



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA EXPERIMENTAL
LABORATORIO DE INMUNOPARASITOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA Y
ULTRAESTRUCTURAL
DE LA TRIOSA-FOSFATO ISOMERASA DE
TRYPANOSOMA CRUZI MEDIANTE UN
ANTICUERPO MONOCLONAL

T E S I S

QUE PRESENTA
ARTURO ANGEL CORTÉS FIGUEROA
PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
ÁREA INMUNOLOGÍA



ASESORA: DRA. INGEBORG BECKER FAUSER

MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Índice	Página
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCION.....	3
Ciclo de vida.....	5
El consumo de glucosa en Trypanosomas.....	6
La glicólisis en parásitos de la familia trypanosomatidae.....	9
Los glicosomas.....	10
Enzimas glicolíticas en Kinetoplastidos.....	14
Triosafosfato isomerasa (TIM).....	15
Inhibición de la glicólisis en el control de enfermedades parasitarias.....	16
HIPOTESIS.....	18
OBJETIVOS.....	18
MATERIAL Y METODOS.....	19
1.- Preparación del antígeno.....	19
2.- Producción de Anticuerpos Monoclonales (Acm).....	19
3.- Producción de líquido de ascitis.....	20
4.- Purificación de los anticuerpos monoclonales.....	20
5.- Fraccionamiento de Trypanosomas.....	21
6.- Western blots.....	21
7.- Identificación de la TIMTc en pacientes con enfermedad de Chagas.....	21
8.- Localización microscópica de la TIM en epimastigotes de T. cruzi con inmunoperoxidasa.....	22
9.- Tinción de inmunofluorescencia de epimastigotes de T. cruzi con Acm 6-11G.....	22
10.- Estudios de microscopía electrónica.....	23
11.- Efectos del Acm 6-11G en el crecimiento del parásito in vitro evaluados por microscopía electrónica.....	23
12.- Inhibición del crecimiento de epimastigotes de T. cruzi con el Acm 6-11G in vitro.....	24
RESULTADOS.....	24
1.- Producción de anticuerpos.....	25
2.- Western blot.....	27
3.- Localización por inmunoperoxidasa e inmunofluorescencia de la TIM de epimastigotes de T. cruzi con Acm 6-11G.....	29
4.- Localización ultraestructural de la TIM en epimastigotes de T. cruzi.....	30
5.- Inhibición del crecimiento in vitro.....	32
6.- Análisis ultraestructural de los daños producidos por el Acm 6-11G cuando es agregado al cultivo de T. cruzi.....	34
DISCUSIÓN.....	36
CONCLUSIONES.....	38
BIBLIOGRAFIA.....	39

CARACTERIZACION INMUNOLOGICA Y ULTRAESTRUCTURAL DE LA TRIOSA-FOSFATO ISOMERASA DE *TRYPANOSOMA CRUZI* MEDIANTE UN ANTICUERPO MONOCLONAL

PROYECTO PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS AREA INMUNOLOGIA

Alumno: Arturo Angel Cortés Figueroa

Laboratorio de inmunoparasitología, Facultad de Medicina, UNAM

Becario de CONACYT para el posgrado en Ciencias Biomédicas, UNAM

RESUMEN

En los parásitos del orden Kinetoplastida, tales como *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei* la glicólisis se lleva a cabo en los glicosomas por medio de las enzimas glicolíticas. Una de las enzimas glicolíticas es la triosafofosfato isomerasa (TIM), la cual en *T. brucei* está localizada exclusivamente en los glicosomas, mientras que en *T. cruzi* no ha sido totalmente determinada su localización. *T. cruzi* tiene un ciclo de vida totalmente diferente al de *T. brucei* dado que está transitoriamente en el torrente sanguíneo antes de infectar diferentes tipos de células. En contraste *T. brucei* permanece en el torrente sanguíneo. En el presente trabajo hicimos un anticuerpo monoclonal (Acm 6-11G) contra TIM recombinante de *T. cruzi* (TIMrTc). La incubación de epimastigotes de *T. cruzi* con el Acm inhibió la supervivencia del parásito. Los Western-blots mostraron que el Acm reconoció la TIMrTc y una banda de 27 kDa en los lisados de *T. cruzi* que corresponde a la TIMTc. El suero de pacientes con enfermedad de Chagas reconoció la TIMrTc y presentó reacción cruzada con la TIM recombinante humana. Esta reacción cruzada entre la TIM del parásito y la humana posiblemente contribuye con la patogénesis autoinmune de la enfermedad de Chagas. La microscopia electrónica de epimastigotes de *T. cruzi* con el Acm mostró que la TIM se encuentra dentro de los glicosomas, en el citoplasma, el núcleo y el kinetoplasto. En conjunto los datos aportan una nueva luz sobre la TIM de *T. cruzi* y abren perspectivas para el diseño de medicamentos.

ABSTRACT

In parasites of the order Kinetoplastida, such as *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*, glycolysis is carried out by glycolytic enzymes in glycosomes. One of the glycolytic enzymes triosephosphate isomerase (TIM), which in *T. brucei* is localized exclusively in glycosomes, whereas in *T. cruzi* the localization of TIM has not been fully ascertained. *T. cruzi* has a different life cycle than *T. brucei*, since it is transiently in the bloodstream before infecting different cells. In contrast, *T. brucei* remains in the bloodstream. In the present work we made a monoclonal antibody (mAb 6-11G) against recombinant *T. cruzi* TIM (rTcTIM). Incubation of *T. cruzi* epimastigotes with the mAb inhibited parasite survival. Western-blotting showed that the mAb recognized rTcTIM and a 27 kDA band in *T. cruzi* lysates that corresponded to TcTIM. Sera from patients with Chagas disease recognized rTcTIM and cross-reacted with human recombinant TIM. The cross-reactivity between parasite and human TIM possibly contributes to the autoimmune pathogenesis of Chagas disease. Electron microscopy of *T. cruzi* epimastigotes with the mAb showed that TIM was located within glycosomes, in the cytoplasm, the nucleus and the kinetoplast. Collectively, the data shed new light on *T. cruzi* TIM and opens perspectives for drug design.

INTRODUCCION:

La trypanosomiasis Americana o enfermedad de Chagas es producida por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*, el cual es endémico en América Latina donde afecta alrededor de 18 a 20 millones de personas. Se encuentra en tercer lugar entre las enfermedades parasitarias más frecuentes a nivel mundial, después del paludismo y la esquistosomiasis (Dusanic 93, Moncayo 93, WHO 91). En México se han identificado áreas endémicas en prácticamente toda la República, predominando en Chiapas, Oaxaca, Jalisco, Yucatán, y Zacatecas (Tay 92, Velasco 91, Ramos-Ligonio 2006, Ramsey JM 2005). El parásito es transmitido por triatomas y en el hombre es de localización intracelular, preferentemente en el músculo cardiaco. La enfermedad de Chagas se caracteriza por un período de incubación que oscila entre 4-10 días, el cual generalmente es asintomático. Algunos pacientes pueden presentar manifestaciones de puerta de entrada como el Signo de Romaña (complejo oftalmoganglionar) o bien Chagomas de inoculación. Durante la fase aguda, los pacientes pueden presentar linfadenopatías, fiebre (37-38⁰C) intermitente, irregular que guarda relación con la parasitemia, persistiendo de 2-4 semanas. Puede haber hepato-esplenomegalia, meningoencefalitis y cardiopatías. En los casos graves pueden evolucionar hacia la insuficiencia cardiaca congestiva de instalación súbita y muerte rápida. La fase aguda generalmente termina de 30 a 90 días posteriores a la infección. Después de 10 a 20 años (fase indeterminada), la enfermedad de Chagas evoluciona hacia la enfermedad crónica, y solo del 30 al 40% de las personas infectadas desarrollan esta fase. La incidencia de infección se estima en un millón de casos por año y la mortalidad es de 45,000 muertes en el mismo período. Es en la fase crónica cuando la vida del paciente corre peligro debido a la cardiomiopatía con bloqueos en el sistema de conducción y produciendo cardiomegalia con debilitamiento del músculo cardiaco. Frecuentemente hay síndromes mega-gastrointestinales con grandes dilataciones en esófago y colon (megaesófago, megacolon). El desarrollo de las dilataciones puede ser totalmente asintomático y el paciente puede morir súbitamente por infartos o ruptura de los órganos afectados. En la fase crónica la parasitemia es esporádica y escasa, por lo que no es posible detectar el parásito por métodos directos. En la fase aguda la mortalidad es baja y depende de la edad del enfermo, en niños menores de dos años se ha reportado hasta de un 10% y

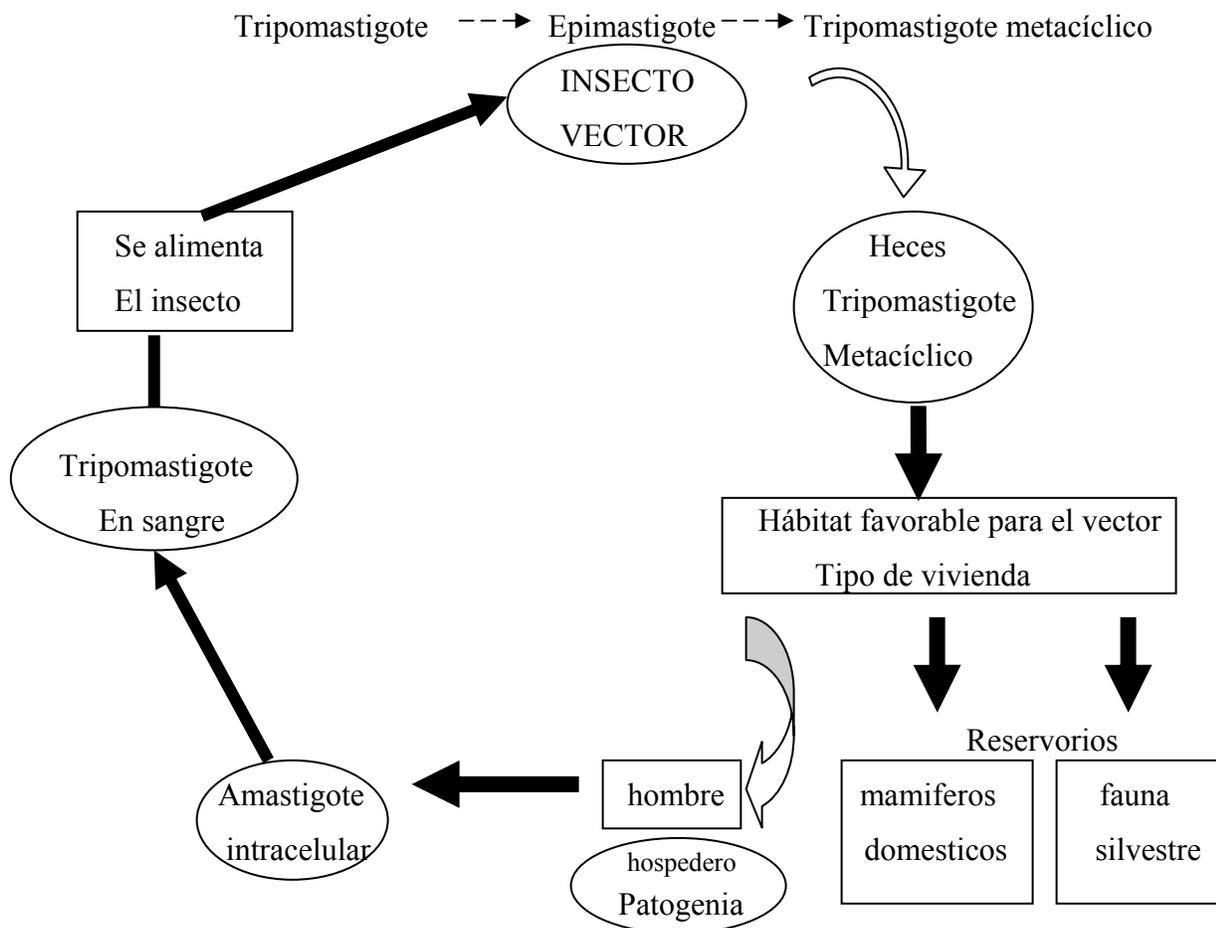
cuando la infección es intrauterina puede ser mucho mayor como lo revela un estudio en el cual de 90 neonatos con tripanosomiasis congénita nacieron vivos solo 37. Sin embargo como se menciono la mayor parte de enfermos en ésta fase son asintomáticos. En la fase crónica la mortalidad reportada varia según la región pero en general se refiere de un 10%, y del 30% al 40% de los enfermos desarrolla enfermedad cardiaca, de éstos el 70% mueren por falla cardiaca y el 30% de muerte súbita (Velasco 91, Viotti 06).

T. cruzi es un protozoo perteneciente al *subphylum Mastigophora* del *phylum Sarcomastigophora*, orden Kinetoplastida, que comprende los organismos flagelados con cinetoplasto. Se incluye en la sección estercoraria, junto con el grupo de tripanosomas cuyos estadios infectivos se desarrollan en el tubo digestivo de los insectos vectores y contaminan a los hospederos mamíferos a través de las heces. Los tripanosomas que se multiplican en los vertebrados por estadios intracelulares se incluyen en el subgénero *Schizotrypanum*, por eso su nombre taxonómico completo es *Trypanosoma (schizotrypanum) cruzi*. El parásito tiene tres formas evolutivas en su desarrollo que son: tripomastigote, amastigote y epimastigote.

El tripomastigote es una forma alargada del parásito con el cinetoplasto grande detrás del núcleo. El flagelo se extiende prácticamente a todo lo largo de la célula. Esta forma se encuentra en sangre de los hospederos mamíferos. En el intestino posterior de los insectos reducidos vectores se encuentran los tripomastigotes metacíclicos, que constituyen la forma infectiva del parásito. Tiene forma de "C" y miden de 16.3 a 21.8 μm de largo incluido el flagelo libre, el ancho fluctúa entre 0.7 y 5.9 μm . El amastigote se encuentra dentro de la célula del hospedero vertebrado o en cultivos de células; constituye la forma reproductiva intracelular del parásito en células humanas o de animales hospederos. Tiene un pequeño flagelo junto al cinetoplasto y mide entre 2.4 y 6.5 μm de diámetro. Los epimastigotes constituyen una etapa de transición en el hospedero vertebrado, son las formas reproductivas en insectos vectores hasta que maduran a tripomastigotes metacíclicos; miden de 35 a 40 μm de largo, el cinetoplasto se localiza anterior al núcleo y el flagelo se origina cerca del cinetoplasto. Crecen bien en medios de cultivo (NNN, LIT).

Ciclo de vida

El triatomino infectado se alimenta de sangre y defeca simultáneamente, depositando las formas infectantes de tripomastigotes metacíclicos con las heces. Las heces contaminadas pueden ser llevadas a la conjuntiva donde pueden originar la principal manifestación de puerta de entrada, el signo de Romaña. Puede llegar a la sangre por otras vías como son por heridas en la piel o por vía oral. El parásito presenta un tropismo especial por el músculo cardiaco, donde penetra las células y forma nidos de amastigotes. Cuando los amastigotes intracelulares se liberan y pasan a la sangre del hospedero, se convierten en tripomastigotes infectantes que circulan en la sangre y pueden ser ingeridos por un insecto vector no infectado, en cuyas vías digestivas se diferencia y multiplica hasta originar las formas infectantes de tripomastigotes metacíclicos para completar el ciclo de vida.



