

**ANALISIS COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN  
ESTADIOS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* I**

**MARTHA LUCIA DIAZ GALVIS**



**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS  
BUCARAMANGA**

**2010**

**ANALISIS COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN  
ESTADIOS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* I.**

**MARTHA LUCIA DIAZ GALVIS**

**Trabajo de grado presentado para optar al título de:  
Maestro en Ciencias Básicas Biomédicas**

**Director:**

**CLARA ISABEL GONZALEZ RUGELES, MSC., PHD.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS  
BUCARAMANGA**

**2010**

Dedico este triunfo, a mi esposo Eduardo, sin su apoyo y afecto no hubiera podido lograrlo y a mis pequeños Juan Sebastián y Daniel Eduardo quienes son el amor de mi vida y mi inspiración cada día.

A mis padres por su incondicional amor y comprensión, por enseñarme todo sin pedir nada a cambio y a mis hermanos Luis Alfonso y Johan Darío que junto a mis padres siempre estuvieron ahí para apoyarme.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por acompañarme siempre, por darme fortaleza en los momentos difíciles.

A mi maestra, la Dra. Clara Isabel González mi profunda gratitud, ella me permitió la increíble oportunidad de iniciarme en la investigación y me guió a través de todo el proceso. Gracias por permitirme aprender a su lado.

A la Dra. Carmen Cecilia Cabrales, por escucharme y ayudarme siempre, por siempre estar ahí.

A todos mis compañeros en el grupo y en el Laboratorio Central de Investigaciones algunos ya no están, pero hoy también los recuerdo y les digo gracias por todo.

## CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN .....	14
1. ENFERMEDAD DE CHAGAS.....	17
1.1 EPIDEMIOLOGIA .....	17
1.2 MECANISMOS DE TRANSMISION.....	20
1.2.1 Vectorial .....	20
1.2.2 Transfusional .....	20
1.2.3 Trasplante .....	21
1.2.4 Congénita.....	21
1.2.5 Oral .....	21
1.2.6 Accidental .....	21
1.3 ASPECTOS CLINICOS O FASES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.....	21
1.3.1 Fase Aguda.....	21
1.3.2 Fase Asintomática.....	23
1.3.3 Fase Crónica.....	23
1.3.3.1 Cardiomiopatía chagásica crónica. ....	23
1.3.3.2 Enfermedad de Chagas en el tracto digestivo (ECTD). ....	24
2. TRYPANOSOMA CRUZI .....	26
2.1 ESTADIOS DEL Trypanosoma cruzi.....	26
2.1.1 Tripomastigote .....	26
2.1.2 Epimastigote .....	26
2.1.3 Promastigote.....	26
2.1.4 Amastigote .....	26
2.2 CICLO BIOLÓGICO DE <i>T. cruzi</i> .....	27
3. GENÉTICA DEL PARASITO.....	30
3.1 ESTRUCTURA POBLACIONAL.....	31
3.2 LINAJES DE <i>T. cruzi</i> .....	32
3.2.1 Variabilidad genética vs variabilidad en la distribución geográfica.....	34

3.2.2 Variabilidad genética vs variabilidad en las manifestaciones clínicas.....	34
4. REGULACION DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN TRIPANOSOMAS.....	36
4.1 TRANSCRIPCIÓN POLICISTRÓNICA .....	36
4.1.1 Proceso de “trans-splicing” .....	37
4.1.2 Edición del RNA.....	38
5. FISIOPATOGENIA.....	39
5.1 INTERACCIÓN HOSPEDERO – PARASITO .....	39
5.1.1 Adhesión.....	39
5.1.1.1 Internalización.....	40
5.1.1.2 Vías para la invasión de los fagocitos no profesionales.....	40
5.1.2 Vías de señalización .....	43
5.1.3 Salida de la vacuola.....	46
5.2 EL ESTALLIDO OXIDATIVO DEL MACRÓFAGO .....	47
5.3 SUPERVIVENCIA DE TRYPANOSOMA CRUZI EN EL MACRÓFAGO.....	49
5.3.1 Tripanotión .....	50
5.3.2 Tripanotión reductasa .....	52
5.3.3 Triparedoxina .....	52
5.3.4 Triparedoxin peroxidasa.....	52
6. OBJETIVOS.....	53
6.1 OBJETIVO GENERAL .....	53
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	53
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	54
7.1 CEPAS DE TRYPANOSOMA CRUZI .....	54
7.2 CLONACIÓN DE LA CEPA.....	54
7.3 CULTIVOS CELULARES.....	55
7.4 CULTIVOS Y OBTENCIÓN DE DIFERENTES ESTADIOS.....	55
7.4.1 Obtención de Epimastigotes .....	55
7.4.2 Obtención de Tripomastigotes .....	55
7.4.3 Obtención de los Amastigotes .....	56
7.5 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS.....	56

7.5.1 Cuantificación de proteínas.....	56
7.6 ELECTROFORESIS EN 2DE .....	57
7.6.1 Isoelectroenfoque .....	57
7.8 SDS-PAGE .....	57
7.7.1 Tinción con azul de coomassie .....	57
7.8 ANÁLISIS DE IMAGEN.....	58
7.8.1 Digestión de las proteínas y espectrometría de masas.....	58
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	60
9. RESULTADOS.....	61
9.1 ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN 2 DIMENSIONES (E-2D) .....	61
9.2 ANALISIS COMPARATIVO DE LA EXPRESION DE PROTEINAS ENTRE....	62
9.3 AMASTIGOTES DE LOS AISLADOS AGUDO Y CRONICO.....	62
9.3.1 Identificación de las proteínas expresadas diferencialmente entre los amastigotes del aislado agudo vs crónico utilizando MALDI-TOF y LC-MS/MS ....	64
9.4 ANALISIS COMPARATIVO DE LA EXPRESION DE PROTEINAS ENTRE TRIPOMASTIGOTES DE LOS AISLADOS AGUDO vs. CRONICO .....	68
9.4.1 Identificación de las proteínas expresadas diferencialmente entre los tripomastigotes del aislado agudo vs. crónico utilizando MALDI-TOF y LC-MS/MS.....	71
9.5 ANALISIS COMPARATIVO DE LA EXPRESION DE PROTEINAS ENTRE EPIMASTIGOTES DE LOS AISLADOS AGUDO vs. CRONICO .....	80
9.5.1 Identificación de las proteínas expresadas diferencialmente entre los epimastigotes del aislado agudo vs. crónico utilizando MALDI-TOF y LC-MS/MS. ....	83
10. DISCUSIÓN .....	89
CONCLUSIONES .....	99
BIBLIOGRAFÍA.....	101

## LISTA DE TABLAS

pág.

<b>Tabla 1.</b> Proteínas identificadas en el estadio amastigote en los aislados agudo vs. Crónico .....	65
<b>Tabla 2.</b> Proteínas identificadas en el estadio tripomastigote en los aislados agudo vs. Crónico .....	72
<b>Tabla 3.</b> Proteínas identificadas en el estadio epimastigote en los aislados agudo vs. crónico .....	84
<b>Tabla 4.</b> Tabla de categorías funcionales de los péptidos identificados .....	88

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Países endémicos para la enfermedad de Chagas.....	18
<b>Figura 2.</b> Áreas endémicas para enfermedad de Chagas en el departamento de Santander, Año 2006. ....	19
<b>Figura 3.</b> Estadios del <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	27
<b>Figura 4.</b> Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> .....	28
<b>Figura 5.</b> Proceso general de la síntesis de ARNm en tripanosomátidos. ....	37
<b>Figura 6.</b> Vía dependiente de los lisosomas.....	42
<b>Figura 7.</b> Mecanismo de invasión a la célula hospedadora de <i>T. cruzi</i> . ....	45
<b>Figura 8.</b> Mecanismo de salida de la vacuola fagocítica .....	47
<b>Figura 9.</b> Mecanismo de muerte intracelular en el macrófago no activado .....	48
<b>Figura 10.</b> Mecanismo de muerte intracelular en el macrófago activado. ....	49
<b>Figura 11.</b> Síntesis del tripanotión en tripanosomátidos.....	50
<b>Figura 12.</b> Esquema propuesto para el metabolismo del peróxido dependiente del tripanotión en tripanosomátidos. ....	52
<b>Figura 13.</b> E-2D de proteínas solubles del aislado 338.....	61
<b>Figura 14.</b> E-2D de proteínas solubles en amastigotes de los aislados agudo vs. crónico.....	62
<b>Figura 15.</b> E-2D de proteínas solubles en tripomastigotes de los aislados agudo vs. crónico.....	68
<b>Figura 16.</b> E-2D de proteínas solubles en Epimastigotes de los aislados agudo vs. crónico.....	80

## RESUMEN

### TITULO:

ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN ESTADIOS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* I\*

### AUTOR:

DIAZ GALVIS, Martha Lucia\*\*

### PALABRAS CLAVES:

*T. cruzi*, Chagas agudo, triparedoxin peroxidasa, proteínas de choque calórico, electroforesis 2D, MALDI-TOF, LCMS/MS.

### DESCRIPCIÓN:

*Trypanosoma cruzi* es un parásito protozoario causante de la enfermedad de Chagas, patología con una gran variabilidad clínica que va desde una forma aguda hasta formas crónicas que afectan diferentes órganos. Posee un ciclo de vida complejo que involucra diferentes fases de desarrollo, con perfiles específicos de proteínas responsables de las características biológicas del parásito y ha sido clasificado en diferentes linajes denominados DTUs que van de I-VI. La mayoría de los aislados obtenidos de pacientes chagásicos en Colombia pertenecen al DTU I asociado con la forma cardíaca, a diferencia de países del cono sur de Suramérica en los cuales se encuentra también DTU II asociado con formas cardíacas y/o digestivas. En *T. cruzi* la regulación de la expresión génica se da principalmente a nivel postranscripcional, esta característica hace de los métodos proteómicos una herramienta ideal para el estudio de los cambios adaptativos en estos parásitos que podrían estar asociados con las diferentes formas de presentación y severidad observadas. Por lo tanto, se realizó un análisis proteómico comparativo entre estadios de *T. cruzi* linaje I aislados de paciente con Chagas agudo y crónico, mediante la electroforesis en 2D y análisis por espectrometría de masas (MALDI –TOF y LCMS/MS). En el aislado del caso agudo se identificaron 21 proteínas con expresión diferencial respecto al caso crónico, mientras en el aislado crónico 19 proteínas se expresaron diferencialmente. La mayor expresión en el aislado agudo se relacionó con proteínas asociadas a metabolismo de poliaminas, respuesta al stress y mecanismos antioxidantes. Estos hallazgos sugieren que la expresión diferencial de este tipo de proteínas en los parásitos responsables de la forma aguda de presentación de la enfermedad, podrían estar asociados con factores de virulencia del mismo, que le permitirían evadir el sistema inmune y por lo tanto sobrevivir durante la interacción hospedero parásito.

---

\* Proyecto de Grado

\*\* Departamento de Ciencias Básicas. Maestría en ciencias básicas biomédicas. Directora: Clara Isabel González Rugeles, MSc., PhD.

## SUMMARY

### TITLE:

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE GENIC EXPRESSION IN STAGES OF TRYPANOSOMA CRUZI LINEAGE I \*

### AUTHOR:

DIAZ GALVIS, Martha Lucia \*\*

### KEYWORDS:

*T. cruzi*, acute Chagas, Triparedoxin Peroxidase, HSP, Electrophoresis 2D, MALDI-TOF, LCMS/MS.

### DESCRIPTION:

*Trypanosome cruzi* is a protozoan parasite and the etiological agent of Chagas disease. This disease has great variability in the clinical course, from acute to chronic forms which affect different tissues. *T. cruzi* has a complex life cycle involving several developmental stages with specific patterns of proteins responsible for its biological features. In addition, *T. cruzi* has been classified in two several lineages named DTUs (Discret tipification units) ranged from I – VI. The most parasites isolated in Colombia from Chagasic patients belong to DTU I associated with the cardiac clinical form. In contrast, it has been reported DTU II associated with cardiac and digestive clinical disease in the South of South America. Gene expression in *T. cruzi* is regulated principally at the post transcriptional level. For this reason proteomic analysis are important tools to study the behaviour changes which might be associated with the clinical forms and their severity.

Here, it is reportated a comparative proteomic analysis between *T. cruzi* group I and its stages isolates from chagasic patient with acute and chronic form by 2D electrophoresis and mass spectrometry analyses (MALDI-TOF and LC MS/MS). In the parasite isolated from the acute form were identified 21 proteins with differential expression of the chronic case, whereas in the last case were identified 19 proteins.

The main expressions in the acute form were related with proteins associated with polyamines metabolism, stress response, and antioxidant mechanism. These results suggest that the differential expression of these groups of proteins in the parasites from the acute form could be associated with virulence factors, which allow to the parasite, avoid the immune system and survive during the host parasite interaction.

---

\* Graduation Project

\*\* Department of Basic Sciences. Masters in Biomedical Basic sciences. Director: Clara Isabel González Rugeles, MSc., PhD.

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas (EC) constituye un importante factor de morbilidad y mortalidad en América Central y Suramérica donde afecta aproximadamente a 13 millones de personas y 90 millones se encuentran en riesgo de adquirir la infección. En Colombia se calcula que el 5% de la población está infectada y que el 11% se encuentra en riesgo de contraer la infección.

La enfermedad es causada por la infección con el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* y se caracteriza por presentar un curso clínico variable que va desde una forma aguda severa o asintomática, hasta cardiomiopatía y/o patología gastrointestinal crónica (Macedo, 1998). Esta variabilidad en los síntomas ha sido atribuída en parte a la diversidad de las cepas de *T. cruzi*, sin embargo, hasta el momento aún no se conocen los mecanismos que explican por qué algunos pacientes desarrollan formas clínicas agudas leves o severas y otros formas crónicas cardíacas o digestivas. Así mismo, se ha observado que estas diferencias clínicas son predominantes en diferentes áreas geográficas, en el caso de Colombia predomina la forma cardíaca y nuestro grupo reportó el primer caso documentado de megacolon, por el contrario en Chile la forma digestiva es frecuente e igualmente la forma cardíaca. Esta heterogeneidad en la distribución geográfica de las formas clínicas de presentación de la enfermedad acompañada con la distribución de diferentes linajes asociados con la enfermedad en estas regiones ha llevado a los investigadores a buscar una asociación clara entre las variaciones genéticas del parásito y el establecimiento del tipo clínico de la enfermedad.

Diversos estudios han demostrado una alta heterogeneidad genética entre las poblaciones de *T.cruzi* (Dvorak, 1984, Tibayrenc 1993, Momen 1999), con comportamientos diferentes en términos de parasitemia, virulencia, patogenicidad y sensibilidad a fármacos. A pesar de la alta variabilidad estas poblaciones se han

podido clasificar en diferentes linajes consensualmente denominados DTUs I, II, III, IV, V y VI (Zingales, 2009). La mayoría de los aislados obtenidos de pacientes chagásicos en fase aguda o crónica en Colombia pertenecen al DTU I. Estos aislados han sido poco caracterizados bioquímica y genéticamente y actualmente, en nuestro país no hay reportes de estudios relacionados con expresión génica diferencial.

