



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Efecto de los inhibidores de proteasas en la estabilidad de extractos antigénicos para el diagnóstico de la infección por Trypanosoma cruzi

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :
B I Ó L O G A
P R E S E N T A:
ELIA TORRES GUTIÉRREZ



TUTORA: M. en C. MARTHA IRENE BUCIO TORRES

2006



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.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno
Torres
Gutiérrez
Elia
55 71 93 87
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
098078396
2. Datos del tutor
M en C
Martha Irene
Bucio
Torres
3. Datos del sinodal 1
Dra
Paz Maria Silvia
Salazar
Schettino
4. Datos del sinodal 2
M en C
Margarita
Cabrera
Bravo
5. Datos del sinodal 3
Dr
Guillermo
Salgado
Maldonado
6. Datos del sinodal 4
M en C
Yolanda
Guevara
Gomez
7. Datos del trabajo escrito
Efecto de los inhibidores de proteasas en la estabilidad de extractos
antigénicos para el diagnóstico de la infección por Trypanosoma cruzi
60 p
2006

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Biología de Parásitos de la Facultad de Medicina de la UNAM con apoyo económico parcial de Laboratorios Silanes, S.A. de C.V.

DEDICATORIA

A mis padres por el apoyo incondicional que siempre me han brindado en todos los aspectos, por la confianza que me dan y sobre todo por el cariño que siempre me hacen sentir.

A mi hermanito Fer por ser un motivo de orgullo para mí y por mantenerme actualizada en algunas materias.

A Iván por la amistad, el amor y todos los momentos que hemos compartido, por su comprensión y por que su cariño es una de mis grandes motivaciones.

A mis amigas de la Facultad: Nid, Soni y Mari porque fueron un gran apoyo durante la carrera y siempre puedo contar con ellas.

A mis compañeros del taller: Laura, Nelia, Rox, Rocío David y José Luis por los buenos tiempos.

A Caty por ser mi amiga incondicional desde hace.....mucho tiempo.

A toda la gente que en algún momento me ha brindado su amistad: mis compañeros y amigos de Basket, los de ingles, de la Prepa los de la fac y todos los que saben que cuentan con mi amistad.

Porque la vida seria muy aburrida sin ustedes.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Paz Maria Salazar por darme la oportunidad de formar parte de su equipo, además de todo el apoyo y confianza que me ha brindado.

A la M. en C. Martha Bucio por todo el conocimiento que hasta la fecha me sigue transmitiendo, por su paciencia y especialmente la confianza que me ha ofrecido.

A la M. en C. Margarita Cabrera por su apoyo, comprensión y las valiosísimas aportaciones a este trabajo.

A la M. en C. Yolanda Guevara por su apoyo en la revisión de la tesis y por los conocimientos transmitidos.

Al Dr. Guillermo Salgado por la revisión de este trabajo y porque en sus clases fomento mi gusto por la parasitología.

Al Dr. Edgar Centeno por las ideas aportadas.

A la Dra. Ingeborg Becker Fauser por los sueros proporcionados.

A la Dra. Guadalupe García de la Torre por sus sugerencias.

A David por su gran ayuda en los pesos moleculares, pero especialmente por su amistad.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Biología de Parásitos: Lore, Ade, Glory, Santi, Laurita, Nelia, Citlalli, Erick, Mauro y Evita por todo lo que he aprendido de ustedes, su amistad y los buenos momentos que hemos compartido.

A la UNAM porque es un orgullo pertenecer a esta gran institución.

ÍNDICE

1. Resumen.....	1
2. Introducción – Enfermedad de Chagas.....	3
2.1 Agente Etiológico.....	4
II. 1.1 Ubicación taxonómica.....	4
II. 1.2 Ciclo de vida.....	5
2.2 Vectores.....	8
II. 2.1 Ubicación taxonómica.....	8
II. 2.2 Biología e importancia.....	8
2.3 Mecanismos de infección.....	9
2.4 Cuadro clínico.....	10
2.5 Patogenia.....	12
2.6 Patología.....	13
2.7 Inmunología.....	14
2.8 Diagnóstico.....	15
2.8.1 Métodos parasitológicos.....	15
2.8.2 Métodos inmunológicos.....	16
2.9 Antígenos y proteasas de <i>T. cruzi</i>	17
2.10 Prevención de proteólisis no deseada.....	18
2.11 Inhibidores de proteasas.....	20
3. Justificación.....	25
4. Hipótesis.....	26
5. Objetivos.....	27
5.1 Objetivo general.....	27
5.2 Objetivos particulares.....	27
6. Metodología.....	28
6.1 Microorganismos.....	28
6.2 Extracción de antígenos.....	28
6.3 Rendimiento parasitario y proteico.....	29
6.4 Cuantificación de proteínas.....	29

6.5	Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	30
6.6	Evaluación de la reactividad.....	30
6.7	Electroinmunotransferencia.....	31
6.8	ELISA indirecta.....	31
	6.8.1 Calibración de la técnica de ELISA indirecta en microplaca.....	31
	6.8.2 Preparación del antígeno empleado en la técnica.....	31
	6.8.3 Titulación del extracto antigénico.....	32
	6.8.4 Titulación del conjugado.....	32
	6.8.5 Determinación de la reactividad de los extractos antigénicos hacia sueros con anticuerpos anti- <i>Leishmania mexicana</i>	33
6.9	Análisis estadístico.....	33
7.	Resultados.....	34
	7.1 Rendimiento parasitario y proteico.....	34
	7.2 Cuantificación de proteínas totales.....	34
	7.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	36
	7.4 Electroinmunotransferencia.....	43
	7.5 ELISA indirecta.....	44
	7.6 Determinación de la reactividad de los extractos antigénicos hacia sueros con anticuerpos anti- <i>Leishmania mexicana</i>	47
8.	Discusión.....	48
9.	Conclusiones.....	52
10.	Perspectivas.....	53
11.	Bibliografía.....	54

1. RESUMEN

La enfermedad de Chagas, cuyo agente etiológico es *Trypanosoma cruzi*, es una amenaza permanente para una cuarta parte de la población de América Latina. Su diagnóstico se realiza principalmente por la detección de anticuerpos en suero, por lo que es importante realizar extracciones antigénicas para emplearlas con un estricto control de calidad con técnicas serológicas que sean sensibles, específicas y estables. Con esta finalidad, en el presente trabajo se evaluó la calidad proteica y reactividad de extractos antigénicos para la detección de la infección por *T. cruzi* en presencia de inhibidores de proteasas durante un año; determinando así su efectividad para el manejo y conservación de extractos antigénicos con fines diagnósticos.

Los extractos se obtuvieron de una cepa aislada y caracterizada previamente (Aguilar, 2004), la extracción antigénica se realizó según la metodología descrita por Bucio en 1999. El extracto antigénico se dividió en 3 lotes: sin inhibidores de proteasas, con PMSF y con una combinación de inhibidores (AEBSF, EDTA, Bestatina, Pepstatina A y E-64). Las evaluaciones de concentración y composición proteica se realizaron por el método de Lowry y electroforesis en geles de poliacrilamida. La reactividad antigénica se evaluó con la técnica de ELISA indirecta y Electroinmunotransferencia (Western-blot) con sueros reactivos y no reactivos a *T. cruzi* y a *Leishmania mexicana* a los 30, 90, 180, 270 y 360 días.

Los tres lotes tratados mostraron reactividad a sueros positivos a *T. cruzi* en Western-blot y ELISA sin cruce inmunológico con sueros positivos a *L. mexicana*. El lote tratado con PMSF presentó la menor concentración proteica, al año se habían perdido el 50% de sus componentes y su reactividad no presentó diferencias con el tratamiento sin inhibidores. El lote tratado con la combinación de inhibidores mostró una mayor concentración proteica, los componentes detectados en la electroforesis se conservaron a lo largo del año aunque con cierta disminución en la relevancia observada inicialmente. Llama la atención que con la prueba de ELISA indirecta conservó buena reactividad, a diferencia de los lotes

tratados con PMSF y sin inhibidores, por lo que el empleo de la combinación de inhibidores se propone como una buena alternativa para prolongar la vida de anaquel de estos reactivos antigénicos.

2. ENFERMEDAD DE CHAGAS

La Tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas, cuyo agente etiológico es *T. cruzi*, se reportó por primera vez en 1909 por Carlos Chagas en Brasil. (Chagas, 1909).

La infección humana se distribuye únicamente en el Continente Americano, desde el sur de Estados Unidos hasta el sur de Argentina y Chile. En 2002 la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2002) estimó que en América Latina, existen entre 11 y 18 millones de personas infectadas, ocasionando aproximadamente 13 000 muertes por año y que cerca de 100 millones se encuentren en riesgo de adquirir la infección. Para el año 2000 Schofield estimó que en México existe una seroprevalencia de 540 mil casos, con 10,854 nuevos por año. Diversos estudios realizados en el país señalan una distribución heterogénea de la infección con seroprevalencias entre el 5 y 20 % en el área rural (Dumonteil, 1999).

En México, existen todos los factores para que la cadena epidemiológica se lleve a cabo, como son la presencia del transmisor en todos los estados de la república mexicana y a todas las altitudes (Tay, 1980; Salazar-Schetino, 1983), las precarias condiciones de vivienda en las zonas rurales, así como la presencia de *Trypanosoma cruzi* con virulencias y trópicismos variados.

2.1 AGENTE ETIOLÓGICO

2.1.1 Ubicación taxonómica (Levine, 1989)

Reino Protista

Subreino Protozoa

Phylum Sarcomastigophora

Subphylum Mastigophora

Clase Zoomastigophorea

Orden Kinetoplastida

Familia Trypanosomatidae

Género *Trypanosoma*

Especie *Trypanosoma cruzi* (Chagas 1909)

El *Trypanosoma cruzi* presenta tres formas de importancia biológica:

a) Amastigote: es la forma tisular intracelular del mamífero, se reproduce por fisión binaria longitudinal, se presenta como una estructura esférica de 2-4 μm , no presenta flagelo libre, el núcleo es muy aparente y el cinetoplasto tiene forma de bastoncillo (Haro, 1995). Estudios realizados con amastigotes *in vitro* muestran que pueden ser infectivos para células de vertebrados (Carvalho, 1986; Ley, 1990)

b) Epimastigote: presenta forma oval alargada que mide entre 20 y 40 μm de largo. El cinetoplasto se localiza anterior y sobre el núcleo, el flagelo emerge del cinetoplasto y forma una pequeña membrana ondulante antes de salir por la parte anterior del parásito. Esta forma se puede observar en medios de cultivo, en el intestino del transmisor donde se multiplica para dar paso a la fase infectiva y como forma transicional entre amastigotes y tripomastigotes en el huésped vertebrado (Meyer, 1948; De Souza, 2002).

c) Tripomastigote: tiene cuerpo alargado en forma de "S" o "C", mide aproximadamente 25 μm de largo y 2 μm de ancho, presenta un núcleo muy aparente en la parte media del cuerpo, una membrana ondulante y el cinetoplasto

posterior al núcleo, en el extremo posterior del parásito. A partir del cinetoplasto emerge la membrana ondulante que recorre al parásito a lo largo del cuerpo saliendo libre en la porción anterior en forma de flagelo para moverse activamente como un látigo. El tripomastigote puede ser sanguíneo cuando se encuentra en el torrente circulatorio del vertebrado y metacíclico si se encuentra en la ampolla rectal y heces del transmisor, así como en la fase estacionaria en cultivos (De Souza, 2002) (figura 1).

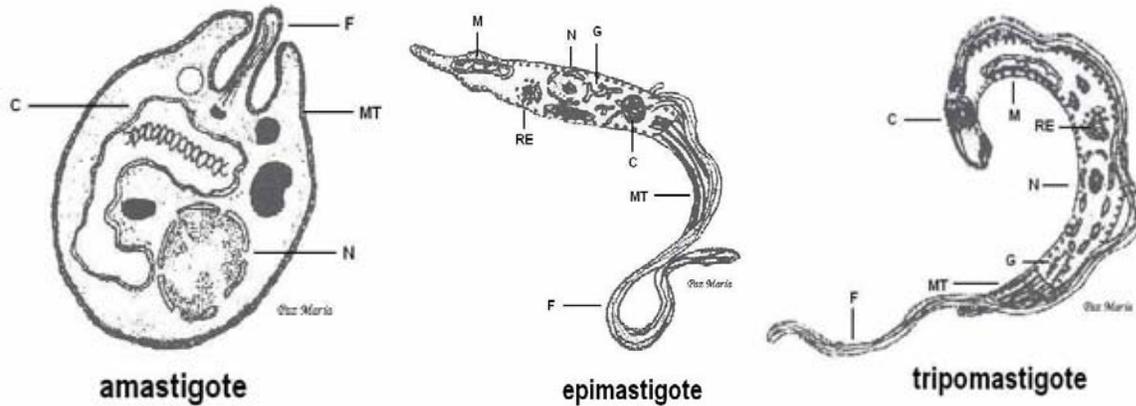


Figura 1- Fases de *Trypanosoma cruzi*

C - cinetoplasto **M** - mitocondria **RE** - retículo endoplásmico **N** – núcleo

G - aparato de Golgi **MT** – microtúbulos **F**- flagelo

Cortesía: Dra Paz Maria Salazar Schettino

2.1.2 Ciclo de vida

El ciclo biológico (figura 2) comienza cuando el huésped invertebrado (triatomino transmisor) ingiere sangre con tripomastigotes de un vertebrado infectado. En el estómago del insecto, los tripomastigotes sanguíneos se transforman en epimastigotes y algunos en formas redondeadas. En el intestino, los epimastigotes se dividen repetidamente por fisión binaria y se adhieren a las células intestinales por hemidesmosomas (Zeledón, 1997); ya en el recto una cierta proporción de los epimastigotes se transforman en tripomastigotes metacíclicos, los cuales son eliminados en las heces y tienen la capacidad de infectar células de vertebrados (De Souza, 2002).

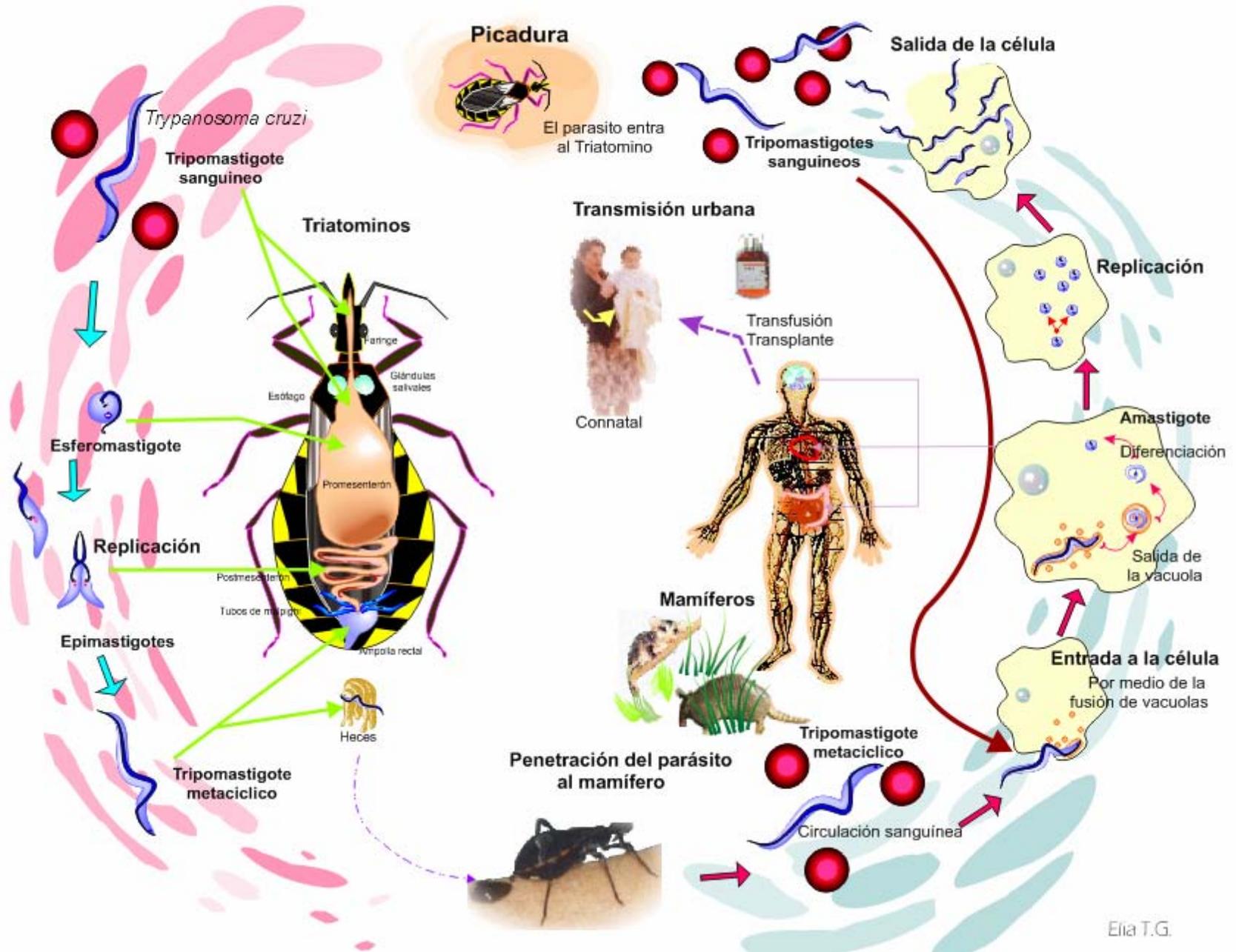
Al picar a un huésped sano, el triatomino defeca sobre él y a través de la piel o mucosa, penetran las formas infectantes.

