastigotes incubado en presencia de EDTA y L-cisteína y  $\circ$  ausencia de activadores,  $\bullet$  representa el extracto de tripomastigotes incubado en presencia de EDTA y L-cisteína y  $\blacksquare$  en ausencia de estos. El producto de degradación de la azocaseína se midió espectrofotométricamente a 366 nm. En la gráfica se representa el experimento más representativo hecho por triplicado.

#### IV.1.2. Estudio de Actividad Proteolítica en Cultivos y Sobrenadantes de *T. cruzi*.

Enseguida se estudió lo que sucedía con la actividad proteolítica con los parásitos vivos, pues se quería saber si los parásitos vivos secretaban proteasas al medio que tal vez fueran más o menos activas que las de extractos, lo cual, aportaría evidencias que nos permitieran proponer funciones diferentes para estas enzimas. Para ello, lo primero que se hizo fue analizar la degradación de azocaseína al incubar epimastigotes vivos con el sustrato. Debido a que los epimastigotes se cultivan en el laboratorio a 28°C, se probó la degradación a 28 y 37°C, con el fin de saber si las proteasas se activaban o se secretan más a una u otra temperatura.

En la figura 4 se observa la cinética de degradación de azocaseína cuando se incuban epimastigotes (fase estacionaria) a 28 y 37°C en presencia del sustrato y también se señala la viabilidad a lo largo del experimento. La actividad proteolítica fue prácticamente la misma a las dos temperaturas y estadísticamente no hubo diferencia estadísticamente significativa hasta los 60 minutos de incubación. De nuevo, al igual que con los extractos de epimastigotes y tripomastigotes, se favorece la degradación del sustrato cuando el tiempo de incubación del extracto con el sustrato es mayor.

Debido a que el parásito en su fase de epimastigotes presenta dos fase de crecimiento, se pensó en la posibilidad de diferencias en la actividad proteolítica en el cultivo entre las dos fases, por lo que, se analizó lo anterior comparando la actividad proteolítica en las dos fases de crecimiento e incubando a 37°C, los resultados se observan en la figura 5 en donde se representa la degradación de azocaseína con respecto al tiempo y a la viabilidad a lo largo del experimento. No hay diferencia estadísticamente significativa en la actividad proteolítica entre las dos fases de crecimiento del parásito. La viabilidad en este último como en el anterior experimento se mantiene arriba del 80%, por lo cual, podemos decir que la actividad proteolítica observada en estos dos experimentos corresponde a proteasas de secreción y/o proteasas de superficie de los epimastigotes.

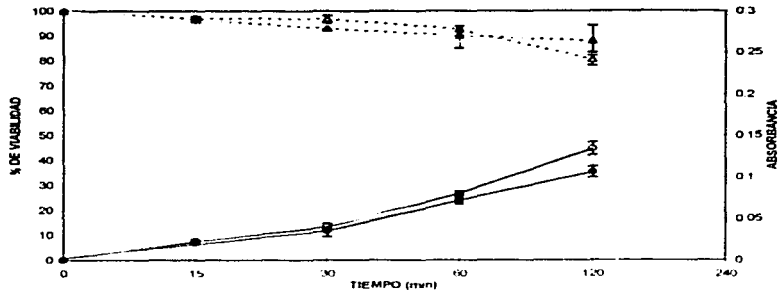
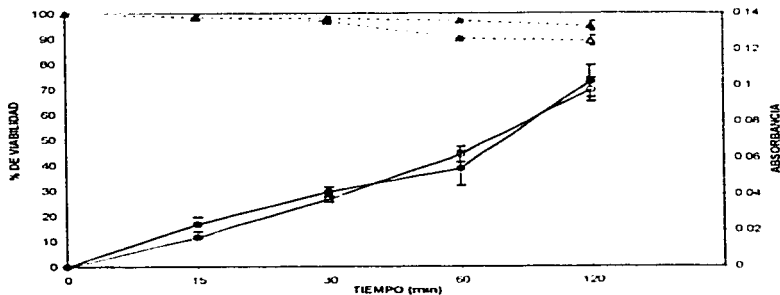


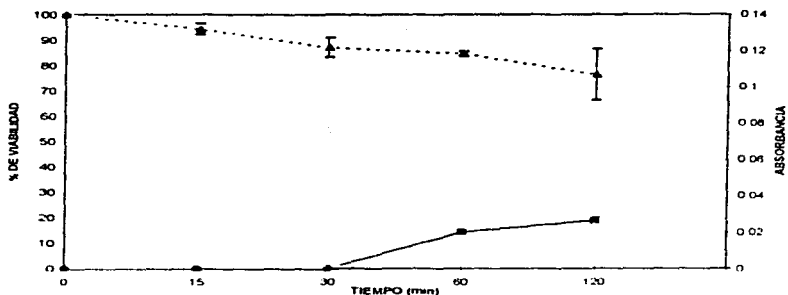
FIGURA 4. Degradación de azocaseína en cultivo de epimastigotes a 28°C y a 37°C. Se incubaron  $1.5 \times 10^8$  parásitos en un volumen total de 1.5 ml de solución de Hanks con el sustrato, y se fueron tomando alícuotas a los 15, 30, 60 y 120 minutos de incubación.  $\rightarrow\rightarrow$  representa a los parásitos en fase estacionaria y  $\leftarrow\leftarrow$  en logarítmica. De igual manera,  $\rightarrow\Delta$  representa la viabilidad de los parásitos en fase estacionaria y  $\leftarrow\Delta$  en fase logarítmica. El producto de degradación de la azocaseína fue detectado a 366nm.

Sabiendo que no había diferencias en la actividad de proteasas a 28 ni a 37°C, ni tampoco en ninguna de las dos fases de crecimiento, se procedió a analizar si esta actividad enzimática correspondía a proteasas de secreción o de membrana, para lo cual se analizó exclusivamente la actividad proteolítica presente en sobrenadante de parásitos incubados a 37°C durante diferentes intervalos de tiempo. En la figura 6, se observa la cinética de degradación de azocaseína generada por proteasas de secreción de epimastigotes cuando éstos fueron incubados en medio LIT sin SFB. Se retiraron alícuotas del sobrenadante a los 15, 30, 60 y 120 minutos de incubación del cultivo de parásitos. A estas alícuotas se les agregó el sustrato y se incubaron a 37°C durante 15, 30, 60 o 120 minutos, según se había tomado el sobrenadante del cultivo de parásitos inicialmente. Lo que se observó fue que hasta los 30 minutos la actividad proteolítica fue tan baja que no se pudo detectar por este método. A los 120 minutos la actividad proteolítica en el sobrenadante fue alrededor de 5

veces menor a la actividad que había cuando se incubó el sustrato con los parásitos, lo cual indica que la mayor actividad proteolítica en epimastigotes está probablemente dada por proteasas que se encuentran formando parte de la membrana y que son activas aun a intervalos relativamente cortos de incubación (ver fig. 5). Si se tabula la actividad proteolítica de cultivo y sobrenadante de epimastigotes juntos se puede ver la diferencia entre la magnitud de actividad proteolítica entre uno y otro sistema, lo cual sugiere que la mayor actividad proteolítica presente en el cultivo de epimastigotes es debida a proteasas que se encuentran en la superficie del parásito (tabla I)



**FIGURA 5.** Actividad proteolítica de epimastigotes en fase logarítmica y estacionaria sobre azocaseína. Se incubaron  $1.5 \times 10^8$  parásitos en un volumen total de 1.5 ml de solución de Hanks con azocaseína a  $37^\circ\text{C}$ , y se fueron tomando alícuotas a los 15, 30, 60 y 120 minutos de incubación  $\rightarrow\bullet\rightarrow$  representa a los parásitos en fase estacionaria y  $\rightarrow\Delta\rightarrow$  en logarítmica. De igual manera  $\rightarrow\Delta\rightarrow$  representa la viabilidad de los parásitos en fase estacionaria y  $\rightarrow\bullet\rightarrow$  en fase logarítmica. El producto de degradación de la azocaseína fue detectado a 366nm.



**FIGURA 6.** Actividad proteolítica en sobrenadante de epinastigotes en fase estacionaria sobre azocaseína. Se incubaron a 37°C  $1.5 \times 10^6$  parásitos en un volumen total de 1.5 ml de LIT sin SFB, se fueron tomando alícuotas a los 15, 30, 60 y 120 minutos de incubación y puestas posteriormente en presencia de azocaseína durante igual tiempo  $\rightarrow$  representa la actividad proteolítica de los parásitos en fase estacionaria y  $\triangle$  representa la viabilidad de los parásitos. El producto de degradación de la azocaseína fue detectado a 366nm.

**TABLA I.**

Comparación de actividad proteolítica entre parásitos completos y sobrenadante de los mismos

TIEMPO DE INCUBACIÓN (minutos)	ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA EN PARÁSITOS COMPLETOS (Absorbancia)	ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA EN SOBRENADANTE (Absorbancia)
0	0	0
15	0.0223	0
30	0.0400	0
60	0.0803	0.0200
120	0.1350	0.0265

Para investigar si también en los tripomastigotes existían diferencias entre la actividad proteolítica de las células completas y de su sobrenadante se llevaron a cabo los experimentos siguientes: se analizó la actividad proteolítica en el cultivo de parásitos vivos en presencia del sustrato y posteriormente la actividad de las proteasas de secreción.

En la figura 7, se representa la actividad proteolítica del cultivo de tripomastigotes que fueron incubados a 37°C en D-MEM sin SFB colocando como sustrato azocaseína, se tomaron alícuotas a los 15, 30, 60 y 120 minutos de incubación, al mismo tiempo que se verificaba la viabilidad. Como se puede notar, al igual que con los epimastigotes, la degradación de azocaseína aumenta en forma proporcional de acuerdo al tiempo de incubación. La viabilidad se mantuvo por encima del 80%, lo que indica que la actividad proteolítica en este ensayo corresponde a proteasas de secreción del parásito y/o proteasas de superficie, para evidenciar si la actividad detectada correspondía solo a proteasas de secreción o de superficie se realizó el ensayo de la figura 8, donde se presenta la cinética de degradación de azocaseína provocada únicamente por proteasas de secreción de tripomastigotes, para lo cual se incubaron tripomastigotes a 37°C en D-MEM sin SFB y se retiraron alícuotas de sobrenadante a los 15, 30, 60 y 120 minutos, al mismo tiempo que se iba verificando la viabilidad. A estas alícuotas se les agregó azocaseína y se incubaron a 37°C. Como se aprecia en la figura, la degradación de azocaseína provocada por las proteasas de secreción de tripomastigotes, es mayor al incrementarse el tiempo de incubación de los parásitos en el cultivo, mientras que la viabilidad se mantiene superior al 80%, por lo que se atribuyó la actividad enzimática solo a proteasas de secreción del parásito. Aquí, a diferencia de las proteasas de secreción de epimastigotes (fig. 6), la actividad proteolítica es detectada a partir de los 15 minutos y a los 120 minutos llega a representar casi la mitad de la actividad proteolítica que existe con las proteasas de los parásitos completos (fig. 7), lo



cual nos indica que solo una parte de la actividad enzimática en ese ensayo corresponde a proteasas de secreción, mientras que la actividad remanente observada en el cultivo de los parásitos completos corresponde a proteasas de superficie. La diferencia entre la actividad proteolítica de los tripomastigotes completos y del sobrenadante de los mismos, se puede apreciar en la tabla II.