*T. cruzi* posee un ciclo de vida complejo, que alterna entre hospederos invertebrados (insectos pertenecientes a la familia de los triatomíneos) y vertebrados mamíferos (incluyendo el hombre). Durante su interacción con los hospederos, el parásito se diferencia en diversas formas de desarrollo: epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes que le permiten establecerse y continuar el ciclo entre los hospederos. En el curso de la diferenciación del parásito hay cambios en el patrón de proteínas expresado, así como en las proteínas específicas de fase (Heath, 1990) que podrían jugar un papel determinante en los procesos de invasión y supervivencia del protozoario.

En este sentido, la proteómica constituye una herramienta primordial para el estudio global de las proteínas (Tyers y Mann, 2003). La aplicación de esta tecnología en los tripanosomátidos es particularmente importante porque en estos organismos la regulación de la expresión génica ocurre a través de mecanismos postranscripcionales (Graham, 1995 Vanhamme y Pays, 1995), por lo tanto estos eventos no pueden ser medidos usando perfiles transcripcionales. También es conocido que las modificaciones postraduccionales (acetilación, glicosilación) juegan un papel importante en la modulación de las funciones proteicas en tripanosomátidos. Adicionalmente, con la reciente terminación de la secuenciación del genoma de *T. cruzi* (El Sayed, 2005) se han generado gran cantidad de datos que necesitan ser interpretados y contrastados mediante herramientas como la proteómica que a su vez permitirán revelar la identidad y función de miles de

proteínas codificadas en los genes, las cuales podrían ser blancos farmacológicos o utilizadas en el diseño de vacunas.

En virtud de la gran variabilidad clínica y epidemiológica de la EC, de las características genéticas de la población de *T.cruzi*, la no disponibilidad de vacunas, los tratamientos limitados con altas tasas de efectos colaterales, adquiere relevancia el análisis diferencial de la expresión de proteínas en las diferentes formas de desarrollo del parásito *T. cruzi* linaje I obtenido de pacientes con formas diferentes de presentación de la enfermedad, como son el Chagas agudo y crónico con cardiomiopatía.

## **1. ENFERMEDAD DE CHAGAS**

La enfermedad de Chagas es una zoonosis causada por la infección humana con *Trypanosoma cruzi*, parásito protozoario que se encuentra exclusivamente en el continente americano. Recibe su nombre en honor al Dr. Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas, médico brasileño quién describió la enfermedad por primera vez en 1909 e identificó al tripanosoma dándole el nombre de su profesor, el Dr. Oswaldo Cruz. El Dr. Chagas también definió el ciclo de vida del parásito e identificó a los insectos que lo transmiten, así como el grupo de pequeños mamíferos que actúan como reservorios en la naturaleza.

### **1.1 EPIDEMIOLOGIA**

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es una infección endémica en América Latina, se encuentra distribuida desde el norte de México hasta el sur de Argentina y Chile.

Esta enfermedad se observa principalmente en las zonas rurales, las comunidades indígenas y los suburbios más pobres. Actualmente se estima que el número de individuos infectados en Latinoamérica es de 12 a 14 millones de personas (Días, 2007).

**Figura 1.** Países endémicos para la enfermedad de Chagas.



Fuente. Tomado de: OPS/HDM/CD/425-06

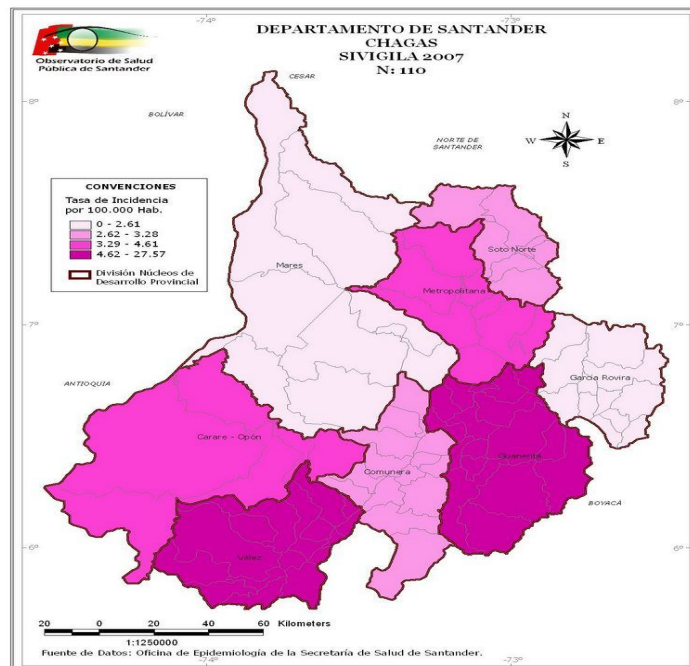
La OMS considera que cerca de 108 millones de personas, se encuentran viviendo en zonas endémicas en los 21 países del continente y la incidencia anual es de alrededor de 200.000 nuevos casos. Actualmente la enfermedad provoca 14.000 muertes cada año, por lo tanto, esta enfermedad representa una grave amenaza para la salud de los países de la región. Por otra parte, como resultado del aumento de los desplazamientos a nivel global, cada vez se están reportando más casos urbanos en Colombia y en países no endémicos como Estados Unidos, Canadá, Europa, Australia y Japón (Schmunis, 2007).

En Colombia, la enfermedad de Chagas es endémica en varias regiones, pero se conoce muy poco acerca de la epidemiología de la enfermedad. La información sobre la prevalencia es escasa y la importancia de esta enfermedad en salud pública permanece en constante controversia. Ha sido estimado que un 5% de la población que vive en áreas endémicas está infectada, lo cual corresponde a 700.000 personas (Moncayo 2009) y cerca del 20% se encuentra en riesgo de adquirir la infección. Los departamentos con más alta tasa de infección son Arauca

(21.1%), Casanare (10%), Santander (6,3%), Norte de Santander (5,2%), Boyacá (3,7%), Cundinamarca (1,9%) y Meta (1,7%) (Guhl, 1999).

Desde el punto de vista climatológico y orográfico, Colombia posee una gran variedad de hábitats que proveen las condiciones naturales para la transmisión del parásito, aunados a la existencia de diversas regiones rurales pobladas por personas de bajo nivel socio-económico, condiciones que favorecen la infestación de las viviendas por los vectores, sin que el departamento de Santander sea la excepción. El departamento de Santander es una de las zonas más afectadas y a pesar de las medidas de control vectorial, control químico y mejoras en las viviendas, que se implementaron durante los años 90, la prevalencia de la enfermedad continúa siendo alta. (Angulo 1990, Gutiérrez 2004) Ver figura 2.

**Figura 2.** Áreas endémicas para enfermedad de Chagas en el departamento de Santander, Año 2006.



Fuente. Secretaria de Salud de Santander

## 1.2 MECANISMOS DE TRANSMISION

La transmisión del *T. cruzi* en el ser humano puede ocurrir por diversas formas.

**1.2.1 Vectorial.** Este es el mecanismo de transmisión más común y ocurre a través de las heces de los triatomíneos. Estos insectos después de alimentarse con la sangre de los vertebrados, por regla general defecan, eliminando formas infectantes, los tripomastigotes metacíclicos, que penetran por el orificio de la picadura o por solución de continuidad dejada por el acto de rascar o aún a través de la penetración activa de mucosas como las de la boca o los ojos. Los vectores implicados en la transmisión de la enfermedad de Chagas son insectos del orden Hemíptera, familia Reduviidae y subfamilia Triatominae, más conocidos como triatomíneos o “pitos” (Colombia).

El parásito se presenta en una gran variedad de hospederos e infecta 150 especies de 24 familias de animales domésticos y silvestres. La presencia de la enfermedad en los humanos es un hecho puramente accidental, en la medida en que el hombre entró en contacto con los focos naturales y provocó desequilibrios ecológicos (WHO, 2002), que llevaron a los triatomíneos a ocupar las viviendas humanas, en las cuales estos insectos encontraron refugio y suficiente alimento en la sangre humana y la de los animales domésticos. De esta manera, el hombre entra a formar parte activa de la cadena epidemiológica de la enfermedad de Chagas.

**1.2.2 Transfusional.** Esta vía es la segunda causa más común de transmisión de la enfermedad debida a donadores de sangre no examinados. Ocurre por el uso de transfusiones de sangre y/o hemoderivados (sangre total, plaquetas, plasma fresco congelado o glóbulos rojos empaquetados) de donantes infectados a receptores sanos o inmunosuprimidos (Schmunis, 1999).

**1.2.3 Trasplante.** Los trasplantes constituyen otra fuente de transmisión cuando individuos infectados, sin conocer su condición donan órganos y el receptor, un paciente inmunosuprimido desarrolla la enfermedad aguda (Barcan, 2005).

**1.2.4 Congénita.** Ocurre por el paso del parásito en mujeres infectadas a sus bebés durante la gestación, el parto o mientras lo alimentan con leche materna (Punukollu, 2007). La infección durante el embarazo puede resultar en abortos o nacimientos prematuros.

**1.2.5 Oral.** Ocurre por la ingestión de alimentos contaminados con las heces de triatomíneos infectados u ocasionalmente por secreciones de las glándulas de olor de los marsupiales infectados (género *Didelphis*). Además por la ingestión de carne mal cocida o sangre de animales salvajes (armadillo) (Coura, 2002). Los mamíferos que actúan como reservorio frecuentemente adquieren la enfermedad al comerse los insectos infectados.

**1.2.6 Accidental.** Ocurre por el contacto de la piel herida o de las mucosas con material contaminado (sangre de enfermos, excreciones de triatomíneos), animales contaminados o durante la manipulación en laboratorios sin el uso adecuado de equipamiento de protección personal.

### **1.3 ASPECTOS CLINICOS O FASES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS**

La enfermedad de Chagas presenta un curso clínico variable que varía desde una infección leve o asintomática hasta una enfermedad severa crónica que involucra los sistemas cardiovascular y /o gastrointestinal.

**1.3.1 Fase Aguda.** Esta fase se presenta en el 5% de los individuos infectados. Generalmente se acompaña de una lesión inflamatoria en el sitio de entrada del parásito conocida como *chagoma de inoculación*, el cual se observa como una

zona indurada con eritema. En seguida, este proceso inflamatorio se extiende a la región y signos de inflamación de los ganglios locales se hacen evidentes a los pocos días de la primoinfección.

La mayoría de las personas con enfermedad de Chagas agudo manifiestan síntomas leves. Sin embargo, en los niños y en menor frecuencia los adultos desarrollan síntomas severos después de un período de incubación de 7 a 15 días. Estos síntomas incluyen inicialmente: edema periorbital o signo de Romahna y conjuntivitis. No obstante, se observan otras manifestaciones clínicas como: fiebre, hepatoesplenomegalia, náusea, vómito, diarrea, rash, anorexia e irritación gastrointestinal o meníngea. De los pacientes con enfermedad de Chagas agudo un pequeño porcentaje desarrolla miocarditis severa. La miocarditis puede ser evidente clínicamente y puede incluir taquicardia, arritmias, falla cardíaca congestiva y cardiomegalia acompañada de alteraciones electro cardiográficas (Tanowitz, 1992). Aunque los pacientes inmunosuprimidos y niños pueden desarrollar formas más severas de la infección con compromiso cardíaco y/o encefalomiелitis que pueden llevar incluso hasta la muerte.

En esta fase de la enfermedad, los tripomastigotes son encontrados en sangre periférica y también en el líquido cefalorraquídeo en pacientes con infección aguda. Otros hallazgos de laboratorio incluyen trombocitopenia, anemia, leucocitosis con predominancia de linfocitos, función anormal del hígado y elevados niveles de las enzimas cardíacas. Por último, el 1% de los pacientes que desarrollan una enfermedad aguda mueren por las complicaciones presentadas en la miocarditis o meningoencefalitis.

Aproximadamente, entre 1 o 2 meses después del contacto infeccioso, la parasitemia cesa por respuesta inmune y se establece la fase crónica. Se han establecido casos de reagudización en pacientes crónicos inmunosuprimidos (Simoës, 1995).

### **1.3.2 Fase Asintomática**

Después de un episodio agudo, la gran mayoría de los pacientes progresan a una fase crónica indeterminada, la cual puede durar de 20 a 30 años o puede persistir indefinidamente. En esta fase los pacientes no tienen síntomas o anormalidades clínicas, radiológicas o electrocardiográficas. Sin embargo, con una búsqueda más rigurosa algunos pacientes podrían mostrar ligeras anormalidades cardíacas o digestivas (Días, 1989). En esta fase el número de parásitos cae dramáticamente, pero algunos pueden ser aún detectados en ciertos tejidos durante la fase crónica.

### **1.3.3 Fase Crónica**

Después de un largo período asintomático, un 30-35% de los pacientes desarrolla síntomas clínicos, los cuales incluyen cardiomiopatía, falla cardíaca y anormalidades en el tracto digestivo tales como: megaesófago y megacolon. El involucramiento de los sistemas cardíaco y digestivo puede variar desde ligero a severo dependiendo de la extensión del tejido dañado y estos síntomas generalmente determinan la morbilidad de la enfermedad.

**1.3.3.1 Cardiomiopatía chagásica crónica.** La cardiomiopatía chagásica crónica puede presentarse inicialmente con arritmias o como una insuficiencia miocárdica, en algunos casos como eventos tromboembólicos o falla cardíaca congestiva. La cardiomiopatía dilatada congestiva es una importante manifestación de enfermedad crónica de Chagas que aparece años después de la infección aguda. Las principales manifestaciones clínicas de los pacientes en esta forma de la enfermedad son palpitaciones, disnea progresiva, edema, dolor precordial y tos. Algunos pacientes presentan mareos, vértigo y pérdida de la conciencia lo cual está relacionado con el bloqueo atrio ventricular completo (Elizari, 1999)

El infarto de miocardio en esta fase de la enfermedad es debido a la embolización de un aneurisma apical izquierdo. La arterioesclerosis y arteriolitis necrotizante

también ha sido descrita. La mayoría de los casos de infarto de miocardio ocurre en presencia de arterias coronarias normales. En modelos caninos se ha observado vasculitis de la microvasculatura coronaria, áreas difusas de infiltrado inflamatorio, fibrosis e hipertrofia en todas las áreas del corazón y alteraciones en la conducción.

**1.3.3.2 Enfermedad de Chagas en el tracto digestivo (ECTD).** La enfermedad de Chagas crónica, está asociada a alteraciones en plexo mientérico y mucoso del tracto digestivo, debido a la respuesta inmunitaria del hospedero contra neuronas sensibilizadas por los antígenos del *Trypanosoma cruzi*. En este sentido, el fenómeno básico de ECTD es la denervación intramural de los plexos del sistema nervioso autonómico mioentérico, especialmente los parasimpáticos. Esta denervación induce lesiones inflamatorias en la proximidad con los plexos afectados, produciendo así ganglionitis, periganglionitis y miositis (Lopes & Chapadeiro 1997, Köberle 1968).