Dentro del mamífero, los tripomastigotes se adhieren a la superficie de las células, desatando una cascada de señalización en la célula huésped que provoca el reclutamiento y fusión de lisosomas con la membrana plasmática, generando una vacuola parasitófora. Los parásitos son liberados dentro de la célula, saliendo de la vacuola; diferenciándose en amastigotes y comenzando la fase de división (Burleigh B, Woolsey A, 2002). Su multiplicación continúa y posteriormente se da la transformación a tripomastigotes; durante este proceso ocurren cambios en la organización de la célula y en su tamaño que se incrementa de 1 a 20 μm .

Al finalizar la etapa intracelular del ciclo, se incrementa el movimiento de los parásitos que ahora tienen un flagelo largo, contribuyendo a la ruptura de la célula huésped y la liberación de los parásitos, que tienen la capacidad de infectar otras células del mamífero (De Souza W, 2002).

El parásito tiene la capacidad de invadir cualquier célula del organismo, siendo más afectadas, las del músculo cardíaco, esquelético, músculo liso del aparato digestivo y sistema nervioso central.

Figura 2
Enfermedad de Chagas
Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*



2.2 VECTORES

2.2.1 Ubicación Taxonómica

Clase Hexapoda (Borror, 1992)

Orden Hemiptera

Familia Reduviidae

Subfamilia Triatominae

Los triatominos están distribuidos a través del continente americano y algunas islas del Caribe entre los 40° de latitud norte y 46° de latitud sur.

2.2.2 Biología e importancia

Los triatominos al igual que todos los hemipteros, son hemimetábolos. Su desarrollo contempla las fases de huevo, 5 estadios ninfales y adulto. Los estadios ninfales se diferencian del adulto en que carecen de alas y son sexualmente inmaduras. La mayoría de las especies completan su ciclo entre 5 y 12 meses en condiciones óptimas. El tamaño del adulto varía dependiendo de la especie en un rango de 5 a 45 mm. Son de origen silvestre; la invasión del hábitat de estos insectos por el ser humano ha favorecido la adaptación de algunas especies a las áreas donde el hombre realiza sus actividades. Su eficacia como transmisores depende de diversos factores como son: grado de adaptación al domicilio humano, preferencias alimenticias, metaciclogenia y tiempo de defecación después de la alimentación (UNAM-SSA, 2002).

México es considerado como el país latinoamericano que más población de triatominos tiene (figura 3), se han reportados siete géneros: *Belminus*, *Dipetalogaster*, *Eratyrus*, *Panstrongylus*, *Paratriatoma*, *Rhodnius* y *Triatoma* distribuidos en todos los estados. Las especies de mayor importancia médica pertenecen al género *Triatoma* del cual se han reportado 24 especies (Salazar Schettino, 1988, Carcavallo, R, 1999).



Figura 3

Algunos triatominos transmisores de *T. cruzi* en México

Cortesía: M. en C. Margarita Cabrera Bravo

2.3 MECANISMOS DE INFECCIÓN

La infección en el humano puede ser adquirida por diversos mecanismos, el más importante es la forma natural por medio del insecto hematófago infectado (Chagas rural). Otros mecanismos son la transmisión por transfusión de sangre o de los componentes sanguíneos y la transmisión por trasplantes de órganos (Chagas urbano), la transmisión vertical de la madre al producto (connatal) por las vías trasplacentaria, neonatal y por ingestión de leche materna (Blanco, 2000). Otras formas de infección son los accidentes en laboratorio, la ingestión de artrópodos infectados, de carne cruda o insuficientemente cocida de reservorios y de alimentos o bebidas contaminadas con materia fecal de triatominos o con orina o secreciones de las glándulas anales y heces de marsupiales infectados los que han sido descritos como mecanismos particularmente raros (Wendel, 1992).

2.4 CUADRO CLÍNICO

En la evolución de la enfermedad de Chagas se han descrito tres fases: aguda, indeterminada y crónica.

Aproximadamente el 70% de los individuos infectados cursan asintomáticos en la **fase aguda** y menos del 5% presentan las manifestaciones clínicas patognomónicas como son el signo de Romaña-Mazza (figura 4) y chagoma de inoculación. Las manifestaciones sistémicas descritas son fiebre vespertina de 38° C, taquicardia, adenitis, linfangitis, hepato-esplenomegalia, astenia, diaforesis, hiporexia, cefalea, mialgias y artralgias (Prata, 1994). Su duración es de 8 semanas posteriores a la infección. La enfermedad aguda es mortal aproximadamente en el 1% de los pacientes, causada por miocarditis aguda o meningoencefalitis, afecta principalmente a ancianos y niños (infectados durante el primer año de vida), siendo casos raros y muy severos.

La fase **indeterminada**, ha sido descrita como el periodo en el que el paciente no presenta síntomas ni signos aparentes de la enfermedad.

La fase **crónica** se presenta después de 10 a 20 años de la infección. En Brasil, aproximadamente el 30% de los infectados desarrollan lesiones, de éstos, el 27% presentan signos y síntomas cardíacos (miocardiopatía), el 6% digestivos, principalmente en esófago y colon (megacolon) y el 3% en el sistema nervioso periférico (Moncayo A., 1997) (Figura 5).

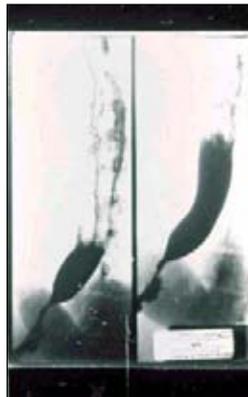


Figura 4
Signo de Romaña

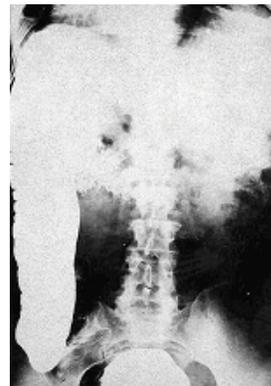
Cortesía: Dra. Paz Maria Salazar Schettino



a



b



c

Figura 5

Fase crónica

a) miocarditis b) megaesofago c) megacolon

Cortesía: Dra Paz Maria Salazar Schettino

2.5 PATOGENIA

Trypanosoma cruzi produce lesiones por diferentes mecanismos patogénicos relacionados con factores que determinan la evolución de la infección y dependen fundamentalmente del parásito y el huésped; los principales factores se señalan en la Tabla 1 (Tafari WL, 1987).

Tabla1
Principales factores relacionados con la patogenia

Parásito	Huésped
inóculo	respuesta inmune
polimorfismo	estado nutricional
tropismo	constitución genética
virulencia	especie
constitución antigénica	edad
	raza
	infecciones
	sexo
	temperatura
	dieta

Los parásitos muestran características biológicas distintas, por lo que, algunos investigadores definen diferentes tipos de cepas con base en su morfología, parasitemia, índice de multiplicación, tropismo y patogenicidad en el ratón. Las cepas más virulentas son las que tienen mayor poder de penetración y cuanto mayor sea el número de parásitos y de células muertas mayor será la cantidad de antígenos parasitarios liberados (Tafari, 1987).

2.6 PATOLOGÍA

Se presentan dos tipos de lesiones, la inflamatoria y la neuronal; en ambas, la respuesta básica del huésped parece ser consecuencia directa de la multiplicación del parásito; esta multiplicación origina lesión por destrucción de las células del huésped y/o por mecanismos de sensibilización. Adicionalmente, pueden ocurrir alteraciones degenerativas en células no parasitadas como consecuencia de trastornos isquémicos o metabólicos inducidos por el proceso inflamatorio o por autoinmunidad.

En la fase aguda existe elevada parasitemia y escaso parasitismo en órganos y tejidos; frecuentemente se presentan focos inflamatorios que pueden ser de gran tamaño. Durante la fase crónica los focos inflamatorios son escasos, menos aparentes e irreversibles, presentan fibrosis peri e intraganglionar y reducción en el número de neuronas (Tafari, 1971; Köberle F. 1968).

2.7 INMUNOLOGÍA

La respuesta inmune defiende al huésped contra los efectos de la invasión parasitaria desde el momento de la infección, realizando un papel preponderante en el control del número de parásitos en el organismo. Sus mecanismos evitan que una eventual reinfección de lugar a una nueva fase aguda. A pesar de esta actividad protectora, el microorganismo no es erradicado y se establece una relación huésped-parásito condicionada por las características de ambos y por factores ambientales que tiende a llevar la infección aguda a la cronicidad.

Durante la fase aguda se ha descrito una severa inmunodepresión que coincide con el punto más elevado de la parasitemia (Teixeira, 1978). En la fase indeterminada se restablece la respuesta inmune y en la fase crónica el parasitismo es escaso. La presencia de lesiones como una miocarditis intensa se atribuye a fenómenos de autoinmunidad ya que en estudios realizados en conejos infectados con *T. cruzi* y con fracciones subcelulares del mismo se ha comprobado una intensa respuesta inmune mediada por células, contra antígenos del parásito y contra antígenos de miocardio (Teixeira, 1975).

2.8 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico tiene como finalidad la detección y confirmación de individuos infectados o enfermos, así como la evaluación de las medidas terapéuticas establecidas y desde el punto de vista epidemiológico, el monitoreo de programas sanitarios para la detección, vigilancia y control del padecimiento (UNAM-SSA, 2002).

La presencia de formas parasitarias y de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* constituyen los elementos más relevantes para el diagnóstico de laboratorio; por esta razón, los métodos de diagnóstico son clasificados en parasitológicos e inmunológicos.

2.8.1 Métodos Parasitológicos

Los métodos parasitológicos sirven para demostrar la presencia del parásito en sangre y son de gran utilidad en la fase aguda de la enfermedad, donde la parasitemia es elevada y constante.

La observación microscópica de tripomastigotes en sangre puede realizarse por examen directo, gota gruesa o frote, lo cual diagnostica aproximadamente el 50% de los casos durante la fase aguda, también son útiles para el diagnóstico intencionado de las formas transplacentaria y neonatal o en algunos casos atípicos o de difícil diagnóstico como los adquiridos por vía transfusional o por trasplante de órganos. Adicionalmente, se pueden utilizar métodos de concentración como el Strout y microhematocrito con lo que la sensibilidad puede aumentar hasta un 95%. Otros métodos útiles con el fin de ampliar el número de microorganismos son el xenodiagnóstico en serie y el hemocultivo con una sensibilidad cercana al 100% en casos agudos y 50% en crónicos; así como, la inoculación en animales de laboratorio. El estudio histopatológico es de utilidad para la búsqueda de amastigotes durante la fase crónica de la enfermedad (UNAM-SSA, 2002).

2.8.2 Métodos inmunológicos

Los métodos inmunológicos son útiles para demostrar la presencia de anticuerpos específicos generados por la infección, estos métodos son de elección principalmente en las fases crónica e indeterminada.

Los métodos serológicos que por su reactividad se consideran de más alta sensibilidad son aquellos que detectan concentraciones muy bajas de anticuerpos como es el caso del inmunoensayo enzimático (ELISA indirecta), de reactividad intermedia como la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la hemaglutinación indirecta (HAI).

Para el diagnóstico de la infección por *Trypanosoma cruzi*, la OPS/OMS, recomienda especialmente el uso de las siguientes pruebas:

- Hemaglutinación indirecta
- ELISA indirecta
- Inmunofluorescencia indirecta

Debido a que la positividad en una sola prueba serológica no constituye un criterio de diagnóstico suficiente, la OMS define para la confirmación del diagnóstico de infección, demostrar reactividad en dos pruebas serológicas.

2.9 ANTÍGENOS Y PROTEASAS DE *T. cruzi*

T. cruzi es altamente inmunogénico y presenta una amplia oferta antigénica para el huésped vertebrado, con proteínas en su membrana celular; cuya presencia, concentración e inmunogenicidad pueden variar en los diferentes estadios del ciclo vital del parásito. Estos antígenos pueden estar representados por fracciones proteicas y glucoproteicas totales o fracciones purificadas (De Lima, 2001).

Este parásito presenta glucoproteínas (GP) de superficie con concentraciones entre 2 y 10% de oligosacáridos enlazados a la cadena peptídica. Algunas de estas GPs son específicas de un determinado estadio; la GP de 72kD se encuentra en epimastigotes (Hart, 1992), la GP 90 en tripomastigotes metacíclicos (Yoshida, 1990), la GP 85 en tripomastigotes sanguíneos (Katzin, 1983) y la estadio específica Ssp-4 en amastigotes (Andrews, 1987). Se ha reportado que existen GP estadio específicas comunes a diferentes cepas y que existen variaciones en la composición de las GP tipo mucina en diferentes aislados de epimastigotes, así como entre diferentes estadios de un mismo aislado. La composición glucoproteica de este parásito cambia durante su diferenciación de un estadio a otro; sin embargo, ninguna de las fases presenta inmunodominancia y a diferencia de otros tripanosomatidos no se le han comprobado mecanismos de variación antigénica (Nussenzweig, 1963; Snary D., 1980).

En los extractos proteicos de *T. cruzi* se ha reportado la presencia de las cuatro clases principales de proteasas: de cisteína, serina, treonina y metaloproteasas, algunas de las cuales participan en los eventos de invasión celular y diferenciación (Cazzulo, J., 1999). Algunas de ellas han sido caracterizadas bioquímica y estructuralmente (Ashall, 1990; Cazzulo, 1990).

La cruzipaina es una cisteína proteasa lisosomal con isoformas en la membrana plasmática, considerada como la de mayor actividad en extractos de *T. cruzi*; ha sido caracterizada como una endopeptidasa con estructura glucoproteica y peso molecular variable entre 40 y 65 kDa, que posee un extremo carboxiterminal altamente antigénico, es activada por β -mercaptoetanol e inhibida por E-64. Esta

proteasa actúa a diferentes valores de pH y se encuentra en una concentración 10 veces mayor en epimastigotes que en tripomastigotes y amastigotes (Cazzulo, J.J.; 1999).