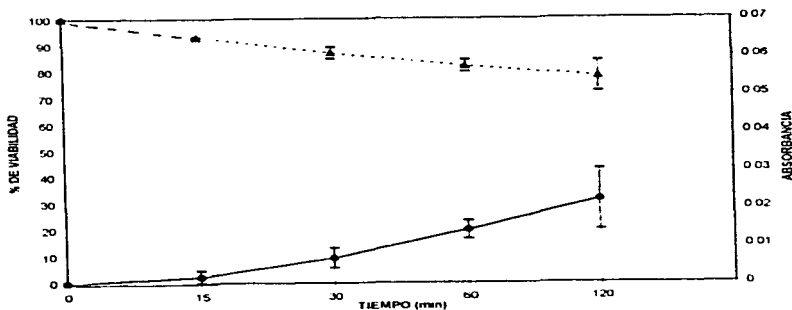


FIGURA 7. Actividad proteolítica de tripomastigotes usando azocaseína como sustrato. Se incubaron  $2.2 \times 10^7$  parásitos en un volumen total de 0.88 ml de D-MEM con azocaseína a  $37^\circ\text{C}$ , y se fueron tomando alícuotas a los 15, 30, 60 y 120 minutos de incubación.  $\square$  representa la actividad proteolítica de los tripomastigotes. De igual manera  $\blacktriangle$  representa la viabilidad de los parásitos a lo largo del experimento. El producto de degradación de la azocaseína fue detectado a 366nm.

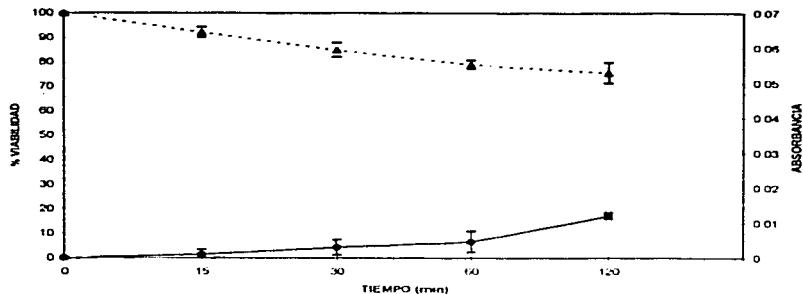


FIGURA 8. Actividad proteolítica en sobrenadante de tripomastigotes usando azocaseína como sustrato. Se incubaron  $2.2 \times 10^7$  parásitos en un volumen total de 0.88 ml de D-MEM sin SFB a 37°C, se fueron tomando alícuotas a los 15, 30, 60 y 120 minutos de incubación y puestas a incubar a 37°C posteriormente en presencia de azocaseína durante igual tiempo.  $\rightarrow$  representa la actividad proteolítica de los parásitos y  $\triangle$  representa la viabilidad de los parásitos. El producto de degradación de la azocaseína fue detectado a 366 nm.

TABLA II

Comparación de actividad proteolítica entre tripomastigotes completos y sobrenadante de los mismos

TIEMPO DE INCUBACION (minutos)	ACTIVIDAD PROTEOLITICA EN PARASITOS COMPLETOS (Absorbancia)	ACTIVIDAD PROTEOLITICA EN SOBRENADANTE (Absorbancia)
0	0	0
15	0.0016	0.001
30	0.0066	0.003
60	0.014	0.0066
120	0.022	0.012

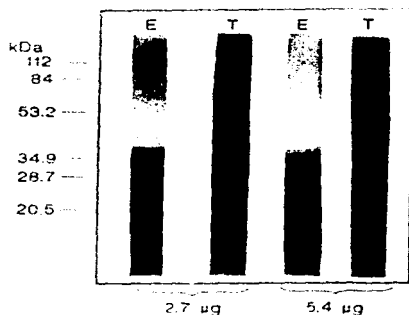
## IV.2. Determinación de Actividad Proteolítica en *Trypanosoma cruzi* por un Método Electroforético.

### IV.2.1. Actividad Proteolítica en extractos de *T. cruzi*.

Debido a que el método colorimétrico resultó ser poco sensible, ya que requería de una gran cantidad de material biológico y a que no se proporcionaba información sobre el tipo de proteasas que se hallaban presentes en los extractos y sobrenadantes de *T. cruzi*, se decidió usar una segunda técnica (SDS/PAGE), con el fin de llevar a cabo una caracterización más fina de las proteasas de *T. cruzi*.

Se analizaron las proteasas de dos estadios del parásito, epimastigote y tripomastigote y se comparó la actividad proteolítica en extractos y sobrenadantes de estos, ya que uno representa la fase infectiva para el humano y el otro la del vector y se sospecha que debe haber diferencias en la actividad proteolítica, pues, el tripomastigotes se replica intracelularmente y el epimastigote no. Las condiciones de alojamiento en el humano y el vector son diferentes (fisiológicamente hablando), lo cual sugiere que también por ello las proteasas podrían ser diferentes. Por lo tanto se preparon extractos de ambos estadios y se estudiaron las proteasas de uno y otro activando a pH 5.6, pues fue a este pH al que ya se habían estudiado las proteasas de extracto por el método colorimétrico y además otras proteasas de otros parásitos se activan más o menos a este pH. Se usaron iguales concentraciones de proteína total de cada extracto en el gel con el fin de verificar donde hay mayor actividad proteolítica. En la figura 9 se puede comparar el patrón de actividades proteolíticas en extractos de epimastigotes y tripomastigotes cuando se colocaron en el gel dos concentraciones de proteína total para cada uno (2.7 ó 5.4 µg de proteína por carril). Lo que se hizo evidente después de este experimento fue que con el extracto de epimastigotes aparece una banda muy intensa de actividad proteolítica aproximadamente

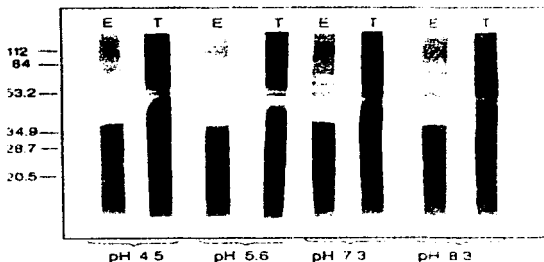
desde 40 kDa hasta 75 kDa y otra banda > 112 kDa, cuando se utilizan 2.7  $\mu$ g de proteína. Cuando se duplicó la cantidad de proteína total se incrementó la actividad proteolítica. Por otra parte, analizando la actividad que se presenta en el extracto de tripomastigotes se ve que esta es inferior a la del extracto de epimastigotes, pues solo aparece una banda de actividad proteolítica de aproximadamente 50 kDa y otra en 52 kDa con las dos concentraciones de proteína usadas.



**FIGURA 9.** Comparación de activación de proteasas en extractos de epimastigotes y tripomastigotes. Se prepararon extractos de epimastigotes y tripomastigotes y se corrieron 2.7 ó 5.4  $\mu$ g de proteína total de cada extracto por carril en el gel que fue corrido a 130 V e incubado posteriormente 1 h a temperatura ambiente en agitación constante en solución de tritón 100X al 2.5 % y posteriormente a 37°C durante toda la noche en solución de acetato-DTT 1 mM, pH 5.6. E representa los carriles donde se colocó extracto de epimastigotes y T el de tripomastigotes, en la parte inferior del gel se indica la cantidad de proteína empleada en cada caso. A la izquierda se indica el peso molecular de los marcadores.

En la figura 10, se muestra la actividad de proteasas en extractos de epimastigotes y tripomastigotes a diferentes pH's, empleando los mismos extractos del experimento anterior, que se mantuvieron a -20°C durante 6 días, y con el fin de lograr saber si en el extracto de tripomastigotes se lograban apreciar más proteasas, se incrementó arbitrariamente la concentración de proteína total, utilizando 15.6 µg para cada extracto por carril. Como se puede ver, a pH 4.5 para los epimastigotes, se observó una banda de actividad proteolítica muy intensa desde 40-60 kDa, mientras que en los tripomastigotes solo aparecieron dos bandas, una de aproximadamente 50 kDa y otra de más o menos 52 kDa. A pH 5.6 para epimastigotes aparece la misma banda que a pH 4.5, pero aun más intensa a partir de los 60 kDa y hasta después de los 84 kDa, mientras que para los tripomastigotes siguen apareciendo las mismas dos zonas de actividad que a pH 4.5. Analizando la actividad a pH 7.3 se observó que la actividad en el extracto de epimastigotes resulta notablemente disminuida en comparación de los pH's ácidos, pues ahora solo aparecieron tres zonas evidentes de actividad proteolítica, una de 40-50 kDa, otra de 52 kDa y finalmente una de aproximadamente 70 kDa. Mientras que en el extracto de tripomastigotes a este pH solo se vio una banda de aproximadamente 50 kDa. Por último, a pH 8.3 en el extracto de epimastigotes se ve casi la misma actividad que a pH 7.3, a excepción de la banda de 70 kDa que apareció un poco más intensa, mientras que, en el extracto de tripomastigotes la banda de 52 kDa resultó casi completamente inactiva, mientras que la de 50 kDa apareció menos activa que a pH 7.3. Por lo cual, el mejor pH de activación para proteasas de epimastigotes y tripomastigotes fue a 5.6. En este experimento además se constató el hecho de que las proteasas de epimastigotes son más activas que las de tripomastigotes aun a diferentes valores de pH's. Es importante hacer notar que la cantidad de proteína empleada en este ensayo para los extractos en el gel (15.6 µg por carril) es más de tres veces la empleada en el ensayo de la figura 13, a pesar de ello la actividad proteolítica se ve casi igual para el extracto de epimastigotes y quizá sólo resulta más evidente la banda de 50 kDa. En el experimento anterior se esperaba que la actividad fuera al menos tres veces

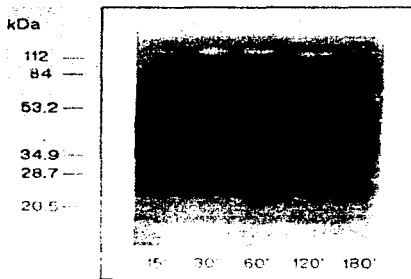
mayor a la que se presentaba cuando se usaron 5.4  $\mu$ g de proteína total del extracto (ver fig. 9). Una posible explicación sería la posible degradación de las proteasas ocurrida al mantener los extractos almacenados, por lo que, en lo sucesivo, solo se emplearan en los ensayos extractos y sobrenadantes frescos, con el fin de evitar esta degradación



**FIGURA 10.** Comparación de activación de proteasas en extractos de epimastigotes y trypomastigotes a diferentes pH's. Se prepararon extractos de epimastigotes y trypomastigotes y se corrieron 15.6  $\mu$ g de proteína total de cada extracto por carril en el gel que fue corrido a 130 V e incubado posteriormente 1 h a temperatura ambiente en agitación constante en solución de trifenil 100X al 2.5 % y cortado en tiras que fueron incubadas posteriormente a 37°C durante toda la noche en solución de amortiguador de acetatos- DTT 1mM, pH 4.5, 5.6, 7.3 u 8.3, según fuera el caso. E representa los carriles donde se colocó extracto de epimastigotes y T el de trypomastigotes, en la parte inferior del gel se indica el pH empleado en cada caso. A la izquierda se indica el peso molecular de los marcadores.