El vector se vuelve infectivo entre 30 a 40 días posterior a la ingestión de sangre infectada. La infección persiste en el intestino del triatomino durante toda su vida, en general el tiempo de vida de los triatóminos puede variar según la especie, pero se ha reportado de varios meses hasta un año o dos.

Hay dos hipótesis para explicar la patogenia de la enfermedad de Chagas: la primera establece que *T. cruzi* induce respuestas inmunitarias contra los tejidos del hospedero independientes de la persistencia del parásito es decir se genera autoinmunidad. La segunda es que la persistencia del parásito en los tejidos infectados produce una reacción inflamatoria crónica. En ambos casos, las alteraciones de carácter inmunopatológico acaban por producir la destrucción focal y acumulativa de los tejidos y los signos y síntomas de la enfermedad clínica. Se ha demostrado la existencia de antígenos compartidos por *T. cruzi* y células de mamíferos y sobre su función en la patogenia de la enfermedad de Chagas. Se aportaron pruebas de la existencia de anticuerpos contra el endocardio, el endotelio vascular y el intersticio cardíaco (anticuerpos EVI), la laminina, las células nerviosas y el retículo sarcoplásmico cardíaco. Se demostró que los anticuerpos humanos contra las proteínas P ribosómicas del parásito reaccionaban con proteínas del hospedero.

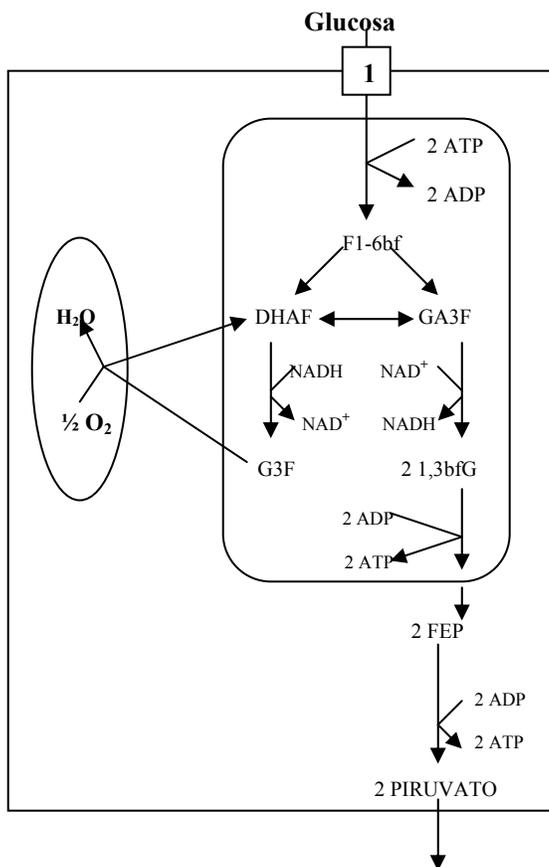
El consumo de glucosa en Trypanosomas.

Dado que la glucosa es una molécula de tamaño grande y polar, no puede pasar las membranas celulares por simple difusión. Las células que utilizan glucosa deben elaborar sistemas específicos de transporte. Se han identificado numerosos transportadores de glucosa, y se ha hecho la caracterización estructural y funcional de estas proteínas integrales de membrana. *Leishmania* por ejemplo cataboliza la glucosa a muy altos rangos, tanto en fase de promastigote en el intestino del insecto, así como de amastigote en el interior de los macrófagos del vertebrado. Estos cambios de ambiente son necesarios para completar el ciclo de vida del parásito, pero hay cambios sustanciales en la disponibilidad de sustratos. En el intestino del insecto, el acceso a la glucosa y otros azúcares se logra principalmente durante la alimentación del insecto con la sangre del vertebrado, con lo cual se obtienen los sustratos que requiere el parásito para completar su desarrollo a la forma infecciosa: la metacíclica. El amastigote intracelular tiene acceso a mucho menor nivel de glucosa dentro del polifagosoma

del macrófago y en consecuencia se reduce el catabolismo de glucosa e incrementa el de ácidos grasos en comparación con el promastigote (Langford 94).

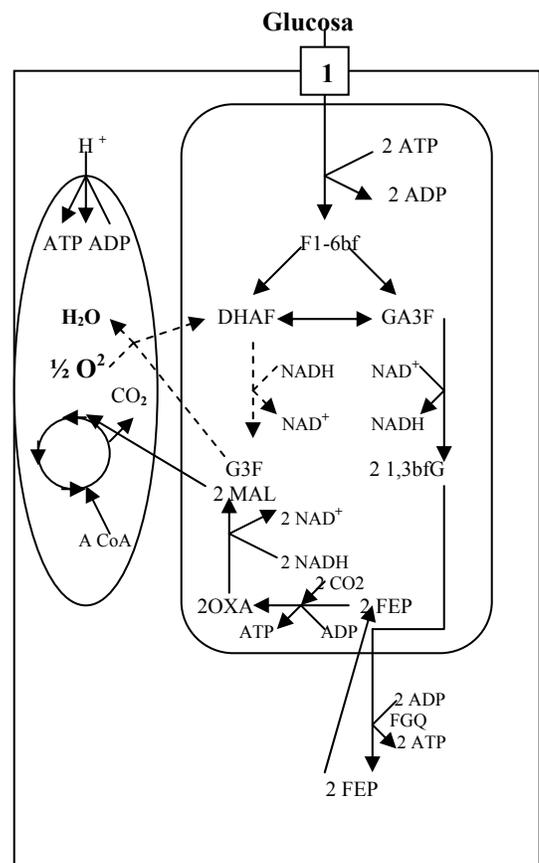
La glucosa es transportada por un mecanismo de difusión facilitada, bajo un gradiente de concentración y es posible que el segundo paso del transporte tenga una afinidad intermedia. La tasa de consumo de glucosa cambia drásticamente al cambiar las condiciones de aerobiosis o anaerobiosis, pero la suma en la producción de piruvato y glicerol es la misma bajo estas dos condiciones (Visser 81). En condiciones aeróbicas, la glucosa es convertida en piruvato y en anaerobiosis son producidas cantidades equimolares de piruvato y glicerol (esquema).

a *Trypanosoma sanguíneo* – aerobiosis



Torrente sanguíneo

b *Tripomastigote procíclico*



Tubo digestivo

Esquema: Utilización de la glucosa en *Trypanosoma Brucei* en fase sanguínea (a) y en intestino del insecto (b). 1 – transporte de la glucosa a través de las membranas: plasmática y glicosomal. F1,6bf: fructosa 1,6bifosfato, DHAF: dihidroxiacetona fosfato, GA3F: gliceraldehído 3-fosfato, 1,3bfG: 1,3-bifosfoglicerato, FGQ: fosfoglicerato quinasa, FEP:

fosfoenolpiruvato, OXA: oxalacetato, MAL: malato, \bigcirc ciclo de Krebs, H^+ : cadena respiratoria.

En condiciones anaeróbicas el 3fosfoglicerato (Gli3F) es convertido a glicerol por la glicerol quinasa (Opperdoes 87), como el ΔG^0 de esta reacción es fuertemente positivo el glicerol inhibe la glicólisis a bajas concentraciones (50 % de inhibición a 0.8 mM). (Fairlamb 77). Sin embargo, en condiciones aeróbicas el glicerol puede ser usado como sustrato. La concentración de glucosa intracelular, el flujo glicolítico y el rango de (ATP)/(ADP) es función de la concentración extracelular de glucosa. Es decir en aerobiosis la glucosa intracelular (Glu/i) se mantiene en bajas concentraciones, cuando la glucosa extracelular (Glu/e) se mantiene por debajo de 5 mM, pero por arriba de este parámetro se incrementa drásticamente la Glu/i (Ter Kuile 91). Un incremento en la glucosa extracelular debe causar un incremento en el flujo de glucosa al interior.

En la mayoría de células, la glicólisis se lleva a cabo en el citosol, mientras que en los Trypanosomas en fase sanguínea ocurre en los glicosomas, los cuales son pequeños organelos rodeados de una membrana, que contienen las siete primeras enzimas de la glicólisis en su interior (Opperdoes 77a, 87). Cuando el *Trypanosoma* entra a un huésped vertebrado, pasa al torrente circulatorio. En estas circunstancias las mitocondrias están casi ausentes y poco desarrolladas, careciendo de un ciclo del ácido cítrico (ciclo de los ácidos tricarbónicos o de Krebs) y cadena de transporte de electrones funcionales, y dado que el aporte de glucosa es abundante, ésta sirve como única fuente de carbono y energía para el Trypanosoma. En los Trypanosomas se generan únicamente 4 moléculas de ATP y 2 de piruvato por mol de glucosa y este último es excretado como tal al torrente circulatorio del huésped, debido a que no es metabolizado a lactato o dióxido de carbono y agua, al no entrar al ciclo del ácido cítrico y cadena respiratoria, como ocurre en otros organismos.

Así la generación de energía en estas condiciones da como rendimiento neto 2 moléculas de ATP. Esto parece incongruente ya que el parásito depende únicamente de la glicólisis como fuente de energía en esta fase, pero en realidad esto puede explicar la importancia de los glicosomas en los Cinetoplastos, ya que el flujo glicolítico es muy alto y excede con mucho al de otras células eucariontes. Esto se debe a dos factores: en primer lugar, que las enzimas glicolíticas están concentradas en los glicosomas, obteniéndose una mayor eficiencia en la glicólisis al tener en estos pequeños compartimientos una alta concentración de enzimas y

sustratos que, en comparación con otras células, le permite tener una menor concentración de proteína para esta función y en segundo lugar al abundante aporte de glucosa del medio (Oppenheimer 77a, 84). Los Trypanosomas carecen de almacenes de carbohidratos tales como el glucógeno u otro tipo de polisacáridos y tampoco tienen reservas de energía como la creatinina fosfato o polifosfatos, por lo que la depleción en el aporte de glucosa lleva a los Trypanosomas a una rápida caída del nivel de ATP y pérdida total de la movilidad.

La salida del piruvato como producto terminal de la glicólisis es por difusión facilitada con un acarreador (Barnard 93, Wiemer 92, 95b). Este transportador es saturable, la K_m del piruvato es de 2 mM y exhibe el fenómeno de transacetilación, típica de acarreadores de difusión facilitada.

La glicólisis en parásitos de la familia trypanosomatidae.

La vía glicolítica es una de las vías más importantes en cualquier organismo vivo para iniciar el proceso metabólico de la transformación de glucosa y otras hexosas a energía y otros metabolitos indispensables para la generación de sustratos que entrenen a diversas vías según los requerimientos metabólicos de la célula. La vía glicolítica es una de las más antiguas y conservadas en la naturaleza y las enzimas que la constituyen son bastante homologas entre los distintos tipos de células, tanto procariontas como eucariotas. Los tripanosomas no son una excepción y también dependen de la glicólisis para iniciar la producción de energía.

Los Trypanosomas en el mamífero se dividen cada 6 a 7 horas y este crecimiento rápido requiere el aporte suficiente de nutrientes, no solo de carbohidratos que son abundantes en estos fluidos, sino de colesterol y metales que circulan unidos a proteínas acarreadoras. Las células de vertebrados tienen sistemas de captación por endocitosis, mientras que las células de parásitos pueden tener este mecanismo o únicamente el de pinocitosis. Los Trypanosomas son capaces de interiorizar moléculas exógenas tales como: ferritina, polivinilpirrolidona, o triton WR-1339 (Coppens 87). Asimismo, la presencia de diferentes hidrolasas ácidas en la bolsa flagelar y en los lisosomas de los Trypanosomas demuestran que estos organismos son capaces de digerir material macromolecular.

Los glicosomas

El glicosoma es un organelo dentro del Trypanosoma que le permite mantener un potencial de fosfatos y estado redox que es substancialmente diferente al que prevalece en el citosol de otras células. Esto sugiere que la membrana que rodea a este organelo es una verdadera barrera, ya que los experimentos *in vivo*, con pulsos marcados, han demostrado que en el conjunto de glicosomas los intermediarios glicolíticos se equilibran muy lentamente con el resto de la célula (Visser 81). Estos organelos han sido encontrados en todos los miembros de los protistas del orden Kinetoplasto, tanto de los Trypanosomas (Trypanosoma, Leishmania, Crithidia, Phytomonas) como de Bodonina (Trypanoplasma). La compartimentalización de la glicólisis en Trypanosomas es fundamentalmente diferente a la de todos los organismos eucariontes, en los cuales la glicólisis se lleva a cabo en el citosol. El contenido enzimático del glicosoma varía durante el ciclo de vida del Trypanosoma (Hart 84). La variación en la composición del glicosoma está totalmente coordinada con la variación de la actividad metabólica del parásito. Las formas sanguíneas de Trypanosomas son enteramente dependientes de la conversión de la glucosa a piruvato en aerobiosis, para cubrir sus necesidades energéticas, ya que las mitocondrias no son funcionales. El piruvato es el único producto terminal y es excretado a la sangre del huésped. Como el 90% del contenido proteico de estos organelos son las enzimas glicolíticas se denominan glicosomas, donde la glucosa es metabolizada hasta 3 fosfoglicerato y en el citosol es transformado a piruvato.

La contribución del glicosoma al volumen celular no es muy importante, ocupa el 4.3% del total de éste (Oppendoes 84). Los glicosomas en general tienen un diámetro promedio de 0.27 μm (de 0.2 a 0.8), un radio de 0.135 μm , una área de membrana 0.233 μm^2 y un volumen de 0.0108 μm^3 . Muy pocos glicosomas presentan un core denso con apariencia multilaminar. En el microscopio electrónico se observan con forma redondeada u oval, con cuerpos electrodensos y una fina matriz granular y son rodeados por una membrana simple con una densidad similar a las membranas del retículo endoplásmico y de mitocondrias (6-7 nM). En *T. brucei* se calcula que hay 230 glicosomas por célula (Oppendoes 84), lo que representa un 8 a 9 % del total de la proteína celular en un volumen celular de 58 μm^3 . La concentración de proteína del glicosoma es entre 320 y 360 mg/ml (mientras que la concentración de proteína por célula es de 175 mg/ml), siendo más alta que la de los peroxisomas de mamíferos. El 75 %

de esta proteína está presente en la matriz y el resto está asociado a la membrana glicosomal. La membrana de los glicosomas en los Trypanosomas sanguíneos contiene fosfatidilcolina (68%) y fosfatidiletanolamina (32%) y algo de esfingomielina. Las formas procíclicas del estadio del insecto también contienen fosfatidilserina y fosfatidilinositol.