2.10 PREVENCIÓN DE PROTEÓLISIS NO DESEADA

La proteólisis es uno de los mayores problemas que se presentan en la extracción de proteínas de cualquier organismo (Deutscher, M.P., 1990). Intracelularmente se encuentra altamente controlada por medio de la compartimentalización, la presencia de inhibidores endógenos y la influencia de los componentes celulares en la conformación de las proteínas. Cuando las células o tejidos se rompen durante el proceso de extraer proteínas, todos esos controles se pierden; desaparecen los compartimentos subcelulares, se forman o disocian complejos enzima-inhibidor y se alteran las interacciones entre las proteínas y otras moléculas. Los componentes del amortiguador de extracción pueden alterar la conformación de las proteínas e incrementar su vulnerabilidad a la proteólisis. Durante este proceso se dan muchas circunstancias que pueden propiciar la proteólisis adventicia.

La extracción de proteínas implica la remoción de componentes que normalmente las protegen de la proteólisis o que mantienen a la proteína en una conformación resistente. Así, la separación de proteínas de la membrana provoca que éstas sean más propensas a la proteólisis. Algunos componentes individuales de proteínas multiméricas, pueden tener sitios vulnerables que se encuentran “escondidos” hasta que los componentes son disociados. Las proteínas son más resistentes en su estado nativo y cualquier perturbación durante la extracción incrementa la posibilidad de un problema de proteólisis.

Cualquier molécula que de forma directa o indirecta afecte la conformación de la proteína, puede influir en el grado en que ésta es susceptible a la proteólisis. La unión de moléculas como substratos o cofactores tienden a mantener a la proteína en una conformación resistente, aunque algunas moléculas efectoras pueden tener una consecuencia opuesta. Las moléculas que tienen algún efecto en la estructura de las proteínas afectan indirectamente su susceptibilidad a la proteólisis, incluyendo

algunos compuestos como el glicerol y el DMSO (dimetil sulfoxido) que estabilizan la conformación de la proteína; los agentes reductores que previenen la oxidación de grupos tiol, mantienen la estructura nativa de las proteínas; aunque, pueden tener un efecto desestabilizador por la reducción de los puentes bisulfuro. Claramente, la proteólisis y sus subsecuentes problemas dependerán de la naturaleza de las proteasas presentes en la muestra (North, M. y Beynon, R.J., 2000).

Sin embargo, para conocer si en un caso determinado la proteólisis es un problema, se puede realizar una prueba simple que consiste en incubar el extracto a una temperatura moderada (por ej. 30° C), extrayendo alícuotas a intervalos de tiempo y probando la presencia de actividad biológica (Deutscher, M.P., 1990; Sarath, 2000) . Sin embargo, existen otros síntomas que permiten reconocer cuando se tiene un problema de proteólisis, los cuales se enumeran en la tabla 2.

Tabla 2. Manifestaciones más frecuentes de la proteólisis no deseada

Manifestación	Comentarios
Ausencia de una proteína específica	Falta de actividad o inmuno reactividad.
Escaso rendimiento o pérdida de actividad	La pérdida de actividad durante el tiempo de almacenamiento, frecuentemente es causada por la proteólisis en preparaciones proteicas no homogéneas.
Cambios en la actividad	Resultan de una proteólisis limitada, que puede ser difícil de detectar, por lo que las propiedades observadas pueden ser engañosas.
Cambios estructurales visibles en el patrón electroforético	Escasa resolución de las componentes . Pérdida de bandas de alto peso molecular e incremento del número de bandas de bajo peso molecular. Ausencia de bandas específicas . Discrepancia entre el peso observado para la misma proteína purificada por un procedimiento alternativo.

Modificada de North y Beynon, 2000

Para la obtención y análisis de cualquier proteína, es necesario seleccionar protocolos en los que la actividad proteolítica se minimice. Esto requiere de procedimientos que permitan reducir los niveles de proteasas; sin embargo, la remoción total de éstas resulta prácticamente imposible, por lo que es necesario tomar precauciones. Una estrategia exitosa de extracción requiere: a) selección de condiciones que supriman la proteólisis, b) inactivación de proteasas por desnaturalización y c) suprimir la actividad proteolítica por medio de inhibidores de proteasas (dependiendo de las características del extracto).

2.11 INHIBIDORES DE PROTEASAS

Las proteasas son enzimas que rompen los enlaces peptídicos de un polipéptido y los inhibidores de proteasas son moléculas capaces de impedir la actividad proteolítica de estas enzimas. Muchos tipos de moléculas inhiben enzimas y actúan de diversas formas. Debe establecerse una diferencia importante entre la inhibición reversible y la irreversible. Existen diversos modos de inhibición reversible; sin embargo, todos implican la unión no covalente de un inhibidor a la enzima, pero difieren en los mecanismos por medio de los cuales reducen la actividad enzimática y en la forma en que afectan la cinética de la reacción; éstos pueden ser competitivos (Figura 6) o no competitivos (Figura 7). En la inhibición irreversible, algunas sustancias se combinan de forma covalente con las enzimas y las inactivan de forma irreversible; casi todos los inhibidores de este tipo son sustancias tóxicas, naturales o sintéticas (Mathews, 2000).

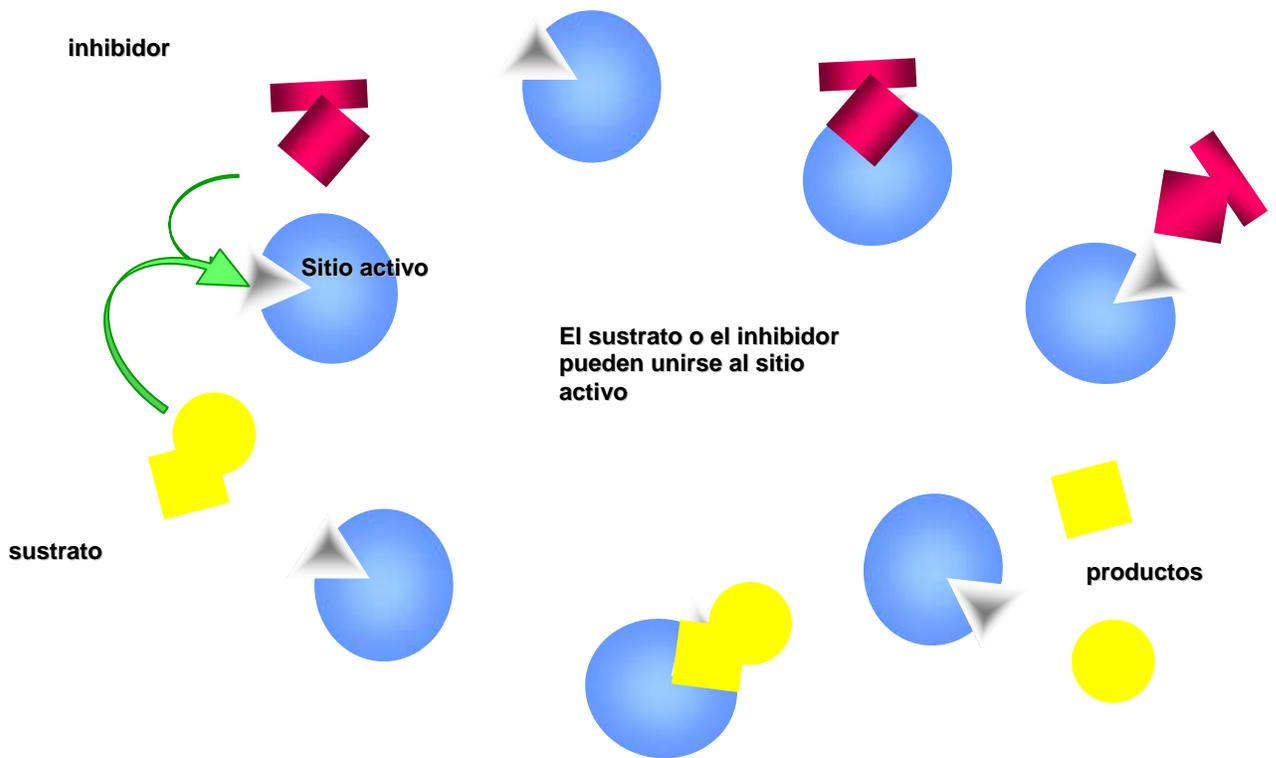


Figura 6 - Inhibición competitiva

Tanto el sustrato como el inhibidor pueden unirse al sitio activo. El sustrato puede ser procesado por la enzima, mientras que el inhibidor no.

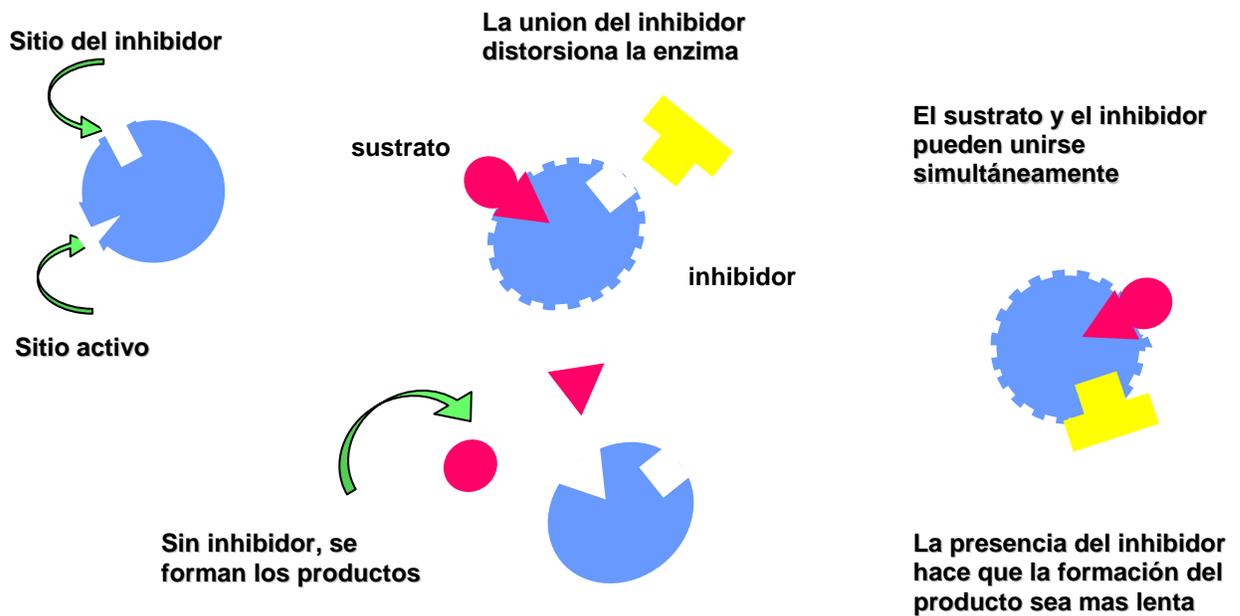


Figura 7 - Inhibición no competitiva

El inhibidor no interfiere en la unión del sustrato, pero si inhibe el fenómeno catalítico.

La inclusión de inhibidores de proteasas durante y después de la ruptura de tejidos, representa una de las mejores respuestas al problema de la proteólisis no deseada; ya que el uso de los inhibidores adecuados puede inactivar las enzimas proteolíticas de un extracto. Debido a la variedad de proteasas que se encuentran en diferentes organismos e incluso en diferentes tejidos de un mismo organismo es necesario encontrar los procedimientos y reactivos adecuados para cada caso particular. Por lo anterior es necesario conocer las características de los inhibidores como son su especificidad, la concentración ideal, solubilidad, toxicidad, tipo de inhibición que realiza y la velocidad de la reacción.

A continuación se presentan las características de algunos de los inhibidores de proteasas de uso comercial y en la tabla 3 se resumen sus propiedades más relevantes.

EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)

Inhibe metaloproteasas y proteasas activadas por metales. Peso molecular, sal disódica: 372.24. Su concentración efectiva es 1–10 mM y es estable en solución acuosa. Actúa como unidor del Zinc en el sitio activo de las metaloproteasas aunque también puede inhibir otras proteasas dependientes de iones (Umezawa,H., 1982; North y Beynon, 2000).

PMSF (fenilmetilsulfonilfluoruro)

Inhibidor irreversible de proteasas de serina y actúa de forma reversible en algunas proteasas de cisteína. Su velocidad de reacción es lenta; existen algunas variantes más específicas y con menores tiempos de reacción. El PMSF es el menos selectivo y por tanto el más usado como inhibidor general de proteasas de serina.

Su peso molecular es de 174.2 y su concentración efectiva va de 0.1 a 1.0 mM, con un tiempo promedio de reacción de una hora a pH 7.5. La solución stock (200 mM) puede ser estable hasta por 9 meses a 4° C (Umezawa,H., 1982; North y Beynon, 2000).

AEBSF (4-(2 aminoetil) benznesulfonil fluoruro)

Inhibidor irreversible de proteasas de serina, sus constantes de inhibición son similares a las del PMSF, además de tener mayor solubilidad en agua y menor toxicidad que éste. Su peso molecular es 239.5 y su concentración efectiva va de 0.1 a 1.0 mM (Umezawa,H., 1982; North y Beynon, 2000).

E-64 (Trans-epoxysuccinil-L- leucylamido-(4-guanidin) butano; N-(trans-epoxy-succinyl)-L-leucin 4-guanidinobutylamida; L-trans-3-carboxyoxiran-2-carbonyl-L-leucylagmatina)

Potente inhibidor de proteasas de cisteína que no afecta los residuos de cisteína de otras enzimas. La inhibición de proteasas de la familia de las papainas por E-64, resulta de la ocupación de sitios activos de la enzima, seguida de una alquilación de la cisteína catalítica por el grupo trans-epoxido.

Su peso molecular es 357.4 y su concentración efectiva va de 1 a 10 μM y es estable por días a pH neutro (Umezawa,H., 1982; North y Beynon, 2000).

Pepstatina A (isovaleryl – Val – Val – AHMHA – Ala- AHMHA [AHMHA = (3s,4s) 4 – amino – 3 – hidroxil – 6 – metil – ácido heptanoico])

Potente inhibidor de proteasas ácidas, incluyendo la pepsina, renina y cathepsina D y muchas proteasas microbianas aspárticas. Es un compuesto parecido a un pentapéptido secretado por las especies del género *Streptomices*, que contiene dos residuos del inusual aminoácido estatina. Su peso molecular es 685.9 y su concentración efectiva es 1 μM , la cual es estable hasta por un día (Umezawa,H., 1982; North y Beynon, 2000).

Bestatina (N- [(2S,3R)-3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutyryl]-L-leucine hidrócloruro)

Inhibidor de metaloproteasas, selectivo para aminopeptidasas. Su peso molecular es de 308.4 y su concentración efectiva va de 1 a 10 μM , siendo estable por un día (Umezawa,H., 1982; North y Beynon, 2000).

Tabla 3 – Propiedades de algunos inhibidores de proteasas

Inhibidor	Tipo de proteasas que inhibe	Ejemplos	Tipo de inhibición
PMSF	de Serina	Tripsina	irreversible
AEBSF	de Serina	Quimotripsina	irreversible
EDTA	Metaloproteasas		competitiva
Bestatina	Metaloproteasas Aminopeptidasas	De leucina De alanina	competitiva
Pepstatina A	Proteasas ácidas	Pepsina Renina Catepsina D Quimosina Proteasa B	competitiva
E-64	de Cisteína	Calpaina Papaina Catepsina B y L	Irreversible

3. JUSTIFICACIÓN

En México, como en otros países, el diagnóstico de la infección por *T. cruzi*, se realiza principalmente por serología, por lo que es importante emplear reactivos antigénicos no solo específicos y sensibles sino además estables.

Estos reactivos diagnósticos, se degradan en cortos periodos de tiempo aún en presencia de inhibidores de proteasas a bajas temperaturas (De Lima, 2001).