Adicionalmente hay lesiones preganglionares y una reducción en el número de células dorsales del nervio vago. Esto debido probablemente a la destrucción resultante de la pérdida de las neuronas en el plexo intestinal. Las alteraciones más frecuentes e importantes se encuentran en el esófago y el colon terminal; las alteraciones básicas de la ECTD son de naturaleza motora, pero también alteraciones de absorción y de secreción pueden estar presentes (Rezende 2.000). La ECTD puede presentarse precozmente ya en la fase aguda de la enfermedad, especialmente el megaesófago; sin embargo, el megacolon es siempre la manifestación más tardía, encontrándose la mayor proporción de los enfermos en los mayores de los 40 años de edad (Dias & Coura 1997, Rezende 2.000)

Las alteraciones varían desde simples desórdenes en el movimiento (disperistalsis) hasta enormes dilataciones. Los síntomas y signos más comunes

del megaesófago chagásico son: disfagia, regurgitación, hipo, sialorrea y mal nutrición. La complicación más común del megaesófago es la esofagitis debido a estasis del alimento pudiendo llevar al desarrollo de ulceraciones; el cáncer de esófago ocurre como complicación del megaesófago en aproximadamente el 6% de los casos. La hipertrofia de glándulas salivares como la glándula parótida, debido a la excesiva salivación, puede estar asociada con megaesófago (Da silva, 1999). Por otra parte, el megacolon chagásico se manifiesta con: constipación, meteorismo y dolor abdominal. También son frecuentes los fecalomas con obstrucción del recto sigmoideo y síntomas como megacolon y megaesófago pueden ser observados simultáneamente. Aproximadamente la mitad de los casos de enfermedad digestiva están acompañados por cardiomiopatía chagásica (Rezende 1979).

## 2. TRYPANOSOMA CRUZI

La familia *Trypanosomatidae* pertenece a un grupo biológico peculiar del super reino Eucariota, clase Euglenozoa, orden *Kinetoplastida*. Todos los miembros del orden *Kinetoplastida* se caracterizan por la presencia de un organelo peculiar que los define, llamado kinetoplasto.

### 2.1 ESTADIOS DEL *Trypanosoma cruzi*

Existen 4 formas morfológicas principales de los tripanosomas: tripomastigote, epimastigote, promastigote y amastigote (Fig.3). Las diferentes formas se distinguen entre sí por la posición del kinetoplasto en relación al núcleo y por la presencia o ausencia de una membrana ondulante.

**2.1.1 Tripomastigote.** Esta forma es muy delgada y alargada, es la forma infectante y no se divide. El kinetoplasto se encuentra localizado posterior al núcleo, usualmente en la porción más posterior del parásito. El flagelo sale del extremo posterior y se dobla hacia delante a lo largo del cuerpo del parásito, formando una membrana ondulante a lo largo de todo el parásito y emerge en forma libre en su extremo anterior.

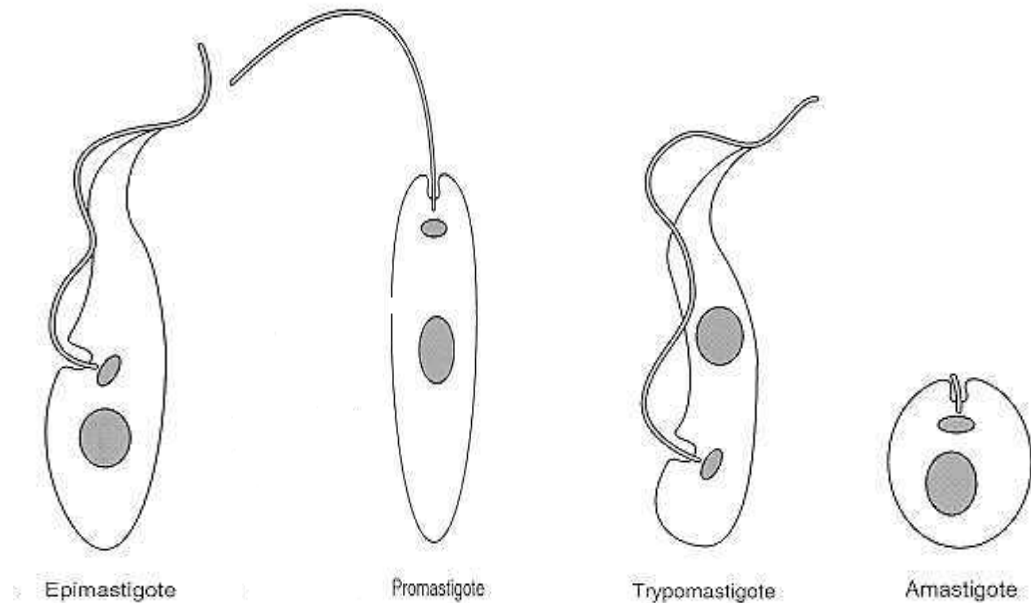
**2.1.2 Epimastigote.** Su forma es alargada y es la forma replicativa que se encuentra en el tracto digestivo de los invertebrados. El kinetoplasto se encuentra localizado en la parte media del organismo justo por delante del núcleo. El flagelo emerge de la parte media del parásito y forma una membrana ondulante más pequeña que la observada en los tripomastigotes.

**2.1.3 Promastigote.** Tiene el kinetoplasto en la parte anterior y un flagelo libre sin membrana ondulante.

**2.1.4 Amastigote.** Este estadio se caracteriza por su forma esférica y aflagelada.

El kinetoplasto se reconoce como un cuerpo oscuro cerca del núcleo. Esta forma es replicativa y se localiza en el interior de las células mamíferas.

**Figura 3.** Estadios del *Trypanosoma cruzi*



Fuente. Zephyris, Wikipedia. [http://es.wikipedia.org/wiki/Trypanosoma\\_cruzi](http://es.wikipedia.org/wiki/Trypanosoma_cruzi)

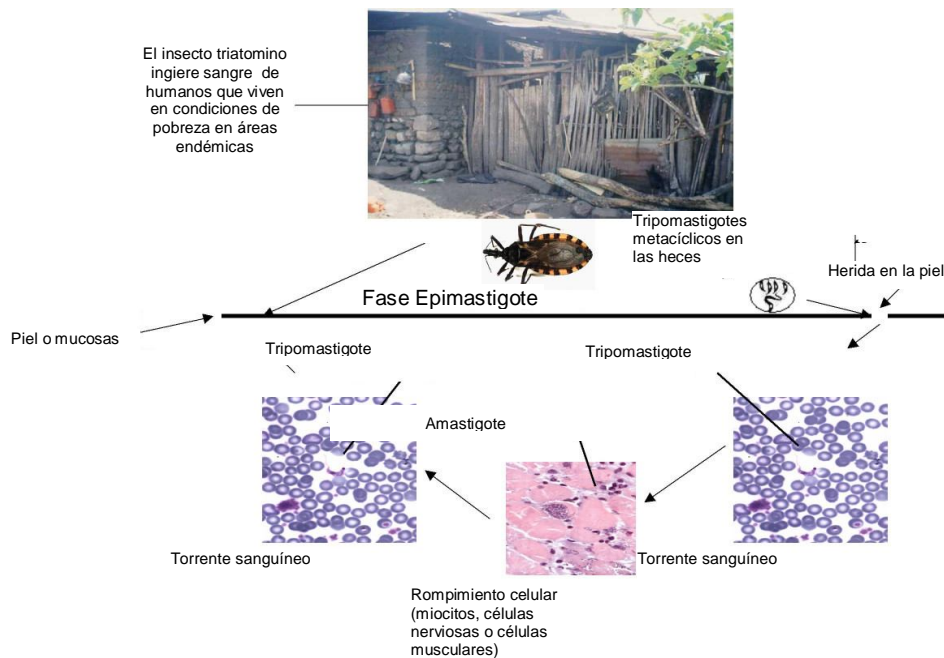
## 2.2 CICLO BIOLÓGICO DE *T. cruzi*

*Trypanosoma cruzi* posee un complejo ciclo de vida con múltiples fases de desarrollo que alternan entre el hospedero invertebrado (insecto) y una variedad de hospederos vertebrados mamíferos, los cuales incluyen al humano y diferentes especies de animales domésticos o salvajes. Los insectos vectores son hemípteros de la familia *Reduviidae*, subfamilia *Triatominae*, que se alimentan de sangre durante la noche.

El ciclo de transmisión se inicia cuando el insecto ingiere, las formas tripomastigotes que se encuentran circulantes en la sangre del hospedador vertebrado infectado. Estas formas alcanzan el intestino medio del insecto y es allí

donde se diferencian a epimastigotes; los cuales se multiplican repetidamente por división binaria y se adhieren a las membranas perimicrovillares de las células intestinales (Alves, 2007). Más tarde, en el recto del insecto los epimastigotes se diferencian a tripomastigotes metacíclicos (un proceso conocido como metaciclogénesis) pudiendo ambas formas ser eliminadas a través de las heces y orina durante una segunda ingesta de sangre del vector infectado.

**Figura 4.** Ciclo de vida de *T. cruzi*



Fuente. Franco-paredes et al, 2007

Los parásitos se multiplican como epimastigotes en el intestino del insecto vector, después de la transformación en tripomastigotes metacíclicos los organismos son depositados con las heces del vector e infectan las células mamíferas en las superficies mucosas, conjuntivas o heridas en la piel. Una vez dentro de la célula hospedadora los parásitos se transforman en amastigotes y después de algunos ciclos de multiplicación se transforman de nuevo en tripomastigotes sanguíneos. La célula hospedadora se rompe liberando los parásitos al tejido adyacente y la circulación; el ciclo se completa cuando los tripomastigotes son ingeridos en la comida por otro insecto vector y se transforma a epimastigote en el intestino.

El prurito causado por la lesión cutánea de la picadura facilita el contacto de los parásitos con la lesión y la entrada de las formas metacíclicas produciéndose así la infección del hospedero vertebrado (Figura 4). Otras vías de infección son a través de las mucosas bucal y conjuntiva (Manoel - Caetano, 2007).

Rápidamente, los tripomastigotes metacíclicos en el hospedero vertebrado, invaden células de diferentes tejidos, tales como: macrófagos, fibroblastos, cardiomiocitos, células del músculo liso y células epiteliales, entre otras. Después de la invasión celular los tripomastigotes metacíclicos son contenidos dentro de una estructura conocida como vacuola parasitófora (Carvalho & De Sousa 1989), desde donde ellos escapan al citoplasma para así diferenciarse en amastigotes que se replican libres en el citoplasma. Después de unos nueve ciclos de división binaria y cuando los amastigotes casi llenan la célula, éstos se diferencian nuevamente a tripomastigotes altamente móviles, los cuales son liberados al torrente sanguíneo por la ruptura de la célula hospedera. Los tripomastigotes sanguíneos pueden infectar otras células o bien ser ingeridos por el insecto vector durante la picadura al hospedador, completándose de esta manera el ciclo vital del parásito.

### 3. GENETICA DEL PARASITO

El Orden *Kinetoplastida* al cual pertenece *Trypanosoma cruzi* se caracteriza por la ubicación del ADN mitocondrial en una estructura denominada kinetoplasto. Los primeros estudios en *T. cruzi* se centraron en este ADN y permitieron dilucidar la estructura y función de esta organela. Ahora se conoce que el kinetoplasto en *T. cruzi* cumple un doble papel funcional, como mitocondria para garantizar la supervivencia de los estadios dependientes de fosforilación oxidativa y otro como reservorio de heterogeneidad poblacional del genoma extra-nuclear (Westenberger, 2006).

El ADN del kinetoplasto (kADN) representa más del 20% del ADN total celular y posee dos clases de moléculas de ADN circulares y concatenadas, denominadas maxicírculos y minicírculos. Los maxicírculos tienen genes típicamente mitocondriales, muchos de los cuales se traducen sólo después de editarlos. Los minicírculos codifican los ARN líder (SL) involucrados en los procesos de maduración de los ARNm ó ARN mitocondriales (edición de ARN). Se ha demostrado que la heterogeneidad de los minicírculos es producto de recombinaciones entre ellos y además éste material génico contribuye en la síntesis de los ARN líder los cuales participan en los procesos de edición de ARNm (Macedo, 2004).

La bioquímica de *T.cruzi* fue estudiada a lo largo de varias décadas hasta el momento en que se introdujeron las técnicas de biología molecular. Con el desarrollo de la clonación y la secuenciación se caracterizaron muchos genes de *T. cruzi*, inicialmente algunos se identificaron, como antígenos de superficie del parásito, entre los más destacados se encuentran los genes que codifican para Tc52 y las proteínas de superficie gp70 y gp80 (Yoshida, 1983).

Entre 1993 y 1994, durante varias reuniones en Brasil, Argentina y Europa fue planificado el proyecto genoma de *T. cruzi*. Finalmente se concretó a mediados de 1994 y se determinó la cepa CL Brener como la cepa para adelantar los estudios de *T. cruzi* II y el clon Dm28c fue seleccionado como representante del linaje *T. cruzi* I. Actualmente se conoce que la cepa CL Brener es un híbrido (Elias, 2005).

La secuencia genómica total de *T. cruzi* CL-Brener fue oficialmente publicada junto con las secuencias genómicas completas de *L. major* y *T. brucei*, en 2005. De esta forma fueron predichas 22.570 proteínas, de las cuales 12.570 representan pares alélicos. El 50% del genoma está constituido por secuencias repetidas tales como retrotransposones y otros elementos repetitivos, además se encontraron muchos genes pertenecientes a grandes familias de proteínas de superficie, como las trans-sialidasas, mucinas, gp63 proteasa y proteínas asociadas a mucinas (MASP), que representan cerca de 18% de todas las secuencias codificantes.

### **3.1 ESTRUCTURA POBLACIONAL**

*T. cruzi*, exhibe un alto grado de variabilidad, que involucra aspectos morfológicos (formas delgadas, gruesas e intermedias, ya observadas por Carlos Chagas a comienzos de siglo), genéticos y bioquímicos. La heterogeneidad genética del taxón *T. cruzi* sugiere una gran variabilidad biológica. El conjunto de características heterogéneas de las poblaciones de *T. cruzi*, junto con los variados hábitos alimenticios de los insectos vectores y el grupo diverso de hospedadores vertebrados presentes en un determinado ambiente, define dos ciclos de transmisión del *T. cruzi*, el ciclo silvestre, que abarca principalmente marsupiales y pequeños roedores silvestres y el ciclo doméstico, que involucra al hombre y algunos otros mamíferos del ambiente peridomiciliar (OMS, 2002).

Existen evidencias de la policlonalidad de las poblaciones de *T. cruzi* (D'Ávila, 2009). Los pacientes de áreas endémicas probablemente se infectan múltiples

veces por el contacto con diferentes triatominos, los cuales a su vez se alimentan de la sangre de diferentes individuos. Este escenario podría conducir a la formación de una población multiclinal de *T. cruzi* en hospederos y vectores (Coura, 2003).

### **3.2 LINAJES DE *T.cruzi***

*T. cruzi* es un organismo diploide, a pesar de que su genoma ha sido recientemente secuenciado aún muchos aspectos de su evolución permanecen desconocidos. Miles y col (1977) iniciaron los estudios enzimáticos en muestras de *T. cruzi* aislado de diferentes hospederos en varias regiones de Brasil. Usando métodos electroforéticos los autores describieron tres clases de parásitos, distinguibles sobre la base de un patrón específico para un grupo de enzimas, llamados zimodemas (Z1, Z2 y Z3). Los estudios epidemiológicos mostraron que Z1 y Z3 estaban asociados con el ciclo selvático y Z2 con el ciclo domiciliario (Miles, 1980).