Los glicosomas de los Trypanosomas se parecen mucho a otros microcuerpos de otros eucariontes, como los peroxisomas. Ambos son esféricos o elipsoides rodeados de una membrana simple, y tienen también una matriz electrodensa y, ocasionalmente, un core cristalino. No hay evidencia que los glicosomas contengan DNA como los peroxisomas, que se definen como organelos parecidos a microcuerpos involucrados en el metabolismo del peróxido y que contienen oxidasas productoras de peróxido y catalasa. A diferencia de mitocondrias y cloroplastos, todas las proteínas de los glicosomas son codificadas por cromosomas nucleares y sintetizadas en ribosomas libres en el citosol, para posteriormente ser importadas post-traduccionalmente al interior del glicosoma sin ningún procesamiento detectable (Hart 87, Clayton 87). Los polipéptidos son sintetizados a su tamaño maduro y dentro del glicosoma no se ha detectado ningún procesamiento secundario o modificación como la fosforilación, glucosilación o unión covalente a lípidos durante la transferencia al interior del glicosoma. Esto hace suponer que toda la información requerida para importar las proteínas al interior del glicosoma reside en la estructura primaria de la proteína misma. La vida media en el citosol de varias proteínas es corta: de 1 a 3.4 min. (Hart 87, Clayton 87). Estos valores son comparables a las altas tasas de translocación descritas para proteínas contenidas en microcuerpos en hígado de rata o levaduras, indicando que en el glicosoma la importación de proteínas es un proceso rápido y eficiente. Se han publicado datos controversiales sobre la vida media de los polipéptidos glicosomales dentro del organelo (Hart 87, Clayton 87, Sommer 94).

La importación de proteínas al interior del glicosoma depende de la presencia de un tripéptido conservado en el C-terminal, análogo a la señal ser-lys-leu (SKL). Esta secuencia es el blanco para la luciferasa de peroxisomas de la luciérnaga (Sommer 94a). Las proteínas se importan a la matriz del peroxisoma después de su traducción (Borst 86,89) y muchas contienen en el extremo C-terminal la señal blanco de peroxisomas 1 (PTS-1) o una relacionada del tipo SKL (Blattner 95, Fung 91, Sommer 92). Esta secuencia es reconocida en proteínas completas dobladas por un receptor soluble citoplasmático, producto de los genes pas8 (*Pichia pastoris*)

(McCollum 93) o pas10 (*Saccharomyces cerevisiae*) (Van der Leij 93). Se ha demostrado la presencia de señal tipo PTS-1 en varias proteínas glicosomales (Sommer 92) aunque estudios posteriores han mostrado que los requerimientos de la secuencia del tripéptido son más laxos en los glicosomas que en los peroxisomas de células de mamífero (Sommer 93,94b). El espectro de variantes del tripéptido tipo SKL en el C-terminal en Trypanosomas difiere marcadamente del observado en células de mamíferos. El primer aminoácido puede ser: serina, alanina o cisteína, como en los peroxisomas, o un aminoácido neutral pequeño (G,H,N,P,T). Los requerimientos para la segunda posición son muy laxos y la leucina del C-terminal puede ser remplazada por un aminoácido hidrofóbico (isoleucina, tirosina o metionina), sin que esto tenga mucho efecto sobre el blanco glicosomal. Al parecer los Trypanosomas compensan esta reducida especificidad para la señal SKL al tener requerimientos más rígidos, de la secuencia del tripéptido, se ha observado que variantes de SKL o incluyendo la misma SKL no funcionan tan eficientemente en tripanosomas como la señal glicosomal PGK de la GAFDH (Blattner 1992). Se ha obtenido evidencia que las señales parecidas al SKL no son solo señales blanco de microcuerpos (Swinkels 91). Aunado a esto, se ha postulado que el alto contenido de cargas positivas en la superficie de las enzimas glicosomales (comparado con el de sus homologas citosólicas de mamíferos), pudiera ser otra señal blanco para ser importadas al interior del glicosoma (Wierenga 87). En peroxisomas existe otra señal en la región N-terminal de la tiolasa y una homóloga en la malato deshidrogenasa (Swinkels 92). Varias proteínas glicosomales no presentan la señal PTS-1, una de las cuales es la aldolasa, pero que tiene en el N-terminal un tripéptido parecido a la PTS-2 (Blattner 95). La comparación entre la aldolasa de Trypanosoma y la citosólica de mamíferos, muestra la presencia de una señal específica de Trypanosomas (Clayton 85, Marchand 88). Aunque el glicosoma es un microcuerpo altamente especializado en la degradación de la glucosa, y no del peróxido de hidrogeno (Opperdoes 84, 88), los glicosomas contienen algunas enzimas que generalmente están asociadas a microcuerpos y peroxisomas, como las involucradas en la β -oxidación y biosíntesis de éterlípidos (Opperdoes 84, 88). En algunas especies de Trypanosomas se ha reportado la presencia de enzimas típicas de peroxisomas como la D-aminoácido oxidasa, la α -hidroxiacida oxidasa y enzimas del ciclo del glioxilato, pero nunca dentro de microcuerpos. Por otro lado, la catalasa que es una enzima típica de microcuerpos, que no es detectable en la mayoría de los Kinetoplastos, aunque si se ha

detectado en glicosomas de *Crithidia luciliae*, *Phytomonas sp.*, y *Trypanoplasma borelli*. Los glicosomas están morfológicamente, enzimáticamente y evolutivamente relacionados con los peroxisomas y con los glioxisomas de levaduras, insectos, plantas y mamíferos (Blattner 95).

Los microcuerpos se encuentran en todos los eucariontes excepto en los más primitivos y tienen una membrana simple que rodea y separa a diversas vías metabólicas en el citoplasma. Hay una gran diversidad en el contenido de enzimas entre los miembros de la familia de microcuerpos.

Se considera que su origen más probable es del tipo monofilogenético, debido a algunas pocas enzimas comunes, a la morfología similar, a la ruta de biogénesis y a la conservación de señales topogénicas (todos los microcuerpos contienen proteínas con el tripéptido constituido por los aminoácidos SKL en la región C terminal o con permutaciones de esta secuencia que contiene residuos con características fisicoquímicas similares) (Michels 91b, De Hoop 92).

Todos los organismos protistas que viven bajo condiciones anaerobias han sido agrupados en el súper reino de los Archeozoa (Cavalier 87). En todas las otras Taxas de eucariontes se encuentran microcuerpos, aunque en algunos microorganismos los organelos pueden haberse perdido. La distribución de microcuerpos sugiere que estos organelos se pudieron originar en la evolución después de la divergencia de varios Archeozoa en la rama principal del árbol filogenético de los eucariontes, pero después del desarrollo de los linajes de los Kinetoplastos y la Euglenoidia (Sogin 86). Los microcuerpos pueden haberse originado por sistemas de construcción de membranas presentes en ancestros de organismos unicelulares de los eucariontes para englobar parte del contenido celular. La nueva vesícula formada pudo luego evolucionar hacia un organelo funcional. Varias objeciones teóricas se pueden hacer en contra esta hipótesis: 1) ¿Cómo pudo la nueva vesícula haber adquirido la posibilidad de multiplicarse ella misma? 2) Los microcuerpos contienen generalmente gran parte de las vías metabólicas completas (Borst 89). Sin embargo, es difícil pensar que una cadena enzimática completa y funcional pueda estar presente en una sola vesícula recién formada (Borst 89, Michels 91b). La transferencia de enzimas pertenecientes a una vía hacia el interior de un nuevo organelo es improbable. Una hipótesis alternativa es que los microcuerpos son derivados de un endosimbionte, en el cual debe haberse perdido la mayor parte del contenido enzimático durante la evolución junto con el genoma del endosimbionte. Posiblemente algunos genes pudieron haberse transferido al núcleo de la célula huésped, como ha pasado en

la evolución de cloroplastos y mitocondrias. La conclusión es que, diferentes clases de microcuerpos retuvieron selectivamente algunas funciones. Adicionalmente, nuevas enzimas y funciones pudieron haber sido adquiridas en los distintos organelos durante la evolución (Michels 94). Se postula que en los Kinetoplastos la vía glicolítica ha sido retenida en estos organelos porque representó una ventaja selectiva muy temprana en la evolución. La hipótesis de que los microcuerpos se originaron de un endosimbionte se basa en la similitud de su multiplicación y biogénesis entre éstos y las mitocondrias y cloroplastos (Michels 94).

La multiplicación de microcuerpos parecidos a organelos es controversial, por lo que se piensa que los microcuerpos crecen y se dividen de los ya previamente existentes. Aunque existe evidencia que apoya esta hipótesis, se desconocen los mecanismos que regulan la forma, número y posición de estos organelos durante el ciclo de vida de la célula.

En resumen, aunque el glicosoma es un organelo con un contenido enzimático único, tiene una serie de características, tales como la ruta de biosíntesis, que sugieren que debe ser clasificado como un miembro de la familia de los microcuerpos tales como los peroxisomas y los glioxisomas (Opperdoes 88).

Enzimas glicolíticas en Kinetoplastidos.

Las primeras siete enzimas de la glicólisis se encuentran compartimentalizadas en los glicosomas y se cree que esta situación ayuda a mantener un alto flujo glicolítico en los Trypanosomas cuando están en fase sanguínea, ya que dependen únicamente de la glicólisis para cubrir las demandas de energía (Opperdoes 87). Debido a esta situación, las enzimas de esta vía han sido estudiadas extensamente en los Trypanosomas para conocer su estructura y función con la finalidad de desarrollar fármacos (Kuntz 88, Gómez-Puyou 95). Dichos estudios han demostrado que los parámetros cinéticos de algunas de estas enzimas como la FGI (glucosafosfato isomerasa) y TIM (triosafosfato isomerasa) son muy similares a su contraparte en los mamíferos, mientras, otras enzimas como la FFQ (fosfofructoquinasa), ALD (aldolasa), α -GAFDH (α -gliceraldehído fosfato deshidrogenasa), y la gFGQ (glicosomal fosfoglicerato quinasa) muestran características más inusuales. Estas diferencias en la cinética pudieran ser atribuidas a la participación de diferentes residuos de aminoácidos en el proceso catalítico. Por ejemplo, algunos residuos que participan directamente en el sitio activo

podieran ser diferentes en las enzimas glicosomales o diferentes aminoácidos pudieran estar involucrados como cofactores de unión, o bien, diferentes residuos pudieran formar parte de los canales del sustrato hacia el sitio activo. Varias enzimas glicosomales han sido cristalizadas y la estructura tridimensional ha sido resuelta en el caso de TIM y GAFDH (Wierenga 91, Vellieux 93).

El hecho de que las enzimas glicolíticas de los Kinetoplastos estén concentradas en los glicosomas, y que en ellas falte el mecanismo común de control mediante retroalimentación, hace que se logre una elevada capacidad glicolítica con relativamente pocas adaptaciones, y con una concentración baja de enzimas. Esto ha sido demostrado en *T. brucei*, donde las enzimas glicolíticas constituyen únicamente el 9 % del total de la proteína celular, mientras que, en levaduras y *Z. mobilis* este valor puede ser tan alto como el 50 %. Otro de los ajustes que presumiblemente se han hecho para incrementar el flujo glicolítico, es incrementar los acarreadores de sustratos y el desarrollo de un acarreador específico en la membrana plasmática para la eliminación del piruvato como único producto terminal de la glicólisis en *T. brucei*. El análisis de secuencias de aminoácidos de enzimas glicosomales en el parásito sugiere que hay una adaptación adicional para sustentar el alto flujo glicolítico. Las enzimas glicosomales de los Kinetoplastos tiene en general un exceso de residuos cargados positivamente, confiriéndoles un alto punto isoeléctrico (Misset 86, Wierenga 87). El pI es más alto en las enzimas glicolíticas de los Trypanosomas que de cualquier otro organismo (Kendall 90, Hannaert 94, Kohl 94). Este exceso de residuos cargados positivamente ayudan a neutralizar las cargas negativas de los intermediarios glicolíticos fosforilados en los glicosomas (Michels 91b, Hannaert 94).

Triosafosfato isomerasa (TIM).

La TIM, una de las enzimas glicolíticas, ha sido seleccionada como un posible blanco para el diseño de fármacos debido a que se ha estudiado con detalle sus características cinéticas (Lambeir 87), su secuencia (Swinkels 86), su estructura tridimensional (Wierenga 91), la facilidad para ser producida (Borchert 93) y adicionalmente se conocen muchas características de la TIM en varias especies de mamíferos y en células eucariontes. En todos los organismos analizados, tanto procariotes como eucariontes, se encontró que la TIM es una proteína

dimérica con dos subunidades idénticas de aproximadamente 27 kDa (Fothergill 93). El gen de la TIM de *T. cruzi* ha sido aislado y expresado, y se conoce su estructura a detalle. Tiene 4 residuos de cys en posiciones: 14, 39, 117 y 126 (Ostoa-Saloma 1997). Se encontró que la TIM de *T. cruzi* es un homodímero, como sus homólogas (Kohlhoff 96, Maldonado 98). Esta enzima cataliza la conversión reversible entre DHAF (dihidroacetona fosfato) y GA3F (glicerol 3 fosfato) es decir su isomerización. La TIM de *T. brucei* es un dímero de 52,000 Mr con dos subunidades idénticas de 250 aminoácidos, que tiene aproximadamente un 50 % de identidad en sus posiciones con TIMs de otros organismos (Swinkels 86). Tiene un pI de 9.8, indicando claramente que la enzima lleva muchos aminoácidos cargados positivamente en su superficie. Las propiedades cinéticas de la enzima no son muy diferentes a la de otras TIMs (Lambeir 87). La enzima tripanosomal es inhibida por el sulfato, fosfato, arseniato, 2-fosfoglicolato y por metil-metanotiosulfonato. La TIM de Trypanosoma fue la primera enzima de parásitos cristalizada y posteriormente fue resuelta su estructura tridimensional (Wierenga 91).

Inhibición de la glicólisis en el control de enfermedades parasitarias.

En la actualidad aun no existen tratamientos específicos contra *T. cruzi* que no sean tóxicos para el ser humano. El tratamiento más utilizado en la fase aguda es el nifurtimox (recientemente discontinuado por Bayer), el cual es tóxico para el hombre y sirve únicamente en la fase aguda del padecimiento. Debido al desarrollo de resistencias al medicamento en varios países afectados por la parasitosis, el desarrollo de nuevos medicamentos es uno de los puntos de interés primordial en esta enfermedad (Nozaki 96, Sommer 94). Actualmente los derivados heterocíclicos de benzofuraxanos representan una mejor alternativa terapéutica (Boiani 2008); ya que tampoco existen vacunas efectivas contra esta parasitosis. En parte el problema es debido a que el parásito sufre modificaciones antigénicas en su superficie relacionadas con las distintas fases del ciclo en el hombre y por ser intracelular. La ausencia de una vacuna eficaz aunado a un tratamiento poco efectivo y con efectos tóxicos ha propiciado una continua expansión del padecimiento.