Por lo anterior, se requiere emplear y evaluar procedimientos de extracción y conservación que permitan garantizar una buena reactividad antigénica al incrementar la vida de anaquel para su empleo en el diagnóstico serológico.

4. HIPÓTESIS

Para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas se emplean fracciones de origen proteico y glucoproteico de *Trypanosoma cruzi*, las cuales son degradadas por enzimas proteolíticas; el uso de inhibidores de proteasas deberá evitar la acción enzimática, manteniendo la estabilidad de los extractos antigénicos.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar la calidad proteica mediante concentración, composición proteica y reactividad de los extractos antigénicos en presencia y ausencia de inhibidores de proteasas, para determinar su efectividad en la detección de la anticuerpos anti - *T. cruzi* con fines diagnósticos.

5.1 Objetivos particulares

Determinar si los inhibidores de proteasas son de utilidad para mantener la concentración, composición proteica y reactividad de los extractos antigénicos de *T. cruzi* durante un año.

Determinar si existen diferencias estadísticamente significativas con relación a la concentración, composición proteica y reactividad entre el extracto sin inhibidores, el tratado con PMSF y el tratado con una combinación seleccionada de inhibidores en base a las proteasas identificadas previamente en *T. cruzi*.

6. METODOLOGÍA

6.1 Microorganismos

Se utilizó una cepa de *Trypanosoma cruzi*, denominada Tequesquitengo, aislada de un ejemplar de *Triatoma pallidipennis* del estado de Morelos y que forma parte del cepario del Laboratorio de Biología de Parásitos de la Facultad de Medicina de la UNAM.

La expansión parasitaria se realizó en medio de cultivo RPMI-1640 a partir de un inóculo de medio de cultivo LIT (Liver Infusion Triptose). Cada 10 días se realizó un pase con el fin de eliminar los componentes del medio LIT y al tercer pase se concluyó la expansión parasitaria en matraces Erlenmeyer de 500 ml con tapón de rosca, los cuales se incubaron a 28°C durante todo el proceso. Para definir las fases de crecimiento, previamente se cuantificaron los parásitos cada 24 hrs en cámara de Neubauer durante 15 días. La cosecha se realizó en la fase estacionaria de crecimiento. En ese momento el parásito se encontraba polimórfico (en los estadios de epimastigote, esferomastigote y tripomastigote).

6.2 Extracción de antígenos

Para la obtención de los extractos antigénicos se siguió la metodología previamente descrita por Bucio en 1999 de la siguiente forma:

a) Cosecha, lavado y cuantificación de la masa parasitaria. Se realizaron 3 lavados con amortiguador de fosfatos (PBS) pH 7.2: KCl 0.2 gr, KH₂PO₄ 0.2 gr, NaCl 8 g y Na₂HPO₄ 12H₂O 2.9 gr; para 1000 ml, se centrifugaron a 2 500 g durante 20 min a 4°C (Sorvall RT 6000 D); los sobrenadantes fueron desechados en cada paso. Después de retirar el último sobrenadante, se cuantificó la masa parasitaria por peso (gr).

b) Posteriormente se resuspendió en 13.5 ml Tris HCl 50 mM pH 7.4 con CHAPS (3-[(3-colamidopropil) dimetil ammonio]-1-propansulfonato) 10 mM (Sigma*).

c) La extracción del antígeno se realizó por sonicación mediante un procesador ultrasónico (Vibra Cell VC50) 7 pulsos de 40 watts durante 60 segundos con intervalos de enfriamiento en hielo-etanol de 60 segundos.

d) El extracto obtenido se dividió en 3 lotes uno control y dos a los que se les trató con inhibidores de proteasas:

- **SI** -Control sin inhibidores
- **PMSF** - Con Fenil Metil Sulfonil Floruro en concentración 2mM (Sigma*)
- **CI** -Combinación de inhibidores al 5%(AEBSF, EDTA, Bestatina, Pepstatina A, E-64).

Los inhibidores de proteasas se dejaron actuar con los extractos a temperatura ambiente durante 30 minutos.

e) Se centrifugó a 43 000 *g* a 4°C durante 60 min. (Sorvall RC 26 Plus).

f) El sobrenadante se separó y fraccionó en alícuotas de 200 µl en tubos tipo eppendorf para su conservación a - 20°C hasta su uso.

6.3 Rendimiento parasitario y proteico

Se cuantificó el volumen de antígeno obtenido, se cuantificaron las proteínas totales de cada lote con los diferentes tratamientos y se obtuvo el rendimiento proteico total.

6.4 Cuantificación de proteínas totales

Se cuantificaron las proteínas totales de cada lote por el método de Lowry modificado, construyendo una curva patrón con albúmina sérica bovina (BSA 1mg/ml) en concentraciones de 0.125, 0.250, 0.375 y 0.500 mg/ml. Se realizaron dos diluciones (1:16 y 1:24) de cada tratamiento del extracto antigénico en PBS pH 7.2, se adicionó una solución cúprica alcalina compuesta de tartrato de sodio y potasio al 2% (1 ml), sulfato de cobre al 1% (1 ml) y carbonato de sodio al 5% en hidróxido de sodio 0.1 N (50ml), se dejó reposar y se agregaron 100 µl del reactivo de Folin-

Ciocalteus (Sigma*), dejándolo en oscuridad por 30 minutos. La absorbancia se leyó en un espectrofotómetro Pharmacia LKB Ultrospec Plus, se obtuvo el promedio de las lecturas (Å) y se calcularon las concentraciones finales en mg/ml. La cuantificación proteica se realizó a los días 1, 30, 90, 180, 270 y 365.

6.5 Electroforesis en geles de polioacrilamida (SDS-PAGE)

La separación por peso molecular de los componentes de los extractos antigénicos se determinó por medio electroforesis discontinua en geles de poliacrilamida con gel concentrador al 5% y gel separador al 12.5% con dodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE), siguiendo en términos generales la metodología descrita por Laemmli en 1970. Se realizó en un equipo Mini Protean III de Electrophoresis Cell (Bio-Rad[®]) a una diferencia de potencial constante de 150 Volts por 60 min aproximadamente con una fuente de poder Bio-Rad[®] Modelo 200/2.0. Se usó amortiguador de corrimiento constituido o por 0.025 M Trizma-base (Tris [hidroximetil] aminometano), 0.192 M glicina y dodecil-sulfato de sodio (SDS) al 0.1%, pH 8.3. Las muestras fueron preparadas por separado en dilución 1:2 con un amortiguador constituido por 3.125 ml de Trizma-base 1 M pH 6.8, 5 ml de glicerol, 1.25 ml de SDS al 10%, 2.5 ml de β-mercaptoetanol, 2.5 mg de azul de bromofenol y agua desionizada para aforar a 25 ml y se sometieron a ebullición en baño de agua por 5 minutos; el volumen se ajustó para contener aproximadamente 100 µg de proteína por carril. Se emplearon marcadores de peso molecular comerciales con rango entre 198 y 6.9 kDa (Bio-Rad[®]). Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie R-250 (Sigma*) durante 10 minutos. Las electroforesis se realizaron a los días 1, 30, 90, 180, 270 y 365.

6.6 Evaluación de la reactividad

La reactividad de los tres lotes del reactivo antigénico hacia sueros con anticuerpos anti- *Trypanosoma cruzi* se evaluaron por las pruebas de Electroinmunotransferencia (Western- Blot) e Inmunoensayo enzimático (ELISA indirecta). Esta última prueba también fue empleada para determinar la reactividad antigénica hacia sueros reactivos a *Leishmania mexicana*.

6.7 Electroinmunotransferencia (Western-blot)

Se realizó siguiendo en términos generales los lineamientos descritos por Towbin en 1979. Después del corrimiento electroforético, se realizó la transferencia a membranas de nitrocelulosa con poro de 0.45 μm (Bio-Rad[®]) en un aparato Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer (Bio-Rad[®]) a una diferencia de potencial constante de 12 volts durante 22 min, con un amortiguador de transferencia constituido por Trisma-base 0.025 M, glicina 0.192M y metanol 20%, pH 8.3. Una vez concluida la transferencia, la nitrocelulosa fue bloqueada con una solución PBS/Tween20 0.3% / leche 5% durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación ligera. Se realizaron 2 lavados rápidos con PBS/Tween20 0.3% y se incubaron los sueros testigo reactivos a *T. cruzi* en dilución 1:100 a 4°C en agitación ligera durante la noche. Se realizaron tres lavados con PBS-Tween20 0.3% y posteriormente se incubó con el conjugado anti IgG humana unido a peroxidasa (Zymed*) en dilución 1:10 000, durante 2 hrs a temperatura ambiente. Se realizaron 5 lavados y se colocó en oscuridad el sustrato correspondiente DAB (3,3 diaminobenzidina) en una solución de PBS pH 7.2 con peróxido de hidrógeno al 30% en oscuridad. La reacción se frenó con agua destilada.

6.8 ELISA indirecta

6.8.1 Calibración de la técnica de ELISA indirecta en microplaca

El sistema previamente se calibró mediante la titulación de antígenos y conjugado a diferentes diluciones (1:100 – 1:12 000).

6.8.2 Preparación del antígeno empleado en la técnica

Para realizar la prueba de ELISA indirecta se ajustó la concentración proteica del antígeno entre 1 y 1.5 mg/ml, con un amortiguador Tris HCl 50mM a pH 7.4. y en el caso de los lotes tratados con inhibidores se agregó el inhibidor correspondiente a la misma concentración usada durante la extracción (PMSF-2mM y PMSF-5%). El reactivo antigénico se fraccionó en alícuotas de 1 ml en criotubos con tapón de rosca para su almacenamiento y conservación a -20° C.

6.8.3 Titulación del extracto antigénico

Se emplearon 3 sueros de origen humano previamente titulados con reactividades confirmadas con 3 técnicas (HAI, ELISA e IFI): RA-reactivo alto, RB-reactivo bajo y N-normal.

Para determinar la concentración óptima del extracto antigénico se realizaron diluciones progresivas del mismo para ser probadas con los sueros previamente titulados cuyas densidades ópticas (D.O.) son de 0.450 para el reactivo alto (RA) , 0.235 (D.O.) para el reactivo bajo (RB) y de 0.038 (D.O.) para el normal (N) . Se determinó la concentración óptima con base en las lecturas (D.O.) obtenidas con el extracto tratado con PMSF.

6.8.4 Titulación del conjugado

Para definir la dilución óptima del conjugado anti IgG humano unido a peroxidasa (Zymed*) se realizó inicialmente una titulación gruesa 1:10 000, 1:20 000, 1:30 000, 1:40 000, 1:50 000, 1:60 000 y posteriormente otra titulación fina en diluciones entre 21,000 y 30,000 con los mismos sueros descritos anteriormente.

La prueba de ELISA se realizó en placas de poliestileno de 96 pozos con fondo plano de alta unión (COSTAR). El antígeno para la adsorción a la placa se utilizó en dilución 1:400, el bloqueo de sitios inespecíficos se realizó con PBS-leche deshidratada, descremada (DIFCO) al 5% y los lavados con PBS-TWEEN 20 al 0.05%.

Cada tratamiento del antígeno se probó con los sueros reactivo alto, reactivo bajo y normal en dilución 1:200, el conjugado empleado fue Anti-Gammaglobulina G humana conjugada a peroxidasa en dilución 1:28 500 empleando como sustrato peróxido de hidrógeno y el cromógeno (O-fenilendiamina) Para frenar la reacción se empleó ácido sulfúrico 1 N. La lectura se realizó en un espectrofotómetro para placas (Microplate reader Bio-Rad Mod. 550) con un filtro de 490 nm. Los títulos de corte habían sido determinados previamente; se consideraron positivas las lecturas iguales o superiores a 0.180 (D.O.), en zona gris entre 0.160 y 0.179 y negativos las inferiores a 0.160 (D.O.).

Las pruebas para evaluar reactividad se realizaron simultáneamente a los 3 lotes, con los mismos sueros empleados inicialmente a los 30, 90, 180, 270 y 365 días.

6.8.5 Determinación de la reactividad de los extractos antigénicos hacia sueros con anticuerpos anti-*Leishmania mexicana*

Se comparó la reactividad de los 3 extractos hacia 10 sueros de pacientes con diagnóstico de Leishmaniasis cutánea de los cuales 5 corresponden a la forma clínica localizada y 5 a la difusa. Estos sueros fueron proporcionados por la Dra. Ingeborg Becker Fauser del Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM.

6.8.6 Análisis estadístico

Se calcularon los valores de promedio, desviación estándar y varianza de las concentraciones de proteínas obtenidas para cada lote en, comparándolos por medio de un análisis de varianza (ANOVA)

Se asignaron valores cualitativos de relevancia observada a los componentes proteicos seleccionados de los corrimientos electroforéticos, se calculó el porcentaje en que se presentaron estos valores en cada corrimiento y estos porcentajes se graficaron por separado para cada lote.

En el caso de la ELISA indirecta, se compararon las reactividades obtenidas con los sueros: reactivo alto, reactivo bajo y normal contra los lotes del antígeno por medio de un análisis de varianza.

- * Todos los reactivos de SIGMA provienen de SIGMA CHEMICAL CO. St. Louis MO USA.
- * Todos los reactivos de Zymed provienen de Zymed laboratories, San Francisco CA. U.S.A.
- * Los reactivos y equipos de Bio-Rad provienen de Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA. USA.

7. RESULTADOS

7.1 Rendimiento parasitario y proteico

La expansión en 2 700 ml de medio de cultivo produjo una masa parasitaria de 1.488gr los cuales para realizar la sonicación, se llevaron a un volumen final de 15 ml que fueron divididos en tres lotes para los tratamientos sin inhibidores, con PMSF y con una combinación de inhibidores. El volumen obtenido de cada tratamiento, así como su concentración proteica y rendimiento, se presentan en la tabla 4.

Tabla 4
Rendimiento proteico

Tratamiento	Volumen (ml)	Concentración proteica (mg/ml)	Proteínas totales (mg)
SI	3	6.6l	19.83
PMSF	8	6.02	48.16
CI	4	6.7	26.8
Rendimiento total			94.79

S: extracto sin inhibidores, **PMSF:** extracto con el inhibidor de proteasas PMSF, **CI:** extracto tratado con la combinación de inhibidores.

7.2 Cuantificación de proteínas totales

Se determinó la cantidad de proteínas totales presentes en cada tratamiento durante el transcurso de un año (gráfica 1). Se calcularon los valores del promedio, desviación estándar y varianza de cada uno (tabla 5), comparándolos con un análisis de varianza (ANOVA). Aquí se observó que la diferencia en la cantidad de proteínas de los lotes tratados es estadísticamente significativa ($P < 0.05$); es decir, que el lote tratado con PMSF presenta una menor cantidad promedio de proteínas a las presentadas en el tratado sin inhibidores ($P 0.03$) y que el tratado con la combinación

de inhibidores presenta mayor cantidad de proteínas que el sin inhibidores (P 0.03) y que el tratado con PMSF (P 0.000038).