Más tarde, Tibayrenc y col (1988), a partir del estudio de 15 genes en clones de *T. cruzi*, aislados de diferentes hospederos de diversas regiones de Suramérica, demostraron la existencia de un marcado polimorfismo y propusieron 43 genotipos. Este grupo también sugirió la posibilidad de una estructura clonal para los linajes de *T. cruzi* basado en la existencia de clones sin interacción sexual separados por un largo proceso evolutivo. En conclusión, los linajes de *T. cruzi* son clones producto de la selección natural, en la que se favoreció únicamente cierto tipo de patrón genético o combinaciones y podría resultar en un número limitado de grupos de isoenzimas representados por tres clones (Tybarenc, 1988). La hipótesis de una correlación entre la variabilidad biológica y filogenética de *T. cruzi* fue confirmada por Revollo (1988) usando varios parámetros como MLEE (electroforesis multilocus enzimático) y RAPD (ADN polimórfico amplificado aleatoriamente) y basándose en la distancia genética. De esta manera, los tipos biológicos biodemas fueron correlacionados con los zimodemas (Z1, Z2, Z3)

descrito por Miles y col. (1980). El biotipo tipo II corresponde al Z2 y el tipo III al Z1 (Andrade, 1999). La excepción fue el tipo I el cual presentó un patrón electroforético peculiar no descrito previamente y subsecuentemente fue designado como Z2b.

La identificación de marcadores de ADN nuclear con muy baja tasa evolutiva como el gen de la subunidad ribosomal 24S y la región intergénica de genes del mini exón ayudó a establecer la existencia de 2 linajes filogenéticos principales dentro del taxón de *T. cruzi* (Souto, 1996). Estos linajes fueron designados por un comité experto basado en la evidencia bioquímica y genética. En 1999, en un esfuerzo para homogeneizar la nomenclatura adoptada por los diferentes grupos de investigación, los dos linajes principales fueron renombrados como *T. cruzi* I y *T. cruzi* II (Anonymous, 1999).

Posteriormente, utilizando análisis de isoenzimas y RAPD, Brisse y colaboradores en el 2000, propusieron la subdivisión del taxón *T. cruzi* en seis linajes o DTUs (Unidades discretas de tipificación) I, IIa, IIb, IIc, IId, IIe, siendo el DTU I correspondiente al linaje *T. cruzi* I y el DTU IIb correspondiente al linaje *T. cruzi* II. Los sublinajes IIa, IIc-e incluyen las cepas híbridas y aquellas pertenecientes al zimodema 3. A pesar de no haber sido oficialmente recomendada, esta nomenclatura es la que ha venido siendo utilizada por la comunidad científica.

Freitas y colaboradores en 2006, utilizando un conjunto de 7 marcadores moleculares, incluyendo el polimorfismo asociado a 5 locus de microsatélites y a dos genes, uno nuclear (rADN 24S $\alpha$ ) y otro mitocondrial (COII - subunidad II de la citocromo oxidasa), propusieron la existencia de un tercer linaje principal en *T. cruzi*, designado como *T. cruzi* III. Recientemente, basados en los diferentes marcadores moleculares, el encuentro de expertos realizado en Buzios, Brasil recomienda nuevamente la homogenización de la nomenclatura de las cepas de *T. cruzi*

siguiendo la clasificación de seis DTUs denominadas desde *T. cruzi* I a VI (Zingales, 2009).

### **3.2.1 Variabilidad genética vs variabilidad en la distribución geográfica.**

Numerosos estudios han mostrado diferencias entre los DTUs de *T. cruzi* I y II, los cuales presentan una distribución geográfica particular a través del continente americano. El DTU I predomina en Centro América y en los países ubicados al norte de la cuenca amazónica de Suramérica como Ecuador, Venezuela y Colombia asociado tanto con el ciclo doméstico como con el salvaje. En Colombia, *T. cruzi* I ha sido descrito como el linaje predominante aunque no es exclusivo, ya que recientemente nuestro grupo de investigación reportó la presencia de DTU II no sólo en vectores sino en sangre y tejido de pacientes con EC (Zafra 2008, Mantilla, 2010). Por el contrario, el DTU II predomina en los países del cono sur de Suramérica como Brasil, Chile y Argentina asociado con el ciclo doméstico y con la presentación de la enfermedad, aunque también hay algunos reportes de CC asociada con Tc I en la cuenca amazónica brasilera. Además de esta variabilidad en la distribución geográfica de los linajes asociados con la patología se han reportado variaciones en la distribución geográfica de las formas clínicas de la EC, las cuales por lo tanto podrían estar relacionadas con la carga genética y factores epigenéticos tanto del hospedero como del parásito.

### **3.2.2 Variabilidad genética Vs. variabilidad en las manifestaciones clínicas.**

Uno de los desafíos más importantes para los investigadores en la EC es el posible papel de la variabilidad genética de las poblaciones de *T. cruzi* en la determinación de las diferentes formas clínicas. En este contexto algunos estudios han intentado establecer una relación entre los diferentes DTUs de *T. cruzi* y las manifestaciones clínicas de la EC (Oliveira et al. 1997; Espinoza et al. 1998). A pesar de estos estudios, aún no se han podido establecer asociaciones entre los diferentes marcadores moleculares de una cepa de *T. cruzi* y una característica particular de la patología (Carneiro, 1991, Lauria Pires y Teixeira, 1996, Buscaglia

y Di Noia, 2003, Pena, 2009). Recientemente, una investigación analizó la variabilidad genética de algunos genes del maxicírculo de *T. cruzi* II, entre ellos la subunidad 7 de la NADH dehidrogenasa (ND7), citocromo oxidasa III (COIII) y la subunidad 4 de la NADH dehidrogenasa (ND4/CR4). Sin embargo, los resultados de este estudio no permitieron establecer correlación alguna entre los marcadores genéticos del maxicírculo con las formas indeterminada y crónica de la EC (Carranza et al, 2009). La mayoría de las investigaciones en este campo se han realizado con parásitos de *T. cruzi* II y no hay reportes publicados con parásitos de *T. cruzi* I, los cuales son prevalentes en Colombia. Adicionalmente, otros reportes han establecido relaciones entre las poblaciones multiclonales del parásito que infectan un individuo con el tropismo específico hacia diferentes tejidos (Vago et al. 2000 y Macedo et al. 2004). El mecanismo por el cual las diferentes formas clínicas de la enfermedad se establecen aún permanece oscuro. Sin dudas, factores asociados al paciente están involucrados, pero también es evidente el papel fundamental asociado al genoma del parásito.

## **4. REGULACION DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN TRIPANOSOMAS**

Los Kinetoplastida presentan mecanismos genéticos característicos como son ausencia de promotores típicos de eucariotas, transcripción policistrónica, control de la expresión génica a nivel post-trascricional mediante los procesos de “transplicing” y edición del ARNm.

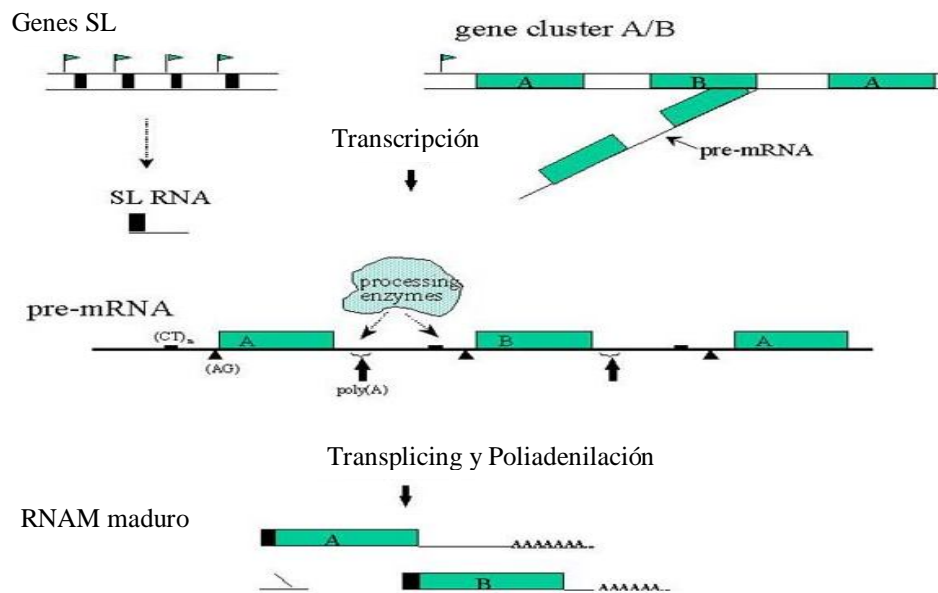
### **4.1 TRANSCRIPCION POLICISTRONICA**

La mayoría de los organismos eucariotas regulan la transcripción de sus genes a través de factores de transcripción, estos elementos se unen a regiones promotoras dependientes de RNA polimerasa II. Por el contrario, en los tripanosomátidos, los promotores de la RNA polimerasa II están casi ausentes (Benz, 2005) y los genes que codifican proteínas se encuentran organizados en grupos que son coordinadamente transcritos en precursores policistrónicos de ARN mensajeros (Martínez, 2003).

Estas unidades policistrónicas generalmente son largas y contienen secuencias intergénicas cortas. Sin embargo, a diferencia de la transcripción policistrónica descrita en procariotas, los diferentes ARNm co-transcritos en los tripanosomátidos, generalmente no están relacionados en términos de funcionalidad o expresión temporal de las proteínas.

Por otra parte, únicamente los ARNm monocistrónicos son traducidos, por lo tanto los precursores de ARNm policistrónicos deben ser procesados hasta ARNm individuales. Este procesamiento es realizado a través de una combinación de mecanismos de “trans-splicing” en 5' y poliadenilación en 3' (Liang, 2003) (Fig. 5).

**Figura 5.** Proceso general de la síntesis de ARNm en tripanosomátidos.



Fuente. Texeira, 1988.

La mayoría de los genes de tripanosomas caracterizados están organizados en repeticiones en tándem (las cajas representan dos copias del gen A y una copia del gen B). En otra localización cromosómica hay algunas cientos de repeticiones en tándem que codifican SL ARNs (cajas oscuras). En algunos casos un único promotor está presente corriente arriba del primer gen en el cluster, mientras que en el cluster del gene SL cada repetición tiene un promotor transcripcional (Banderas). Después de la transcripción el ARNm policistrónico es procesado por “transplicing” y poliadenilación, mediante señales presentes dentro de la región intergénica, como es el caso de una secuencia rica en polipirimidinas o CTn (Cajas pequeñas). Finalmente, los ARN maduros tienen la región codificante en el extremo 5'UTR, la secuencia SL y la cola de poli A en el extremo 3' UTR.

**4.1.1 Proceso de “trans-splicing”.** Este proceso involucra mecanismos de corte y empalme, los cuales consisten en la adición de una cubierta en el extremo 5' y la adición de una cola de poliA en el extremo 3' cuando finaliza el proceso de la

transcripción. En este proceso una secuencia líder (SL) o ARNm común es adicionado a cada transcrito para producir un mensaje original. Esta secuencia líder se origina a partir del procesamiento de un ARN donador llamado minixon el cual es codificado en un sitio diferente del genoma del parásito. De esta forma, todos los ARNm del *T. cruzi* poseen en su extremo 5' una secuencia común. Esta organización particular probablemente explica por qué se han encontrado pocos promotores en los tripanosomas. A pesar de la transcripción primaria común, genes individuales pertenecientes a la misma unidad pueden mostrar patrones de expresión marcadamente diferentes, indicando, que el control de la expresión génica en los tripanosomátidos opera principalmente a nivel postranscripcional (Clayton, 2007). Los sitios de poliadenilación están localizados 100-300 nucleótidos corriente arriba de la señal de "trans-splicing" y hasta el momento no se conoce la señal del sitio de poliadenilación, sin embargo observaciones recientes sugieren un mecanismo que actúa a una distancia conservada corriente arriba del sitio del procesamiento del siguiente gen. Las repeticiones de residuos de adenosina parecen ser blancos preferenciales para este proceso de poliadenilación.

**4.1.2 Edición del RNA.** El termino edición del RNA describe los procesos moleculares en los cuales el contenido de la información de una molécula de RNA es alterado. La generación de ARNm funcional involucra la adición postranscripcional o delección de residuos de Uridina. En los tripanosomátidos la edición del RNA es esencial para la expresión de genes mitocondriales los cuales producen transcritos no funcionales (transcritos que carecen de información). Estos transcritos defectuosos son editados en sus mensajes funcionales alterando la secuencia mediante la inserción o delección de uridinas (Stuart, 1997, Horton, 2002). Este proceso está mediado por ARNs pequeños llamados ARN guías codificados en los minicírculos y maxicírculos. La edición ocurre por una serie coordinada de pasos enzimáticos que involucra el clivaje endonucleolítico del pre mRNA seguido por la adición o remoción de una o más uridinas en el extremo 3'

## 5. FISIOPATOGENIA

Desde hace unas décadas, algunos grupos de investigación se han interesado en conocer los mecanismos involucrados en la interacción hospedero – parásito que llevan a las formas clínicas de la EC. Gracias a las múltiples investigaciones en diferentes campos de la ciencia, hoy en día se tiene bastante información acerca del parásito y del papel del hospedero. Sin embargo, quedan todavía campos por explorar. En el hospedero vertebrado, *T. cruzi* sobrevive como un parásito intracelular y la invasión de la célula hospedadora constituye un factor fundamental en la amplificación y persistencia de la infección.

### 5.1 INTERACCION HOSPEDERO – PARASITO

La interacción de *Trypanosoma cruzi* con su hospedero puede resumirse en 4 etapas: **adhesión** y reconocimiento de receptores en la célula blanco por parte de moléculas de superficie del parásito, **señalización**, **internalización** y **escape de la vacuola parasitófora**.

**5.1.1 Adhesión.** Las formas tripomastigotes se adhieren a través de interacciones mediadas por receptores en una gran variedad de células nucleadas, exhibiendo tropismo principalmente por los cardiomiocitos y células del músculo liso en el hospedero vertebrado. Un gran número de moléculas involucradas en la invasión han sido identificadas en el parásito, las cuales reconocen diferentes receptores en la superficie de las células hospederas. Este repertorio le permite al parásito interactuar con diferentes ambientes tanto en el vector como en el hospedero mamífero. Entre las moléculas involucradas en el reconocimiento inicial se encuentran: las glicoproteínas con residuos de manosa, fucosa o N-acetilglucosamina (Taylor, 1993), lípidos (Priotto, 2009) y proteínas tipo lectina (Herrera, 1994, Alves, 1986, Schenkman, 1993).

Algunos estudios han caracterizado estas glicoproteínas como pertenecientes a una superfamilia definida por homología a las sialidasas como “transialidasas”. Las transialidasas se encargan de remover los residuos de ácido siálico de glicoproteínas presentes en el ambiente y transferirlo a moléculas aceptoras llamadas mucinas presentes en la membrana plasmática de los tripomastigotes. Así mismo, ha sido evidenciado que el ácido siálico posee actividad moduladora del proceso de adhesión entre *T. cruzi* y las células hospedadoras.