#### IV.2.2. Actividad proteolítica en sobrenadantes de *T. cruzi*.

Como el interés sobre el estudio de proteasas de *T. cruzi* no solo abarcaba a las de extractos de tripomastigotes, nos interesó estudiar entonces las proteasas de sobrenadantes de epimastigotes y tripomastigotes. Para ello, lo primero que se hizo fue detectar la aparición de proteasas en sobrenadante de tripomastigotes, incubando a 37°C los parásitos durante 15, 30, 60, 120 y 180 minutos (fig. 11), con el fin de determinar el tiempo óptimo al que debía ser tomado el sobrenadante, de tal manera que en ensayos posteriores empleáramos tal tiempo de incubación. En esta figura se muestra la cinética de aparición de proteasas de tripomastigotes durante diferentes intervalos de tiempo, como se puede notar por medio de este método se detecta actividad proteolítica desde los 15 minutos, la cual se ve aumentando a medida que avanza el tiempo. A partir de los 30 y hasta los 120 minutos se aprecian dos bandas de actividad proteolítica perfectamente definidas, una de 45-60 kDa y otra de 112 kDa, mientras que a los 180 minutos, además de estas comienza a aparecer una banda pequeña debajo de 45 kDa.

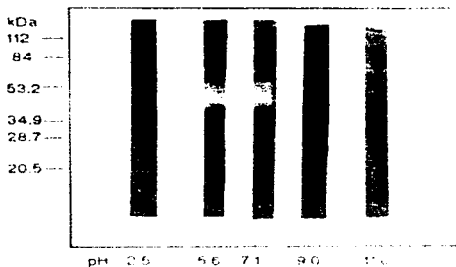


**FIGURA 11.** Aparición de las proteasas de tripomastigotes en el sobrenadante de los cultivos. Se incubaron  $3 \times 10^7$  tripomastigotes en 1 ml de D-MEM sin SFB a  $37^\circ\text{C}$ , se fueron retirando alícuotas a los 15, 30, 60, 120 y 180 minutos, las cuales fueron corridas en un gel de acrilamida-bisacrilamida con gelatina al 2% a 130 V, el gel fue incubado 1 h a temperatura ambiente en agitación constante en solución de triton 100X al 2.5% y posteriormente a  $37^\circ\text{C}$  durante toda la noche en solución de acetatos-DTT 1mM, pH 5.6. A la izquierda se indica el peso molecular de los marcadores.

Después se procedió a determinar el pH de activación óptimo de proteasas de sobrenadante de tripomastigotes, para lo cual se incubó a los tripomastigotes en D-MEM sin SFB a  $37^\circ\text{C}$  durante 2 h y después de correr los geles bajo las mismas condiciones utilizadas en el experimento anterior, se cortaron en tiras e incubaron en solución de amortiguador de acetatos-DTT 1mM a diferentes pH (2.5, 5.6, 7.1, 9.0 y 11.0) durante toda la noche a  $37^\circ\text{C}$ . En la figura 12, se observa el efecto del pH sobre la activación de proteasas de sobrenadante de tripomastigotes. A pH 2.5 las proteasas se inactivan casi completamente, a excepción de una banda de más de 112 kDa, a pH 5.6 se observa la actividad de las proteasas de la zona de 45-60 kDa y ligeramente las de 70-75 kDa, a pH 7.1 es donde se observa la mayor

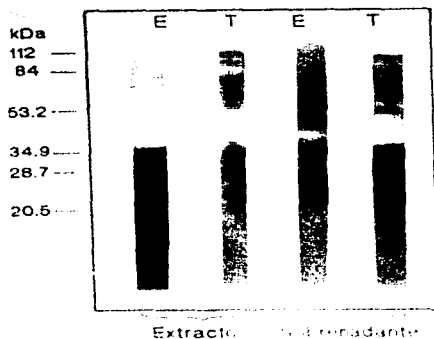


actividad proteolítica, pues se aprecia una banda de 45-60 kDa, otra de 70-75 kDa (más intensa que cuando se incubó a pH 5.6), otra de 112 kDa y finalmente otra mayor a 112 kDa; todas las anteriores resultan inactivas a pH 9.0, mientras que a pH 11.0 se observa actividad en la zona de 70-75, 112 y mayor a 112 con una intensidad similar a la observada a pH 7.1



**FIGURA 12.** Activación de proteasas de sobrenadante de tripomastigotes a diferentes pH's. Se incubaron  $3 \times 10^7$  tripomastigotes en 1 ml de D-MEM sin SFB durante dos horas a 37°C, alícuotas de 15  $\mu$ l fueron corridas en un gel de acrilamida-bisacrilamida con gelatina al 2% a 130 V, e incubado posteriormente 1 h a temperatura ambiente en agitación constante en solución de tión 100X al 2.5 %, entonces se cortaron 5 tiras que fueron incubadas a 37°C durante toda la noche en solución de acetato-DTT 1 mM, pH 2.5, 5.6, 7.1, 9.0 y 11.0 respectivamente. A la izquierda se indica el peso molecular de los marcadores.

Para comparar la actividad proteolítica entre los extractos y sobrenadantes de epimastigotes y tripomastigotes, se utilizaron tanto extractos como sobrenadantes frescos (recién preparados). Para el caso del extracto de epimastigotes se utilizó una concentración de proteína total menor a la empleada anteriormente, con el fin de disminuir la sobreexpresión observada en algunas zonas y poder apreciar si había más de una banda. Se usó 1.5 µg de proteína en el carril y después del tratamiento con triton, solo se incubó durante 2 h a 37°C en solución de amortiguador de acetatos-DTT 1 mM, pH 5.6 con el fin de evitar la sobreexpresión de actividad enzimática y poder así evidenciar las zonas de proteólisis antes y después del uso de inhibidores específicos. Para el extracto de tripomastigotes se empleó 13 µg de proteína total en el carril, mientras que los sobrenadantes fueron obtenidos incubando  $5 \times 10^7$  epimastigotes/ml de LIT sin SFB ó  $3 \times 10^7$  tripomastigotes/ml de D-MEM sin SFB, ambos se incubaron a 37°C durante 2 h (al término del cual la viabilidad de los parásitos era de alrededor del 90%) y entonces se centrifugó para bajar los parásitos y el sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0.22 µm; del sobrenadante de epimastigotes se corrieron 17 µl en un carril del gel, mientras que del de tripomastigotes 8 µl (este último sobrenadante fue primero concentrado a la mitad de su volumen). El extracto de tripomastigotes fue incubado en el amortiguador de acetatos-DTT a un pH de 5.6, mientras que los sobrenadantes fueron incubados a pH 7.1-7.3 durante toda la noche a 37°C. Cuatro zonas principales de actividad proteolítica fueron detectadas en general en los sobrenadantes y extractos (fig 13). En el extracto de epimastigotes hay 2 bandas de actividad proteolítica, una de 45-60 kDa y otra de 70-75 kDa; en el extracto de tripomastigotes aparecen tres bandas bien definidas, una de 45-60 kDa, otra de 112 kDa y una última de más de 112 kDa; por otro lado, en el sobrenadante de epimastigotes aparece una banda, muy tenue en comparación con la de los extractos, de aproximadamente 45 kDa y otra, aún más tenue, de 70 kDa, finalmente en el sobrenadante de tripomastigotes aparece de nuevo la banda de 45-60 kDa, un duplete de 70-75 kDa y una de 112 kDa. Las bandas que se presentan en esta figura se resumen en la tabla III.



**FIGURA 13.** Comparación de actividad proteolítica entre sobrenadantes y extractos de epimastigotes y tripomastigotes. Se prepararon extractos de epimastigotes y tripomastigotes que se corrieron enseguida en el gel de electroforesis, para los epimastigotes se utilizaron 1.5  $\mu$ g de proteína total en el carril y para los tripomastigotes 13  $\mu$ g. Los sobrenadantes fueron obtenidos incubando  $5 \times 10^7$  epimastigotes/ml de LIT sin SFB ó  $3 \times 10^7$  tripomastigotes/ml de D-MEM sin SFB a 37°C durante 2 h. Para el caso de los epimastigotes se colocaron 17  $\mu$ l de sobrenadante y en el de tripomastigotes 8  $\mu$ l de sobrenadante concentrado a la mitad del volumen. Las muestras se corrieron a 130 V a 4°C, se incubaron después en solución de triton 100N al 2.5% 1 h a temperatura ambiente en agitación constante y finalmente en solución de amortiguador de acetato-DTT 1mM, pH 5.6 para los extractos y pH 7.1 para los sobrenadantes a 37°C durante toda la noche, excepto el extracto de epimastigotes que solo fue incubado durante 2 h. A la izquierda se indica la posición y el peso molecular de los marcadores.

TABLA III.

PESO MOLECULAR DE LAS BANDAS DE ACTIVIDAD PROTEOLITICA (kDa)				
	66/45	75/70	112	>112
Sobrenadante de Epimastigotes	•	•		
Sobrenadante de Tripomastigotes	•	•	•	
Extracto de Epimastigotes	•	•		
Extracto de Tripomastigotes	•		•	•

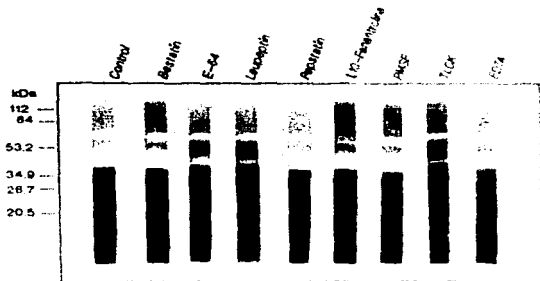
Bandas de actividad proteolítica presentes con la técnica de SDS/PAGE con 2% de gelatina para extractos y sobrenadantes de *T. cruzi*.

Como se ve en la tabla I, la única banda en común tanto en extractos como sobrenadantes de *T. cruzi* es la de 45-60 kDa, la(s) del área de 70-75 kDa apareció en todos excepto en el extracto de tripomastigotes, la de 112 kDa se encontró tanto en sobrenadante como en extracto de tripomastigotes y la de peso superior a 112 kDa solo aparece en el extracto de tripomastigotes.

#### IV.4. Inhibición de Proteasas de *T. cruzi*.

Una vez sabiendo que proteasas existían en los extractos y sobrenadantes de epimastigotes y tripomastigotes se procedió a inhibir las proteasas de cada extracto con una batería de inhibidores de proteasas específicos, con el fin de conocer de que clase son cada una. Para la inhibición de proteasas de extracto de epimastigotes fresco se utilizaron 1.5 µg de proteína total por carril. Como se muestra en la figura 14 comparando con el control bestatina y pepstatina no inhibieron ninguna banda, E-64 inhibe casi

por completo la banda de 45-60 kDa y alrededor de la mitad a la de 70-75 kDa, lo mismo leupeptin y TLCK. Por otra parte, 1,10 fenantrolina inhibe un poco la de 45-60 kDa y casi por completo la de 70-75 kDa, y PMSF inhibe la de 45-60 muy poco y no inhibe la de 70-75 kDa, finalmente, EDTA inhibe aproximadamente una cuarta parte de la actividad de la banda de 45-60 kDa y la mitad de la de 70-75 kDa. De todo lo anterior se dedujo que en el área de 45-60 kDa podrían existir proteasas de dos tipos metalo y proteasa de cisteinas, y que la mayor actividad esta dada por esta últimas, mientras que en el area de 70-75 kDa también podrían encontrarse proteasas de las dos anteriores clases.