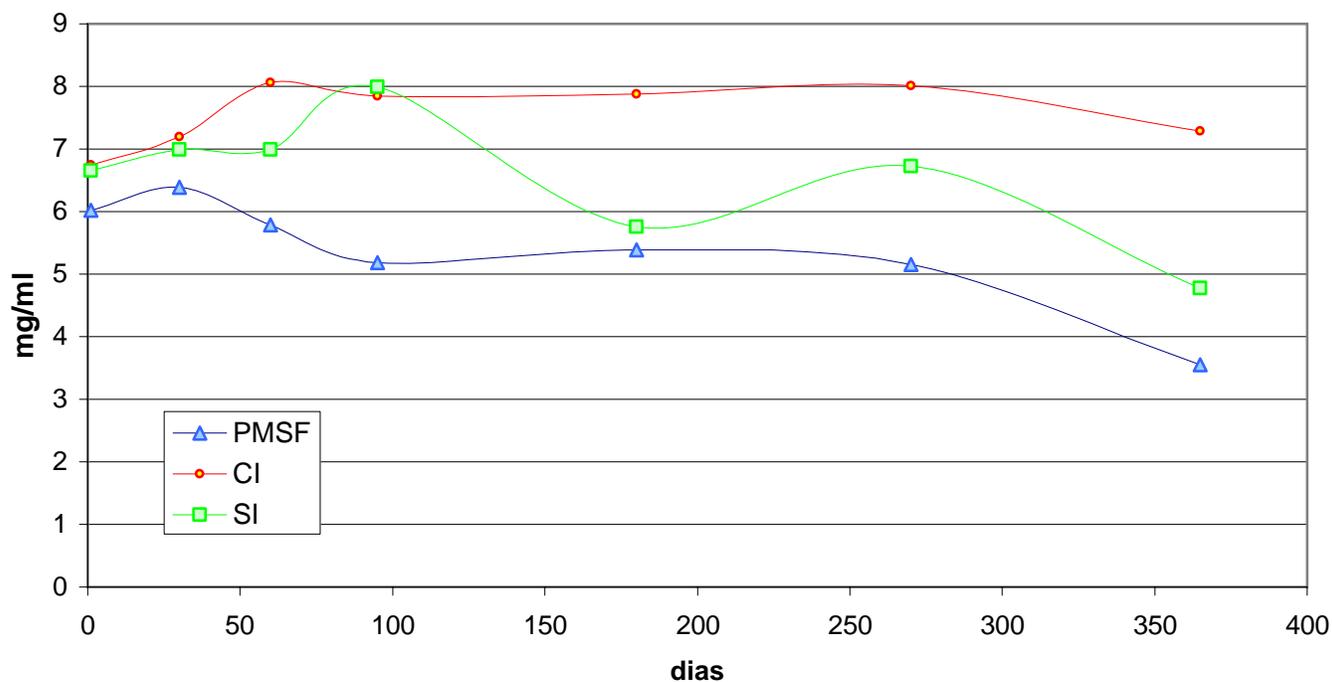
Tabla 5

Promedio de las cuantificaciones proteicas por tratamiento

	Promedio	Desviación estándar	Varianza
SI	6.554	1.024	1.048
PMSF	5.353	0.917	0.840
CI	7.576	0.501	0.251

Gráfica 1

Cantidad de proteínas a través del tiempo en los tres lotes del extracto antigénico.



S: extracto sin inhibidores, **PMSF:** extracto con el inhibidor de proteasas PMSF, **CI:** extracto tratado con la combinación de inhibidores.

7.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida

Los pesos moleculares de 10 componentes relevantes detectados inicialmente fueron: 90, 74, 72, 55, 44, 34, 31, 28, 25 y 20 kDa. Todos estos componentes están presentes en los geles realizados a los 7 y 30 días para los tres lotes tratados (sin inhibidores con PMSF y con una combinación de inhibidores), siendo el más aparente el de 44kDa y los de menor relevancia los de 20 y 25 kDa.

Los componentes encontrados en los geles realizados en el transcurso de un año para los tres lotes del extracto (SI, PMSF,CI) pueden observarse en las figuras 7(8 días), 8 (30 días), 9 (90 días), 10 (180 días), 11 (270 días) y 12 (360 días). La relevancia cualitativa de los componentes seleccionados por tratamiento a través del tiempo se observan en la gráfica 2 (SI), 3 (PMSF) y 4 (CI).

Figura 7

Componentes encontrados para los tres lotes del extracto antigénico en el SDS-PAGE realizado 8 días después de la extracción

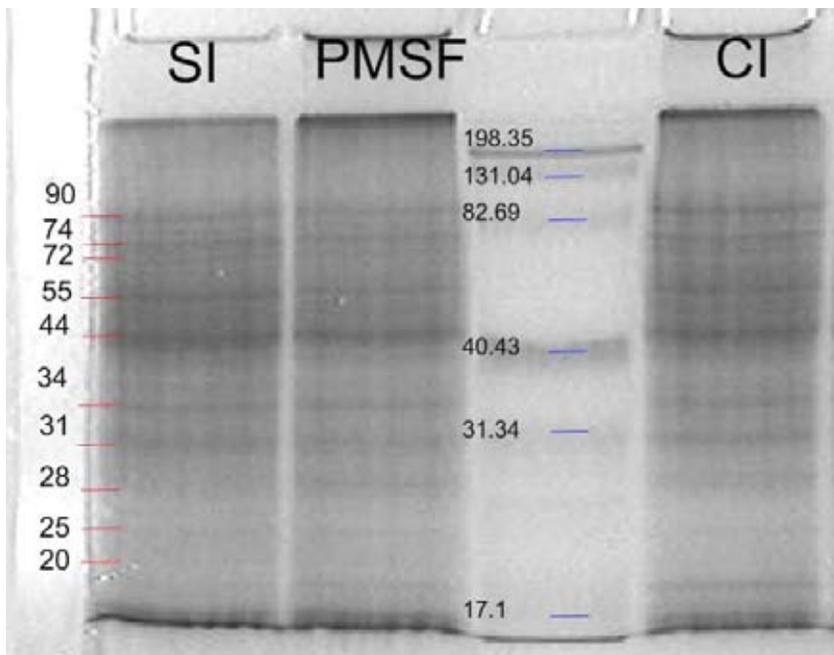
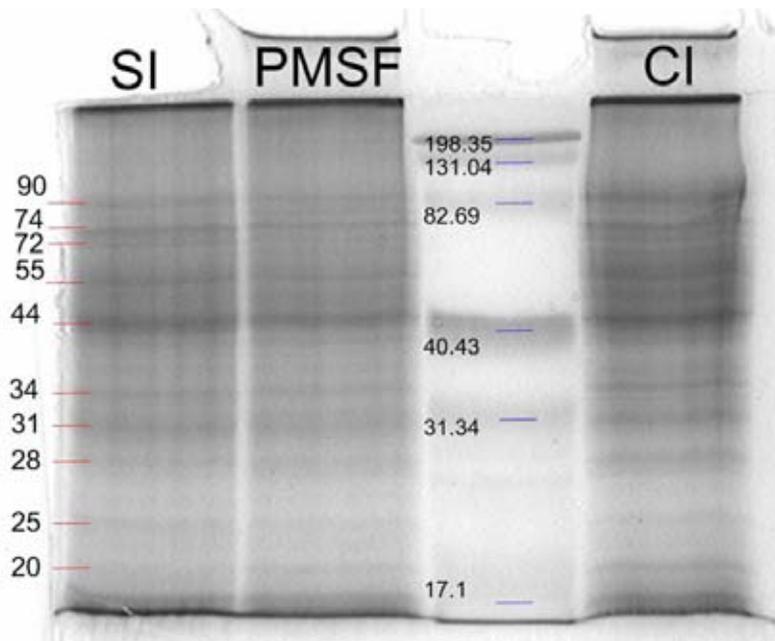


Figura 8

Componentes encontrados para los tres lotes del extracto antigénico en el SDS-PAGE realizado 30 días después de la extracción.



S: extracto sin inhibidores, **PMSF:** extracto con el inhibidor de proteasas PMSF, **CI:** extracto tratado con la combinación de inhibidores.

Figura 9

Componentes encontrados para los tres lotes del extracto antigénico en el SDS-PAGE realizado 90 días después de la extracción.

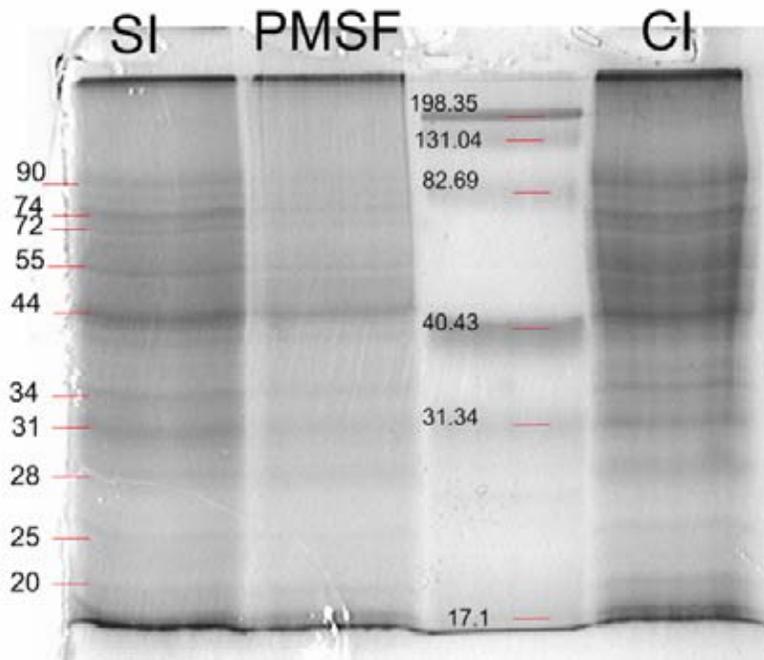
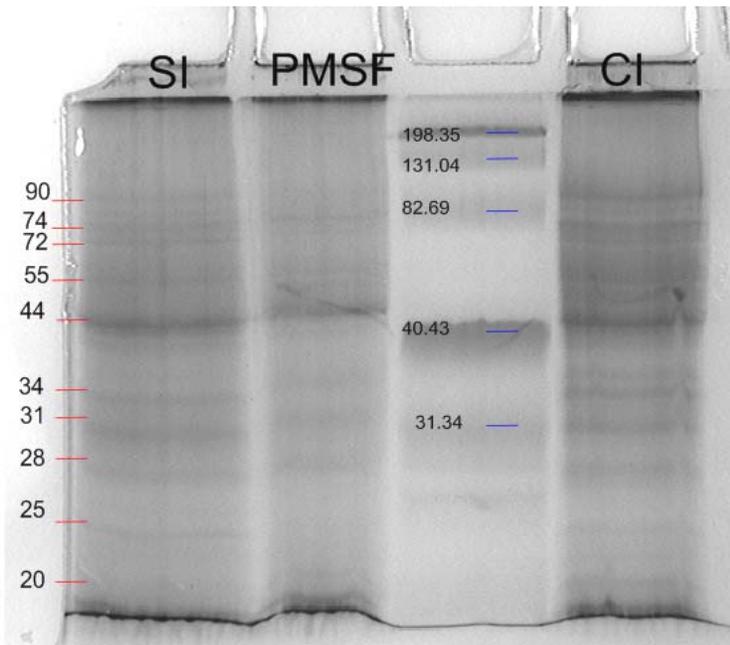


Figura 10

Componentes encontrados para los tres lotes del extracto antigénico en el SDS-PAGE realizado 180 días después de la extracción.



SI: extracto sin inhibidores, **PMSF:** extracto con el inhibidor de proteasas PMSF, **CI:** extracto tratado con la combinación de inhibidores.

Figura 11

Componentes encontrados para los tres lotes del extracto antigénico en el SDS-PAGE realizado 270 días después de la extracción.

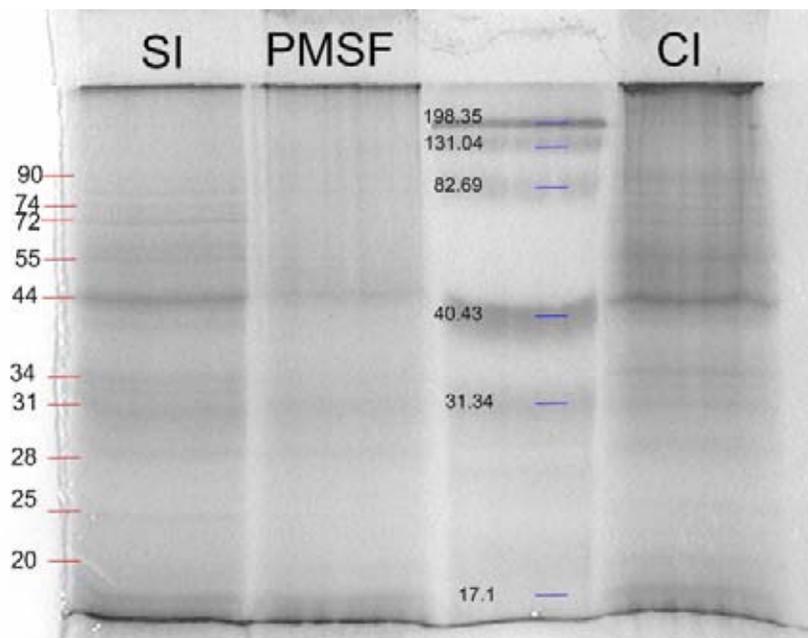
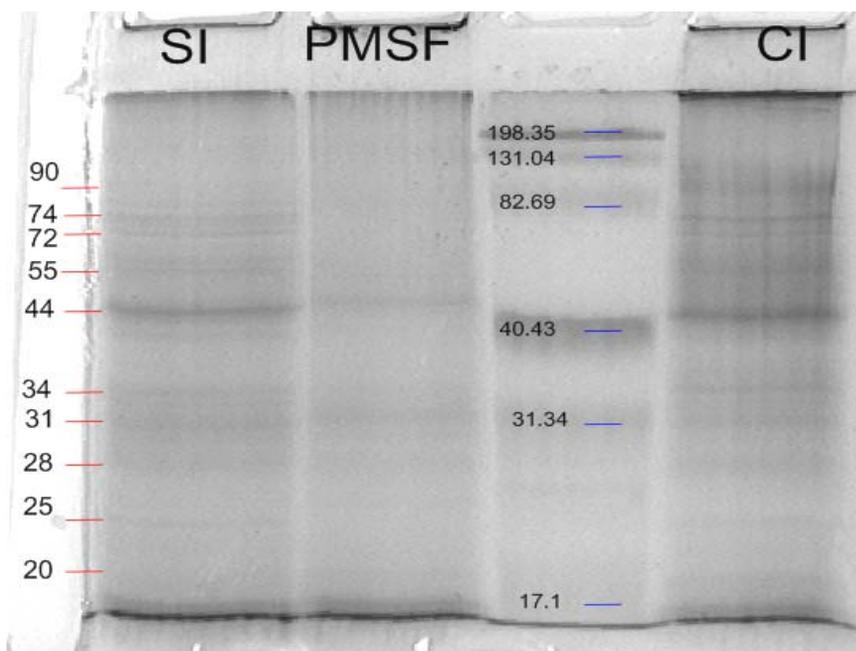


Figura 12

Componentes encontrados para los tres lotes del extracto antigénico en el SDS-PAGE realizado 365 días después de la extracción.