Adicionalmente, otras moléculas tipo glicoproteína han sido recientemente descritas, como el caso de la gp82, la gp85 y la gp90 (Yoshida, 2008). La proteína gp82 se encuentra en la membrana de los tripomastigotes metacíclicos y cumple una función importante en el proceso de interacción durante la infección por vía oral, ya que permite la unión del parásito a la mucina gástrica, a diferencia de la acción ejercida por la glicoproteína gp90 la cual se caracteriza porque modula negativamente la entrada del parásito. Otra molécula de superficie con afinidad para los componentes de la matriz extracelular es la penetrina, una molécula de 60 KDa que selectivamente se une a la heparina, heparan sulfato y colágeno y promueve la adhesión y penetración en los fibroblastos (Ortega-Barria y Pereira, 1991).

**5.1.1.1 Internalización:** Hasta el momento se considera que *T. cruzi* puede entrar a diferentes tipos de células hospederas de tipo fagocítico y no fagocítico. Para cada una de estos tipos de células, *T. cruzi* emplea diferentes estrategias de entrada, en las células fagocíticas los mecanismos de entrada dependen de la polimerización de la actina y en las células no fagocíticas se han descrito dos mecanismos distintos: las vías dependiente e independiente de lisosomas.

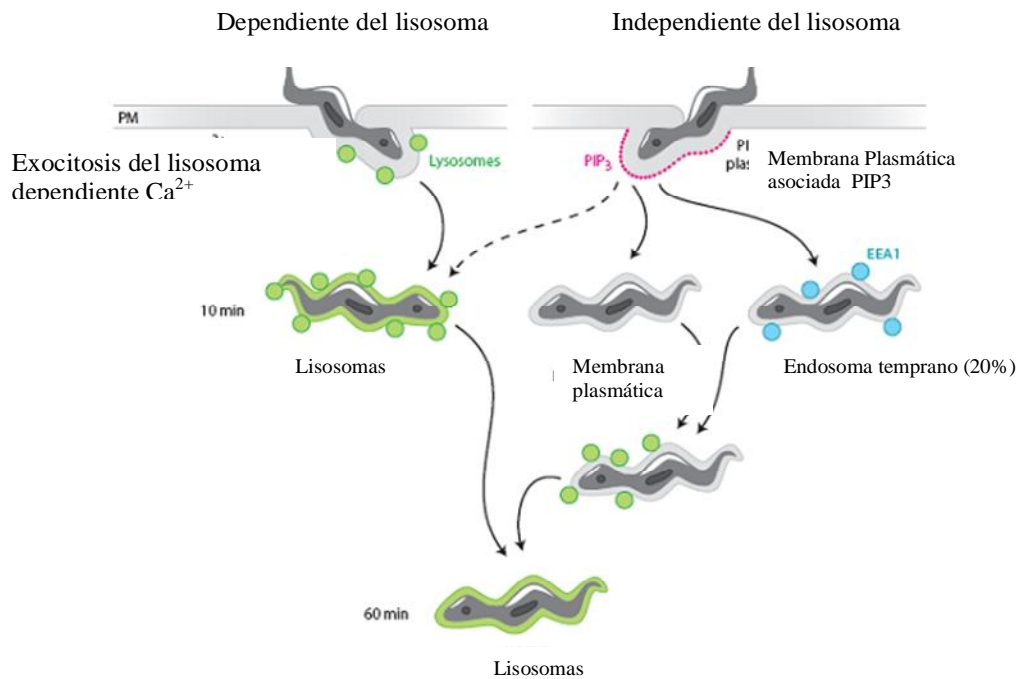
**5.1.1.2 Vías para la invasión de los fagocitos no profesionales.** Es claro que la interacción de *T. cruzi* con el compartimento lisosomal es un evento crítico que conduce a la localización citosólica y supervivencia de este patógeno dentro de las células mamíferas. El estado actual de la investigación en esta área indica que

dos vías distintas son usadas para la entrada de los tripomastigotes y el tráfico hacia los lisosomas en células fagocíticas no profesionales

**Vía dependiente de los lisosomas.** Hace más de una década fue evidenciado que los tripomastigotes infectantes desarrollan un mecanismo diferente a la polimerización de la actina para entrar a los fagocitos no profesionales que involucra el reclutamiento y fusión de los lisosomas de la célula hospedera en el sitio de entrada del parásito (Schenkman, 1991, Tardieux 1992, Andrews 1995). Algunas de las evidencias experimentales que permitieron suponer estos mecanismos, consistieron en el tratamiento con citocalasina D y en el pre-tratamiento de fibroblastos con agentes que causaban el movimiento anterógrado de los lisosomas, esto dió como resultado un aumento en la invasión, mientras que el movimiento retrógrado de los lisosomas en las células disminuyó la capacidad invasiva de los tripomastigotes.

Adicionalmente, hay evidencia que el sitio de interacción parásito-célula puede actuar como un centro para la reorganización de los microtúbulos lo que facilitaría la atracción de los lisosomas al sitio de entrada. Por lo tanto, estos hallazgos apoyan la idea de que la vacuola que contiene al tripomastigote es formada al momento de entrada del parásito, por la fusión inmediata y específica de los lisosomas de la célula hospedadora. Se sugiere además que señales activadoras en la célula hospedadora activadas por tripomastigotes invasores son requeridas para iniciar los eventos tempranos, de rearrreglos de actina, reclutamiento de lisosomas y fusión de membrana plasmática.

**Figura 6.** Vía dependiente de los lisosomas



Fuente. <http://www.hsph.harvard.edu/faculty/barbara-burleigh/>

Otro mecanismo que *T. cruzi* podría emplear para invadir células es aprovechar la propiedad celular de reparación de la membrana plasmática, de esta forma una exocitosis de lisosomas dependiente de calcio generaría la vacuola parasitófora en el sitio de invasión a través de una fusión de lisosomas dependiente de  $Ca^{2+}$  que han sido reclutados de una manera dependiente de kinesina y una vía independiente de actina.

Vía independiente del lisosoma: una característica clave de la vía dependiente del lisosoma es que la vacuola se genera por la fusión de las membranas de los lisosomas y que la fusión es requerida para la entrada del parásito. Recientemente una vía de entrada alterna ha sido descrita (Woolsey, 2009) ésta es iniciada por la invaginación de la membrana plasmática de la célula hospedera en un proceso que es facilitado por la disrupción de los microfilamentos de actina, originando una

vacuola intracelular que subsecuentemente se fusiona con lisosomas y es también independiente de la polimerización de actina de la célula hospedera.

El trabajo experimental que permitió dar cuenta de este mecanismo empleó marcadores quiméricos GFP los cuales se asocian con el fosfatoinositol PI (4,5) P<sub>2</sub> (3,4,5) o P<sub>3</sub> en la cara citosólica de la membrana plasmática. Los resultados obtenidos mostraron que a los 10 minutos, el 50% de los tripomastigotes invasores se asociaron con la membrana plasmática durante e inmediatamente después del proceso de invasión. El inmunomarcaje de células fijas demostró que el marcador lisosomal LAMP-1 (proteína de membrana asociada al lisosoma) no se colocalizó en los parásitos que fueron positivos para marcadores membranales GFP. De hecho únicamente el 20% de los parásitos internalizados estaban asociados a lisosomas y otro 20% de los parásitos intracelulares claramente se observaron en endosomas tempranos. Estos hallazgos aportan evidencias que permiten indicar que los tripomastigotes pueden invadir células no fagocíticas de una manera independiente de los lisosomas (figura 6).

En conclusión, la adherencia e internalización a la célula hospedadora es un paso crítico para el establecimiento de la infección por *T. cruzi* en mamíferos. Este proceso requiere la participación de varios componentes celulares, moléculas de superficie del parásito que reconocen diversos receptores en las células hospedadoras aún no completamente identificados, dentro de una serie de eventos que conducen a la activación de vías de señalamiento e incremento del Ca citosólico en ambas células y la formación de una vacuola parasitófora que contiene el parásito.

**5.1.2 Vías de señalización.** Los eventos de señalamiento intracelular del parásito, aún no han sido descritos en detalle para los tripanosomas. Durante la invasión se produce liberación de calcio y fosforilación de residuos de tirosina presumiblemente a través de la actividad de las protein quinasas (PK).

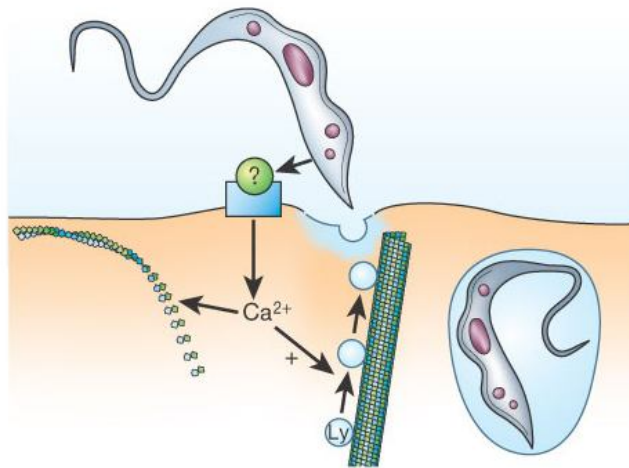
La mayoría de los estudios que se han realizado para elucidar los mecanismos de señalización por *T. cruzi* han usado tripomastigotes metacíclicos (TM) y tripomastigotes derivados de cultivo celular (TCT) como contrapartes del parásito encontrado en el insecto y en la sangre del hospedero vertebrado, respectivamente.

La entrada de formas tripomastigotes activa en las células hospedadoras un proceso de señalización que lleva a la invasión por parte del parásito. En células fagocíticas profesionales ocurre la activación de tirosin quinasas, el reclutamiento de PI-3 quinasa y actina, en el lugar de entrada del parásito. Por otro lado, en las células no fagocíticas profesionales no ocurre la activación de tirosin quinasas, como lo demostraron los trabajos en los cuales, se usaron inhibidores de estas enzimas sin reducción del proceso de invasión. Sin embargo, la activación de PI-3 quinasa, sí ocurre y esta activación parece ser el factor clave regulador del proceso de fagocitosis con participación de los lisosomas de la célula hospedadora. También fue evidenciada la participación en este proceso de tirosin fosfatasas (Cuevas, 2005).

En la vía dependiente de lisosomas, al parecer el reclutamiento de éstos es iniciado cuando el *T. cruzi* se adhiere a la célula hospedera y desencadena eventos de señalamiento que involucran la liberación del calcio y la subsecuente movilización de los lisosomas hacia el sitio de entrada del parásito.

Diversos estudios han mostrado que son dos, las vías de señalamiento que se activan en este proceso: una que involucra la hidrólisis del fosfoinositol dependiente de fosfolipasa C con el 1, 4, 5 inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) que llevan a la movilización de calcio.

**Figura 7.** Mecanismo de invasión a la célula hospedadora de *T. cruzi*.



Fuente. Gruenheid and Finlay, 2003.

Unión de un producto de parásito no identificado a célula hospedadora causa un aumento en el calcio intracelular. Este flujo de calcio desestabiliza el citoesqueleto de actina e induce el reclutamiento de los lisosomas mediado por microtúbulos y posterior fusión de lisosoma con la membrana plasmática para dar origen a la vacuola parasitófora.

En los momentos iniciales de reconocimiento de *T. cruzi* con la célula hospedadora ocurre un aumento de los niveles citoplasmáticos de calcio (tanto en el parásito como en la célula hospedadora). Esta elevación de calcio es importante para la entrada del parásito, ya que si bloqueamos este aumento transitorio de calcio citoplasmático (con tapsigargina), ocurre una reducción en la entrada (Neira, 2002). Sea cual fuera el mecanismo de entrada del parásito, éste se localiza en una vacuola endocítica, que después de un tiempo se funde con lisosomas de la célula hospedadora, formando un fagolisosoma. En la mayoría de los casos, 2 horas después, se observa que el parásito destruye la membrana de la vacuola y escapa al citoplasma donde termina el proceso de diferenciación a amastigote.

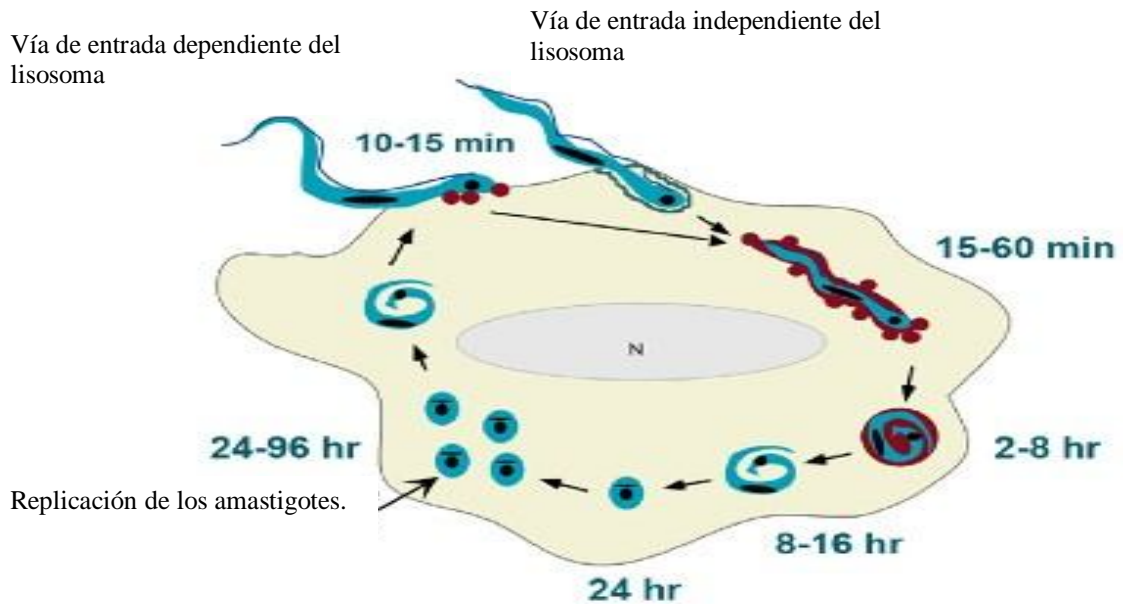
Ha sido mostrado que los aumentos transitorios de calcio en el citoplasma de la célula hospedadora, después de la interacción con formas tripomastigotes de *T. cruzi*, causa una reorganización en el citoesqueleto de actina. Posteriormente, ocurriría una despolimerización de actina en el sitio de entrada facilitando la invasión. Recientemente fué evidenciado que el citoesqueleto de actina es muy importante en la retención de formas tripomastigotes en el citoplasma de la célula hospedadora (Sant' Anna, 2008).

**5.1.3 Salida de la vacuola.** Subsiguientemente a la entrada a la célula hospedadora, los tripomastigotes permanecen por algunas horas en vacuolas individuales, desde donde inician un programa de diferenciación hacia amastigotes. Los parásitos luego escapan de la vacuola y son liberados al citosol de la célula hospedadora donde la replicación de los amastigotes comienza más o menos a las 24 horas post-infección.

La acidificación de la vacuola parasitófora parece ser esencial para la salida del parásito (Ley, 1990). El mecanismo preciso por el cual el parásito sale de la vacuola aún no se conoce, es sabido que requiere la acción de transialidasas (TS) y una hemolisina llamada "TcTox".

El modelo actual propone, que la membrana de la vacuola parasitófora es gradualmente remodelada induciendo un debilitamiento, el cual deja a la membrana muy susceptible a la lisis. Otras observaciones indican que ocurre una fragmentación en pequeñas vesículas que son observadas alrededor de los parásitos libres en el citoplasma (figura 8).