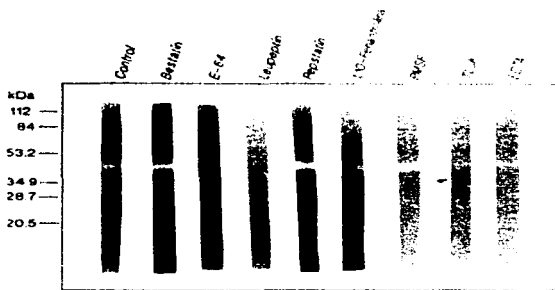
**FIGURA 14.** Inhibición de proteasas de extracto de epimastigotes. Se preparó un extracto de epimastigotes y se corrió enseguida en el gel de electroforesis, utilizando 1.5 µg de proteína por carril, corriéndose a 130 V a 4°C, posteriormente se incubó el gel en solución de triton 100X al 2.5 % en agitación constante a temperatura ambiente 1 h y entonces se cortaron nueve tiras que se incubaron por separado a 37°C durante 2 h en solución de amortiguador de acetatos-DTT 1mM pH 5.6 mas el inhibidor deseado en cada caso, excepto el control que no lleva. En la parte superior se indica el inhibidor empleado en cada caso. A la izquierda se indica la posición y el peso molecular de los marcadores.

En la figura 15 se muestra la inhibición de proteasas en extracto de tripomastigotes, cuando se utilizó 13 µg de proteína total por carril. Como se puede observar comparando con el control, bestatina, pepstatina y EDTA no inhibieron a ninguna de las tres bandas aquí presentes, mientras que E-64, leupeptin y TLCK las inhibieron a todas por completo, por su parte 1,10- fenantrolina tan solo inhibió la banda de 45-60 kDa aproximadamente a la mitad de su actividad y no inhibió al resto, finalmente PMSE no inhibió a la de 45-60 kDa ni la de mas de 112 kDa e inhibió aproximadamente a la mitad a la de 112 kDa. Por su parte las proteasas de 112 y de mas de 112 kDa corresponden a proteasas de sistema, pues la de 112 fue inhibida por PMSE, TLCK, leupeptin y E-64 y la superior a 112, por leupeptin y E-64.



**FIGURA 15.** Inhibición de proteasas de extracto de tripomastigotes. Se preparo un extracto de tripomastigotes y se corrio enseguida en el gel de electroforesis, utilizando 13 µg de proteína por carril, corriendo a 130 V a 4°C, posteriormente se incubo el gel en solución de triton 100X al 2.5 % en agitación constante a temperatura ambiente 1 h y entonces se cortaron nueve tiras que se incubaron por separado a 37°C durante toda la noche en solución de amortiguador de acetato-DTT 1 mM pH 5.6 mas el inhibidor descado en cada caso, excepto el control que no lleva. En la parte superior se indica el inhibidor empleado en cada caso. A la izquierda se indica la posición y el peso molecular de los marcadores.

Para la inhibición de proteasas en sobrenadante de epimastigotes se usó el sobrenadante de  $5 \times 10^7$  epimastigotes por 1 ml. Se observa en la figura 16 que la banda de 70 kDa fue inhibida completamente por bestatina, pepstatina, 1,10-fenantrolina y EDTA y no es inhibida por los restantes inhibidores. Por su parte, la banda de 45 kDa es inhibida completamente por E-64 y leupeptin, mientras que bestatina, 1,10-fenantrolina, PMSE, TLCK y EDTA inhibieron alrededor de la mitad de la actividad de esta banda que no fue inhibida por pepstatina. De lo anterior se concluye que en el área de 45 kDa podrían existir metaloproteasas y proteasas de cisteína, pues la banda en esta área fue inhibida por todos los inhibidores empleados, parcial o totalmente, excepto por pepstatina que no la inhibió.



**FIGURA 16.** Inhibición de proteasas de sobrenadante de epimastigotes. Se incubaron  $5 \times 10^7$  epimastigotes en 1 ml de LIT sin SFB a  $37^\circ\text{C}$  durante 2 h y 17  $\mu\text{l}$  de este cultivo fueron colocados en carriles del gel que se corrió a 130 V a  $4^\circ\text{C}$ , posteriormente se incubó el gel en solución de triton 100X al 2.5 % en agitación constante a temperatura ambiente 1 h y entonces se cortaron las nueve tiras y se incubaron por separado a  $37^\circ\text{C}$  durante toda la noche en solución de amortiguador de acetatos-DTT 1mM pH 7.1 mas el inhibidor deseado en cada caso, excepto el control que no lleva. En la parte superior se indica el inhibidor empleado en cada caso. A la izquierda se indica la posición y el peso molecular de los marcadores.

En la figura 17 se muestra la inhibición de proteasas de sobrenadante de tripomastigotes, este sobrenadante fue concentrado a la mitad de su volumen. Se observó que la banda de 45-60 kDa es inhibida completamente por E-64 y leupeptin y casi totalmente por TLCK, 1,10-fenantrolina la inhibió alrededor de la mitad y no fue inhibida por el resto de los inhibidores. El duplete de 70-75 kDa solo es inhibido un poco por 1,10-fenantrolina y no lo es por los restantes inhibidores, finalmente la banda de 112 kDa no es inhibida por ninguno de los inhibidores empleados.



**FIGURA 17.** Inhibición de proteasas de sobrenadante de tripomastigotes. Se incubaron  $3 \times 10^7$  tripomastigotes en 1 ml de D-MEM sin SEB a 37°C durante 2 h, se concentró este sobrenadante a la mitad de su volumen y 17  $\mu$ l de este fueron colocados en carriles del gel que se corrió a 130 V a 4°C, posteriormente se incubó el gel en solución de triton 100X al 2.5% en agitación constante a temperatura ambiente 1 h y entonces se cortaron las nueve tiras y se incubaron por separado a 37°C durante toda la noche en solución de amortiguador de acetatos-DTE 1mM pH 7.1 más el inhibidor, excepto el control que no lleva. En la parte superior se indica el inhibidor empleado en cada caso. A la izquierda se indica la posición y el peso molecular de los marcadores.

En la tabla IV se resume la inhibición de proteasas en extractos de epimastigotes y tripomastigotes, como se puede ver la banda de 45-60 kDa que es común entre los extractos y sobrenadantes posee al menos dos clases de proteasas, de sistema (mayoritariamente o



más activas) y metaloproteasas. La(s) proteasas del área de 70-75 kDa que son comunes en los sobrenadantes de ambos estadios y en el extracto de epimastigotes, no lograron ser inhibidas con nada en el sobrenadante de tripomastigotes, pero en el sobrenadante de epimastigotes parece que corresponden a metaloproteasas, mientras que en el extracto parecen existir tanto proteasas de cisteína como metaloproteasas. Mientras que las de 112 kDa del extracto de tripomastigotes y la más de 112 kDa del mismo son proteasa de cisteína.

TABLA IV.

Inhibición de las diferentes bandas de actividad proteolítica en sobrenadantes y extractos bajo la presencia de cada inhibidor específico de proteasas

	45-60 kDa				70-75 kDa			112 kDa	>112 kDa
	E <sub>ext</sub>	E <sub>ep</sub>	T <sub>ext</sub>	T <sub>ep</sub>	E <sub>ext</sub>	E <sub>ep</sub>	T <sub>ext</sub>	T <sub>ext</sub>	T <sub>ext</sub>
EDTA	51±8	50	42±42	26±26	27±26	58	12±12	58	29
1,10-Fenantrolina	5±5	50±50	80	53±5	16±16	35	18±7	58	0
Bestatina	2±1	3±3	0	0	0	0	8±8	23	51±4
PMSF	21±19	0	23±23	12±12	10±10	0	24±24	0	0
TLCK	93±6	74	100±0	93 2±0 5	99	74	0	100	0
Leupeptin	60±40	100±0	100	100	100	78	26±20	100	100
E-64	76±17	100±0	100±0	100	48±40	100	22±21	100	90
Pepstatina	55±22	0	60±2	12±9	66±11	0	33±22	0	37±22

E<sub>ext</sub> y E<sub>ep</sub> Representan el extracto y sobrenadante de epimastigotes respectivamente

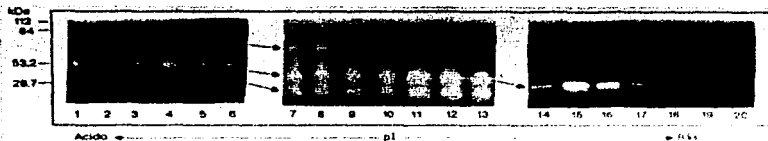
T<sub>ext</sub> y T<sub>ep</sub> Representan el extracto y sobrenadante de tripomastigotes respectivamente

El porcentaje de inhibición relativo fue determinado midiendo la densidad óptica de las bandas de actividad proteolítica por medio del programa RFLPscan 3.0 (Scanalytics) para Windows.

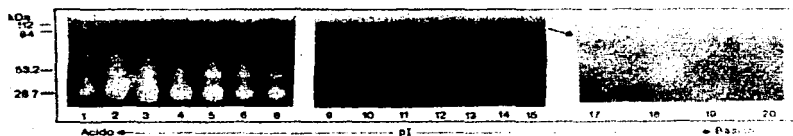
**FALTA PAGINA**

No. 64

Del segundo refraccionamiento, ahora aparecen a pH ácido las mismas proteasas que no logramos separar con el primer fraccionamiento, a excepción de la 1 en la que solo aparece la banda de aproximadamente 35-40 kDa. Lo que tal vez vale la pena hacer notar, es que en este segundo refraccionamiento se logra separar por completo del resto de las proteasas la que posee un peso mayor a 112kDa (fracciones 9-14), en tanto que la de 112 aparece a partir de la 15 hasta la de 20 (fig 19). En la tabla V se resume el peso de las bandas encontradas en cada fracción, así como el pH de todas las fracciones obtenidas. Como se observa en esta última tabla hay varias zonas de actividad proteolítica que tienen un amplio pI, o bien diferentes, ver fig. 18 de las fracciones 13 a la 20, aquí la banda de 45-60 kDa aparece en diferentes pI.



**FIGURA 18** Primer refractionamiento de extracto de epimastigotes. Se preparo un extracto de epimastigotes con una concentración de 2.84 mg/ml de proteína total que se sometió a un electroforesis durante 6 h a 4°C empleando anfólitos de 3/9. Las 20 fracciones obtenidas de este tratamiento fueron corridas en un gel de acrilamida-bisacrilamida copolimerizado con gelatina al 2% a 130 V a 4°C después incubadas a temperatura ambiente en solución de triton 100X al 2.5% con agitación constante y finalmente incubadas a 37°C toda la noche en solución de amortiguador de acetatos-DTT 1mM, pH 5.6. En la parte inferior se señala el número de fracción y a la izquierda la posición y peso molecular de los marcadores.