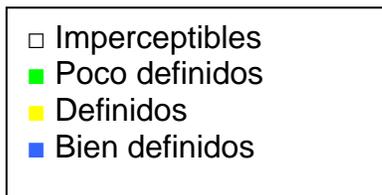
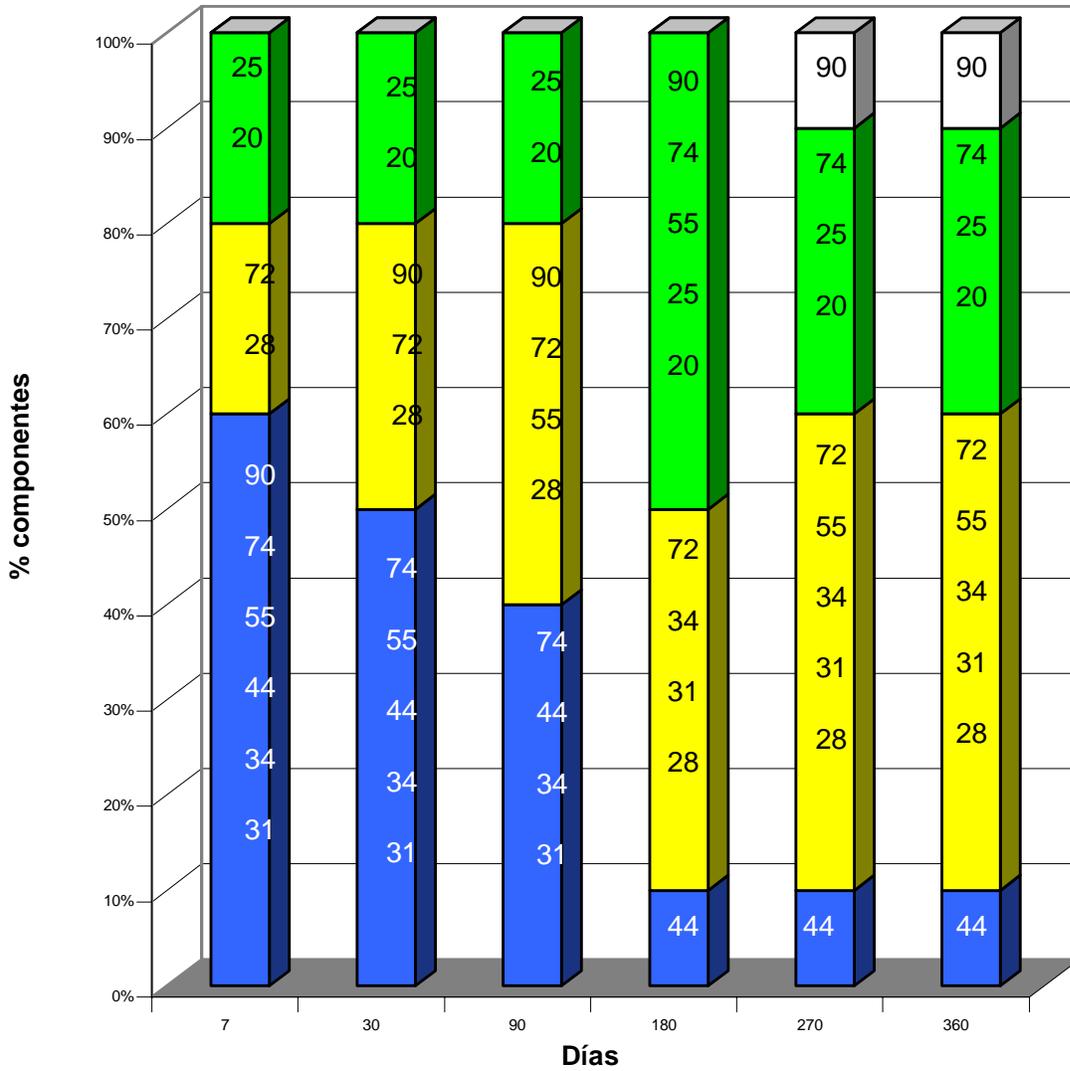


SI: extracto sin inhibidores, **PMSF:** extracto con el inhibidor de proteasas PMSF, **CI:** extracto tratado con la combinación de inhibidores.

Gráfica 2 – Lote del extracto antigénico tratado sin inhibidores de proteasas (SI)

Apariencia de los componentes observados es SDS-PAGE a través del tiempo.

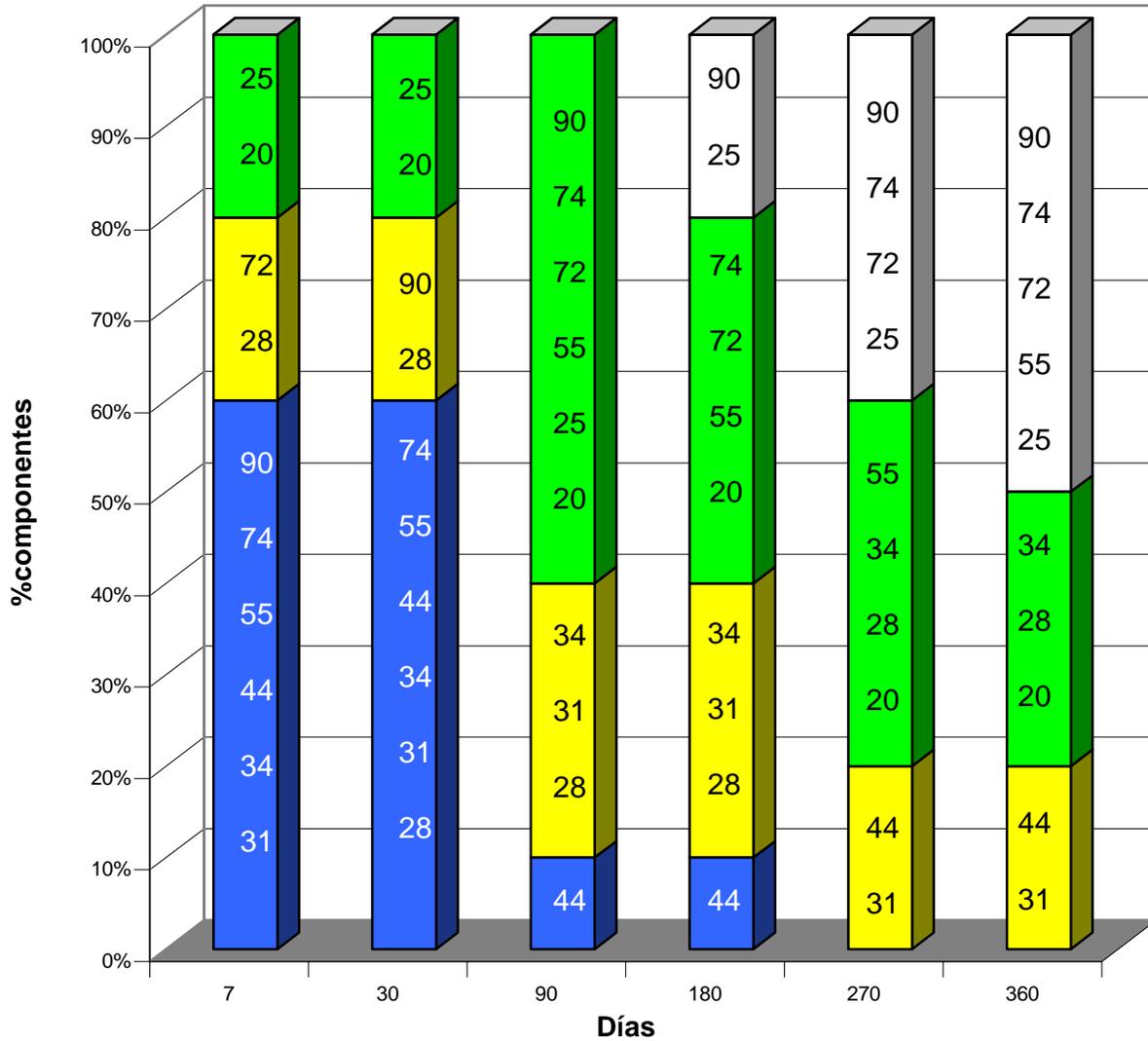
Los números en las columnas corresponden al peso molecular (kDa) de los componentes de cada clasificación.



Gráfica 3 – Lote del extracto antigénico tratado con PMSF

Apariencia de los componentes observados es SDS-PAGE a través del tiempo.

Los números en las columnas corresponden al peso molecular (kDa) de los componentes de cada clasificación.

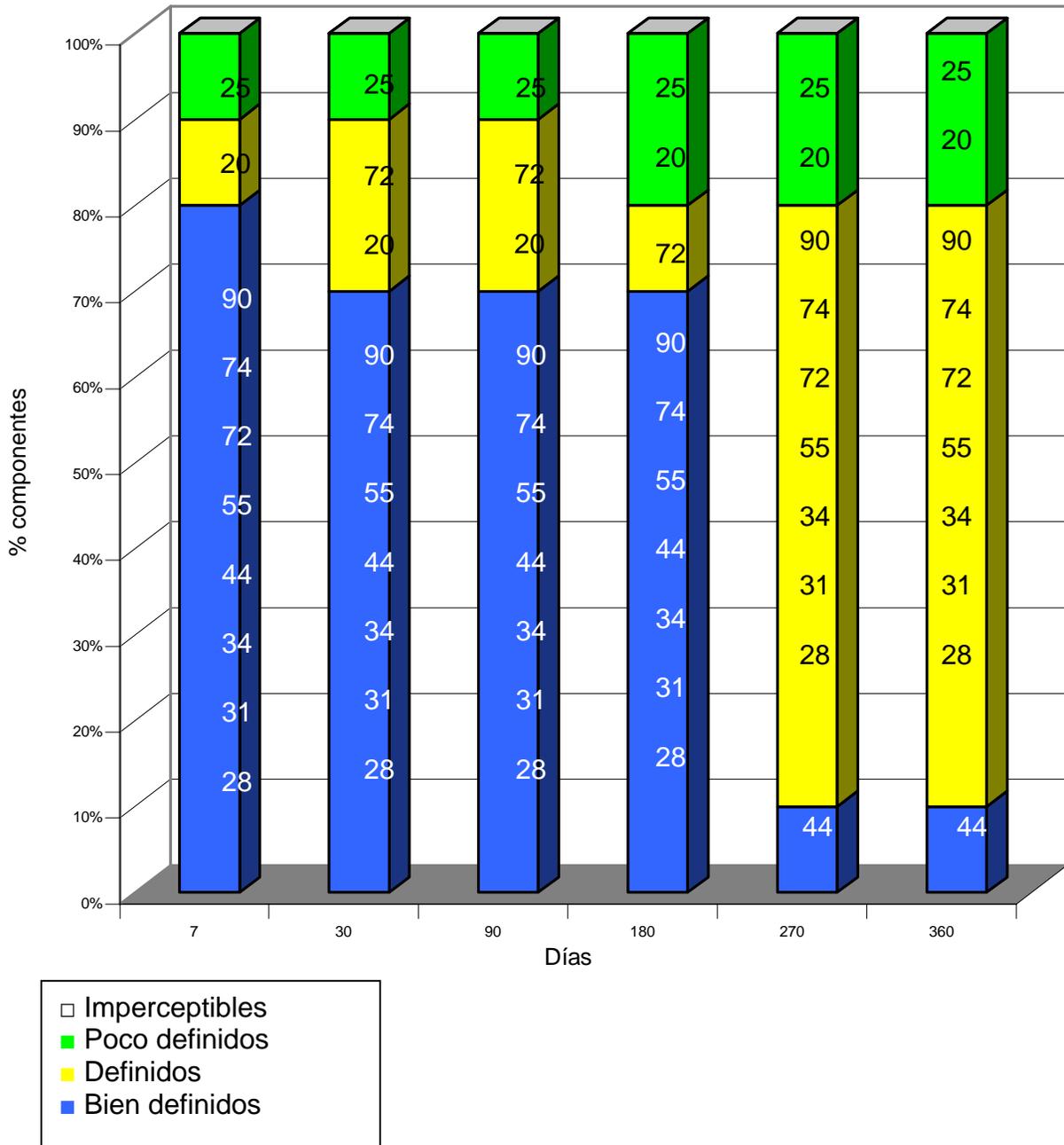


- Imperceptibles
- Poco definidos
- Definidos
- Bien definidos

Gráfica 4 – Lote del extracto antigénico tratado con una combinación de inhibidores de proteasas (CI).

Apariencia de los componentes observados es SDS-PAGE a través del tiempo

Los números en las columnas corresponden al peso molecular (kDa) de los componentes de cada clasificación.



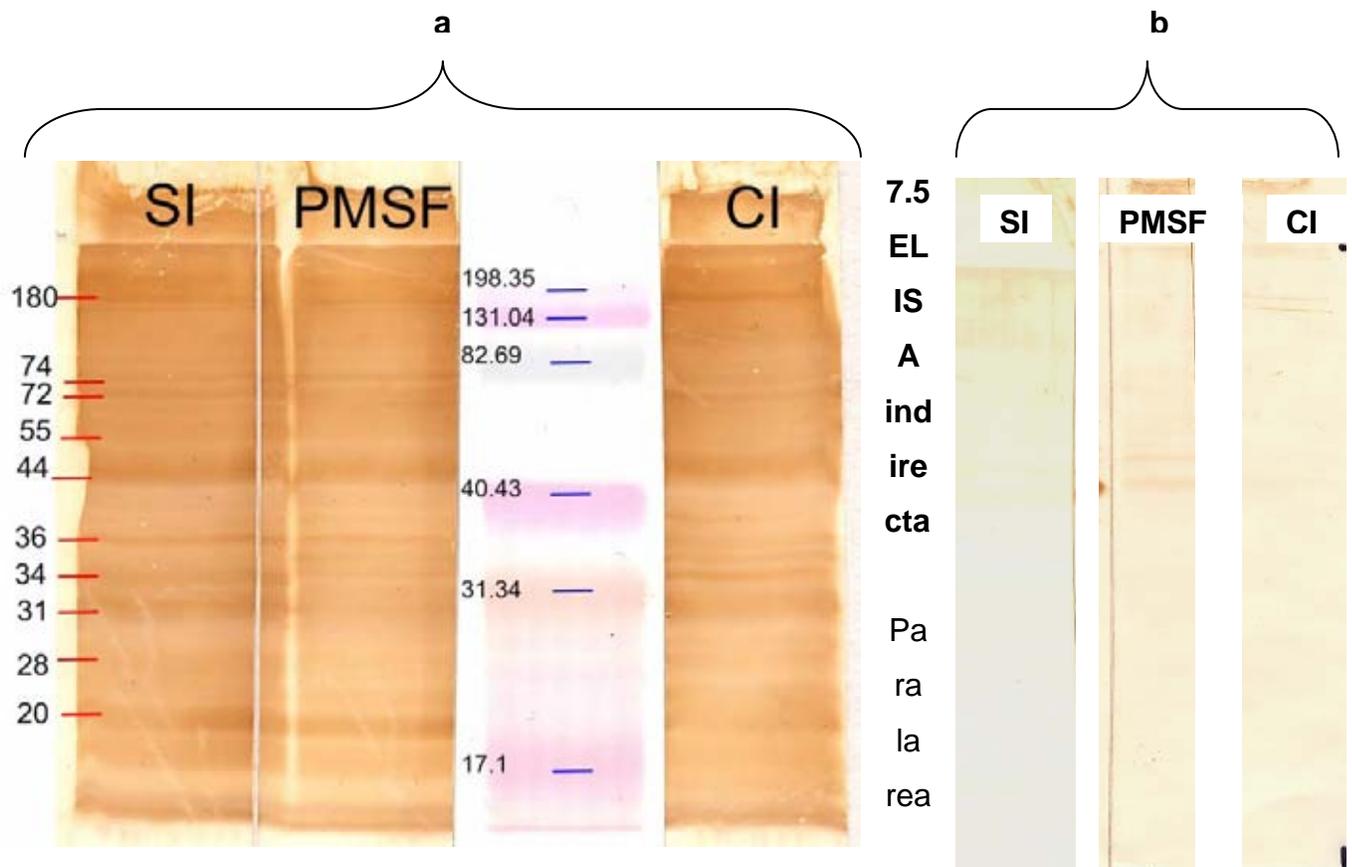
7.4 Electroinmunotransferencia (Western-blot)

Al probar la reactividad de los componentes encontrados en los lotes del extracto antigénico contra un *pool* de sueros de individuos positivos a la infección con *Trypanosoma cruzi* por medio de la técnica de electroinmunotransferencia se observó que los componentes del extracto antigénico que presentan reactividad en los tres lotes tratados, corresponden a los siguientes pesos moleculares: 180, 74, 60, 45, 34, 30, 22 kDa.