Uno de los campos estudiados más intensamente en Trypanosomas es el del metabolismo de los carbohidratos. La presencia de glicosomas y muy particularmente a las enzimas de la glicólisis han sido seleccionadas como posibles blancos para el desarrollo de nuevos fármacos antitrypanosomales (Opperdoes 93, Hart 84, Hannaert 94, Gómez-Puyou 1995). El uso potencial de la TIM como inmunógeno protector ha sido explorado en la esquistosomiasis (Harn 1991). En este estudio encontraron que anticuerpos monoclonales contra la TIM de *Schistosoma mansoni* inhiben parcialmente la actividad enzimática y confieren resistencia pasiva contra el parásito.

Las diferencias de TIM entre los tripanosomatidos *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* y *Leishmania mexicana* y otras células eucarióticas, hacen a esta enzima una molécula de interés para ser analizada como blanco potencial para la quimioterapia y la inmunoterapia. Recientemente se aisló, secuenció y expresó el gene de triosa-fosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* (Ostoa-Saloma 1997). La posibilidad de tener a la TIM recombinante de *Trypanosoma cruzi* hizo posible la producción de un anticuerpo monoclonal. Mediante el uso de anticuerpos monoclonales se podrá analizar la localización ultraestructural de la TIM en el parásito en las distintas fases de su ciclo. Así mismo, se podrá analizar si el anticuerpo monoclonal inactiva a la enzima, lo cual sería de interés para aislar el antígeno o epítipo responsable y hacer un péptido sintético o recombinante que podría servir de inmunógeno para una inmunoprofilaxis

HIPOTESIS:

Mediante anticuerpos monoclonales contra la triosa-fosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* se podrá analizar su localización ultraestructural y su potencial inmunológico para ser utilizado como posible antígeno para una vacuna.

OBJETIVOS:

- 1.- Producción de anticuerpos monoclonales contra TIM recombinante de *Trypanosoma cruzi*.
- 2.- Caracterización de los anticuerpos monoclonales y análisis de reacciones cruzadas con las TIM recombinantes de *Trypanosoma brucei* y de humano mediante ELISA e inmunoelectrotransferencia.
- 3.- Localización de la TIM de *T. cruzi* por microscopía de luz con inmunoperoxidasa y fluorescencia, así como ultraestructuralmente con inmuno-oro.
- 4.- Analizar si la TIMr es reconocida por suero de ratones infectados con *T. cruzi* y por suero de pacientes con enfermedad de Chagas y determinar posibles reacciones cruzadas.
- 5.- Análisis de la inhibición del crecimiento de *T. cruzi in vitro* usando el Acm contra TIM.
- 6.- Análisis de la capacidad del Acm 6-11G de inducir alteraciones ultraestructurales en *T. cruzi* cultivado *in vitro* en presencia del anticuerpo.

MATERIAL Y METODOS:

1.- Preparación del antígeno.

La TIM recombinante de *T. cruzi* (TIMrTc) fue preparada como describió (Osteo-Saloma et al 1997).

2.- Producción de Anticuerpos Monoclonales (Acm).

a). Quince ratones BALB/c hembras de 6 a 8 semanas de edad fueron inmunizados intraperitonealmente con 50 µg de TIMr (TIM recombinante) en adyuvante completo de Freund. Una semana mas tarde se inyectaron 50 µg de TIMr en adyuvante incompleto de Freund como refuerzo y finalmente al día 16 una inyección intravenosa de 50 µg de TIMr sin adyuvante. Se tomó una muestra de sangre del ratón para identificar la presencia de anticuerpos anti-TIM por medio de análisis inmuno enzimático (ELISA). El ratón con mayor título de lectura fue sacrificado 4 días después y las células del bazo se fusionaron con las células de mieloma X63 Ag 8.653. Subsecuentemente se cultivaron, seleccionaron y clonaron las células fusionadas de acuerdo a la técnica descrita por (Zimmermann et al. 1994).

b). La selección de hibridomas se hizo mediante el uso de medio selectivo HAT e identificación de clonas positivas por ELISA.

La selección de hibridomas positivos se realizó por medio de ELISA, añadiendo 0.65 µg de antígeno TIMr en 50 µl de buffer de acoplamiento (100 mM Na₂CO₃, 100 mM NaHCO₃, pH 9.6) por pozo toda la noche a 4°C. Después se realizó lavado en 3 ocasiones con buffer salino de fosfatos (PBS), pH 7.4. La placa fue bloqueada por una hora a temperatura ambiente con 1.6 % de leche descremada y 0.05 % Tween 20 en PBS (solución de bloqueo). Después se lavaron con PBS y se agregaron 50 µl de los sobrenadantes de los diferentes hibridomas y se incubaron en diferentes pozos por dos horas a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas extensamente con PBS y los anticuerpos de conejo anti-ratón (H+L cadenas) marcados con peroxidasa (Zymed, San Francisco, CA), fueron añadidos en solución de bloqueo e incubados por dos horas a temperatura ambiente. La placa fue lavada extensamente y la reacción fue revelada durante 20 min. a 37 °C con 100 µl del sustrato 2,2'-amino-bis(3-ethynilbencil-thiasolona-6-ácido-sulfónico) (100 mM) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO), 5 ml de 100 mM ácido cítrico pH 4.2, y 5 µl de H₂O₂

al 30% por 20 minutos. La densidad óptica en los pozos fue determinada en un lector de ELISA a 405 nm con un filtro de 490 nm.

c) El aislamiento de clonas productoras se hizo mediante la técnica de dilución limitante. Se tomaron 50 μ l del pozo positivo resuspendiendo suavemente con micropipeta y en la placa de 8 x 12 pozos se agregaron 50 μ l de medio HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina) en cada uno, y se depositaron en cada fila del 1 al 12 en forma sucesiva los 50 μ l una vez que se resuspendió suavemente el contenido. Se obtuvieron cinco clonas, y la clona denominada 6-11G fue usada en los estudios de tinción e inhibición.

3.- Producción de líquido de ascitis.

Se expandieron las clonas positivas colocando 2×10^6 células en medio RPMI suplementado con SFB (suero fetal bovino) a 37 °C y 5% CO₂ en placas de 2 ml durante 72 hrs. Se colectaron las células de 5 pozos de cada una de las clonas y se centrifugaron a 1,200 x g durante 10 min. Se resuspendieron en 1 ml de PBS estéril pH 7.4 para administrar 200 μ l por ratón por vía intraperitoneal. Cada una de las clonas se inyectó a cinco ratones singénicos BALB/c hembras, a las cuales se les había inyectado 500 μ l de PRISTANE (2,6,10,14-tetramethyl-pentadecane) por vía intraperitoneal 10 días previos a la inyección de las clonas. A los 10 días se obtuvo el líquido de ascitis mediante punción peritoneal del ratón. El líquido de ascitis se centrifugó a 1,200 x g durante 10 minutos para posteriormente almacenarlo en refrigeración hasta su uso.

4.- Purificación de los anticuerpos monoclonales.

Las inmunoglobulinas fueron purificadas añadiendo un volumen equivalente de solución saturada de sulfato de amonio a los sobrenadantes de cultivo o líquido de ascitis y se dejaron precipitar por 12 horas a 4 °C. La mezcla fue centrifugada a 28.000 x g por 30 min (Sorvall RC 5C, Du Pont) y el precipitado se resuspendió en una tercera parte del volumen inicial en 10 mM Tris-HCL, pH 7.4 y dializado extensamente contra la misma solución. El dializado se concentró cinco a siete veces de su volumen en Amicon (Beverly, Ma USA), con membrana PM 10 (Diaflo, Amicon inc. USA) y purificado en columna de afinidad de agarosa con proteína G.

5.- Fraccionamiento de Trypanosomas.

Se realizó siguiendo el método reportado en la literatura (Aguirre et al 2000). Se colocaron los parásitos en amortiguador de lisis (imidazol 10 mM pH 7,2, EDTA 5 mM, β -mercaptoetanol 0,1%, leupeptina 2 μ g/ml, aprotinina 10 μ g/ml, benzamidina 1 mM, Tritón X-100 1%). Para 8×10^8 parásitos se utilizó 1 ml de amortiguador de lisis y los parásitos fueron sonicados durante 3 ciclos de 3 min, 37% de intensidad a 4 °C (Sonics). Se verificó la lisis del parásito a través del microscopio. El lisado fue analizado por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

6.- Western blots.

La inmunoelectrotransferencia se realizó en geles de poliacrilamida, utilizando 20 μ g de proteína del lisado total del parásito o de TIMrTc (TIM recombinante de *T. cruzi*) los cuales fueron separados por SDS-PAGE y transferidos a membranas de inmunobilon-P (Millipore, Bedford, MA) en 25 mM Tris-HCl, pH 8.3, 192 mM de glicina, y 20% metanol. Los pesos moleculares estándar y el carril conteniendo proteína fueron teñidas con 0.1% de azul de Coomassie en 50% de metanol y desteñido en 20% de metanol y 10% ácido acético. Las membranas fueron incubadas 12 hrs con solución bloqueadora de leche sin grasa al 5% en agitación y lavadas 4 veces con TBS-Tween 20 durante 15 min. La membrana fue cortada en tiras y estas fueron incubadas durante 3 horas a 37°C con el Acm 6-11G precipitado en sulfato de amonio (ascitis) o con ascitis de Acm W6 (anticuerpo de ratón no relacionado) como control negativo. Las tiras fueron lavadas 4 veces con TBS-Tween 20 durante 15 min e incubadas durante 3 hrs a 4°C con un anticuerpo de cabra acoplado a peroxidasa contra ratón (Zymed San Francisco, CA) diluido 1:5000 en TBS-Tween 20. Las tiras fueron lavadas 4 veces con TBS-Tween 20 e incubadas durante 10 min con 0.5 mg/ml 3''diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemical Co.) en 100 mM Tris-HCl, pH 7.4, conteniendo 100 ml de H₂O₂ al 30%. La reacción de la peroxidasa fue finalizada con agua.

7.- Identificación de la TIMTc en pacientes con enfermedad de Chagas.

Se mezclaron los sueros de 4 pacientes con enfermedad de Chagas para analizar si reconocen la TIMrTc. El suero de pacientes fue diluido 1:50 e incubado con el blot de TIMrTc por 12 horas a 4°C. Para este caso, el anticuerpo secundario fue de cabra anti-IgG de humano (Zymed San Francisco, CA), diluido 1:10000 en TBST con 1% de BSA e

incubado por 1 hr a temperatura ambiente. Los blots fueron revelados para AP (fosfatasa alcalina) (Sambrook et al 1989)

Adicionalmente analizamos por Western blot si el Acm 6-11G y el suero de pacientes con enfermedad de Chagas también reconocían la TIM recombinante humana. Esto se hizo usando las mismas condiciones descritas para la TIMrTc.

8.- Localización microscópica de la TIM en epimastigotes de *T. cruzi* con inmunoperoxidasa.

Se hizo según la técnica descrita en la literatura (Becker et al.). Después de lavar los parásitos en PBS en tres ocasiones, se hicieron varios frotis de la suspensión de parásitos en portaobjetos cargados positivamente y se fijaron en acetona fría durante 20 min. y se dejaron secar al aire. El bloqueo de sitios inespecíficos se realizó con PBS/ albúmina sérica bovina al 1% durante 1 hora a 4°C. Posteriormente, se incubaron los frotis con el Acm 6-11G diluido 1:100 en PBS albúmina al 0.1% durante 30 min., a temperatura ambiente. Después de un extenso lavado se incubaron durante 30 min., con anticuerpo de cabra anti-ratón acoplado a biotina diluido 1:1000, y se reveló con el complejo ABP (avidina-biotina-peroxidasa) durante 30 min y posteriormente con peróxido de hidrógeno y diaminobencidina. Como controles negativos se utilizaron un Acm no relacionado, Ac secundario solo, Acm primario solo y el parásito solo.

9.- Tinción de inmunofluorescencia de epimastigotes de *T. cruzi* con Acm 6-11G.

Se incubaron 8×10^6 de epimastigotes de *T. cruzi* los cuales fueron lavados dos veces con PBS y se fijaron los parásitos en acetona fría durante 20 min. Las células fueron lavadas dos veces en TBS (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl). Los epimastigotes fueron bloqueados con PBS/ BSA 1% y Triton-X-100 al 0.01% por 2 hrs e incubados durante 3 hrs con 1 ml de 6-11G diluido 1:1000 en PBS (BSA 0.1%) a temperatura ambiente en agitación y como control se utilizó IgG de ratón normal. Posteriormente fueron lavados dos veces con TBS y se incubaron con el anticuerpo secundario: cabra anti-ratón acoplado a isotiocianato de fluoresceína (Zymed) 1:1000 durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación. Las células fueron lavadas dos veces con TBS y observadas bajo el microscopio con iluminación epifluorescente.

10.- Estudios de microscopía electrónica.

La inmuno-localización ultraestructural de la TIM fue realizada con epimastigotes de *T. cruzi* en cultivo, utilizando Ac acoplados a esferas de oro en una técnica de postinclusión en Epon 812 (epoxy resina). Los parásitos adheridos a cubreobjetos fueron fijados con Paraformaldehído al 4%, glutaraldehído al 0.1% en buffer de cacodilato de sodio 0.1 M pH 7.2 durante 1.5 hrs. a 4°C y posteriormente se postfijaron en tetroxido de osmio al 1% en el mismo buffer durante 5 minutos a 4°C. La deshidratación se hizo con alcoholes de gradación creciente hasta óxido de propileno y la inclusión se realizó colocando cápsulas de Been llenas con Epon 812 adheridas al cubreobjeto toda la noche, para permitir la adecuada infiltración de la resina en la monocapa. Esto fue seguido por el calentamiento de las cápsulas de Been cubreobjeto a 55°C por 48 hrs. para permitir su apropiada polimerización. Finalmente las cápsulas de Been con el cubreobjetos fueron congelados a 0°C durante 1 hora para permitir la separación entre el vidrio y la resina, dejando la monocapa incluida en epon.

Se realizaron cortes de 80 a 100 nm con cuchilla de diamante y se montaron en rejillas de níquel, en las que se realizó la inmuno-localización de la TIM (Bendayan y Zollinger 1983) y (Sasaki y Ueno-Matsuda 1993). Los epimastigotes fueron bloqueados con PBS/BSA 1% y Triton-X-100 al 0.01% por 2 hrs. Se agregó el Acm 6-11G 1:100 anti-TIM y se incubaron los cortes toda la noche a 4°C en una cámara húmeda, posteriormente se lavaron en 3 ocasiones con PBS pH 7.4. Los controles fueron procesados de la misma manera pero incubados con un Acm no relacionado hecho en ratón (W6) o se omitió el anticuerpo primario. Los parásitos fueron lavados con PBS/albúmina 0.1% estéril e incubados con anticuerpo de cabra anti-ratón acoplados a partículas de oro de 20 nm (ICN, Costa Mesa, CA) diluido 1:10 con PBS conteniendo 0.1% BSA y 0.05% Tween 20 en una cámara húmeda por una hora a temperatura ambiente. Después de realizado el lavado con PBS y agua desionizada los cortes fueron contrastados con citrato de plomo y acetato de uranilo para su observación con el microscopio EM-10 (Zeiss).

11.- Efectos del Acm 6-11G en el crecimiento del parásito *in vitro* evaluados por microscopía electrónica.