**Figura 8.** Mecanismo de salida de la vacuola fagocítica



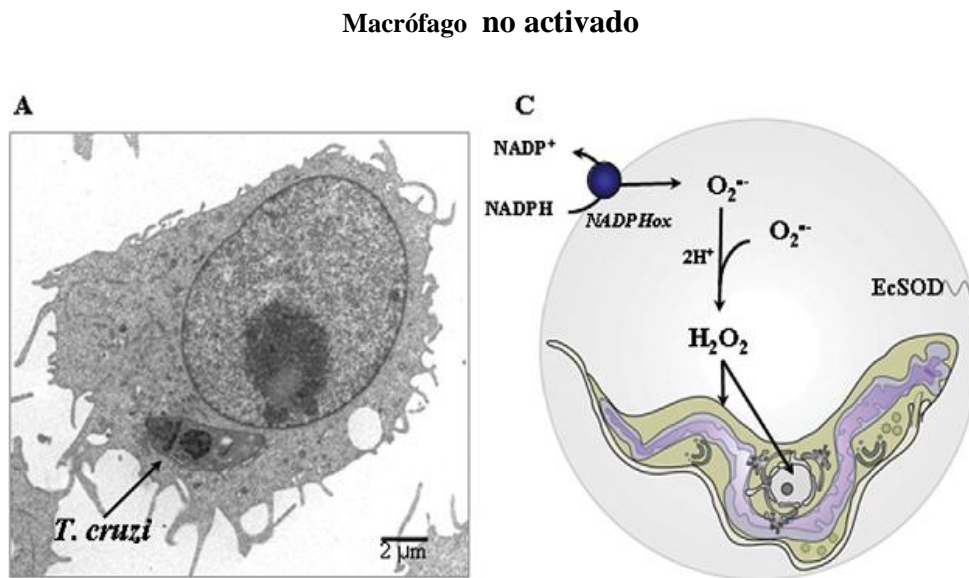
Fuente. [www.hsph.harvard.edu/.../cruzi\\_lifecycle2.jpg](http://www.hsph.harvard.edu/.../cruzi_lifecycle2.jpg).

## 5.2 EL ESTALLIDO OXIDATIVO DEL MACRÓFAGO

Una vez los tripomastigotes acceden al hospedero, ellos pueden invadir diferentes tipos de células incluyendo células del músculo liso, fibroblastos y macrófagos. Los macrófagos residentes en el sitio de invasión son los primeros fagocitos profesionales que establecen contacto con el parásito. Allí los tripomastigotes son internalizados dentro de una vacuola llamada fagosoma. Concomitante a la formación de la vacuola fagocítica, en la membrana plasmática de los macrófagos se activa la enzima la NADPH oxidasa la cual cataliza la formación de iones superóxido ( $O_2^-$ ) los cuales se convierten después en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), bajo la acción de otra enzima la superóxido dismutasa (SOD). Inmediatamente, el peróxido es utilizado por otra enzima de los macrófagos, la mieloperoxidasa (MPO) que oxida el ión cloruro a ácido hipocloroso ( $HOCl^-$ ) y a radicales hidroxilo ( $OH^-$ ). El  $H_2O_2$ ,  $HOCl^-$  y  $OH^-$  juntos son las llamadas especies

reactivas de Oxígeno (ROS) y median una actividad tóxica en el parásito a través de la degradación oxidativa de los lípidos, proteínas y ADN (figura 9).

**Figura 9.** Mecanismo de muerte intracelular en el macrófago no activado

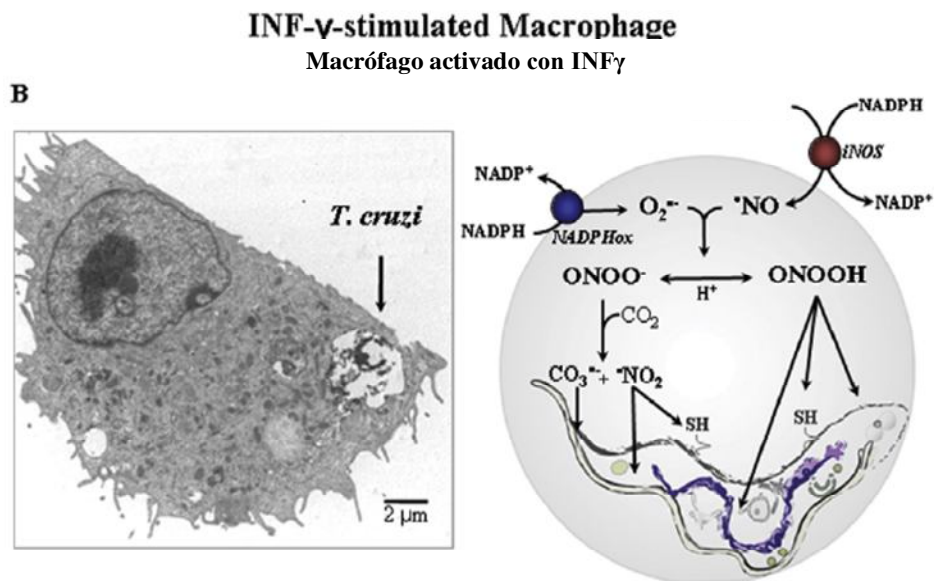


Fuente. Wilkinson, 2003

Por otra parte, durante la fase temprana de la infección (primera semana) las células de la defensa innata como las NK (natural killer) producen  $INF\gamma$ . La importancia de esta citoquina reside, en que activa la producción de mediadores oxidativos en los macrófagos no activados. El  $INF\gamma$  producido por el macrófago lleva a la activación de los LT para que produzcan otras citoquinas y sea desarrollada la respuesta inmune adaptativa contra el parásito. Bajo la acción de algunas citoquinas pro inflamatorias como IL-12,  $INF-\gamma$  and  $TNF-\alpha$  el macrófago promueve la inducción de la enzima oxido nítrico sintasa inducible (iNOS) la cual favorece la formación de altas cantidades de especies reactivas del nitrógeno (RNS) como el Oxido nítrico ( $ON^-$ ), aumentando así el poder citotóxico de los macrófagos. El  $ON^-$  un radical hidrofóbico que es producido en el citosol difunde hacia el fagosoma donde reacciona con el  $O_2^{\bullet -}$  produciendo peroxinitrito ( $ONOO^-$ )

un poderoso oxidante y molécula citotóxica contra algunos patógenos incluyendo los tripanosomas. El peroxinitrito es una molécula de vida corta que causa daño por mecanismos de oxidación directa de uno o dos electrones a moléculas como los tioles. El peroxinitrito también genera especies reactivas secundarias al ON como el OH, el dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2^-$ ) y el carbonato ( $\text{CO}_3^-$ ) (Fig. 10), todos radicales que pueden oxidar lípidos, ADN y además juntos participan en la nitración y oxidación de las proteínas.

**Figura 10.** Mecanismo de muerte intracelular en el macrófago activado.



Fuente. Wilkinson, 2003

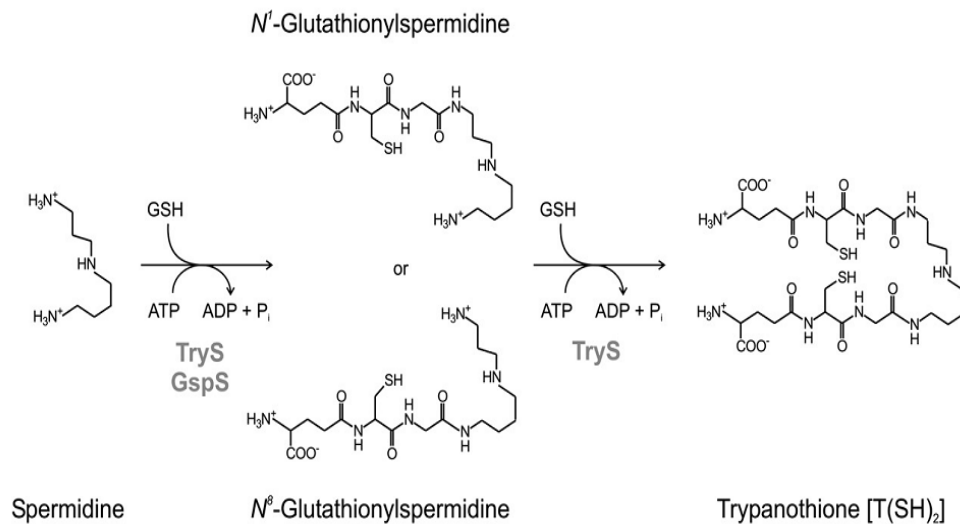
### 5.3 SUPERVIVENCIA DE TRYPANOSOMA CRUZI EN EL MACRÓFAGO

Los tripanosomátidos al ser organismos aeróbicos y parásitos están expuestos a especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS) y nitrógeno que se forman a partir del metabolismo celular o que son producidas por el hospedero como se describió anteriormente. Los tripanosomátidos están bien equipados para enfrentar los oxidantes producidos endógenamente, este hecho es reflejado por la red antioxidante que ocupa un papel importante en los procesos de detoxificación. Los

grupos tiólicos reactivos de proteínas y ciertas biomoléculas de bajo peso molecular son claves en la inactivación o neutralización de estos oxidantes. Además estos podrían actuar como sensores del estado redox y participar en la regulación de diversas funciones celulares en respuesta a cambios en el equilibrio redox intracelular. La homeostasis redox de los tripanosomas depende exclusivamente del sistema tripanotión [T (SH)<sub>2</sub>] y tripanotión reductasa.

**5.3.1 Tripanotión.** El tripanotión fue descrito por primera vez en 1985 (Fairlamb, 1985). Desde su descubrimiento las enzimas que utilizan y metabolizan este único metabolito han atraído considerable interés de la comunidad científica ya que esta sustancia que es un compuesto exclusivo de los tripanosomátidos, mantiene el balance endógeno de óxido reducción en el parásito y es su principal defensa contra superóxidos y radicales libres (Schames, 1986). Esta molécula es un ditiol de bajo peso molecular que es sintetizado por la tripanotión sintetasa en una reacción dependiente de ATP y está conformado por dos moléculas de glutatión covalentemente unidas por una molécula de espermidina (figura 11).

**Figura 11.** Síntesis del tripanotión en tripanosomátidos



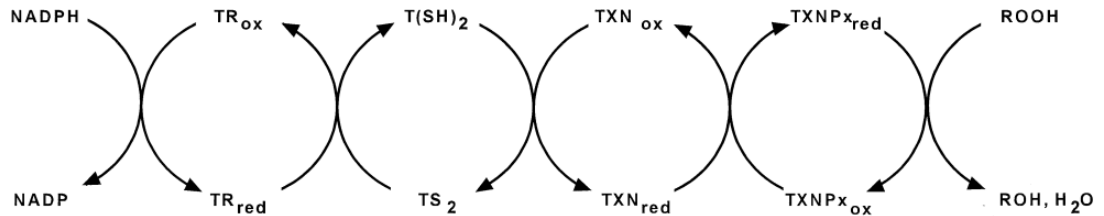
N- glutationoespermidina

Fuente. Moreno ,2008

El tripanotión parece estar adaptado para reducir el hidroperóxido con formación de tripanotión disulfido oxidado. El tripanotión es mantenido en su estado reducido por la actividad de la enzima tripanotión reductasa (TR), y cumple una importante función como donador de electrones en un número en diferentes vías. Direcciona una serie de reacciones redox en dos pasos que resultan en la descomposición de oxidantes tales como:  $H_2O_2$ , peroxinitrito, hidroperóxidos, fosfolípidos y ácidos grasos orgánicos. El componente que acepta los equivalentes reductores del tripanotión es una proteína de la familia de las tioredoxinas, esta proteína ahora llamada triparedoxina es el sustrato de una peroxidasa relacionada llamada tioredoxin peroxidasa, descrita primero como una proteína tiol antioxidante específica de levaduras. Por lo tanto, en los tripanosomátidos el flujo de equivalentes reductores desde NADPH a ROOH involucra tres enzimas distintas, la tripanotión reductasa, la triparedoxina y la triparedoxina peroxidasa y requiere dos enzimas auxiliares para la síntesis del tripanotión.

El dihidrotripanotión ( $TSH_2$ ) es más reactivo que el glutatión, esta propiedad se explica por el pKa que coincide con el pH intracelular y su naturaleza ditiol. Siendo un ditiol favorece la formación de puentes disulfidos después de una o dos oxidaciones. La detoxificación del peróxido es catalizada por un sistema dependiente del tripanotión el cual está ausente en los mamíferos y representa una de las peculiaridades bioquímicas de los tripanosomátidos. Hay substancial evidencia que el tripanotión es esencial para la supervivencia de *T. brucei* y *Leishmania spp* pero se conoce poco sobre su importancia en *T. cruzi* (figura 12).

**Figura 12.** Esquema propuesto para el metabolismo del peróxido dependiente del tripanotión en tripanosomátidos.



Fuente. Wilkinson, 2000 .

**5.3.2 Tripanotión reductasa.** Es una flavoenzima que mantiene el tripanotión en su forma reducida y disponible para la oxidación por la tripanotión oxidada. Esta mantiene un ambiente intracelular reducido y previene el stress oxidativo. Es una flavoproteína homóloga a la glutatión reductasa (GR), y su mecanismo catalítico parece ser idéntico, sin embargo, reconoce un substrato diferente, lo que la convierte en un blanco promisorio para el diseño de drogas (Schmidt, 2002).

**5.3.3 Triparedoxina.** Fue descubierta en *Crithidia fasciculata* (Nogoceke, 1997) y ha sido identificada inmunohistoquímicamente en *T. cruzi* (Lopez, 1997). Esta proteína posee dos isoformas en *C. fasciculata*, (Montemartini, 1998). Químicamente las triparedoxinas pueden ser clasificadas como tioredoxinas. Su principal función es transferir los equivalentes reductores desde el tripanotión a la tripanotión peroxidasa.

**5.3.4 Triparedoxin peroxidasa.** La TXNPx pertenece a una amplia familia de peroxidoxinas, las cuales son encontradas en diferentes organismos realizando distintas funciones. Se ha evidenciado que las TXNPx se encuentran localizadas en el citosol (cTcTXNPx) o la mitocondria (mTcTXNPx). En los parásitos su principal función es detoxificar el peróxido de hidrógeno y los hidroperóxidos orgánicos de cadena pequeña a agua y alcoholes (Wilkinson, 2002), además se ha reportado que posee actividad de reductasa del peroxinitrito (Trujillo, 2004).

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 OBJETIVO GENERAL

Realizar un análisis comparativo del perfil proteómico entre los estadios (tripomastigotes, amastigotes y epimastigotes) de un aislado de *T. cruzi* linaje I obtenido de paciente con chagas agudo y un aislado de *T. cruzi* I obtenido de paciente con enfermedad de chagas crónico.

### 6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el perfil proteico de los diferentes estadios del parásito de cada aislado (agudo y crónico) mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en dos dimensiones.
- Identificar las proteínas diferencialmente expresadas mediante espectrometría de masas.
- Establecer las diferencias en la expresión de proteínas por comparación de los estadios del parásito en el aislado de un caso de Chagas agudo y un caso de Chagas crónico.