**FIGURA 19** Segundo refractionamiento de extracto de epimastigotes. Se juntaron todas las fracciones del primer refractionamiento con pH 7 mismas que se sometieron a un electroforesis durante 6 h a 4°C empleando anfólitos de 5/7. Las 18 fracciones obtenidas de este tratamiento fueron corridas en un gel de acrilamida-bisacrilamida copolimerizado con gelatina al 2% a 130 V a 4°C después incubadas a temperatura ambiente en solución de triton 100X al 2.5% con agitación constante y finalmente incubadas a 37°C toda la noche en solución de amortiguador de acetatos-DTT 1mM, pH 5.6. En la parte inferior se señala el número de fracción y a la izquierda la posición y peso molecular de los marcadores.

**TABLA V.**

Tabla de fracciones obtenidas durante los refraccionamientos de extracto de epimastigotes y el pH al que se separaron las fracciones

PRIMER REFRACCIONAMIENTO			SEGUNDO REFRACCIONAMIENTO		
FRACCION No	pH	PIESO DE LACS) (BANDAS) kDa	FRACCION No	pH	PIESO DE LACS) (BANDAS) kDa
1	3	40/35, 60/45, 75/70	1	5.5	40/35
2	3	"	2	5.5	40/35, 60/45
3	3.5	"	3	5.5	"
4	4	"	4	6	"
5	5	"	5	6	40/35, 60/45, 75/70
6	6	"	6	6	"
7	6	"	7	N.D.	N.D.
8	6	"	8	6.5	"
9	6.5	"	9	6.5	>112
10	7	"	10	6.5	"
11	7	"	11	7	"
12	7	"	12	7	"
13	7	"	13	7.5	"
14	7	45	14	7.5	"
15	7	"	15	7.5	"
16	7	"	16	N.D.	N.D.
17	7	45, 112, >112	17	7.5	112, >112
18	8	"	18	7.5	"
19	9	112, >112	19	8	"
20	9	45, 112, >112	20	8	"

N.D. : No Determinada

## V. DISCUSION

Dentro del estudio de moléculas que participan en la interacción célula huésped-parásito, se ha encontrado que enzimas como las proteasas son importantes para que muchos patógenos se establezcan en el huésped y se desarrolle la enfermedad. Estas proteasas facilitan la entrada de los parásitos a la célula blanco, intervienen en el metabolismo, en la sobrevivencia de estos y en la evasión de los mecanismos de destrucción de patógenos generados por el huésped (McKerrow, 1989, North y col 1990). En *Trypanosoma cruzi* se ha encontrado que estas enzimas son importantes para que esta lleve a cabo el desarrollo de la enfermedad de Chagas. El estudio de proteasas de *Trypanosoma cruzi* se ha enfocado en tres principales líneas de investigación, llevadas a cabo por diferentes grupos en América. Uno de ellos es el de Cazzulo y col (Bontempi y col 1984; Cazzulo y col 1989, 1990a, 1990b, Raimondi y col 1991) en Argentina, que han estudiado el papel de la principal proteasa del parásito involucrada en el metabolismo y la invasión al huésped y cuya identificación y purificación los llevó a proponer que se trataba de una proteasa de cisteína homóloga a la L-catepsina. Por su parte Scharfstein y col (Scharfstein y col. 1985, 1986) en Brasil encontraron que el principal antígeno reconocido por sueros de pacientes infectados por *Trypanosoma cruzi* era una glicoproteína de 51-57 kDa, a la que denominaron GP57/51 y que al ser secuenciada resultó ser la misma proteasa identificada por el grupo de Cazzulo. Finalmente McKerrow y col (Eaking y col 1990), desarrollaron una técnica para clonar genes de proteasas de cisteína de parásitos (entre ellas la cruzipaina) y han utilizado tales proteasas como blanco para tratamiento con drogas antiparasitarias (McKerrow y col. 1995). En este trabajo se estudiaron las proteasas de extractos y sobrenadantes de epimastigotes y tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*, la razón de estudiarlas en dos estados y, además, en extractos y sobrenadantes fue la de comparar diferencias y/o similitudes en la actividad proteolítica en uno y otro. Lo anterior con base en la premisa de que la principal proteasa se encontraba presente en los tres

estadios (Campetella y col. 1990) Esto resulta muy importante pues al encontrar enzimas similares sería posible inhibirlas afectando al mecanismo en el que estén interviniendo y que posiblemente sea útil para el parásito. De ser cierto lo anterior el estudio de las proteasas puede resultar una herramienta importante para el desarrollo de métodos de prevención para la infección por *T. cruzi*. También, existe interés en el papel que puedan estar jugando este tipo de enzimas en la interacción huésped-parásito, ya que resulta importante saber si las proteasas de secreción son similares o no a las de extractos en ambos estadios. Las posibles diferencias nos habrían del posible papel de unas y otras en tal interacción, pues, tal vez, ellas sean importantes en el establecimiento del parásito y el desarrollo de la enfermedad.

De nuestros resultados podemos decir que, como se vio en la figura 1 y 2, la actividad proteolítica en extractos de tripomastigotes y epimastigotes se favorece al incrementar la cantidad de proteína total del extracto y el tiempo de incubación con el sustrato. Lo cual era de esperarse pues al ser incrementada la concentración de proteína total se incrementa de igual manera la de proteasas y, por lo tanto, la degradación del sustrato es mayor. Como se ve en ambas figuras la técnica colorimétrica empleada aquí no es suficientemente sensible, puesto que, se necesitan cantidades muy grandes de proteína total del extracto e incubar por lo menos durante 48 h para tener lecturas que nos permitan observar diferencias evidentes entre cada punto y cada condición empleada (ausencia y presencia de activadores, diferentes temperaturas de incubación y diferentes fases de crecimiento del parásito, así como diferencias de un estadio a otro). Esto podría deberse al sustrato empleado, pues al menos para la principal proteasa de superficie de *Leishmania* (gp63) se ha observado que la actividad proteolítica depende del sustrato empleado (Chaudhuri y Chang, 1988, Tzania y Soteriadou, 1991)

La actividad proteolítica de extracto de epimastigotes y tripomastigotes en función al tiempo de incubación (fig 3), fue como se esperaba, superior mientras mayor fue el

tiempo de incubación con el sustrato y al parecer si se hubiera continuado hasta periodos superiores se hubiera alcanzado mayor degradación. En cuanto a las diferencias entre los dos extractos (que se aprecia mejor a las 48 h de incubación con el sustrato) aquí se ve una clara diferencia entre la actividad de ambos extractos, siendo la de epimastigotes significativamente superior a la de tripomastigotes, tanto en presencia como en ausencia de EDTA y L-cisteína. Esto concuerda con las observaciones de Campetella y col. en 1990 quienes observaron que la actividad proteolítica en amastigotes y tripomastigotes era 10 veces menor a la de epimastigotes (cepas Tul 0, Tul 2, AWP, Corpus Christi, Y, Peru, Sonia y la clona CA-1/72), lo cual es reflejo de la regulación diferencial de tal actividad según el estadio del parásito a lo largo de la metaciclo-genesis del parásito, pues los epimastigotes poseen mayor actividad proteolítica que los tripomastigotes metacíclicos (Bonaldo y col., 1991).

Durante la evaluación de la actividad proteolítica en cultivos y sobrenadantes de epimastigotes y tripomastigotes ( figuras 4-8) se ve que, en comparación con la actividad en los extractos, la actividad de los cultivos es superior y, además, se requieren de tiempos de incubación relativamente pequeños para observar degradación de sustrato. La hipótesis más simple es la posibilidad de que una parte importante de la actividad se deba a proteasas en la superficie del parásito, como en el caso de *Leishmania* ( Eiges y col., 1986) y/o de secreción. Por ello se comparó la actividad proteolítica del cultivo incubado con el sustrato y la actividad del sobrenadante incubado solo. El propósito de haber analizado la actividad proteolítica en los epimastigotes vivos bajo dos temperaturas y dos fases de crecimiento fue evaluar si existía variación de la expresión de proteasas de acuerdo a la fase de crecimiento o la diferencia de temperatura a la que se conservan los cultivos, sin embargo, se observó que no existían diferencias, si no se altera la composición del medio de cultivo, pues ello resulta en alteraciones a la expresión de proteasas, conforme a lo descrito con anterioridad para esta fase del parásito, de otra manera la actividad se conserva, (Pance y Henríquez, 1992). Es claro, tanto en epimastigotes como en tripomastigotes ( tablas I y II



respectivamente), que la mayor actividad proteolítica parece estar dada por proteasas que se encuentran asociadas al parásito, las cuales tal vez podría estar siendo empleadas por el parásito durante la metacicloogénesis (Bonaldo y col 1991) o bien para interactuar con moléculas de la superficie del huésped (Santana y col. 1996). Por otro lado, las proteasas de secreción podrían estar interviniendo durante el metabolismo del parásito y su sobrevivencia en ambientes desfavorables (Harth y col 1993, Meirelles y col 1992). Finalmente, debido a que se mide actividad total, un método colorimétrico no permite distinguir, ni en extractos ni sobrenadantes, la contribución a la actividad proteolítica que tienen diferentes clases de proteasas. Si bien se logra ver alguna inhibición al adicionar EDTA a los sistemas, no podemos asegurar que de verdad se han inhibido alguna(s) proteasas del tipo de metalo dependientes, o bien que las condiciones del sistema al agregar los estabilizadores (EDTA y L-cisteína), ya no sean las mismas para poder degradar el sustrato en ausencia de tales estabilizadores. Este método es poco sensible porque requiere de grandes cantidades de proteína total y además los tiempos de incubación (al menos en extractos) son muy prolongados si se desean comparar diferentes condiciones de incubación, tal vez si se tuviera el sustrato específico para la mayoría de estas proteasas, ello resultaría en el incremento de la sensibilidad de la prueba.

Por lo anterior, se decidió usar la electroforesis, en presencia del sustrato gelatina. Con ello se esperaba reducir la cantidad de material biológico empleada y visualizar bandas de las diferentes proteasas. Además, valiéndose del uso de inhibidores de proteasas específicos se podría determinar a que grupo de proteasa corresponden y, de esta manera saber si son las mismas en los epimastigotes que en los tripomastigotes. Empleando este procedimiento se logró ver de manera muy clara la diferencia entre la actividad proteolítica de extractos y sobrenadantes de cultivo de epimastigotes y tripomastigotes (fig 9) y no solo determinar en donde hay mayor actividad, sino que también, identificar las bandas de actividad comunes y las diferentes (fig 13). Existen bandas de actividad proteolítica comunes en los extractos y sobrenadantes de los dos estadios, lo que podría sugerir que se trata de la misma enzima (Bonaldo y col 1991). Podría proponerse que las proteasas que se encuentran de manera constitutiva en el parásito serían secretadas,

apareciendo de esta manera en sobrenadantes. Sin embargo, se vio que las proteasas son más activas a diferentes pH's, dependiendo de su proveniencia (extracto o sobrenadante). Dado que las proteasas de extractos actúan mejor a pH 5.6, se podría sugerir que corresponden a enzimas de origen lisosomal (Bontempi y col. 1989, Cazzulo y col. 1990b; Souto-Padrón y col. 1990) empleadas por el parásito para digerir proteínas exógenas incorporadas por pinocitosis como fuente de aminoácidos (Bontempi y col. 1989). En tanto que las proteasas de sobrenadante actúan mejor a pH ligeramente básico, lo cual nos podría sugerir su posible intervención durante la interacción con su célula blanco.