Para analizar el efecto que ejerce el Acm 6-11G sobre el parásito cultivado *in vitro* en presencia del anticuerpo, se realizó la inmunolocalización ultraestructural en epimastigotes

de *T. cruzi* cultivados en presencia del Acm 6-11G. Como control se incubaron los epimastigotes con el Acm no relacionado (W6) y un cultivo de parásitos en ausencia de anticuerpos. Se incubaron 8×10^6 epimastigotes de *T. cruzi* por grupo, en 1 ml de medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco, Grand Island NY) durante 48 horas a temperatura ambiente en presencia del Acm 6-11G a una concentración de 9.6 mg/ml de proteína del líquido de ascitis y del Acm W6. Posteriormente se lavaron dos veces con TBS y se procesaron de acuerdo al protocolo descrito arriba para los parásitos no tratados (ver arriba), para la inmuno-localización ultraestructural de la TIM de epimastigotes de *T. cruzi* en cultivo, utilizando Ac acoplados a esferas de oro en una técnica de postinclusión en Epon 812 (epoxy resina).

12.- Inhibición del crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* con el Acm 6-11G in vitro.

Se incubaron 1×10^6 parásitos en 1 ml de medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco, Grand Island NY) en presencia del Acm 6-11G, a una concentración de 9.6 mg/ml de proteína del líquido de ascitis, durante 8 días a 28°C. Se usó como control un Acm no relacionado (W6) en líquido de ascitis y otro control con medio de cultivo únicamente. El crecimiento de los parásitos fue monitoreado a las 24, 48 y 72 hrs. y posteriormente cada tercer día hasta el día 8, contando el número de parásitos con una cámara de Neubauer.

RESULTADOS

De los dos ratones inmunizados, utilizamos el ratón que tuvo valores más altos en el ELISA. El promedio de las dos lecturas independientes fue de 0.263 a 490 nm. Se realizó la fusión y un día después de la misma se diluyeron los hibridomas en medio HAT, vigilando el crecimiento de las células. A los 15 días, se realizó el primer ELISA de los sobrenadantes. De aquellos pozos que tuvieron ELISA positivo, se realizó la dilución limitante. La dilución de los hibridomas se realizó en diez ocasiones, seleccionando las clonas positivas por medio del ELISA. Desde el quinto ELISA se redujo la concentración de la proteína (TIMr) utilizado en cada pozo 0.50 µg.

1.- Producción de anticuerpos.

Como resultado de la fusión de células de bazo de ratón inmunizado con TIMrTc con las células de mieloma se obtuvieron 5 clonas capaces de producir anticuerpos monoclonales específicos contra TIMrTc, los cuales fueron identificados mediante la prueba de ELISA, identificadas como: 6-11G (B), C, D, G y H. Las cinco clonas se inyectaron a cinco ratones por clona, obteniéndose el líquido de ascitis, el cual fue centrifugado a 1,200 x g durante 10 minutos para posteriormente ser almacenado en refrigeración hasta su uso. Una parte del líquido de ascitis fue precipitado en sulfato de amonio saturado. Se realizaron cultivos *in vitro* y tinción con inmunoperoxidasa e inmunofluorescencia utilizando las 5 clonas de Acm contra TIMrTc. Cuando los epimastigotes de *T. cruzi* fueron cultivados *in vitro* en presencia de los Acm a una concentración de 9.6 mg/ml de cada clona por 30 días, se observó una pérdida progresiva de la viabilidad con todas las clonas, que fue mas marcada con 6-11G después de las 24 horas de cultivo y después de 5 días, no se detectaron epimastigotes vivos (Fig. 1). No se observó inhibición del crecimiento cuando se usó un anticuerpo monoclonal no relacionado a *T. cruzi* (Acm W6) el cual estimuló el crecimiento de los epimastigotes por encima de los valores obtenidos en los cultivos de *T. cruzi* en RPMI solo. La clona con valores mas elevados en ELISA fue la 6-11G, la cual se seleccionó para los ensayos fenotípicos y funcionales, ya que además demostró mayor actividad contra los epimastigotes de *T. cruzi*. Encontramos que la clona 6-11G, además de reconocer TIMrTc también reconoció la TIM recombinante de *T. brucei* (TIMrTb) y a la TIM recombinante humana (TIMrH).

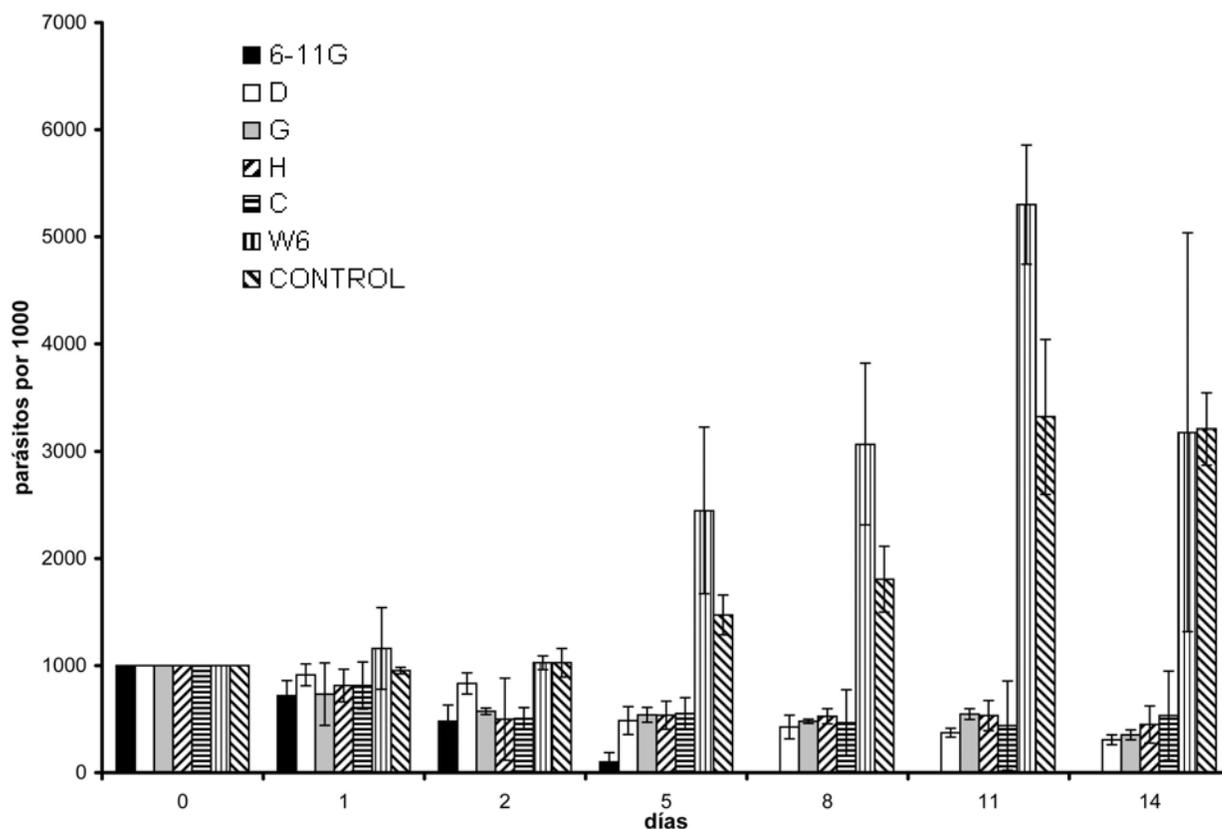


Figura 1.- Crecimiento in vitro de epimastigotes de *T. cruzi* en presencia de 9.6 mg/ml por cada una de las clonas de anticuerpos monoclonales contra TIMrTc. El grado de inhibición con las distintas clonas de Acm contra TIMrTc fue diferente, ya que la mayor inhibición fue encontrada con la clona 6-11G seguida por la: D, G, H y C, respectivamente. En la grafica solo se observan los resultados hasta el día 14, donde se observa un gradual incremento de la inhibición del crecimiento en diferente grado para cada clona. Sin embargo en el seguimiento hasta los 30 días en todas las clonas no se detectaron parásitos vivos. En los controles del Acm no relacionado y con medio RPMI solo hubo crecimiento de *T. cruzi*. (Los datos muestran la media y desviación estándar de tres experimentos independientes).

2.- Western blot.

Con el objetivo de demostrar la especificidad del Acm se hicieron Western blots usando como antígenos los lisados de todo el parásito así como también la TIMrTc (Fig.2). Las proteínas de los lisados de *T. cruzi* así como también la TIMrTc fueron separados en SDS-PAGE y transferidos a membranas de inmunobilon-P y se tiñeron con azul de Coomassie, en la Fig. 2a se observa, que en el carril 1 que corresponde a los estándares de los pesos moleculares, hay una banda que corresponde a 27 kDa, la cual también se observó en el carril 2 que es el lisado del parásito, y en el carril 3 que muestra la TIMrTc, donde encontramos una sola banda de 27 kDa. En el carril 4 encontramos el Western blot de los lisados de *T. cruzi* con el Acm 6-11G contra la TIMrTc, y observamos que únicamente reconoce la banda de 27 kDa. En el carril 5 se encuentra el Western blot de la TIMrTc hecha con 6-11G y podemos observar que el Acm reconoce la misma banda de 27 kDa. Anticuerpos monoclonales no relacionados o el uso de anticuerpos secundarios anti IgG de ratón no mostraron reactividad alguna contra la TIMrTc (datos no mostrados). Estos resultados indican que el Acm contra la TIMrTc es específico para la TIM, dado que no reconoce ninguna otra banda del lisado del parásito. Adicionalmente exploramos si la mezcla de 4 sueros de pacientes con enfermedad de Chagas aguda podía reconocer la TIMrTc. En el carril 6 observamos una banda con masa molecular de 27 kDa, indicando que los pacientes con enfermedad de Chagas son capaces de hacer anticuerpos contra la TIM del parásito y pueden reconocer la TIMrTc. Esta observación fue explorada en el Western blot usando en forma individual cada uno de los sueros de los 4 pacientes con enfermedad de Chagas. La Fig. 2b muestra que los 4 sueros individuales reconocen la banda de 27 kDa, aun cuando con diferente intensidad (carriles 2 – 5). El suero humano normal no reconoce la TIMrTc, como se muestra en el carril 6 de la Figura 2b. El reconocimiento de la TIMrTc por el suero de pacientes con enfermedad de Chagas da evidencia que esta proteína es inmunogénica.

Adicionalmente, con el objetivo de definir si existe reacción cruzada entre la TIMrTc y la TIM recombinante humana, analizamos si el suero de pacientes con enfermedad de Chagas y el Acm 6-11G también reconocen la TIM recombinante humana (Fig. 2c). Un Western blot usando TIM recombinante humana como antígeno mostró que ésta fue reconocida por el suero de pacientes con enfermedad de Chagas (carriles 2-4) así como también por el

Acm 6-11G (carril 7). El suero normal humano no mostró reconocer la TIM recombinante humana (carriles 5 y 6), y tampoco un Acm no relacionado (carril 8). Estos hallazgos indican que los anticuerpos anti-TIM de *T. cruzi* de pacientes con enfermedad de Chagas tiene reacción cruzada con la TIM humana

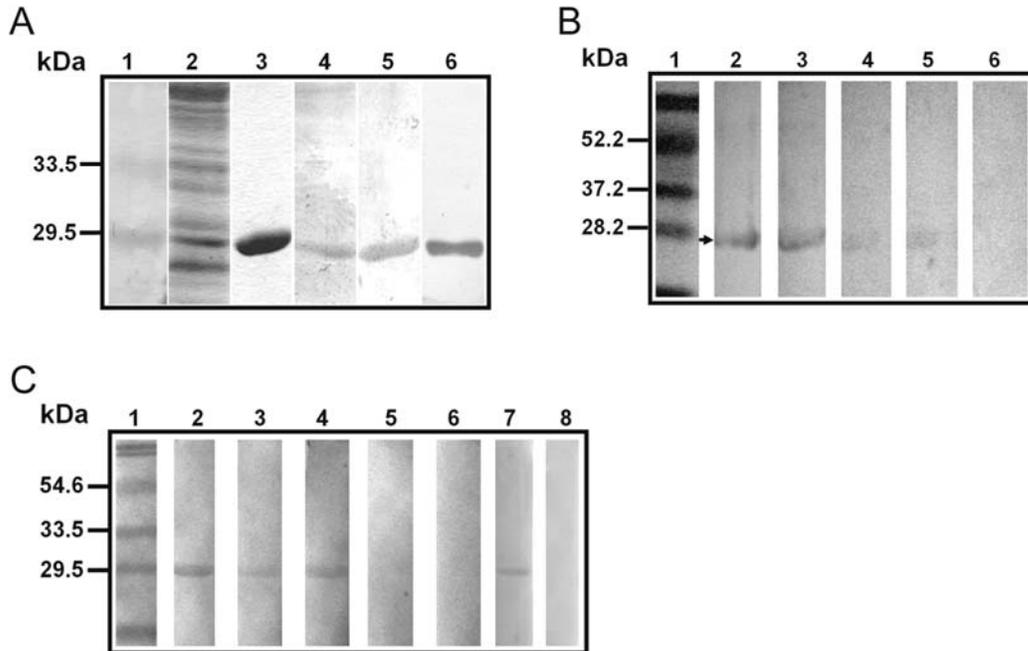


Figura 2.- Análisis electroforético y análisis por Western blot de lisados de epimastigotes de *T. cruzi*, TIMrTc y TIM recombinante humana, usando el Acm (6-11G) o suero de pacientes con enfermedad de Chagas. A) Carriles 1-3 son las proteínas teñidas con azul de Coomassie, mientras las líneas 4-6 son Western blots. Carril 1: estándar de pesos moleculares de bajo rango (Biorad); carril 2: lisado de proteínas de *T. cruzi*; carril 3: proteína recombinante de TIMrTc; carril 4: Western blot del lisado de todo el parásito con Acm 6-11G; carril 5: Western blot de proteína recombinante TIMrTc con Acm 6-11G; carril 6: Western blot de la TIMrTc con una mezcla de 4 sueros de pacientes con enfermedad de Chagas. B) análisis por Western blot de TIMrTc usando 4 sueros en forma individual de pacientes con enfermedad de Chagas (carriles 2-5), y el control suero normal humano (carril 6). C) análisis por Western blot con TIM recombinante humana usando sueros de pacientes con enfermedad de Chagas (carriles 2-4), suero normal humano (carriles 5 y 6), Acm 6-11G (carril 7), y Acm no relacionado de ratón (carril 8).

3.- Localización por inmunoperoxidasa e inmunofluorescencia de la TIM de epimastigotes de *T. cruzi* con Acm 6-11G.

Con parásitos fijados en acetona fría se realizó la inmunolocalización de la TIM mediante inmunoperoxidasa utilizando el Acm 6-11G. Los parásitos mostraron intensa tinción en el núcleo, el kinetoplasto y distribuido puntualmente en citosol (Fig. 3).