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.1 CEPAS DE TRYPANOSOMA CRUZI**

En este trabajo se utilizaron dos cepas colombianas de *T. cruzi* pertenecientes al grupo I: 338 y REM. La primera se aisló en el 2006 a partir de un paciente con enfermedad de Chagas crónico residente en el área urbana de Bucaramanga. La segunda fue obtenida en el 2007, a partir de un paciente con Chagas agudo proveniente del municipio de San Vicente. Estas cepas se han mantenido por repiques sucesivos en medio de cultivo LIT (Liver Infusion Tryptose), suplementado con SBF al 10% a 28 °C.

### **7.2 CLONACIÓN DE LA CEPA.**

Los clones de las cepas fueron obtenidos por medio de la técnica de aislamiento de colonias únicas sobre medio sólido descrita por Goldberg and Chiari, 1980. Se utilizó una capa base de medio sólido compuesta por agar, LIT, BHI (del Inglés Brain Heart Infusion) y sangre, las cuales se mezclaron en las siguientes proporciones: 50 ml de agar estéril con pH 7,2, 100ml de BHI y 6,25 ml de sangre defibrinada. Las placas fueron preparadas colocando 20 ml de medio por caja de Petri, luego estas fueron invertidas e incubadas a 37<sup>0</sup>C por 48 horas para permitir secar la superficie del agar y comprobar esterilidad. Posteriormente las cajas fueron almacenadas a 4°C hasta su uso.

El inóculo fue determinado por contaje directo de los epimastigotes diluídos en PBS en cámara de Neubauer, de esta forma en cada caja se sembraron 0.1 ml conteniendo 100 flagelados, los parásitos fueron esparcidos sobre la superficie estéril del agar con una varilla de vidrio, las placas fueron envueltas con papel

estéril e incubadas a 28<sup>0</sup>C. Después de 20 días de incubación, colonias esféricas, pequeñas, transparentes y bien separadas pudieron ser observadas.

### 7.3 CULTIVOS CELULARES

Las células Vero (ATCC CCL81) fueron cultivadas a 37<sup>0</sup>C en atmósfera con 5% CO<sub>2</sub> en frascos de 75cm<sup>2</sup> conteniendo DMEM suplementado con suero bovino fetal inactivado por calor (56<sup>0</sup>C por 30').

### 7.4 CULTIVOS Y OBTENCIÓN DE DIFERENTES ESTADIOS

**7.4.1 Obtención de Epimastigotes.** Las formas epimastigotes de ambos clones fueron cultivadas en forma idéntica, los parásitos siempre fueron obtenidos como se describe a continuación: los cultivos fueron iniciados a una concentración de 10<sup>6</sup> células por ml, después de 3 días de crecimiento los cultivos fueron diluidos al doble con medio LIT y finalmente recolectados después de tres días de crecimiento.

**7.4.2 Obtención de Tripomastigotes.** Para comenzar la infección de las células *in vitro* los cultivos de epimastigotes fueron crecidos hasta que alcanzaran una densidad de 5x10<sup>7</sup> cels/ml, este cultivo se mantuvo por 15 días (Dusanic, 1980). Luego de este tiempo, la suspensión contenía un 40% de formas tripomastigotes y el restante 60% continuaban siendo epimastigotes. Las formas metacíclicas fueron aisladas por lisis selectiva de las formas contaminantes (epimastigotes) mediante la incubación de la suspensión con suero humano fresco durante 2 horas a 37<sup>0</sup>C (Rubio, 1956). A continuación se realizaron lavados con PBS a 2500 rpm por 15', finalmente, los tripomastigotes fueron resuspendidos en DMEM a una concentración de 5x10<sup>6</sup>parásitos/ml, los cuales fueron utilizados para infectar los cultivos de células Vero no confluentes. Los tripomastigotes fueron purificados según Velazco (1997). Después de 24 horas los flagelados en el sobrenadante de

la monocapa fueron removidos por lavado de las células dos veces con PBS. El sobrenadante de las células Vero, fue recolectado después de 6 días de incubación, centrifugado a 1300 rpm por 5' y el sobrenadante fue recolectado nuevamente y vuelto a centrifugar a 2500 rpm por 15'. Posteriormente se incubó a 37°C por 2 horas en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> para permitir el ascenso de las formas tripomastigotas. Pasado el tiempo, el sobrenadante es recolectado y centrifugado a 3000 rpm por 20'. El pellet contiene 100% formas puras de tripomastigotes.

**7.4.3 Obtención de los Amastigotes.** Las formas amastigotas fueron obtenidas por incubación de los tripomastigotes ( $5 \times 10^6$  cels/ml) en medio LIT por 9 horas a 37°C en una atmósfera de 5%CO<sub>2</sub> (Tomlinson, 1995).

## **7.5 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS**

Los parásitos de cada estadio fueron recolectados por centrifugación, los precipitados fueron lavados tres veces con PBS (137 mM, NaCl 2,7mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2Mm KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) a 4°C. Las proteínas fueron extraídas de acuerdo a Parodi-Talice et al (2004). Extractos de proteínas totales fueron obtenidos por lisis de los parásitos, en un buffer que contenía, 40mM de Tris base, 7M de úrea, 2M de tioúrea, 4% de CHAPS y 1mM de PMSF, durante 30' a temperatura ambiente en agitación constante. Los parásitos lisados fueron centrifugados por 30' a 13.500 rpm para remover todo el material particulado y el sobrenadante resultante fue inmediatamente almacenado a -70°C o usado para el isoelectroenfoco (IEF).

**7.5.1 Cuantificación de proteínas.** La determinación de la concentración de proteínas fue realizada con el reactivo de Bradford, según el protocolo descrito por Bradford (1976).

## 7.6 ELECTROFORESIS EN 2DE

**7.6.1 Isoelectroenfoque.** El IEF fue realizado usando el sistema PROTEAN IEF CELL de (BioRad, Hércules, CA). Los extractos de proteínas solubilizados (180µg) fueron aplicados sobre tiras IPG (del inglés Immobilized pH nonlinear gradient) de 7cm para el isoelectroenfoque. Las tiras fueron rehidratadas por 16 horas a 20°C en un buffer de rehidratación (8 M de úrea, 2M de tioúrea, 2% de CHAPS, 40mM de DTT).

Después de la rehidratación de las tiras, las proteínas fueron separadas a la misma temperatura sobre gradientes de pH 3-10 y 5-8 usando el siguiente protocolo: 500V 1h; 1000 V, 1h; 4000 V, 1h; 8000 V, 4h; hasta alcanzar 80.000 voltios por hora. Después del IEF las tiras fueron equilibradas mediante etapas de alquilación y reducción que se llevaron a cabo mediante la agitación durante 15' en 2,5 ml de una solución que contenía (50mM de Tris-HCl, pH 8.8, 6M úrea, 30% (v/v) de glicerol, 2% (w/v) de SDS, 0.002% TRIS-HCl y 125mM de DTT), seguido por una segunda incubación a las mismas condiciones en el mismo buffer con excepción del DTT, el cual fue reemplazado por 125 mM de iodoacetamida.

## 7.7 SDS-PAGE

Las proteínas fueron resueltas mediante electroforesis bidimensional (SDS PAGE) (Laemmli, 1970), sobre geles de poliacrilamida al 12%, estos geles fueron corridos en una cámara de electroforesis vertical Mini PROTEAN® Tetra cell (BioRad, Hercules, CA, USA). La electroforesis fue llevada a cabo con una corriente fija de 10mAmp por gel.

**7.7.1 Tinción con azul de coomassie.** Las proteínas fueron visualizadas por tinción con azul de coomassie coloidal.

## 7.8 ANÁLISIS DE IMAGEN

Los geles teñidos con azul de Coomassie fueron escaneados mediante un densitómetro calibrado (GS-800, Bio Rad) a una resolución de 300 dpi y las imágenes .TIF generadas fueron analizadas con el software de análisis (PDQuest, Bio Rad). Un gel virtual fue creado usando tres réplicas de cada muestra, el promedio de tres geles de cada estadio de *T.cruzi* fue comparado entre las dos cepas así: tripomastigotes del aislado agudo vs tripomastigotes del aislado crónico, amastigotes del aislado agudo vs amastigotes del aislado crónico y epimastigotes aislado agudo vs epimastigotes aislado crónico. El valor del volumen de cada mancha fue adquirido usando el modo no substracción y normalizado contra la intensidad total de las manchas detectadas. Únicamente las manchas presentes en el promedio de los geles de cada estadio que mostraron valores de desviaciones estándar menores al 20% fueron comparados con las manchas de los geles promedio de la otra cepa. Los polipéptidos que mostraron diferencias del doble en los valores de volumen de cada mancha, entre los geles promedio fueron asignados como diferencialmente expresados. También se tuvieron en cuenta las manchas que aparecen en un gel y no en el otro (presentes y ausente).

**7.8.1 Digestión de las proteínas y espectrometría de masas.** Tras su localización, las manchas de interés se recortaron de forma automática (empleando un robot-digestor de Bruker) luego, fueron digeridas “in-situ” con tripsina empleando un protocolo basado en el descrito por Shevchenko (1996). El sobrenadante de la digestión (que contiene los péptidos) se acidificó con TFA (0.1% concentración final) y se secó al vacío para resuspenderlo en 5 ml de TA (TFA 0.1% acetonitrilo 33%). Una pequeña alícuota (0.5 ml) se depositó en una placa “Anchor-chip” (Bruker) empleando DHB (ácido 2,5-dihydroxybenzoico) como matriz a una concentración de 5 g/l mediante el método “fast evaporation”. La placa se introduce en un espectrómetro de masas de tipo MALDI-TOF (matriz-

assisted laser desorption ionisation/time-of-flight), modelo autoflex de Bruker equipado con reflector. Los espectros de masas obtenidos se utilizaron como "huella peptídica" para la identificación de proteínas en las bases de datos utilizando los motores de búsqueda (Mascot, Profound) accesibles en la red.

Mascot<sup>™</sup> (Matriz Science), se basa en un algoritmo de búsqueda denominado MOWSE (Molecular Weight Search). Los criterios utilizados para la identificación positiva de cada una de las proteínas se basaron principalmente en la utilización de parámetros como la masa péptidica obtenida mediante espectrometría de masas y su correspondencia con las masas péptidicas resultantes de digestiones teóricas de proteínas en las bases de datos ("Peptides Matched"), los mejores valores reportados en la prueba de MOWSE (Individual Ions Scores) que superaron la probabilidad asociada a cada búsqueda (score) y el porcentaje de secuencia de la proteína candidata que cubren las masas de los péptido que se pudieron identificar (expect). Cuanto mayor sea el valor de esos tres parámetros (matches, score y expect) mayor es la probabilidad de una identificación correcta. En los casos en que no se pudieron identificar las proteínas se empleó espectrometría de masas en tándem acoplada a cromatografía líquida.

## **8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

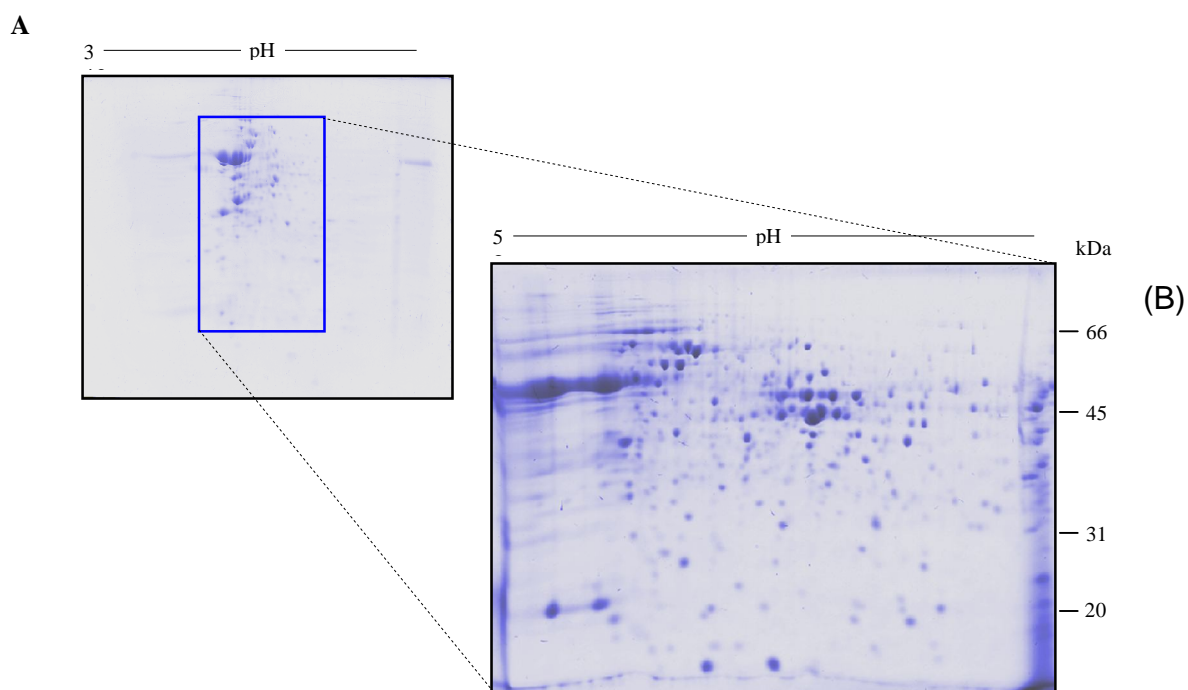
El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó por la comparación de promedios y sus desviaciones estándar cuando fue apropiado. Se realizó la prueba t- Student. La diferencia entre los grupos experimentales se consideró estadísticamente significativa cuando el valor de p fue menor de 0.05.

## 9. RESULTADOS

### 9.1 ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN 2 DIMENSIONES (E-2D)

Después de la obtención de los clones y la estandarización de las condiciones para la realización de los geles de poliacrilamida en dos dimensiones, fueron corridos los extractos de proteínas totales, correspondientes a los diferentes estadios en cada aislado agudo y crónico en tiras de rango de pH de 3 – 10. En este rango de pH se observó que la mayoría de los spots se ubicó en la mitad del gel por lo que se determinó un gradiente de pH en el rango de 5-8, el cual permitió resolver mejor las manchas e identificar las proteínas.

**Figura 13.** E-2D de proteínas solubles del aislado 338.



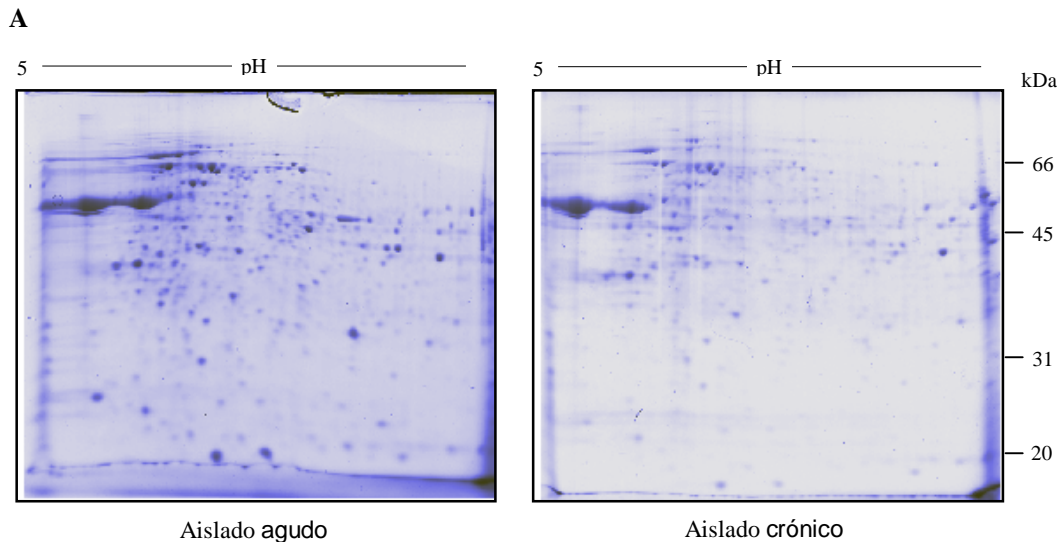
(A) Electroforesis en 2D de las proteínas solubles de epimastigotes del aislado crónico en tiras de un rango de pH 3-10 (B) El mismo aislado en tiras con un rango de pH 5-8.