Para saber si las proteasas comunes en uno y otro estadio son de la misma clase, se usó una batería de inhibidores de proteasas específicos. Esto además, podría indicarnos hacia que tipo de inhibidores debe dirigirse el diseño de agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de la enfermedad por inhibición de las proteasas del parásito (McKerrow y col. 1995). Como se apreció la mayor actividad proteolítica en extracto de epimastigotes (fig. 14) se debe a por proteasas del tipo de cisteína que ya habían sido identificadas y que por el peso molecular, coinciden aproximadamente con las de este estudio (Murta y col. 1990, Campetella y col. 1990, Honaldo y col. 1991, Greig y Ashall, 1990). Además, hay en la zona de 45-60 kDa inhibición por 1,10-fenantrolina con forme a lo reportado ya por Lowndes y col. en 1996 y por tanto pensamos que existen en esta banda componentes con características de metaloproteasas. Todas estas proteasas podrían estar interviniendo en el metabolismo del parásito así como metacicloogénesis dentro del vector. Por otro lado, la inhibición de las proteasas del extracto de tripomastigotes (figura 15) muestra el mismo patrón de inhibición que en extracto de epimastigotes, excepto que, aquí los inhibidores de proteasas de cisteína, inhiben completamente todas las proteasas del extracto, si bien, nuevo la banda de 45-60 kDa también se inhibe ligeramente por 1,10-fenantrolina. Es factible que en esta misma zona existen proteasas del tipo metal-dependiente y proteasas de cisteína. Adicionalmente, en el sobrenadante de epimastigotes (fig. 16) hay muy poca actividad proteolítica comparada con la del sobrenadante de tripomastigotes. Esto podría deberse a que los tripomastigotes constituyen la fase infectiva y que por lo tanto

necesitarían en teoría, secretar más proteasas, no solo para sobrevivir en circulación dentro del humano, sino también para entrar a la célula blanco. En cambio, los epimastigotes cuya replicación es extracelular y en el vector no lo requerían. Aún así, la actividad proteolítica presenta el patrón similar de inhibición para los extractos y sobrenadante de tripomastigotes, y al parecer, la mayor actividad proteolítica esta dada por proteasas del tipo de cisteína y al parecer metaloproteasas.

Con el antecedente de que existían diferentes isoformas de la cruzipaina (Eakin y col. 1992; Martínez y col. 1992), se pensó que sería interesante analizar si en el extracto de epimastigotes era posible resolver las bandas en otras isoformas de proteasas que presentarían un corrimiento similar en SDS/PAGE. Para ello se hizo la separación por medio de un enfoque isoelectrónico (fig. 18 y 19). Esto nos permitió observar que las diferentes bandas de actividad proteolítica poseen microheterogeneidad, es decir, diferentes pI en las bandas del mismo peso molecular. Lo anterior indica que podría tratarse de isoformas de una sola enzima (ver fig. 18, fracciones 13, 16 y 20). Si bien, es cierto las bandas precipitaron con un amplio espectro de pI. La figura 18 muestra claramente como la banda de 45-60 kDa aparece en las fracciones con pI 7 y 9 del primer refraccionamiento (tabla V). Esta banda de 45-60 kDa podría tener dos isoformas distintas con peso molecular semejante pero diferente pI. La banda que apareció debajo de la de 45-60 kDa podría corresponder al producto de degradación de la cruzipaina identificado anteriormente por Scharfstein y col. en 1985 y 1986. Hubiera sido interesante ver si lo mismo sucedía en el extracto de tripomastigotes y los sobrenadantes, pero ello no fue posible, debido a que no se disponía de la cantidad de material biológico suficiente para esta técnica.

Faltaría aún saber si la banda de 45-60 kDa que aparece con un pI de aproximadamente 7 es sensible a los mismos inhibidores de proteasas que la de pI de 9, con lo cual podríamos estar más seguros de que se trata de una isoforma y no de otra clase de proteasa con un corrimiento electroforético similar.

## VI. CONCLUSIONES.

- Por el método colorimétrico se lograron detectar diferencias en la actividad proteolítica entre las proteasas de extracto de epimastigotes y tripomastigotes, habiendo mayor actividad proteolítica en el extracto de epimastigotes que en el de tripomastigotes
- La mayor actividad proteolítica de epimastigotes y tripomastigotes en cultivo, está posiblemente dada por proteasas de superficie.
- Por medio de electroforesis, se detectaron cuatro principales zonas de actividad proteolítica: Una de 60/45 kDa presente en extractos y sobrenadantes de epimastigotes y tripomastigotes; una de 75/70 kDa presente en extractos y sobrenadante de epimastigotes y en sobrenadante de tripomastigotes, una de 112 kDa presente en extracto y sobrenadante de tripomastigotes y otra de más de 112 kDa presente solo en extracto de tripomastigotes
- Las proteasas de extractos presman su mayor actividad a pH ácido (5-6) mientras que las de sobrenadante lo hacen a pH fisiológico (7-1)
- La mayor inhibición está dada por inhibidores de proteasas de cisteína, indicando que gran parte de la actividad proteolítica en *T. cruzi* está dada por proteasas de ese tipo. La inhibición parcial de algunas zonas de actividad por 1,10-fenantrolina nos indica también la presencia de metaloproteasas.
- Mediante el electroisoeñoque de proteínas de extracto de epimastigotes se logró separar la banda de 60/45 kDa y otra de más de 112 kDa.

## VII. BIBLIOGRAFIA.

1. Andrade, E. F., Vermelho, A.B., Branquinha, M.H., Cruz, W. B. and Meirelles, M.N. 1996. Proteinases of heart muscle cells infected with *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 91:211.
2. Araújo-Jorge, T.C., Sampaio, E.P., De Souza, W. 1986. *Trypanosoma cruzi*. Inhibition of Host Cell uptake of Infective Bloodstream Forms by Alpha-2-Macroglobulin. Z. Parasitenk. 72:323-329
3. Ashall, F., Angliker, H., Shaw, E. 1990. Lysis of trypanosomes by peptidyl fluoromethyl ketones. Biochem. Bioph Res Comm. 170: 923-929.
4. Ashall, F., Harris, D., Roberts, H., Healy, N., Shaw, E. 1990. Substrate specificity and inhibitor sensitivity of a trypanosomatid alkaline peptidase. Biochim. Bioph. Acta 1035: 293-299.
5. Ashall, F. 1990. Characterization of an alkaline peptidase of *Trypanosoma cruzi* and other trypanosomatids. Mol. Biochem. Parasitol. 38: 77-88.
6. Athias, A. y Neghme, A. 1984. Parasitología Clínica. Editorial Mediterráneo. Chile pp 238-251.
7. Beynon, R. J. and Bond, J. S. 1989. Proteolytic Enzymes. A practical approach

8. Biagi, F., Tay, J., Guzmán, G., Fong, P. 1964. Tetitlán Guerrero, Foco Endémico de Enfermedad de Chagas en México. Rev. Fac. Med. (Méx ) 6: 625-631.
9. Bonaldo, M., D'Escoffier, L., Salles, J., Goldenberg, S. 1991. Characterization and expression of proteases during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. Exp. Parasitol. 73: 44-51.
10. Bongertz, V. and Hungerer, K. 1978. *Trypanosoma cruzi*: Isolation and characterization of a protease. Exp. Parasitol. 45: 8-18.
11. Bontempi, E., Franke, B., Ruiz, A. and Cazzulo, J. 1984. Purification and some properties of an acidic protease from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Comp. Biochem. Physiol. 77B: 599-604.
12. Bontempi, E., Martínez, J. and Cazzulo, J. 1989. Subcellular localization of a cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 33: 43-48.
13. Bontempi, E. and Cazzulo, J. 1990. Digestion of human immunoglobulin G by the major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. FEMS Microbiol. Lett. 70: 337-342.
14. Bordier, C. 1987. The Promastigote Surface Protease of *Leishmania*. Parasitol. Today. 5: 151-153.
15. Brand, T., von. 1973. Biochemistry of Parasites. Aca Press New York. pp 268-273.

16. Burleigh, B. and Andrews, N. 1995. A 120 kDa alkaline peptidase from *Trypanosoma cruzi* is involved in the generation of a novel  $Ca^{2+}$ -signaling factor for mammalian cells. *J Biol. Chem.* 270 5172-5180
17. Campella, O., Martinez, J., Cazzulo, J.J. 1990. A Major Cysteine Proteinase is Developmentally Regulated in *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol Lett* 67:145-150.
18. Cazzulo, J.J., Couso, R., Raimondi, A., Wernstedt, C. and Hellman, U. 1989. Further Characterization and Partial Amino Acid Sequence of a Cysteine Proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem Parasitol* 33 33-42.
19. Cazzulo, J., Cazzulo M., Martinez, J. and Franke, B. 1990a. Some kinetic properties of a cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. *Bioch. Bioph. Acta* 1037:186-191.
20. Cazzulo, J., Hellman, U., Couso, R., Parodi, A. 1990b. Amino acid and carbohydrate composition of a lysosomal cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. Absence of phosphorylated mannose residues. *Mol Biochem Parasitol* 38 41-48.
21. Chaudhuri, G., Chang, K. 1988. Acid protease of a major surface membrane glycoprotein (gp63) from *Leishmania mexicana* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 27: 43-52.
22. Chagas, C. 1909. Nova Tripanosomíaze Humana. Estudo sobre lo Morfologia o ciclo Evolutivo de *Schizotripanum cruzi* gen. n. sp. Agente Etiológico de Nova Entidade Morbida do Men. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1: 159-218.

23. Chang, C. S. and Chang, K. P. 1986. Monoclonal Antibody Affinity Purification of a *Leishmania* Membrane Glycoprotein and its Inhibition of *Leishmania*-Macrophage Binding. Proc Nat Acad Sciences 83:100-104.
24. Chiari, E. y Camargo, E.P. 1984. Culturing and Cloning of *Trypanosoma cruzi*. Genes and Antigens of Parasites. Morel, Ed. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil pp 23-26.
25. Dvorak, J.A. and Hyde, T.P. 1973. *Trypanosoma cruzi*. Interaction with Vertebrate Cells *in vitro*. Individual Interactions at the Cellular and Subcellular Levels. Exp Parasitol 34:268-283.
26. Eakin, A., Mills, A., Harth, G., McKerrow, J. and Craik, C. 1992. The sequence, organization and expression of the major cysteine protease (cruzin) from *Trypanosoma cruzi*. J Biol Chem 267:7411-7420.
27. Etges, R., Bouvier, J., Bordier, C. 1986. The major surface protein of *Leishmania* promastigotes is a protease. J Biol Chem. 261: 9093-9101.
28. Fernandes, L., Bastos, I., Lauria-Pires, L., Vexenat, A., Grellier, P., Schrével, J., Teixeira, A. and Santana, J. 1996. The alkaline 120 kDa and the ATP-activated proteases of *Trypanosoma cruzi* are immunogenic in human infection. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 91:246.
29. Goldsmith, R. S., Zárate, T., Kagan, L.G., Cedeño, F.J., Galindo, V.M., Paz, E.A. 1978. El potencial de la enfermedad de Chagas por transfusión sanguínea. hallazgos serológicos entre donadores en el estado de Oaxaca. Sal Púb. Méx. 20:439-444.