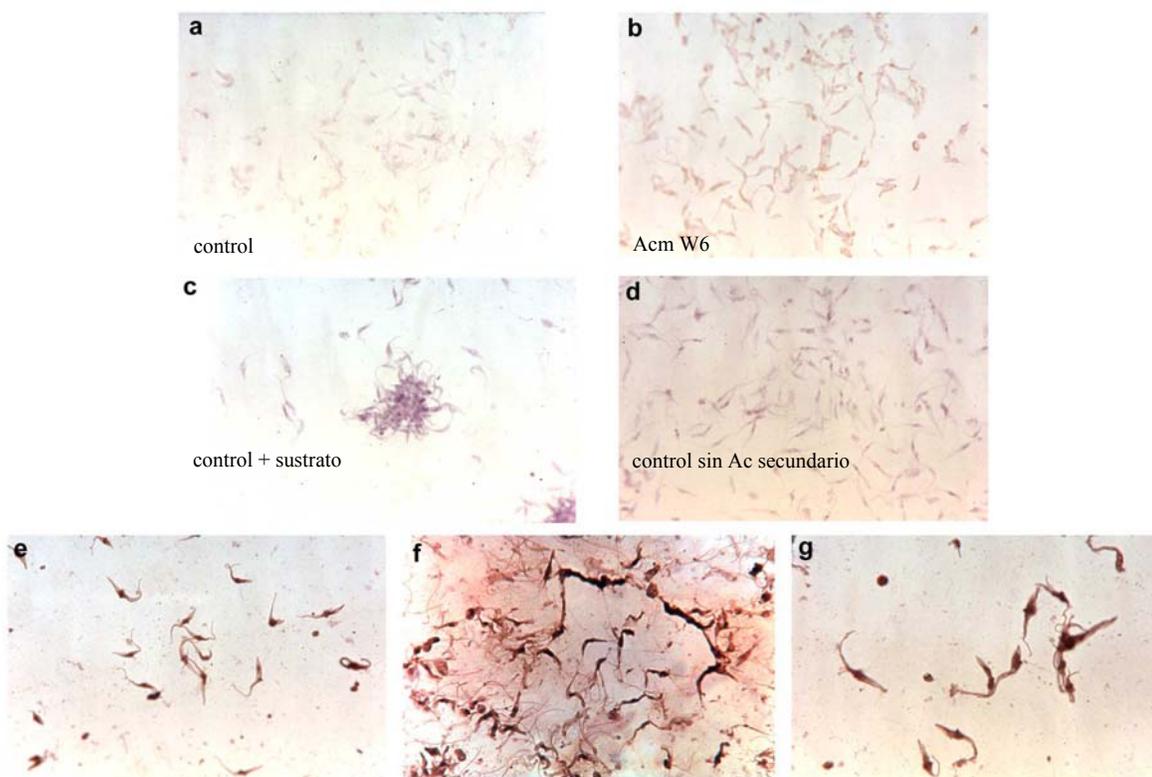


Figura 3. Tinción de la TIM de epimastigotes de *T. cruzi* con Acm 6-11G e inmunoperoxidasa. a: control sin Ac primario; b: control con el Acm no relacionado W6; c: control solo con sustrato; d: control sin anticuerpo secundario; e y f: tinción de la TIMrTc con Acm 6-11G; g: tinción de la TIMrTc con Acm clona C. Aumentos (a-d: 100X; e-g: 1000X).

Además se realizaron tinciones de inmunofluorescencia de la TIM de epimastigotes de *T. cruzi*. Para este estudio se utilizaron el Acm 6-11G y un anticuerpo secundario anti-IGg de ratón acoplado a isotiocianato de fluoresceína. Los parásitos mostraron intensa tinción con puntillero citoplásmico, en el núcleo, y en el cinetoplasto (Fig. 4a). Ocasionalmente se observó tinción en el flagelo.

4.- Localización ultraestructural de la TIM en epimastigotes de *T. cruzi*.

La localización ultraestructural de la TIM en epimastigotes de *T. cruzi* fue explorada con el Acm 6-11G acoplado a perlas de inmuno-oro. Como se muestra en la Fig. 4b, encontramos la marca en el núcleo, el Kinetoplasto y en claras vesículas en todo el citosol. Las partículas de oro también fueron observadas dentro de estructuras densas únicas de forma esférica rodeadas de una membrana con diámetro de aproximadamente 200 a 500 nm. Muchos de estos organelos exhiben un “core denso”, frecuentemente mostrando un aspecto multilaminar (Fig. 4d, flechas). Los controles negativos usando un Acm no relacionado no mostraron tinción (Fig. 4 c y e).

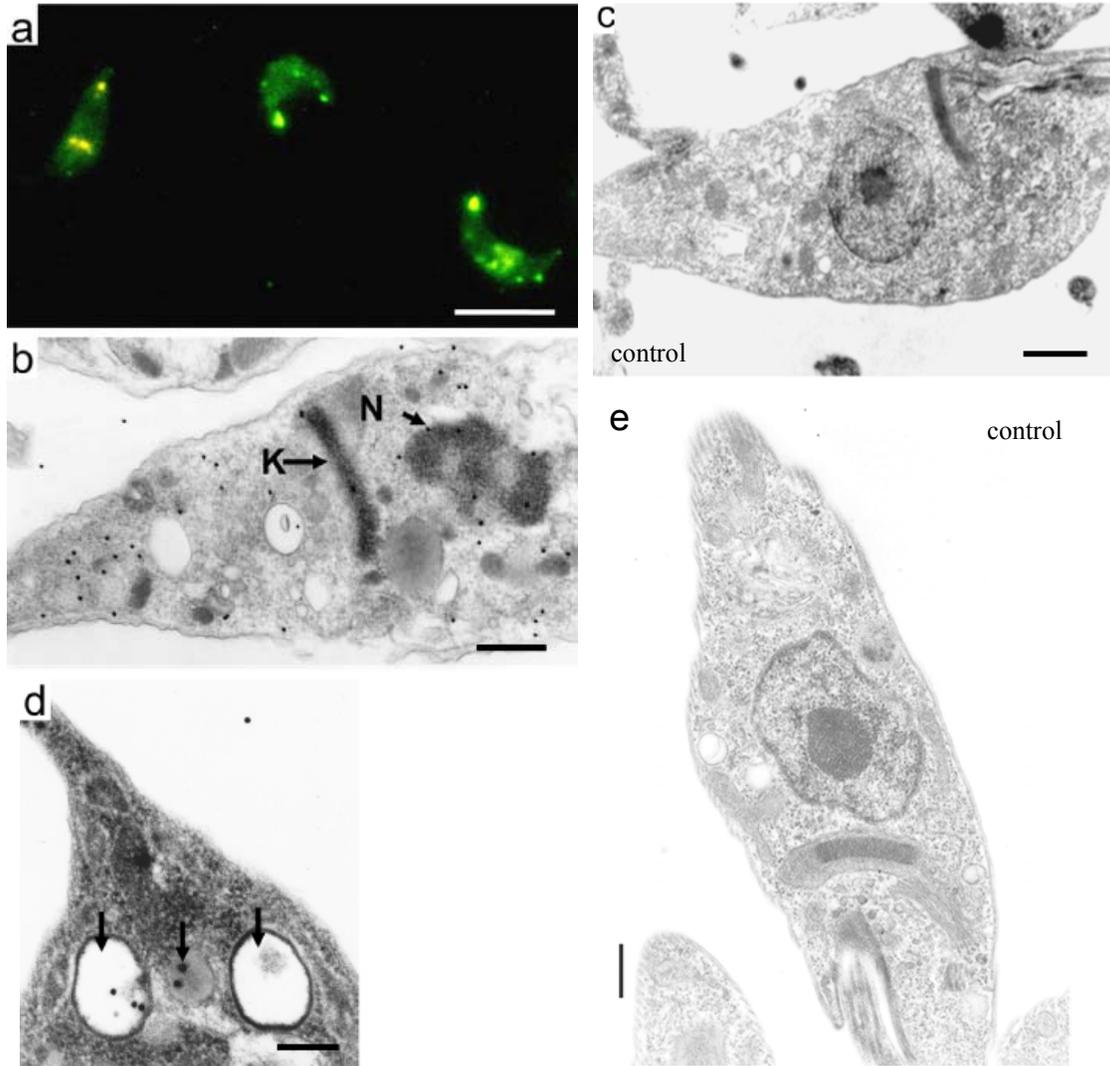


Figura 4. Inmunolocalización de la TIM en epimastigotes de *T. cruzi* usando el Acm 6-11G para inmunofluorescencia y para inmuno-oro con microscopio electrónico. La inmunofluorescencia muestra tinción con puntos citoplasmáticos, en núcleo y kinetoplasto (4a). La tinción con inmuno-oro mostró que la marca se ve en el núcleo (N), el kinetoplasto (K), en vesículas claras y en el citosol (4b). Las partículas de oro fueron observadas también dentro de organelos que muestran un “core” denso, que frecuentemente muestra una apariencia multilaminar (4d, flechas). Los controles con Acm no relacionados W6 (4c) y suero normal de ratón (4e), los cuales no mostraron tinción. Tampoco hubo tinción utilizando el anticuerpos secundario solo (no mostrado). (Las barras corresponden: 4a: = 5 μ m; 4b: = 500 nm; 4c = 500 nm; 4d = 250nm y 4e = 500nm).

Para establecer si la tinción de estas vesículas multilaminares o “core” densas en epimastigotes de *T. cruzi* corresponden a glicosomas, purificamos glicosomas de *T. brucei* de acuerdo al método descrito por Oppendoes et al. (1984). Dado que el Acm 6-11G reconoce ambas enzimas: TIMrTc y TIMrTb, teñimos los glicosomas purificados de *T. brucei* con este anticuerpo. Como se puede ver en la Fig. 5, numerosos glicosomas purificados de *T. brucei* contienen uno o mas partículas de oro sobre el cristaloides o “core” denso mostrando una estructura laminar. Las características finas de la ultraestructura, además de la inmunolocalización ultraestructural de la TIM, confirman que los microcuerpos purificados de *T. brucei* corresponden a los glicosomas descritos en la literatura (Oppendoes et al. 1984), y que adicionalmente son homólogos a los organelos observados con marca de cristaloides “core” denso en epimastigotes de *T. cruzi* (Fig. 4d). Los controles negativos usando un anticuerpo monoclonal no relacionado no mostraron marca.

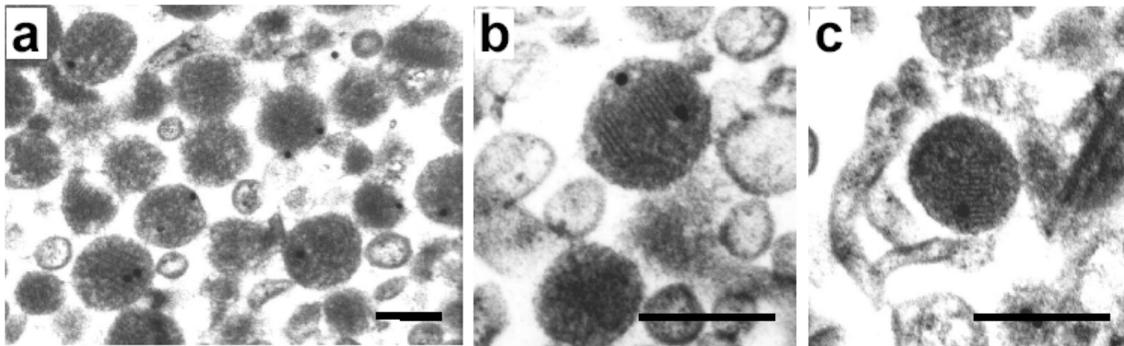


Figura 5. Localización ultraestructural de la TIM en glicosomas purificados de *T. brucei* usando el anticuerpo monoclonal 6-11G mostrando partículas de oro sobre el “core” denso o cristaloides con estructura laminar. (Barras en 5a, 5b y 5c corresponden a 200 nm).

5.- Inhibición del crecimiento *in vitro*.

Cuando los epimastigotes de *T. cruzi* fueron cultivados *in vitro* en presencia del Acm 6-11G a una concentración de 9.6 mg/ml por 8 días, se observó una marcada y progresiva pérdida de la viabilidad después de las 24 horas de cultivo. Después de 5 días, no se detectaron epimastigotes vivos (Fig. 6). En contraste, no se observó inhibición del crecimiento cuando se usó un anticuerpo monoclonal no relacionado a *T. cruzi*, sino por el contrario, el Acm W6 estimuló el crecimiento de los epimastigotes por encima de los

valores obtenidos en los cultivos de *T. cruzi* en ausencia de anticuerpos. No tenemos una explicación para este fenómeno. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes (Fig. 6).

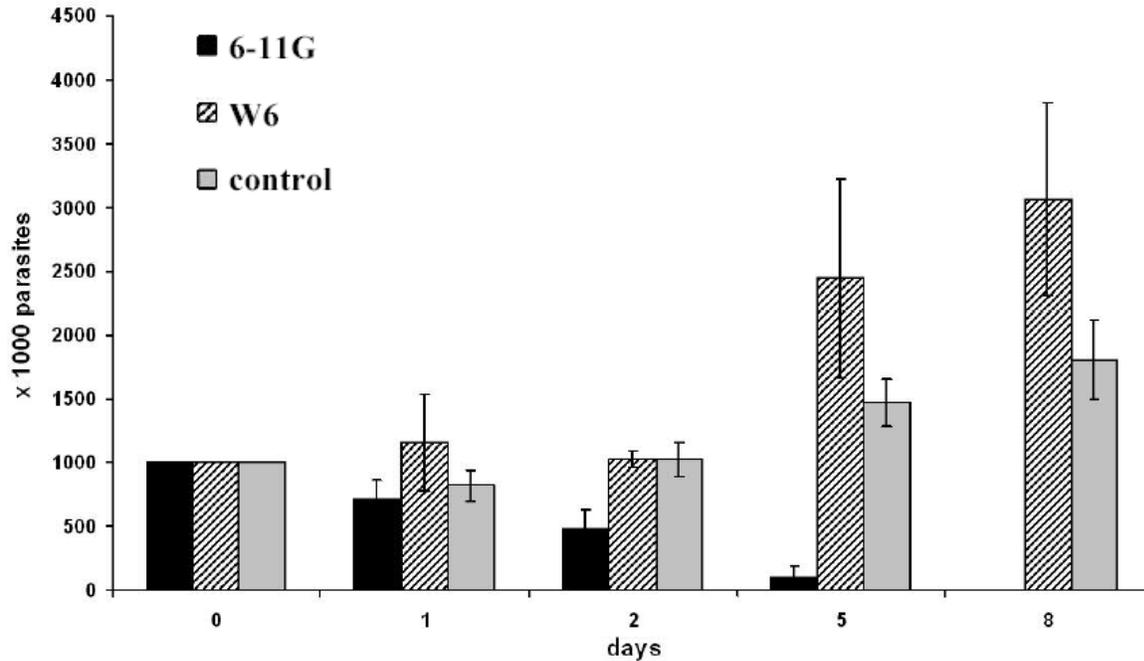


Figura 6. El crecimiento *in vitro* de epimastigotes de *T. cruzi* en presencia de los anticuerpos monoclonal 6-11G contra TIMrTc, a una concentración de 9.6 mg/ml por 8 días, se observó una marcada y progresiva pérdida de la viabilidad después de las 24 horas de cultivo. Después de 5 días, no se detectaron epimastigotes vivos. No se observó inhibición del crecimiento de *T. cruzi* en los controles, sino por el contrario, el Acm W6 estimuló el crecimiento de los epimastigotes. (Los datos muestran la media y desviación estándar de tres experimentos independientes).