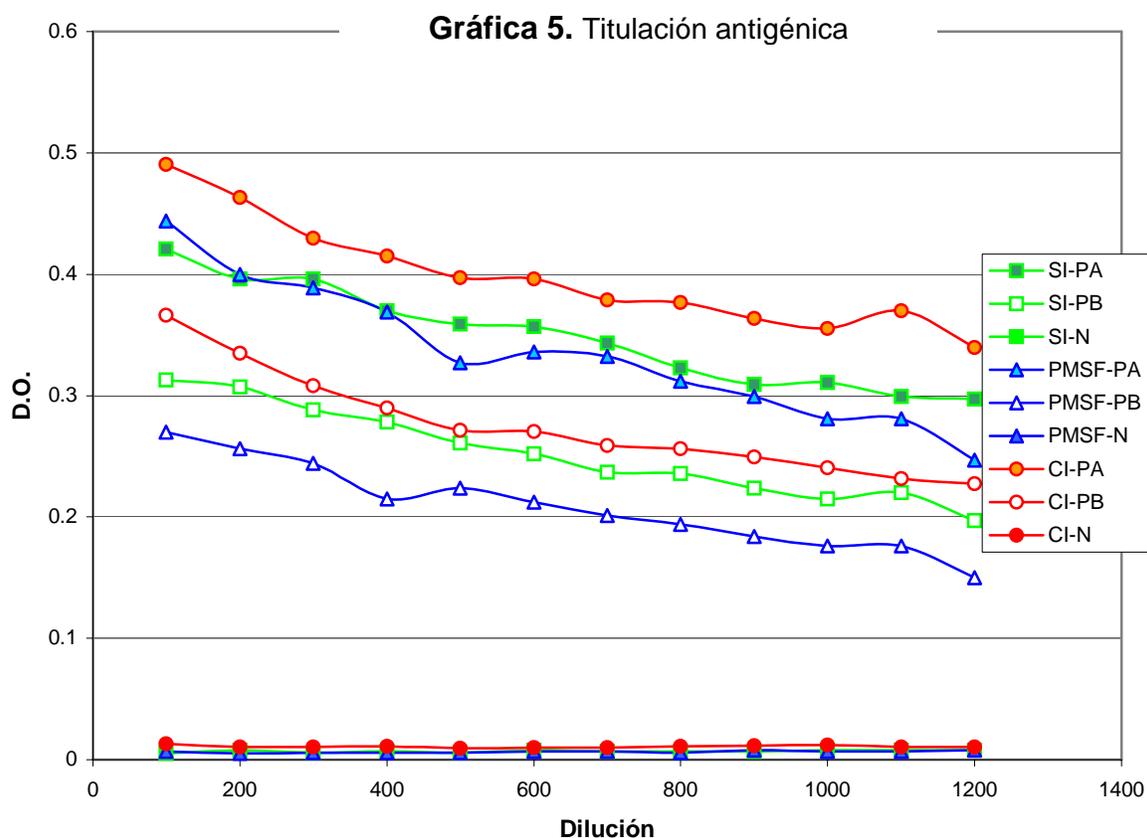
Estos componentes fueron probados contra un suero positivo a *Leishmania mexicana*, así como contra un suero normal; en ninguno caso se presentó reactividad (figura 13).

Figura 13- Reactividad de los tres lotes del extracto antigénico contra a) suero reactivo a *T. cruzi* b) suero reactivo a *L. mexicana*.

inhibidores **SI**: extracto sin, **PMSF**: extracto con el inhibidor de proteasas PMSF, **CI**: extracto tratado con la combinación de inhibidores



lización del inmunoensayo enzimático con los extractos antigénicos se realizó la titulación antigénica correspondiente, empleando sueros de reactividades conocidas, y un conjugado titulado previamente en una dilución 1:28 000. Para conocer la concentración óptima, se realizaron diluciones progresivas de los extractos, entre 1:100 y 1:1200, para ser probadas con los sueros previamente titulados cuyas densidades ópticas (D.O.) son de 0.450 para el reactivo positivo alto (PA) de 0.235 (D.O.) para el reactivo positivo bajo (PB) y de 0.038 (D.O.) para el no reactivo (N). Se determinó con base en las lecturas (D.O.) obtenidas con el extracto tratado con PMSF que la concentración óptima se presentó en dilución 1:400. Los resultados de la titulación se muestran en la gráfica 5.

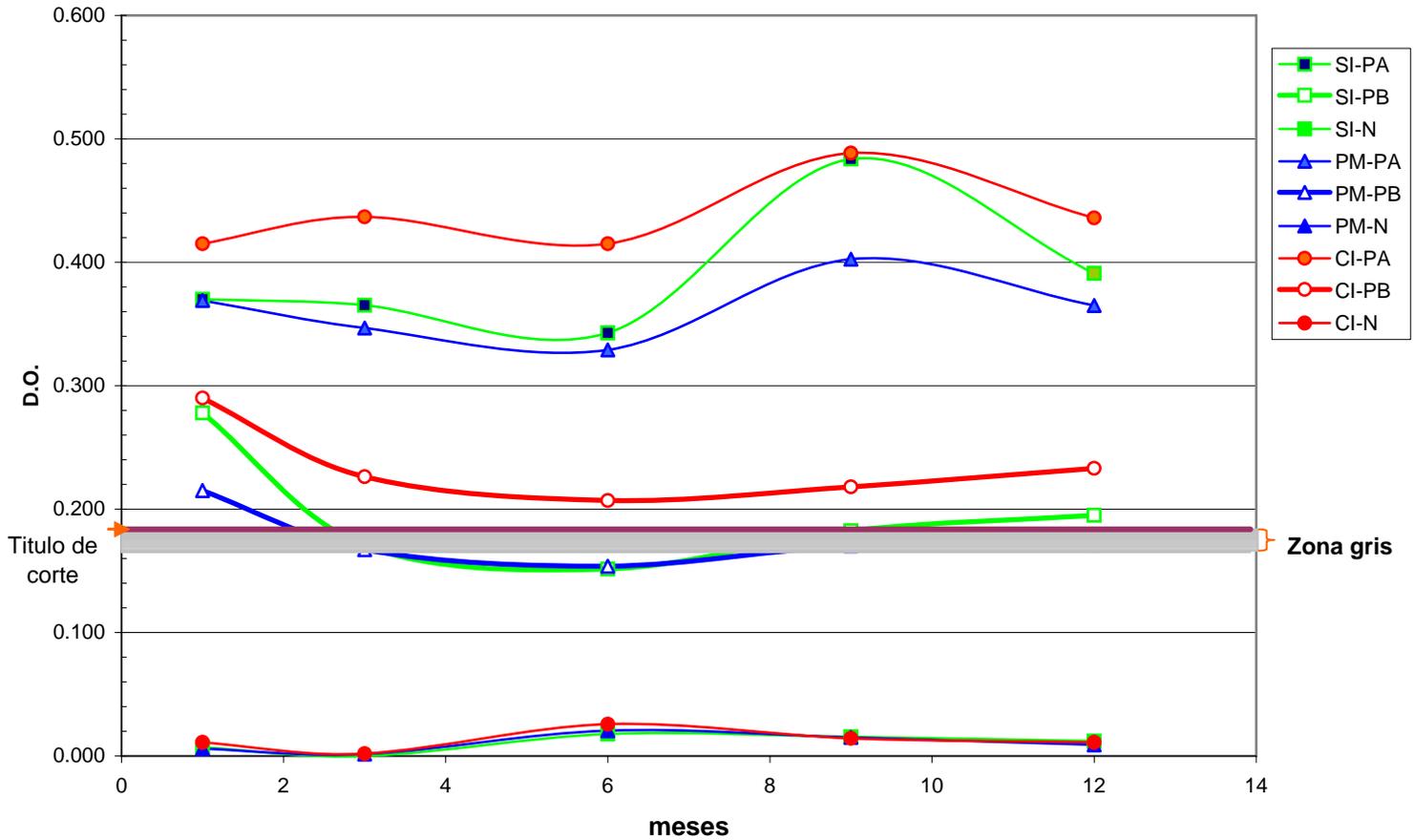


Densidad (D.O.) de sueros reactivos y no reactivos en diluciones sucesivas de los tres lotes del extracto antigénico. **PA:** suero positivo alto, **PB** suero positivo bajo y **N** suero normal. **SI:** extracto sin, **PMSF:** extracto con el inhibidor de proteasas PMSF, **CI:** extracto tratado con la combinación de inhibidores.

Este procedimiento se realizó en las mismas condiciones durante un año, en periodos de tres meses a partir de la extracción del antígeno, se realizaron pruebas

de ELISA simultáneas con los tres lotes del reactivo antigénico en una dilución de 1:400, empleando los tres sueros de reactividad conocida ya mencionados. Los resultados se muestran en la gráfica 6. Se compararon las reactividades obtenidas con los sueros empleados (reactivo alto, reactivo bajo y normal) en los tres lotes del reactivo antigénico. Se encontró que las reactividades del suero reactivo alto no presenta diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.05$) entre los lotes tratados; sin embargo, para el suero reactivo bajo si existen diferencias estadísticamente significativas entre el lote con PMSF y el tratado con la combinación de inhibidores ($P = 0.011$), sin que estos muestren diferencias estadísticamente significativas al compararlos con el lote sin inhibidores. Para el caso del suero Normal, no existen diferencias entre las reactividades de los tres lotes.

Gráfica 6 –Técnica de ELISA indirecta con sueros reactivos y no reactivos a *T. cruzi*



Antígeno en dilución 1:400, conjugado en dilución 1:28000

PA: suero positivo alto, **PB** suero positivo bajo y **N** suero normal. . **SI:** extracto sin, **PMSF:** extracto con el inhibidor de proteasas PMSF, **CI:** extracto tratado con la combinación de inhibidores

7.6 Determinación de la reactividad de los extractos antigénicos hacia sueros reactivos a *Leishmania mexicana*

Empleando la prueba de ELISA indirecta, se determinó la reactividad de los tres lotes del reactivo antigénico contra 10 sueros de pacientes con diagnóstico de Leishmaniasis cutánea (*L. mexicana*) de los cuales 5 corresponden a la forma clínica localizada (LCL) y 5 a la difusa (LCD). La densidad óptica obtenida para los 10 sueros fue inferior a 0.160, en el rango estipulado como no reactivo. Los títulos obtenidos para cada suero se presentan en la tabla 10.

Tabla 10 – D.O. (490nm) en ELISA indirecta presentadas hacia sueros de individuos con diagnóstico de leishmaniosis cutánea localizada (LCL) y la forma difusa (LCD) con los extractos antigénicos: Sin inhibidores (SI), con PMSF, con la combinación de inhibidores (CI)

		SI	PMSF	CI
LCL	1	0.006	0.006	0.019
	2	0.009	0.013	0.023
	3	0.009	0.019	0.026
	4	0.003	0.001	0.006
	5	0.034	0.031	0.036
LCD	6	0.013	0.014	0.022
	7	0.016	0.016	0.023
	8	0.019	0.015	0.036
	9	0.040	0.073	0.089
	10	0.013	0.014	0.022

8. DISCUSIÓN

Los antígenos empleados para el diagnóstico de *T. cruzi*, pueden estar representados por fracciones proteicas y glucoproteicas totales, semipurificadas, purificadas e incluso parásitos enteros. Dadas las características del proceso de extracción en este trabajo, se trata de un antígeno semipurificado, compuesto principalmente por glucoproteínas de la membrana plasmática. En los extractos de *T. cruzi* se ha reportado la presencia de diferentes clases de proteasas (de serina, cisteína, treonina y metaloproteasas) (Cazzulo J., 1999), por lo que el bloquear una sola de estas vías por medio de inhibidores, puede no garantizar que la actividad proteolítica disminuya; por el contrario, podría incluso favorecer otras formas de proteólisis y afectar la concentración proteica. Para comprobar si esto ocurre, sería necesario medir la actividad proteolítica de cada uno de los lotes, lo cual podría realizarse por pruebas con diferentes sustratos (Sarath, G. 2000).

Con respecto a la concentración proteica de los tres lotes del extracto antigénico, se observa que el lote tratado con la combinación de inhibidores presenta mayor concentración que el sin inhibidores y que el lote con PMSF fue el que mostró menor rendimiento proteico. Debido a que la combinación incluye 5 diferentes inhibidores de proteasas (AEBSF, Bestatina, EDTA, E-64, Pepstasina A), los resultados obtenidos concuerdan con lo esperado al limitar la acción proteolítica lo que se refleja en la concentración proteica de este lote. En cuanto al PMSF, se esperaba que al ser un inhibidor de proteasas de serina principalmente, limitará cierta actividad proteolítica y que el lote tratado con este mantuviera una mayor cantidad de proteínas que sin inhibidor; sin embargo, en este caso no ocurrió así.

A partir de la década de los 60s, el PMSF empezó a ser ampliamente estudiado, especialmente por sus efectos inhibitorios ante enzimas de vertebrados como tripsina, quimotripsina y acetilcolinesterasa (Turini, 1969); posteriormente empezó a ser empleado como inhibidor de proteasas en reactivos antigénicos con fines diagnósticos por diversos investigadores; en el caso de *T. cruzi*, se señala su empleo en diferentes concentraciones desde 0.4 mM hasta 10 mM (Grögl, 1985; Araujo, 1984; Rodríguez, 1987; Nogueira, 1982); debido a su reiterada mención en la

literatura es que inicialmente se eligió para su empleo en uno de los lotes; sin embargo, no se reportan evaluaciones comparativas de su efectividad en especial en sistemas similares a los que se presenta en este trabajo.

A pesar de que en estos resultados no se comprueba que la actividad proteolítica del lote con PMSF sea mayor a la que presentan los otros dos, se sabe que además de proteólisis podrían existir otros factores que disminuyan concentraciones proteicas como pueden ser concentración, temperatura y tiempos de acción de los inhibidores. Respecto a la finalidad de este trabajo, si es posible afirmar que el lote con PMSF presentó la menor efectividad para mantener la concentración proteica.

En el SDS-PAGE se aprecia que tanto en el lote tratado con la combinación de inhibidores como el de sin inhibidores, la pérdida de componentes es poco notoria; sin embargo, la relevancia de los componentes proteicos disminuye a través del tiempo, lo que significa una disminución en la concentración de estos componentes. Con el lote tratado sin inhibidores, el componente de 90 kDa resulta imperceptible a partir de los 270 días. En el lote tratado con PMSF, desde los tres meses no se aprecian los componentes de 90 y 25 kDa y a los 12 meses han desaparecido el 50% de los componentes (90, 74, 72, 55 y 25 kDa). Estos componentes que aparentemente desaparecen, corresponden casi en su totalidad a los de mayor peso molecular; lo cual, aunado a la disminución en la relevancia de los componentes, concuerda con lo descrito en la tabla 2 sobre las características frecuentes de la proteólisis no deseada (North y Beynon, 2000), por lo que se supone la posibilidad que en el lote tratado con PMSF siga existiendo actividad proteolítica; sin embargo, dado que no se realizaron ensayos que permitan detectar esta actividad en forma específica, no podemos descartar que la pérdida de componentes en el tratamiento con PMSF se deba a otras causas como se señaló anteriormente respecto a la cuantificación de proteínas totales.

En Western-blot, los tres lotes conservan buena reactividad y especificidad con reconocimientos similares a *T. cruzi*, sin cruce inmunológico con sueros reactivos a *L. mexicana* y sin reactividad ante sueros normales.