30. Goldsmith, R. S., Zárate, R. J., Zárate, L. G., Kagan, Y., Jacobson, L. B. 1985 Clinical and epidemiologic studies of Chagas' disease in rural communities in Oaxaca state Mexico, and a seven-years follow-up. Y. Cerro del Aire. PAHO Bull. 19: 120-138
31. Greig, S. and Ashall, F. 1990 Electrophoretic Detection of *Trypanosoma cruzi* Peptidases. Mol. Biochem. Parasitol. 39: 31-38
32. Grellier, P., Picard, I., Bernard, F., Mayer, R., Heidrich, H., Monsigny, M., Schrével 1989. Purification and identification of a neutral endopeptidase in *Plasmodium falciparum* schizonts and merozoites. Parasitol. Res. 75: 455-460
33. Harth, G., Daidaris, G. and So, M. 1987. Neuraminidase from *Trypanosoma cruzi*: analysis of enhanced expression of the enzyme in infectious forms. Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 8320.
34. Harth, G., Andrews, N., Mills, A. A., Engel, J. C., Smith, R. and McKerrow, J. H. 1993. Peptide-Fluoromethyl Ketones Arrest Intracellular Replication and Intercellular Transmission of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 58: 17-24
35. Helssen, C. and Dowdle, E. 1980. Electrophoretic Analysis of Plasminogen Activators in Polyacrylamide Gels Containing Sodium Dodecyl Sulfate and Copolymerized Substrates. Anal. Biochem. 102: 196-202
36. Hecaly, N., Greig, S., Enahoro, H., Roberts, H., Drake, L., Shaw, E. 1992. Detection of peptidases in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes using chromogenic and fluorogenic substrates. Parasitol. 104: 315-322.

37. Hellman, U., Wernstedt, C. and Cazzulo, J. 1991. Self-proteolysis of the cysteinase, cruzipain, from *Trypanosoma cruzi* gives a major fragment corresponding to its carboxy-terminal domain. *Mol Biochem. Parasitol.* 44: 15-22.
38. Itow, S., Camargo, P. 1977. Proteolytic activities in cell extracts of *Trypanosoma cruzi*. *J. Protozool.* 24: 591-595.
39. Joiner, K.A., Hieny, S., Kirchhoff, L.V., Sher, A. 1985. GP72, the 72 kilodalton glycoprotein is the membrane acceptor site for C3 on *Trypanosoma cruzi*. *J. Exp. Med.* 161: 1196.
40. Katz, M., Despommier, D., Gwadz, R. 1988. *Parasitic Diseases* Edited by Springer-Verlag. 2<sup>nd</sup> ed. New York. 301 pp.
41. Keene, W. E., Fetitt, M.A., Allen, S. and McKerrow, J.H. 1986. The Major Neutral Proteinase of *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* 163: 536-549.
42. Lima, A.P., Tessier, D.C., Thomas, D.Y., Scharfstein, J., Storer, A.C. and Vernet, T. 1994. Identification of New Cysteine Protease Gene Isoforms in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 67: 333-338.
43. Lowndes, C., Bonaldo, M., Thomaz, N., Goldenberg, S. 1996. Heterogeneity of metalloprotease expression in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol.* 112: 393-399.
44. Lozano, K., Hernández, G., Kasten, M., García, O., Lomeli, E., Ramírez, A. 1995. Megaeosófago por enfermedad de Chagas en la infancia. Un caso en el estado de Jalisco. Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales. Universidad de Guadalajara.

45. Lozano, K., Sánchez, C., González, B., Prata, A., Reis, L. 1993. Doença de Chagas Aguda em Mulher de 80 Anos no México. Relato Anatomopatológico. Rev Soc Bras Med. Trop. 26: 231-235
46. Martínez, J. and Cazualo, J. 1992. Anomalous electrophoretic behaviour of the major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* in relation to its apparent molecular mass. FEMS Microbiol Lett. 74:225-229
47. Mazzotti, L. 1940. Dos casos de Enfermedad de Chagas en el estado de Oaxaca. Gac Med. Mex. 70:417-420
48. Mazzotti, L. y Dias, E. 1949. Resumen de los publicados sobre enfermedad de Chagas en México. Rev Soc Mex Hist Nat 10:103-111
49. McGrath, M., Eakin, A., Engel, J., McKerrow, J., Craik, C., Fletterick, R. 1995. The crystal structure of cruzain. A therapeutic target for Chagas' disease. J. Mol. Biol. 247: 251-259.
50. McKerrow, J. 1989. Parasites Proteases. Exp Parasitology 68:111-115.
51. McKerrow, J. 1993. The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. Annu. Rev Microbiol. 47:821-853.
52. McKerrow, J.H., McGrath, M.E. and Engel, J.C. 1995. The Cysteine Protease of *Trypanosoma cruzi* as a Model for Antiparasite Drug Design. Parasitol. Today. 11:279-282.

53. Meirelles, M., Juliano, L., Carmona, E., Silva, S., Costa, E., Murta, A. and Scharfstein, J. 1992. Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51), impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* *in vitro*. Mol Biochem Parasitol. 52: 175-184.
54. Meyer, H., Musacchio, M.O. and Mendonça, I.A. 1958. Electron Microscopic Study of *Trypanosoma cruzi* in Thin Sections of Infected Tissue Cultures and Blood agar Forms. Parasitol. 48: 1-8.
55. Monteiro, A., Abrahamson, M., Yong, V. and Scharfstein, J. 1996. Cloning and expression of a novel *T. cruzi* inhibitor of cysteinyl proteinases. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 91: 268.
56. Mott, K.E., Muñoz, T.M., Lehman, J.S., Hoff, R., Morrow, R.H., de Olivera, T.M., Sherlock, Y., Draper, C. 1978. House Construction, Triatomine Distribution and Household Distribution os Seroreactivity to *Trypanosoma cruzi* in a Rural Community in Northeast Brazil. Am J Trop. Med Hyg. 27: 1116-1122.
57. Murta, A., Persechini, P., Souto-Pradon, T., Souza, W. de, Guimaraes, J. and Scharfstein, J. 1990. Structural and functional identification of GP57/51 antigen of *Trypanosoma cruzi* as a cystein proteinase. Mol Biochem Parasitol. 43: 27-38.
58. Noble, E., Noble, S., Schand, G. and McInnes, A. 1989. Parasitology, the biology of animal parasites. Edited by Lea and Febiser. 2th ed. Londres. pp 28-34.

59. Nóbrega, O., Dos Santos Silva, M., Teixeira, A. and Santana, J. Further characterization and molecular cloning of an ATP-activated cysteine protease of *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 91: 271
60. North, M., Mottram, J. and Coombs, G. 1990. Cysteine proteinases of parasitic protozoa. Parasitol Today. 6: 270-275
61. OMS. 1986. Epidemiología y control de la tripanosomiasis Informe de un comité de expertos de la OMS. Serie de Informes Técnicos No. 739. Ginebra. 98 páginas
62. OMS. 1991. Control de la Enfermedad de Chagas. Informe de un Comité de Expertos de la OMS. Serie Informes Técnicos No. 811. Ginebra. 101 páginas
63. Ouassi, M. A., Cornette, J. and Capron, A. 1986. Identification and Isolation of *Trypanosoma cruzi* Trypomastigote Cell Surface Protein with Properties Expected of a Fibronectin Receptor. Mol. Biochem. Parasitol. 19:201-211
64. Palencia, L. y Montaño, E. 1959. Un Nuevo Caso de Tripanosomiasis en México. Rev. Fac. Med. Méx. 1: 737-740
65. Pance, A., Henriquez, D. 1992. Changes in proteolytic activity during the growth of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Biochem. Int. 27:613-623
66. Pereira, M. 1983. A developmentally regulated neuraminidase activity in *Trypanosoma cruzi*. Science. 219:1444-1446

67. Pereira, M. 1990. Cellular, Immunological and Molecular Aspects. In *Modern Parasite Biology* Edited By Wyler, D.J. De. Freeman and Co. USA pp 64-78.
68. Piras, M.M., Henriquez, D and Piras, R. 1985. The Effect of Proteolytic Enzymes and Protease Inhibitors on the Interaction *Trypanosoma cruzi* - Fibroblasts. *Mol. Biochem. Parasitol.* 14:151-163.
69. Raimondi, A., Wernstedt, C., Hellman, U and Cazzulo, J. 1991. Degradation of oxidised insulin A and B chains by the major cystine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Mol Biochem. Parasitol.* 49: 341-344.
70. Rangel, H., Araujo, P., Repka, D., Costa, M. 1981. *Trypanosoma cruzi* Isolation and characterization of a proteinase. *Exp Parasitol.* 52: 199-209.
71. Reyes, P. 1984. Enfermedad de Chagas en México. *Arch. Inst. Cardiol. Méx.* 54: 1-2.
72. Reyes, P. 1993. Chagas' Disease in North America. *Am. Heart J.* 126: 1496.
73. Reyes, P. A., Marcuschmer, J.M. 1978. Enfermedad de Chagas en México. *Arch. Inst. Cardiol. Méx.* 48: 952-966.
74. Reyes, P., Mendoza, D., Marcuschmer, J., Garcia, C. 1983. Miocardiopatía congestiva y Tripanosomiasis americana. *Sal. Pùb. Méx.* 25: 139-144.

75. Rosenthal, P., McKerrow, J., Aikawa, M., Nagasawa, H., Leech, J.H. 1988. A malarial cysteine proteinase is necessary for hemoglobin degradation by *Plasmodium falciparum*. *J. Clin Invest* 82:1560-1566.
76. Rosenthal, P.J., McKerrow, J., Rasnick, D., Leech, J. 1989. *Plasmodium falciparum* inhibitors of lysosomal cysteine proteinases inhibit a trophozoite proteinase and block parasite development. *Mol. Biochem. Parasitol* 35: 177-184.
77. Salvesen, G. and Nagase, H. 1989. Inhibition of proteolytic enzymes. In proteolytic enzymes. Edited by J. Beynon and S. Bond. U.K. IRL Press. pp 83-104.
78. Salazar, P.M., De Haro, I., Tay, J., Bucio, M., Anzures, M., Flores, A. 1983. Primer Caso de Megalosofago con Serología Positiva a *Trypanosoma cruzi*. *Sal Pub Méx* 26: 452-455.
79. Salazar, P.M., Tay, J., Ruiz, H., De Haro, I., Bucio, M., Jiménez, J., García, Y., Gutiérrez, Q. 1984. Seropositividad a *Trypanosoma cruzi* en cuatro Grupos de una Población del Estado de Oaxaca. *Sal Pub Mex* 26: 589-1984.
80. Salazar, P.M., de Haro, I., Uribarren, B.T. 1988. Chagas' Disease in Mexico. *Parasitol. Today*. 4:348-352.
81. Salles, J., Thomas, N., Carreira Frago, M. and Goldenberg, S. 1996. Purification of a metalloproteinase constitutively expressed during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 91: 269.
82. Santana, J.M., Grellier, P., Rodier, M-H., Schrevel, J. and Teixeira, A. 1992. Purification and characterization of a new 120 kDa alkaline proteinase of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Bioph. Res. Comm* 187: 1466-1473.