6.- Análisis ultraestructural de los daños producidos por el Acm 6-11G cuando es agregado al cultivo de *T. cruzi*.

Para analizar el mecanismo por el cual el anticuerpo inhibe el crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi*, realizamos inmunocitoquímica ultraestructural en epimastigotes de *T. cruzi* cultivados en presencia de Acm 6-11G. Se observó tinción en el núcleo, cinetoplasto y citoplasma y adicionalmente encontramos una amplia destrucción de las estructuras intracelulares del parásito, con la formación de grandes vesículas que no permitieron la identificación precisa de las estructuras citoplasmáticas. Adicionalmente encontramos destrucción parcial de la membrana celular y de organelos intracelulares (Fig. 7: b,c,e,f,g,h). El anticuerpo monoclonal no relacionado no indujo daño en el parásito (Fig. 7d), que se observa en las mismas condiciones que *T. cruzi* que no fue cultivada en presencia de anticuerpos (Fig. 7a).

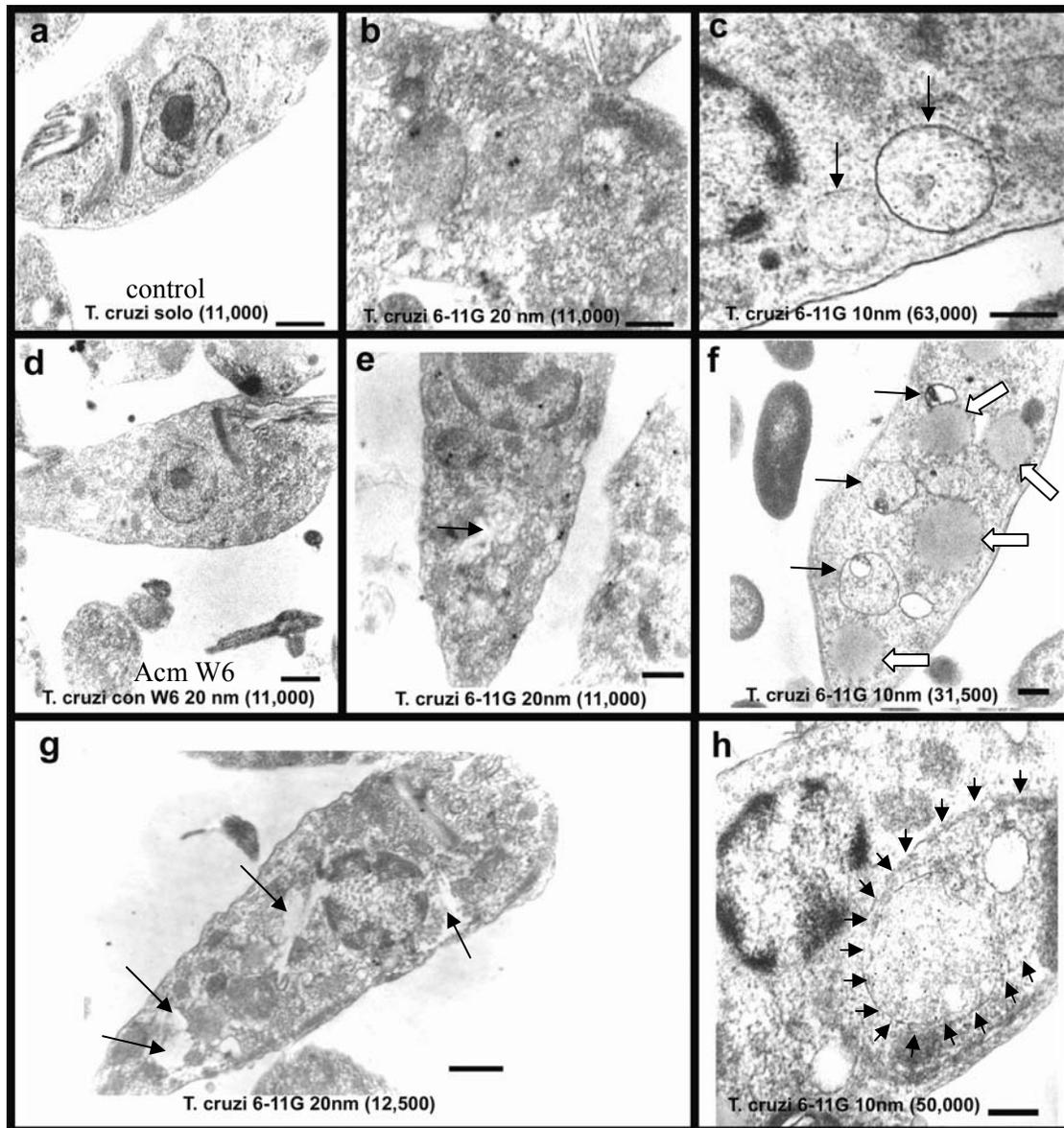


Figura 7. Inmunolocalización de la TIM en epimastigotes de *T. cruzi* cultivados *in vitro* con 9.6 mg/ml del Acm 6-11G durante 48 horas y se fijaron para el protocolo de postinclusión. 7a: *T. cruzi* en ausencia de anticuerpos; 7b, 7e y 7g: *T. cruzi* con Acm 6-11G e inmuno-oro de 20 nm; 7c, 7f y 7h: *T. cruzi* con Acm 6-11G e inmuno-oro de 10 nm; 7d: *T. cruzi* con Acm no relacionado W6 e inmuno-oro de 10 nm. (Las barras corresponden: 7a y 7d: 1 μ m; 7b, 7c, 7e, 7f y 7h = 250nm; 7g = 2 μ m). Los aumentos de las micrografías se indican en las mismas dentro del paréntesis. Con flechas negras señalo las vesículas claras con inmunoreactividad a TIM (c, f) y zonas claras del citoplasma (e, g). Las flechas blancas (f) señalan probables gotas de lípidos. Nótese la gran vesícula, en cuyo interior hay otras más pequeñas con marca (h). las marcas señaladas pueden considerarse como datos de daño celular. Adicionalmente, la cromatina en los parásitos dañados está más densa o condensada, localizada hacia la periferia del núcleo y no se observan los nucléolos como en el caso de los parásitos de a y d.

DISCUSIÓN

Hemos producido un anticuerpo monoclonal contra la TIM de *T. cruzi* que inhibe el crecimiento y la supervivencia de epimastigotes de *T. cruzi* después de 24 horas de cultivo. Estos hallazgos están en concordancia con datos obtenidos de otros parásitos, donde anticuerpos contra TIM inducen un beneficio al huésped. Por ejemplo, en la infección por *Schistosoma mansoni*, un anticuerpo monoclonal contra la TIM induce parcial inhibición de la enzima y resistencia pasiva en ratones que recibieron el Acm previo a la infección con *S. mansoni* (Harn et al, 1991). Además se ha demostrado que la inmunización contra la TIM de *Thaenia solium* protege al ratón contra la infección de *Thaenia crassiceps* (Jiménez et al. 2003). Nuestros datos muestran que la TIM de *T. cruzi* es una molécula inmunogénica, dado que fue reconocida por el suero de pacientes con enfermedad de Chagas (Fig. 2a, carril 6; Fig. 2b, carriles 2-4). Sin embargo, los anticuerpos contra TIMTc detectados en pacientes con enfermedad de Chagas también reconocen la TIM humana (Fig. 2c, carriles 2-4). Esto fue un hallazgo inesperado y que cuestiona la aplicabilidad de la inmunización con TIM de *T. cruzi* para protección contra la enfermedad de Chagas, aunque esto ha sido usado exitosamente en otras enfermedades parasitarias (Harn et al, 1991, Jiménez et al. 2003). En la infección de *T. cruzi*, la formación de anticuerpos contra la TIMTc parece ser una espada de dos filos, dado que por una parte, esto puede limitar el crecimiento del parásito y su supervivencia, pero por otro lado, los anticuerpos pueden tener reacción cruzada con la TIM del huésped, contribuyendo con otro mecanismo autoinmune, lo cual es una marca distintiva de la patología en la enfermedad de Chagas (Kierszenbaum 2005).

El hallazgo de que los Acm contra la TIM de *T. cruzi* inducen la muerte del parásito nos llevó a analizar la localización de TIM en epimastigotes de *T. cruzi* con el objetivo de explorar porque los Acm producen tal efecto. Los estudios de ultraestructura nos revelaron que no existe una aparente unión del Acm a la superficie de la célula; en cambio, mostraron que se encuentran unidos a la TIMTc presente en los glicosomas lo que concuerda con varios estudios que indican que los glicosomas tiene una cantidad sustancial de TIM, de hecho, en *T. brucei*, la evidencia disponible indica que la TIMTb se encuentra exclusivamente en los glicosomas (Oppendoes et al. 1977). Sin embargo debemos remarcar que nuestros estudios de ultraestructura también mostraron que la enzima existe en el

núcleo, el citosol y el kinetoplasto. En este contexto, es relevante que Bourgignon et al. (1998), usando un anticuerpo policlonal de conejo contra TIMTc, observaron que la TIMTc estaba en el citosol; aunque sus técnicas de microscopía electrónica no le permitieron acertar si la enzima se localizaba exclusivamente en los glicosomas. Sin embargo, Taylor y Gutteridge (1987) estudiaron la localización subcelular de las enzimas glicolíticas en *T. cruzi* y encontraron por centrifugación isopícnica que la TIMTc estaba dentro de los glicosomas, sin embargo ellos también encontraron que una porción importante de la enzima estaba en fracciones ligeras, incluyendo la fracción soluble. Así los datos bioquímicos de Taylor y Gutteridge (1987) y nuestros estudios de ultraestructura sobre la localización de la TIMTc están totalmente en concordancia y apoyan la noción de que la TIM tiene múltiples localizaciones en epimastigotes de *T. cruzi*. Taylor y Gutteridge (1987) también reportan que las primeras seis enzimas de la vía glicolítica, incluyendo la TIMTc, están presentes en la fracción glicosomal de epimastigotes de *T. cruzi*. Así, es muy posible que en *T. cruzi* a semejanza con *T. brucei*, esta parte de la vía glicolítica se lleve a cabo en los glicosomas. Así la pregunta que surge de los datos de Taylor y Gutteridge (1987) y de nuestros propios datos, concierne a ¿cual es la función que tiene la TIMTc que esta localizada en la fracción no glicosomal del parásito? Esta pregunta adquiere particular relevancia porque el Acm es deletéreo para epimastigotes de *T. cruzi*. Queda por analizarse, si la muerte del parásito cultivado en presencia del anticuerpo monoclonal 6-11G es debida a que el anticuerpo se une al sitio activo de la enzima e inhibe su capacidad catalítica, o bien si hay otro mecanismo de daño. Dado que algunas imágenes son sugestivas de alteraciones apoptóticas (Fig. 7b-h), será interesante analizar si este anticuerpo es capaz de inducir una muerte con características apoptóticas en estos parásitos (Nguewa et al. 2004). Dado que en los lisados de epimastigotes el Acm reconoce solo una banda de proteína que corresponde a TIMTc, podemos concluir que el Acm es altamente específico. Así, el principal efecto deletéreo del Acm puede ser debido a la interacción con la TIMTc glicosomal y con la enzima que están fuera de los glicosomas, o con las enzimas que existen en ambas fracciones. En este momento la pregunta no puede ser contestada. Sin embargo, si el efecto deletéreo del Acm es debido a esta interacción con la TIMTc no glicosomal, esto apoyaría que la función de la TIMTc no glicosomal es esencial para la vida del parásito.

El hecho que las TIMs de *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. mexicana* tienen diferencias con las TIM humanas, hacen a esta enzima una molécula potencialmente interesante de ser analizada como blanco potencial para la quimioterapia e inmunoterapia. Sin embargo, la reacción cruzada entre la TIMTc y la TIM humana, y el reconocimiento de ambas TIM por los sueros de pacientes con enfermedad de Chagas, ponen en duda su potencial de ser utilizado para inmunoterapia, porque favorecería la inducción de autoanticuerpos y de esta manera contribuir a los mecanismos de daño en esta enfermedad.

CONCLUSIONES

- 1.- Los presentes hallazgos aportan nueva luz sobre la importancia vital de esta enzima para la supervivencia de *T. cruzi* y abren nuevas perspectivas para el desarrollo de fármacos contra estos parásitos.
- 2.- Los análisis ultraestructurales revelaron que la TIM en epimastigotes de *T. cruzi* se localiza en dos fracciones: la glicosomal y la extra-glicosomal que se distribuye en el núcleo, cinetoplasto, flagelo y citosol.
- 3.- El anticuerpo monoclonal 6-11G es incorporado por los epimastigotes de *T. cruzi* causando daño extenso y destrucción de organelos.
- 4.- Reportamos una nueva molécula que posiblemente puede contribuir en la patogenia de la autoinmunidad en los enfermos con enfermedad de Chagas.

Queda por analizarse si el Acm 6-11G inhibe la actividad enzimática de la TIM y si esto es responsable del daño del parásito, evidenciado morfológicamente por microscopía electrónica y funcionalmente en los ensayos de inhibición del crecimiento *in vitro*.