En la prueba de ELISA indirecta, se presentan reactividades muy similares entre los lotes especialmente con el suero de reactividad alta; sin embargo, con el suero de reactividad baja, el cual se ubica cercano a los títulos de corte, se hacen más aparentes las variaciones en reactividad y se observa que el lote tratado con la combinación de inhibidores presenta mayor reactividad a la presentada por el lote con PMSF. A pesar de lo anterior, ninguno de estos dos lotes presenta reactividad significativamente diferente a la presentada por el extracto sin inhibidores. En el caso de la prueba de ELISA, es necesario tomar en cuenta que ésta tiene títulos de corte, a partir de los cuales, una muestra es considerada reactiva o no reactiva. Esta prueba fue calibrada con fines diagnósticos con antígenos y sueros de procedencia mexicana, los títulos de corte se ubican para sueros reactivos en 0.180 (D.O.), con una zona gris entre 0.160 y 0.179 D.O. y no reactivo menor a 0.160; en la gráfica 5 se presentan los resultados obtenidos para la reactividad del suero bajo, se observa que los lotes SI y PMSF presentaron reactividades que disminuyeron gradualmente de los valores de reactividad a través de zona gris e incluso hacia valores no reactivos, a diferencia del lote con la combinación de inhibidores, el cual siempre se conservó dentro de valores de reactividad. Este comportamiento es de especial interés para los objetivos de este trabajo ya que la finalidad es mejorar estos reactivos con fines diagnósticos para el país ya que para que un procedimiento de diagnóstico serológico sea confiable debe presentar buena sensibilidad y especificidad.

En el presente trabajo se corrobora la factibilidad de conservar muy buena reactividad antigénica de un extracto durante un año por medio del uso de una combinación de inhibidores de proteasas, aún cuando se reporta en la literatura la degradación de estos reactivos antigénicos en tiempos menores a 3 meses incluso con el empleo de inhibidores de proteasas y su almacenamiento a baja temperatura (-20° C) (De Lima, 2001).

Este trabajo plantea la posibilidad de continuarlo después del año para determinar hasta cuando se conservan las reactividades antigénicas aceptables, especialmente relacionadas con la prueba de ELISA indirecta. A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se generan nuevas preguntas como sería la velocidad de

degradación proteica ante diferentes condiciones de temperatura en relación a la infraestructura presentada en los diferentes centros de diagnóstico que serían a -20°C (congelación), 4°C (refrigerador y cámaras frías para transporte de biológicos) y temperatura ambiente lo que nos permitiría determinar si el uso de inhibidores podría conservar las cualidades de estos reactivos antigénicos en condiciones que permitan su transporte para el empleo en laboratorios alejados de las grandes ciudades del país con infraestructuras limitadas.

En el presente trabajo es posible confirmar que para mantener la cantidad y calidad proteica de un extracto antigénico es necesario tomar medidas que prevengan su degradación; sin embargo, no existe una metodología bien estandarizada que pueda ser empleada universalmente para estos fines, puesto que cada sistema celular presenta diferentes problemáticas por lo que se requiere el estudio individual de cada sistema. En este caso el lote tratado con PMSF mostró no ser efectivo para su uso en la metodología de extracción empleada y el tratado con una combinación cuyos inhibidores fueron seleccionados con base en las proteasas reportadas en la literatura para este parásito mostró ser muy eficaz.

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, existe la motivación para continuar profundizando con los objetivos aquí planteados y que sería relacionarlos básicamente a protocolizar algunas variantes como el realizar los experimentos por duplicado y medir actividad enzimática, lo cual permitiría un análisis estadístico más profundo.

9. CONCLUSIONES

El extracto tratado con PMSF, mostró una efectividad menor a la presentada por el control. Probablemente la causa sea un incremento en la actividad proteolítica que con las pruebas realizadas en este trabajo no es posible corroborarlo.

El lote tratado con la combinación de inhibidores mostró mayor efectividad al conservar una buena reactividad del extracto antigénico, en comparación con el control y el tratado con PMSF.

El empleo de inhibidores de proteasas propició efectos positivos al mantener una buena calidad de los extractos antigénicos, como ocurrió en el extracto tratado con la combinación de inhibidores. En el caso del uso del PMSF se apreciaron efectos negativos que provocaron la degradación proteica del extracto antigénico.

En el presente trabajo se propone el empleo de una combinación de inhibidores, seleccionados con base en las proteasas existentes en *T. cruzi* para su empleo en extractos antigénicos para la detección de anticuerpos específicos en procedimientos serodiagnósticos a tiempos prolongados.

10. PERSPECTIVAS

Existen otras posibilidades para continuar estudiando los componentes de estos extractos antigénicos, sus proteasas y otros inhibidores que podrían emplearse. Se podría conocer el o los tipos de proteasas que se encuentran en los extractos obtenidos, si la actividad proteolítica predominante correspondiera a cisteína proteasas, como se ha reportado en otros extractos de este mismo parásito (De Lima, 1999) y así, determinar el tipo inhibidor que se requeriría específicamente. Para profundizar en el estudio de las proteasas y sus inhibidores, se requeriría realizar caracterizaciones bioquímicas a los antígenos con diferentes sustratos para detectar actividades proteolíticas (Wilk, 2000), uno para cada inhibidor, además de diversas combinaciones de los mismos con sus respectivos controles debidamente protocolizados.

Otro aspecto de interés, sería el determinar las proteasas que se presentan con estos procedimientos de extracción para ser comparados con los de otras cepas y aislados y determinar si existe alguna relación entre la presencia y cantidad de proteasas con las virulencias y patrones anatomoclinicos observados en diversas cepas, aislados y clonas referidos en la literatura y así, contribuir a un conocimiento mas profundo no sólo de la biología del parásito, sino de las diferencias intraespecíficas del mismo. Existen algunos trabajos, relacionados con inhibidores de proteasas, particularmente la cruzipaína, donde se plantea la factibilidad del uso de inhibidores específicos para proponer otras alternativas en la terapéutica farmacológica contra la enfermedad de Chagas.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar D.H. 2004, **Caracterización biológica e inmunoquímica de cuatro aislados de *Trypanosoma cruzi***. Tesis de licenciatura. Biología. Facultad de Ciencias, UNAM. México. D.F. pp 53
- Andrews, N.W., Hong, K., Robbins, E.S., Neussenzweig, V. 1987. **Stage-Specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi***. Exp. Parasitol. 64:474-484.
- Araujo, FG. Y Guptill D. 1984. **Use of antigen preparations of the amastigote stage of *Trypanosoma cruzi* in the serology of Chagas disease**. Am. J. Trop. Med. Hyg., 33(3): 362-371.
- Ashall, F. 1990. **Characterización of an alkaline peptidase of *Trypanosoma cruzi* and other trypanosomatids**. Mol. Biochem Parasitol. 38:77-88.
- Beynon, R.J., Salvesen, G. 2000. **Commercially available proteinase inhibitors**, En: Proteolytic Enzymes a practical approach (ed. Beynon, R. y Bond S. J.) , Oxford . 211-232pp.
- Blanco, S. B., Segura, E., Cura, E., Chuit, R., Tulián, L., Flores, I., Garbarino, G., Villalonga, J.F., Gurtier, R. E., 2000, **Congenital transmisión of *Trypanosoma cruzi*: an operational outline for detecting and treating infected infants in north western Argentina**, Trop Med Inter Health. 5(4): 293-301.
- Borrer, J., Triplehoin, C., Jhonson, N. 1992. **Chapter 7. Study of insects**. 6a ed. Sounders. College Publishing. E.U.A. pp. 146-163.
- Bucio, M.I., Cabrera, M., Segura, E.L., Zenteno, E., Salazar- Schettino, P.M. 1999. **Identification of Immunodominant antigens in mexican strains of *Trypanosoma cruzi***. Immunological Investigations, 28(4), 257-268.
- Carvalho, T.U, De Souza, W. 1986. **Infectivity of amastigotes of *Trypanosoma cruzi***. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 28(4): 205-212.
- Burleigh, B.A, Woolsey, A.M. 2002. **Cell signaling and *Trypanosoma cruzi* invasion**. Celular Microbiology. 4(11), 701-711.
- Carcavallo, R., Galíndez-Girón, J., Jurberg, J., Galvao, C.and, H. Lent. 1999.

- Vol.III 747-792) **Geographical distribution and alti-latitudinal dispersion:** En: Atlas of Chagas Disease vectors in the Americas (R U Carcavallo, I Galíndez-Girón, J Jurberg, H Lent -eds). Editora Fiocruz, Rio de Janeiro
- Cazzulo, J.J., Cazzulo F., Martínez, J., Franke de C. 1990. **Some kinetics of a cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*.** *Biochim. Biophys Acta.* 1037: 186-191.
 - Cazzulo, J.J. 1999. **La cruzipaina, cisteína proteinasa principal del *Trypanosoma cruzi*. Secuencia y organización genómica de los genes que la codifican,** MEDICINA (Buenos Aires), 59(2): 7-10.
 - Chagas C. 1909. **Nova tripanozomíaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiologico de nova entidade morbida do homem.** Mem Inst Oswaldo Cruz ; 1: 159-218.
 - De Lima, et al. 2001. **Purificación Parcial y Empleo de Fracciones Glucosídicas de *Trypanosoma cruzi* en el Diagnostico de al Enfermedad de Chagas,** Acta Científica Venezolana. 52: 235-247.
 - De Souza W. 2002. **Basic cell Biology of *Trypanosoma cruzi*,** Current Pharmaceutical Design. 8:269-285.
 - Deutscher, M.P. 1990. **Mantaining Protein Stability.** en: Merhods in Enzimology, Academic Press Inc. San Diego, Vol. 182: 83-89
 - Dumonteil E. 1999. **Update on Chagas' disease in México.** Salud Pública Mex 1999; 41: 322-327.
 - Greig, F. Ashall. 1990. **Electrophoretic detection of *Trypanosoma cruzi* peptidases,** Mol. Biochem. Parasitol. 30: 31-38.
 - Grögi, M. y Kuhn R.E. 1985. **Identification of antigens of *Trypanosoma cruzi* wich induce antibodies during experimental Chagas'disease,** J. Parasitol. 71(2) 183-191.
 - Haro I, Salazar SPM y Cabrera M. 1995. **Diagnóstico morfológico de las parasitosis.** 2º edición. Mendez Editores. México. 289pp.
 - Hart, G., Mills, A.A., Suoto-Padron, T. y de Sousa, W. 1992. ***Trypanosoma cruzi* glycoprotein 72: inmunological análisis and celular localization.** Mol. Cell.

Biochem. 109:25-36

- Itow S., P. Camargo. 1977. **Proteolytic Activities in Cell Extracts of *Trypanosoma cruzi***, Protozool. 24(4): 591-595.
- Katzin, A.M., Colli, W. 1983. **Lectin receptors in *Trypanosoma cruzi*: an N-acetyl-D-glucosamine containing surface glycoprotein specific for the trypomastigote stage.**, Biochim. Biophys. Acta 68:208-215
- Köberle, F. 1968. **Chagas' Disease and Chagas' Syndromes: The Pathology of American Trypanosomiasis.** Adv Parasitol. 6: 63-116.
- Laemmli UK., 1970, **Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4.** Nature. 227:680-685.
- Levine et. al. 1989. **A new revised classification of the protozoa.** J Protozool. 27:1-37.
- Ley, V, Andrews, N. W, Robbins, E.S, Nussenzweig, V. J. 1990. **The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments.** Exp. Med. 171(2): 401-413.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951, **Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.** J. Biol. Chem. 193:265-275
- Mathews, C.K., Van Holde, K.E. 2000. **Bioquímica**, 2^a ed., McGraw Hill – Interamericana, Madrid.
- Moncayo A. 1997. **Progress Towards the elimination of transmission of Chagas disease in Latin America.** Rapp.trimest. statist. Sanit. Mond., 50: 195-198.
- Nogueira, N., Unkeless, J., Cohn, Z. 1982. **Specific glycoprotein antigens on the surface of insect and mammalian stages of *Trypanosoma cruzi***, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79: 1259-1263.
- North M.J. 1982. **Comparative Biochemistry of the Proteinases of Eukaryotic Microorganisms**, Microbiol. Rev. 46: 308-340.
- North, M.J., R.J. Beynon. 2000. **Prevention of Unwanted Proteolysis**, En: Proteolytic Enzymes a practical approach (ed. Beynon, R. y Bond S. J.) , Oxford.

211-232 pp.

- Nussenzweig V, Deane LM, Kloetzel J. 1963. **Differences in Antigenic Constitution of Strains of Trypanosoma cruzi**. Exp Parasitol. 14: 221-232.
- Prata A. 1994. **Chagas' Disease**. Infectious Disease Clinics of North America, 8: 61-76.
- Rodriguez, SGP, y Vottero-Cima, E. 1987. **Characterization of Trypanosoma cruzi antigens recognized by sera from patients with chronic Chagas' disease**, Int. Archs Allergy appl. Immun. 84: 410-413.
- Salazar-Schettino PM, Haro I de, Jiménez J, García E. 1983. **Dos Nuevas Localizaciones de Transmisores de Enfermedad de Chagas en la República Mexicana**. Sal Pub Mex 25:77-82.
- Salazar-Schettino PM, Haro I de, Uribarren T. 1988. **Chagas disease in Mexico**. Parasitology Today . 4(12): 348-52.
- Sarath, G., Zeece, M., Penheiter, A.R. 2000. **Protease assay methods**, en En: Proteolytic Enzymes a practical approach (ed. Beynon, R. y Bond S. J.) p. 211-232, Oxford.
- Schofield CJ. 2000. **Challenges of Chagas disease vector control in Central America**. WHO/WHOPES. 36pp.
- Snary D., 1980, **Trypanosoma cruzi: Antigenic Invariance of the Cell Surface Glycoprotein**. Exp Parasitol, 49: 68-77.
- Tafuri W.L., Maria T.A., Lopes ER. 1971. **Lesões do Plexo Mientérico do Esofago, do Jejuno e do Colo de Chagásicos crónicos. Estudo ao Microscopio Eletrónico**. Rev Inst Med Trop São Paulo, 13: 76-91.
- Tafuri W.L.. 1987. **Patogenia da Doença de Chagas**. Rev Inst Med Trop São Paulo, 29: 194-199.
- .Tay J, Salazar-Schettino PM, Bucio MI, Zárata R, Zárata L. 1980. **La Enfermedad de Chagas en la República Mexicana**. Sal Pub Mex 12:409-450.

- Tay J.y col. 1980. **Evolución del *Trypanosoma cruzi* cepa mexicana en el huésped vertebrado, invertebrado e in vitro.** Salud Pública de México. 22(5):513-520.
- Teixeira ARL, Teixeira L, Santos-Buch CA. 1975. **The Immunology of Experimental Chagas' Disease. IV. Production of Lesions in Rabbits Similar to those of Chronic Chagas' Disease in Man.** Am J Pathol., 80: 163-180.
- Teixeira A.R.LI, Teixeira G, Macedo V, Prata A. 1978. **Acquired Cell-mediated Immunodepression in Acute Chagas' Disease.** J Clin Invest. 62: 1132-1141.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.** Proc Natl Acad Sci. 76:4350-4354.
- Turini, P., Kurooka, S., Steer, M., Corbascio, A.N., Singer, T.P. 1969. **The action of Phenylmethylsulfonyl Fluoride on Human acetylcholinesterase, chymotrypsin and trypsin,** The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 187(1):98-104.
- UNAM, Secretaria de Salud. 2002. **Manual de laboratorio para el diagnóstico de la infección por *Trypanosoma cruzi*.**, México
- Umezawa, H. 1982. **Low molecular weight enzyme inhibitors of microbial origin.** Ann Rev Microbiol, 36: 75-99
- Von Brand T. 1966. **Biochemistry of parasites.** Academic Press. New York and London. 429 pp.
- Wendel S, Brener ME, Camargo A, Rassi A. 1992. **Chagas Disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine.** ISBT Brazil. 256 pp.
- WHO. 2002. **The World Health Report,** Geneva: World Health Organization
- Yoshida, N., Blanco, S.A., Araguth, M.F., Russo, M., González, J. 1990. **The stage-specific 90-kilodalton surface antigen of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*.** Mol. Biochem. Parasitol., 39:39-46.
- Zeledon, R, Alvarenga, N. J, Schosinsky, K. 1997. En: "Chagas Disease", pp. Pan American Health Organization. Publ. No. 347