83. Santana, J., Nóbrega, O., Santos Silva, M., Grellier, P., Schrével, J. and Teixeira, A. 1996. Novel acidic and neutral proteinases from *Trypanosoma cruzi*. Are they involved in the mechanism of mammalian host cell invasion? Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 91:53
84. Scharfstein, J., Luquetti, A., Murta, A., Senna, M., Rezende, M., Rassi, A. and Mendoça-Previato, L. 1985. Chagas' disease serodiagnosis with purified p25 antigen. Am. J. Trop. Med. Hyg. 34: 1153-1160.
85. Scharfstein, J., Schechte, M., Senn, M., Peralta, J.M., Mendoça-Previato, L. and Miles, M.A. 1986. *Trypanosoma cruzi* Characterization and Isolation of a 57/51,000 MW Surface Glycoprotein (GP57/51) Expressed by Epimastigotes and Bloodstream Trypomastigotes J Immunol 137:1336-1341
86. Serveau, C., Lalmanach, G., Juliano, M., Scharfstein, J., Juliano, L. and Gauthier, F. 1996. Investigation of the substrate specificity of cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, through the use of cystatin-derived substrates and inhibitors. Biochem. J. 313: 951-956
87. Souto-Padrón, T., Campella, O.E., Cazzulo, J.J. and De Souza, W. 1990. Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*. Immunocytochemical Localization and Involvement in Parasite-Host Cell Interaction. J. Cell Sci. 96:458-490.
88. Takle, G. and Sanry, D. 1993. South American trypanosomiasis (Chagas' disease). In Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infections. 3th Ed. by Warren, K. USA. pp 213-236



89. Tay, J., Navarrete, C., Corominas, E., Biagi, F. 1966. La enfermedad de Chagas en el municipio de Tuxpan, Michoacán Rev Fac Med. (México) 8:451-461
90. Tay, L., Goycolea, O., Biagi, F. 1961 Observaciones sobre la enfermedad de Chagas en la Mixteca Baja. Nuevo caso humano en la República Mexicana Bol. Ofia. Sanit. Panamer. 51:322-327.
91. Tay, J., Biagi, F., De Buen, A. 1968 Estado actual de conocimientos sobre la enfermedad de Chagas en el estado de Zacatecas. Medicina (México) 48:121-129
92. Tay, J., Ontiveros, D., Ortega, M. y Torres, J. 1969 Estado actual de los conocimientos sobre la enfermedad de Chagas en México. Bol. Oficina Sanitaria Panamericana 67:310-314.
93. Tay, J., Salazar, P., Velasco, C., De Haro, I., García Y., Gutiérrez, Q. 1979 Estudio epidemiológico de la enfermedad de Chagas en el estado de Jalisco, República Mexicana. Sal. Púb. Mex. 22:145-149.
94. Tay, J., Schenone, H., Sánchez, J.T., Robert, L. 1992 Estado Actual de los Conocimientos sobre la Enfermedad de Chagas en la República Mexicana. Bol. Chil. Parasitol. 47:43-53.
95. Tay, J., Salazar, P., Ontiveros, A., Jiménez, J., De Haro, I., García, Y., Gutiérrez, Q. 1986. Epidemiologic study of Chagas' disease in a town in Oaxaca, Mexico. PAHO Bull. 20358-365.
96. Toy, L., Pettit, M., Wang, Y., Hendstrom, R. and McKerrow, J. 1987. Molecular paradigms for eradicating helminthic parasites. A.R. Liss, New York. pp 85-103

97. Tzinia, A., Soteriadou, K. 1991. Substrate-dependent pH optima gp63 purified from seven strains of *Leishmania*. *Mol. Bioch. Parasitol.* 47: 83-90.
98. Trujillo, C. F., Covarrubias, P., Ocampo, G., López, L. y Gálvez, G. 1993. Megaeosófago Chagásico con Serología y Xenodiagnóstico Positivos. *Rev Gastroenterol Méx* 58: 36-38.
99. Trujillo, C. F., Lozano, K., Soto, G., Hernández, G. 1993. Prevalencia de infección a *Trypanosoma cruzi* en Donadores de sangre en Estado de Jalisco, México. *Rev Soc Bras Med Trop* 26: 89-92.
100. Trujillo, F. y Velasco, O. 1990. La Visceromegalia Digestiva por *T. cruzi* en México. *Medicina y Cultura* 5: 4-7.
101. Velasco, C. O., Valdespino, J. L., Tapia, C. R., Salvarriera, B., Guzman, B., Magos, C., Llausás, A., Gutiérrez, G., Sepúlvera, J. 1992. Seroepidemiología de la Enfermedad de Chagas en México. *Sal. Púb. Méx.* 34: 186-196.
102. Velasco, O., Cortés, J., Labastida, M., Melchor, A., Duarte, N., De Torre, R. 1985. La Enfermedad de Chagas en Santiago Yosotiche, Oaxaca, México. *Sal. Púb. Méx.* 27: 60-65.
103. Velasco, O., Guzmán, B. 1986. Importancia de la Enfermedad de Chagas en México. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 28: 275-28.
104. Verwaerde, C., Auriault, C., Neyrinck, J. L., and Capron, A. 1988. Properties of Serine Proteases of *Schistosoma mansoni schistosomula* Involved in the Regulation of IgE Synthesis. *Scand. J. Imm.* 27: 17-24.

105. Villalta, F., Lima, M. and Zhou, L. 1990. Purification of *Trypanosoma cruzi* surface proteins involved in adhesion to host cells. *Biochem Bio Res Comm.* 172(2):925-931.
106. Yokoyama-Yasunaka, J., Pral, E., Oliveira, O., Alfieri, S., Stolf, A. 1994. *Trypanosoma cruzi*. Identification of proteinases in shed components of trypomastigotes forms. *Acta Tropica* 57:207-315
107. Zavala, V., Rodriguez, L., Baqueiro, D. Enfermedad de Chagas en el estado de Yucatán, México. Informe de cuatro casos clinicos 1975 *Patologia (México)* 13:355-363.
108. Zingales, B., Andrews, N.W., Kuwajima, V. J. and Colli, W. 1982. Cell Surface Antigens of *Trypanosoma cruzi*: Interaction with Host Cells. *Curr Trop. Microb. Imm.* 117:129-152. Oxford/New York: IRL/Oxford Univ. Press

## APENDICE I.

### Medios de Cultivo para *Trypanosoma cruzi* y/o células Vero.

#### A) Medio LIT.

##### Composición por litro:

• Cloruro de sodio (NaCl)	4.0 g
• Cloruro de potasio (KCl)	0.4 g
• Bifosfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	8.0 g
• Glucosa	2.0 g
• Triptose: (DIFCO, núm. cat. 0269-17-7)	5.0 g
• Hemina <sup>1</sup> (SIGMA, núm. cat. H-2250)	25.0 mg
• Suero Fetal Bovino <sup>2</sup> (GIBCO, núm. cat. 200-614J)	100 ml

<sup>1</sup> Se pesan 0.25 g de hemina y se disuelven en 5 ml de trietanolamina (SIGMA, núm. cat. T-1377). Se esteriliza a través de una membrana de 0.22 $\mu$ . Se almacena a 4°C en la oscuridad.

<sup>2</sup> Se inactiva a 65°C durante 30 minutos.

##### Modo de preparación.

Se disuelven primero todas las sales en menos de 1000 ml de agua bidestilada, se ajusta el pH a 7.2 y se afora a 1000 ml. Se esteriliza en autoclave a 120°C y 1 atmósfera durante 20 min. Después se somete a una prueba de esterilidad dejándose a temperatura ambiente durante tres días en la oscuridad, al término de éste tiempo se adiciona la hemina y el suero fetal inactivado y se vuelve a realizar la prueba de esterilidad

## **B) Medio D-MEM.**

El medio D-MEM se encuentra disponible comercialmente. Para los experimentos se utilizó el de la marca GIBCO, núm de cat. 430-2100EC. Se disuelven un sobre de 13.4g y 3.7 g de  $\text{NaHCO}_3$  en menos de 1000 ml de agua bidestilada, se ajusta el pH 7.1-7.3. y se afora a 1000 ml. Se esteriliza por filtración con membrana de  $0.22 \mu$  y se realiza la prueba de esterilidad y, entonces, se complementa con el porcentaje deseado de SFB inactivado y glutamina, piruvato, vitaminas, aminoácidos no-esenciales y antibióticos al 1%.

## APENDICE II.

### Preparación de Soluciones Amortiguadoras.

- Solución Salina Balanceada de HANKS (HBSS).

Disolver 9.75 g de medio de Hanks (GIBCO, núm. de cat. 450-1200) en 950 ml de agua bidestilada, adicionar 0.35 g de  $\text{NaHCO}_3$  y ajustar a pH 7.1. Esterilizar por filtración.

- Amortiguador de acetatos pH 5.5.

Aforar a 1000 ml 48 ml de solución de ácido acético 0.2 M y 452 ml de acetato de sodio 0.2 M, esta solución tiene un pH de 5.5, si se desea otro ajustar el pH.

- PBS pH 7.2

Fosfato de sodio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.36 g
Fosfato de sodio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	1.10 g
Cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ )	9.00 g

- PSG pH 7.5.

Fosfato de sodio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.78 g
Fosfato de sodio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	13.48 g
Cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ )	4.25 g
Glucosa	5.0 g

Disolver en 950 ml de agua bidestilada y ajustar a pH 7.5. Aforar a 1000 ml y esterilizar por filtración.

### APENDICE III.

#### Electroforesis en Gel de Poliacrilamida/bisacrilamida copolimerizado con Gelatina.

La separación de las proteasas de extractos y sobrenadantes se realizó en una cámara Mini-Protean II Dual Slab Cell (Bio-Rad).

##### Preparación de geles.

###### a) Gel separador al 11%

• Acrilamida 30% - bisacrilamida 1%	1.15 ml
• 4X Tris-HCl 1.5 M - SDS 0.4% pH 8.8	1.125 ml
• PBS 1X	0.05 ml
• Gelatina 2% (0.02 g/ml)	0.450 ml
• Agua bidestilada	1.225 ml
Agitar al vacío durante 10 minutos y agregar	
• TEMED	0.005 ml
• Persulfato de amonio (100 mg/ml)	0.010 ml

###### b) Gel concentrador al 4%

• Acrilamida 30% -bisacrilamida 1%	0.210 ml
• 4X Tris-HCl 0.5 M - SDS 0.4% pH 6.8.	0.417 ml
• Agua bidestilada	1.017 ml
Agitar al vacío durante 10 minutos y agregar	
• Persulfato de amonio	0.0083 ml
• TEMED	0.0016 ml

c) Preparación de la muestra y condiciones de corrida.

Los extractos y sobrenadantes se mezclaron en una proporción 1:1 en amortiguador de muestra sin mercaptoetanol y se depositaron en los carriles respectivos de los geles. La corrida se realizó a 4°C a 130 V con amortiguador de corrida (Tris 25 mM, Glicina 192 mM y SDS 0.1 %).

d) Activación de Proteasas

Después de la corrida, el gel se incubó durante 1 h en solución de Tritón X-100 (SIGMA, núm. de cat. X-100) al 2.5%, a temperatura ambiente en agitación. Finalmente se incubó en solución de amortiguador de acetatos-DTT 1mM al pH deseado con o sin inhibidores de proteasas, a 37°C durante el tiempo deseado. Teñir con solución de negro amido al 0.1% en 10 % de ácido acético y 30 % de metanol, durante 1 h en agitación a temperatura ambiente. Desteñir las veces que sea necesario en el disolvente del negro amido. La actividad proteolítica se distingue por la presencia de zona clara en el fondo azul del gel.