BIBLIOGRAFIA:

1. Aguirre-García, MM, Cerbón J, Talamás-Rohana P. Purification and properties of an acid phosphatase from *Entamoeba histolytica* HM-1 IMSS. *Int J Parasitol* 30:585-591, 2000.
2. Barnard J. P, Reynafarje B, Pedersen P. L. Glucose catabolism in African trypanosomes. Evidence that the terminal step is catalyzed by a pyruvate transporter capable of facilitating uptake of toxic analogs. *J Biol Chem.* 268:3654-3661, 1993.
3. Becker, I., Pérez-Montfort, R., Pérez-Torres, A., Rondón-Zarate, A., Montfort, I. And Pérez-Tamayo, R. *Entamoeba histolytica*: Localization of a 30-kDa cysteine proteinase using a monoclonal antibody. *Exp. Parasitol.* 82, 171-181, 1996.
4. Bendayan M. Zollinger M. Ultrastructural localization of antigenic sites on osmium-fixed tissues applying the protein A-gold technique. *Source Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* 31(1):101-9, 1983 Jan.
5. Blattner J, Dorsam H, Clayton C. E. Function of N-terminal import signals in trypanosome microbodies. *FEBS* 360:310-314, 1995.
6. Blattner J, Swinkles B, Dorsam H, Prospero T, Subramani S, Clayton C. Glycosome assembly in trypanosomes: variations in the acceptable degeneracy of a COOH-terminal microbody targeting signal. *J. Cell. Biol.* 119:1129-36, 1992.
7. Boani L, Davies C, Arredondo C, Porcal W, Merlino A, Gerpe A, Boani M, Pacheco J, Basombrío A, Cerecetto H, González M. In vivo studies of 5-arylethenilbenzofuraxans in acute murine models of Chagas disease. *Eur J Med Chem.* 1-9, 2008.
8. Borchert TV, Pratt K, Zeelen JP, Callens M, Noble MEM, Opperdoes FR, Michels PAM, Wierenga RK. Over expression of trypanosomal triosephosphate isomerase in

- Escherichia coli and characterization of a dimmer-interface mutant. Eur J Biochem 211:703-710, 1993.
9. Borst P. How proteins get into microbodies (peroxisomes, glyoxysomes, glycosomes). Biochim Biophys Acta 866:179-203, 1986.
 10. Borst P. Peroxisome biogenesis revisited. Biochim Biophys Acta 1008:1-13, 1989.
 11. Bourignon SC, Meiralles MN, Pacheco RS, Glouanni DS. Purification and partial characterization of *Trypanosoma cruzi* triosephosphate isomerase. Mem Inst Oswaldo Cruz 93:219-224, 1998.
 12. Cavalier-Smith T. Eukaryotes with no mitochondria Nature 326:332-333, 1987.
 13. Clayton CE. Structure and regulated expression of genes encoding fructose biphosphate aldose in *Trypanosoma brucei*. EMBO J 4:2997-3003, 1985.
 14. Clayton CE. Import of fructose biphosphate aldose into the glycosomes of *Trypanosoma brucei*. Cell Biol J105:2649-2653, 1987.
 15. Coppens I, Opperdoes F. R, Courtoy P. J, and Baudhuin P. Receptor-mediated endocytosis in the bloodstream from of *Trypanosoma brucei*. J Protozool 34(4): 465-473, 1987.
 16. De Hoop MJ & Ab G. Import of proteins into peroxisomes and other microbodies. Biochem J 286:657-669. 1992.
 17. Dusanic, D.G. (1993). *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *cruzi*. En Kreier, J.P., Baker, J.R. "Parasitic Protozoa" 2nd Edition. New York. Academic Press. Vol.1, Cap.4.

18. Fairlamb AH, Opperdoes FR, Borst P. New approach to screening drugs for activity against African trypanosomes. *Nature* 265:270-271, 1977.
19. Fothergill-Gilmore LA & Michels PAM. Evolution of glycolysis. *Prog Biophys Mol Biol* 59:105-235, 1993.
20. Fung K, Clayton C. Recognition of a peroxisomal tripeptide entry signal by the glycosomes of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 45:261-264, 1991.
21. Gómez-Puyou A, Saavedra-Lira E, Becker I, Zubillaga R. A, Rojo-Domínguez A, Pérez-Montfort R. Using evolutionary changes to achieve species-specific inhibition of enzyme action-studies with triosephosphate isomerase. *Chem Biol* 2: 847-855, 1995.
22. Hannaert V. & Michels, PAM. Structure, function and biogenesis of glycosomes in kinetoplastida. *J. Bioenergetics and Biomembranes*. 26:2, 205-212, 1994.
23. Harn DA, Gu w, Oligino LD, Mitsuyama M, Gebremichael A and Richter DA. Protective monoclonal antibody specifically recognizes and alters the catalytic activity of Schistosome triose-phosphate isomerase. *J. Immunol.*148, 562-567, 1991.
24. Hart DT & Opperdoes. The occurrence of glycosomes (microbodies) in the promastigote stage of four major leishmania species. *Mol. Biochem. Parasitol.* 13,159-172, 1984.
25. Hart DT, Baudhuin P, Opperdoes FR, de Duve C. Biogenesis of the glycosome in *Trypanosoma brucei*: The synthesis, translocation and turnover of glycosomal polypeptides. *EMBO J* 6:1403-1411, 1987.

26. Hart DT, Misset O, Edwards SW, Opperdoes FR. A comparison of the glycosomes (microbodies) isolated from *Trypanosoma brucei* bloodstream from and cultured procyclic trypomastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 12:25-35, 1984.
27. Jiménez L, Fernández-Velasco DA, Willms K, Landa A. A comparative study of biochemical and immunological properties of triosephosphate isomerase from Tenia solium and *sus scrofa*. *J Parasitol* 89: 209-219, 2003.
28. Kendall G, Wilderspin AF, Ashall F, Miles MA, Kelly JM. *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase does not conform to the 'hostpot' topogenic signal model. *EMBO J* 9:2751-58, 1990.
29. Kierszenbaum F. Where do we stand on the autoimmune hypothesis of Chagas disease? *Trends Parasitol* 21: 521-516, 2005.
30. Kohl L, Callens M, Wierenga R. K, Opperdoes FR, Michels P. A. Triose-phosphate isomerase of Leishmania mexicana mexicana cloning and characterization of the gene, overexpression in *Escherichia coli* and analysis of the protein. *Eur. J. Biochem.* 220:331-338, 1994.
31. Kohlhoff M, Dahm A & Hensel R. Tetrameric triosephosphate isomerase from hyperthermophilic archaea. *FEBS* 383:245-250, 1996.
32. Kuntz D, Kooystra U, Opperdoes FR. Agaricic acid inhibits the glycolytic enzymes of *Trypanosoma brucei*. *Arch Intern Phys Biochim* 96:B99, 1988.
33. Lambeir AM, Opperdoes FR, Wierenga RK. Kinetic properties of triose-phosphate isomerase from *Trypanosoma brucei brucei*. *Eur J Biochem* 168:69-74, 1987.

34. Langford C. K, Burchmore R. J. S, Hart D. T, Wagner W, Landfear S. M. Biochemistry and molecular genetics of Leishmania glucose transporters. *Parasitology* 108: S73-S83, 1994.
35. Maldonado E., Soriano-García M., Moreno A., Cabrera N., Garza-Ramos G., Tuena de Gómez-Puyou M., Gómez-Puyou A. & Pérez-Montfort R. Differences in the intersubunit contacts in Triosephosphate Isomerase from two closely related pathogenic trypanosomes. *J.Mol.Biol.*, 283:193-203, 1998.
36. Marchand M, Poliszczak A, Gibson WC, Wierenga RK, Opperdoes FR, Michels PAM. Characterization of the genes for fructose-bisphosphate aldose in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 29:65-76, 1988.
37. McCollum D, Monosov E, Subramani S. The pas8 mutant of *Pichia pastoris* exhibits the peroxisomal protein import deficiencies of Zellweger syndrome cell-the PAS8 protein binds to the COOH-terminal tripeptide peroxisomal targeting signal and is a member of the TPR protein family. *J Cell Biol* 121:761-774, 1993.
38. Michels PAM, Hannaert V. The evolution of Kinetoplastid glycosomes. *J Bioenerg Biomembr* 26:213-219, 1994.
39. Michels PAM, Opperdoes FR. The evolutionary origin of glycosome. *Parasitol Today* 7:105-109, 1991b.
40. Misset O, Bos OJM, Opperdoes F. R. Glycolytic enzymes of *Trypanosoma brucei*. Simultaneous purification, intraglycosomal concentrations and physical properties. *Eur J Biochem* 157:441-453, 1986.
41. Moncayo, A. (1993) Chagas Disease: En Maurice J. Pearce AM (eds) *Tropical Diseases Research*. TDR. Eleventh Programme Report UNDP/World Bank/WHO. Geneva. ATAR.S.A. cap.7.

42. Nguewa PA, Fuertes MA, Valladares B, Alonso C and Pérez JM. Programmed cell death in Trypanosomatids: a way to maximize their biological fitness. *Trends in Parasitology*. 20:8, 375-379, 2004.
43. Nozaki T, Engel JC and Dvorak JA. Cellular and molecular biological analysis of nifurtimox resistance in *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. trop. Med. Hyg.* 55(1), 111-117, 1996.
44. Opperdoes FR. Brost P. Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*. The glycosome. *FEBS lett* 80:360-364, 1977a.
45. Opperdoes FR. Brost P, Bakker S, Leene W. Localization of glycerol-3-phosphate oxidase in mitochondrion and NAD⁺-linked glycerol-3-phosphate dehydrogenase in the microbodies of the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *Eur J Biochem* 76:29-39, 1977b.
46. Opperdoes FR, Baudhuin P, Coppens I, De Roe C, Edwards S. W, Weijers PJ. and Misset O. Purification, morphometric analysis, and characterization of the glycosomes (microbodies) of the protozoan hemoflagellate *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Biol.* 98: 1178 -1184, 1984.
47. Opperdoes FR. Compartamentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. *Ann Rev Microbiol.* 41:127-151, 1987.
48. Opperdoes FR, Nohynkova E, Van Schaftingen E, Lambeir AM, Veenhuis M, Van Roy J. Demonstration of glycosomes (microbodies) in the Bodonid flagellate *Trypanoplasma borelli* (protozoa kinetoplastida). *Mol Biochem Parasitol* 30:155-63, 1988.
49. Opperdoes FR & Michels PA. The glycosomes of the Kinetoplastida. *Biochemie.* 75, 231-234, 1993.

50. Ostoa-Saloma P, Garza-Ramos G, Ramírez J, Becker I, Berzunza M, Landa A, Gomez-Puyou A, Tuena M, and Pérez-Monfort R. Cloning, expression, purification and characterization of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. Eur J. Biochem 244:700-705, 1997.
51. Ramos-Ligonio A, Ramírez-Sánchez ME, González-Hernández JC, Rosales-Encinas JL, Lopez-Monteon A. Prevalence of antibodies against *Trypanosoma cruzi* in blood bank donors from the IMSS General Hospital in Orizaba Veracruz, México. Salud Publica Méx 48:13-21, 2006.
52. Ramsey JM. Chagas disease transmission in México: a case for translational research, while waiting to take disease burden seriously. Salud Publica Méx 49:e291-e296 edición especial, XII congreso de investigación en salud pública, 2005.
53. Sasaki T, Ueno-Matsuda E. Cysteine-proteinase localization in osteoclasts: an immunocytochemical study. Cell Tissue Res. 271:177-9, 1993.
54. Sogin ML, Elwood HJ, & Gunderson JH. Evolutionary diversity of eukaryotic small- subunit rRNA genes. Proc Natl Acad Sci 83:1383-1387, 1986.
55. Sommer JM, Cheng QL, Keller GA, Wang CC. In vivo import of firefly luciferasa into glycosomes of *Trypanosoma brucei* and mutacional analysis of the C-terminal targeting signal. Mol Biol Cell 3:749-759, 1992.
56. Sommer JM, Peterson G, Keller GA, Parsons M, and Wang CC. The C-terminal tripeptide of glycosomal phosphoglycerate kinase is both necessary and sufficient for import into the glycosomes of *Trypanosoma brucei*. FBES, 316,1:53-58, 1993.

57. Sommer JM, Nguyen TT and Wang CC. Phosphoenolpyruvate carboxykinase of *Trypanosoma brucei* is targeted to the glycosomes by a C-terminal sequence. FEBS 350:125-129, 1994a.
58. Sommer JM & Wang CC. Targeting proteins to the glycosomes of African trypanosomes. Annu. Rev. Microbiol. 48:105-138, 1994b.
59. Swinkels BW, Gibson WC, Osinga KA, Kramer R, Veeneman GH, van Boom JH, Borst P. Characterization of the gene for the microbody (glycosomal) triosephosphate isomerase of *Trypanosoma brucei*. EMBO J 5:1291-1298, 1986.
60. Swinkels BW, Gould SJ, Bodnar AG, Rachubinski RA, Subramani S. A novel, cleavable peroxisomal targeting signal at the amino-terminus of the rat 3-ketoacyl-CoA thiolase. EMBO J 10:3225-3262, 1991.
61. Swinkels BW, Loiseau A, Opperdoes FR, Veenhuis M, Borst P. A phosphoglycerate kinase related gene, conserved between *Trypanosoma brucei* and *Crithidia fasciculata*, encodes a glycosomal (microbody) protein. Mol biochem Parasitol 50:69-78, 1992.
62. Tay, J., Schenone, H., Sánchez, J.T., Robert, L. Estado actual de los conocimientos sobre la enfermedad de Chagas en la República Mexicana. Bol. Chil. Parasitol. 47, 43-53. 1992.
63. Taylor MB, Gutteridge WE. *Trypanosoma cruzi* subcelular distribution of glycolytic and some related enzymes of epimastigotes. Exp Parasitol 63: 84-97, 1987.
64. Ter Kuile B, H. Opperdoes F. R. Glucose uptake by *Trypanosoma brucei*. J Biol Chem 266:857-862, 1991.

65. Van der Leij I, Franse MM, Elgersma Y, Distel B and Tabak HF. PAS10 is a tetratricopeptide-repeat protein that is essential for the import of most matrix protein into peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:11782-11786, 1993.
66. Velasco Castrejón O, Guzmán Bracho C, Cruz Rodríguez J, López Ortiz O, 159.- González Domínguez F. (1991) La enfermedad de Chagas. Publicación Técnica del INDRE No.8. Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud. México.
67. Vellieux FMD, Hajdu J, Verlinde CLMJ, Groendijk H, Read RJ, Greenhough TJ, Campbell JW, Kalk KH, Littechild JA, Watson HC, Hol WGJ. Structure of glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma brucei* determined from data. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:2355-2359, 1993.
68. Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Bertocchi B, Petti M, Alvarez MG, Postan M y Armenti A. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with Benznidazole versus no treatment *Ann Intern Med* 144:724-734, 2006.
69. Visser N, Opperdoes FR, Borst P. Subcellular compartmentation of glycolytic intermediates in *Trypanosoma brucei*. *Eur J Biochem* 118:521-526, 1981.
70. WHO. (1991) Expert Committee on Control of Chagas Disease. WHO Techn. Rep. Ser. No. 811. Geneva.
71. Wiemer EAC, Ter Kuile B, Michels PAM, Opperdoes FR. Pyruvate transport across the membrane of the bloodstream form of *Trypanosoma brucei* is mediated by a facilitated diffusion carrier. *Biochem Biophys Res Comm* 184:1020-1034, 1992.

72. Wiemer EAC, Michels PAM, Opperdoes FR. Inhibition of pyruvate transport across the plasma membrane of the bloodstream form of *Trypanosoma brucei* and its metabolic implications. *Biochem J* 312:479-484, 1995b.
73. Wierenga RK, Kalk KH, and Hol WGJ. Structure determination of the glycosomal triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei brucei* at 2.4 Å resolution. *J Mol Biol* 198:109-121, 1987.
74. Wierenga RK, Noble MEM, Vriend G, Nauche S, Hol WGJ. Refined 1.83 Å structure of trypanosomal triosephosphate isomerase crystallized in the presence of 2.4 M-ammonium sulphate. *J Mol Biol* 220:995-1015, 1991.
75. Zimmermann S, Becker-Pérez I, Beuscher HU, Kroczeck RA, Röllinghoff M and Solbach W. (1994) *Leishmania major* parasites share an epitope with the murine CD3-T complex. *Eur. J. Immunol.* 24, 503-507.