## 9.2 ANALISIS COMPARATIVO DE LA EXPRESION DE PROTEINAS ENTRE

### 9.3 AMASTIGOTES DE LOS AISLADOS AGUDO Y CRONICO

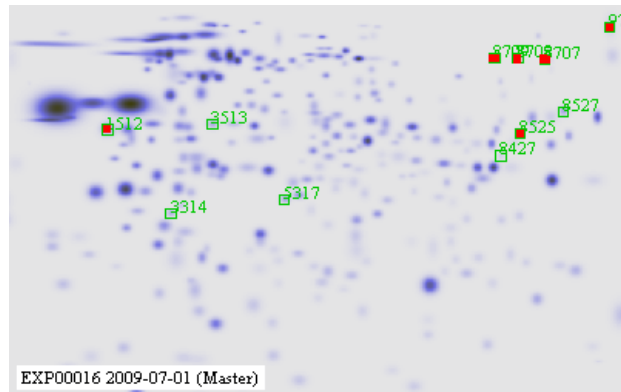
La electroforesis en 2D mostró un perfil de expresión diferencial de las proteínas en el rango de pH de 5 a 8. Se determinaron un total de 640 manchas peptídicas del estadio amastigotes, 337 en el aislado agudo y 303 en el aislado crónico (Figura 14). El análisis de imagen comparativo de los geles de E-2D mostró 47 manchas peptídicas expresadas exclusivamente en el aislado agudo y 16 manchas en el aislado crónico. Adicionalmente, 82 manchas fueron comunes entre los dos aislados y mostraron una expresión diferencial  $\geq 2$  en la intensidad de la señal en 28 manchas en el aislado agudo y 26 manchas en el aislado crónico.

**Figura 14.** E-2D de proteínas solubles en amastigotes de los aislados agudo Vs. crónico.

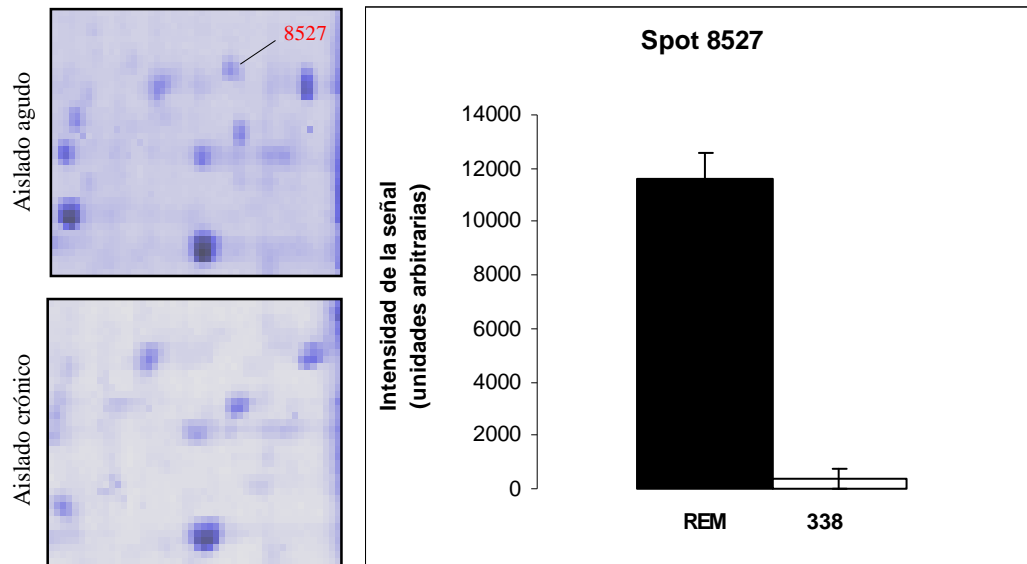


**Figura 2. (Continuación)**

**B**



**C**



(A) Geles de E-2D del extracto proteico soluble del estadio amastigote de *T. cruzi* I de los aislados agudo y crónico en un rango de pH de 5-8. (B) El gel maestro obtenido utilizando el software PDQuest muestra un total de 650 manchas compartidas entre los aislados agudo y crónico, 82 manchas diferencialmente expresadas, 47 exclusivas del aislado agudo y 16 en el crónico. En el gel maestro se identifican las manchas que presentaron una intensidad en la señal  $\geq 2$  veces. Los cuadros vacíos y rellenos muestran las manchas diferencialmente expresadas

en el aislado agudo y crónico, respectivamente. (C) La región magnificada de los geles muestra la mancha 8527 expresada diferencialmente en el estadio de amastigote del aislado agudo comparado con el crónico; el histograma representa el promedio de la intensidad de la señal en unidades arbitrarias  $\pm$  las desviaciones estándar. Los geles de E-2D se realizaron en tres ensayos independientes. Las fotografías representan una de las réplicas de los geles teñidos con azul de Coomassie.

**9.3.1 Identificación de las proteínas expresadas diferencialmente entre los amastigotes del aislado agudo vs crónico utilizando MALDI-TOF y LC-MS/MS.** Se identificaron un total de 9 proteínas entre los aislados agudo y crónico. Las proteínas ubicadas en las manchas 3513, 5317, 3314, 8427 y 8527 fueron identificadas en el aislado agudo y las proteínas ubicadas en los manchas 8525, 8707, 8708 y 8709 fueron identificadas en el aislado crónico (Tabla 1).

**Tabla 1.** Proteínas identificadas en el estadio amastigote en los aislados agudo vs. Crónico

Tabla 1- Proteínas identificadas en el estadio amastigote utilizando MALDI-TOF o LC-MS/MS									
Spot	No. NCBI / UniProt	Proteína identificada	KDa Te.	pI Te.	Secuencia del péptido	Score Mascot®	CS (%) Mascot®	PI / PC Sequest®	Log <sub>2</sub> REM / 338
3513	gi:91983197	<i>B- tubulina</i>	45.1	5.6	REIVCIQAC*QCGNQIGSKF	97	33.7	-	1.5
5317	Q4D144	<i>Sub α proteosoma</i>	31.9	5.7	R.AYAIGQNDQVAQSLLK.R R.AYAIGQNDQVAQSLLKR.D R.AYAIGQNDQVAQSLLK.R R.AYAIGQNDQVAQSLLKR.D K.GVQNSLFDSENMEDKNISGEK.L K.LLEPYGVLPK.T K.GVQNSLFDSENMEDKNISGEK.L	-	-	7/10	3.83
3314	PO8562	<i>B- tubulina</i>	49.57	4.69	R.VGEOFTAM*FR.R K.ALEAYTOAM*QYNSSLKPTSPIR.L R.YYAEIETNTEEQKNK.A R.AVFLDLEPTVVDEIR.T K.ALEAYTOAMQYNSSLKPTSPIR.L R.AVFLDLEPTVVDEIR.T K.LAEQCERYDEILVCM*K.R R.SITALEQKEDIKK.E R.AVFLDLEPTVVDEIR.T R.YYAEIETNTEEQKNK.A R.AVLIDLEPGTM*DSVR.A R.AVLIDLEPGTMDSVR.A	-	-	12/27	4.28
8427	HSP70	<i>HSP70</i>	70	5.1	K.M*KEIAESYLKQ.Q K.M*KEIAESYLKQ.Q K.TFNPEEVSSM*VLSK.M	-	-	11/33	4.05

**Tabla 1. (Continuación)**

Spot	No. NCBI / UniProt	Proteína identificada	KDa <sub>Teo.</sub>	pI <sub>Teo.</sub>	Secuencia del péptido	Score Mascot®	CS (%) Mascot®	PI / PC Sequest®	Log <sub>2</sub> REM / 338
8527	gi : 194368484	<i>Lipoamide dehidrogenase</i>	49.9	6.5	NPYDVVVIGG*GPGGVVASIK	96	100	-	4.95
8707	Q4CRWO	<i>Sub dependent ATP HSP78</i>	41.4	5.9	R.ILGQDEAIESITNVVR.I K.KVFALDMGSLVAGAK.Y R.RILGQDEAIESITNVVR.I K.KVFALDM*GSLVAGAK.Y R.TWVNPQAVPPGFEFLNK.Y R.KIVELLFDQVR.A K.KVFALDM*GSLVAGAK.Y R.IAERQDEYDALEAR.W	-	-	8/17	-2.38
8708	Q4DTH5	<i>Sub dependent ATP HSP78</i>	45.0	6.0	R.IAERQDEYDALEAR.W R.ILGQDEAIESITNVVR.I R.LVQSVLLNR.L K.GVLKDTIEAOGK.I K.VFALDM*GSLVAGAK.Y R.LRLQQESKPEQLDSVER.E R.LVQSVLLNR.L R.GELHCVGATTLDEYRR.H R.IAERQDEYDALEAR.W R.GELHCVGATTLDEYRR.H K.VFALDM*GSLVAGAK.Y	-	-	11/19	-3.06
8709	Q4CRWO	<i>Sub dependent ATP HSP78</i>	41.4	5.9	R.ILGQDEAIESITNVVR.I R.GELHCVGATTLDEYRR.H	-	-	2/2	-2.15

**Tabla 1. (Continuación)**

Spot	No. NCBI / UniProt	Proteína identificada	KDa <sub>Teo.</sub>	pI <sub>Teo.</sub>	Secuencia del péptido	Score Mascot®	CS (%) Mascot®	PI / PC Sequest®	Log <sub>2</sub> REM / 338
8525	gi : 71411514	<i>Helicase RNA</i>	49.8	6.7	<b>TAV.FVFALLEQIE*KVPEGQKPHC</b>	137	47.5	-	-2.32

La tabla 1 muestra la lista de las proteínas identificadas en el estadio amastigote del aislado agudo y crónico. Las proteínas analizadas mediante MALDI-TOF y LC-MS/MS fueron identificadas utilizando la plataforma de búsqueda NCBI y UniProt, respectivamente. Los números de las manchas corresponden a las identificadas en la figura 12B. El puntaje de Mascot (Score Mascot) y el porcentaje de cubrimiento de secuencia (CS Mascot) corresponden a las proteínas analizadas por MALDI-TOF. La relación entre los péptidos identificados exclusivamente en *T. cruzi* y los péptidos con homología para familia *Kinetoplastidae* (PC/PI Sequest) corresponden a las proteínas analizadas por LC-MS/MS. La tabla incluye la masa molecular (KDa), el punto isoeléctrico (PI), la secuencia de los péptidos identificados y la relación de la intensidad de la señal de las manchas identificadas en la figura 12B en términos del Log<sub>2</sub> agudo/crónico.

#### 9.4 ANALISIS COMPARATIVO DE LA EXPRESION DE PROTEINAS ENTRE TRIPOMASTIGOTES DE LOS AISLADOS AGUDO vs. CRONICO

La E-2D mostró un perfil de expresión diferencial de las proteínas en el rango de pH de 5 a 8. Se determinaron un total de 650 manchas peptídicas del estadio tripomastigote, 352 en el aislado agudo y 298 en el aislado crónico (Figura 15). El análisis de imagen comparativo de los geles de E-2D mostró 33 manchas expresadas exclusivamente en el aislado agudo y 12 manchas en el aislado crónico. Adicionalmente, 46 manchas fueron comunes entre los dos aislados y mostraron una expresión diferencial  $\geq 2$  en la intensidad de la señal en 26 manchas en el aislado agudo y 20 manchas en el aislado crónico.

**Figura 15.** E-2D de proteínas solubles en tripomastigotes de los aislados agudo vs. Crónico.

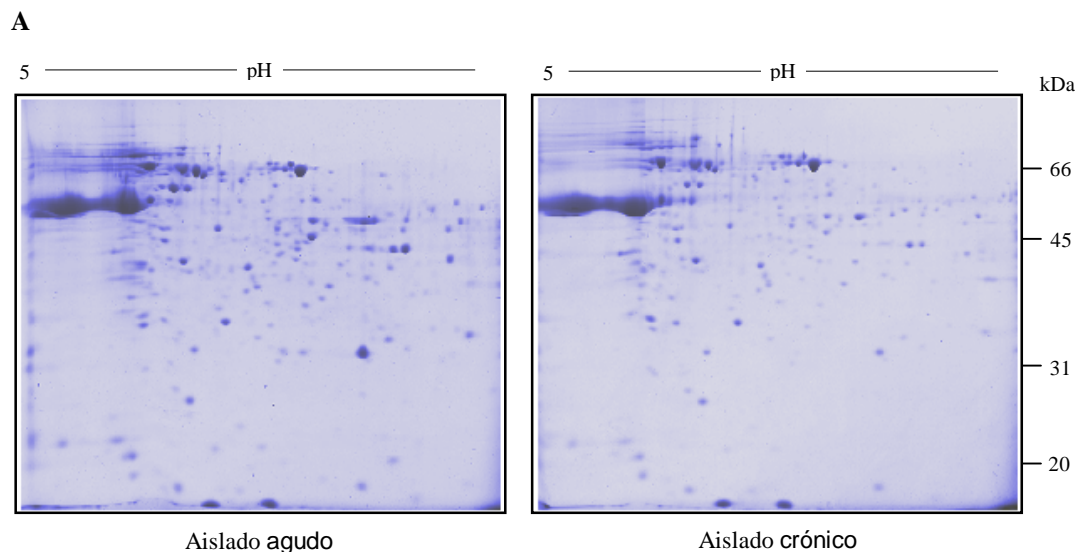
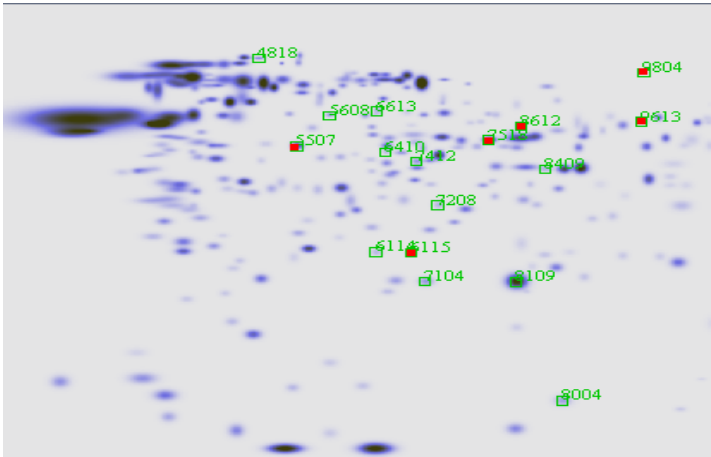


Figura 15. (Continuación)

B



C

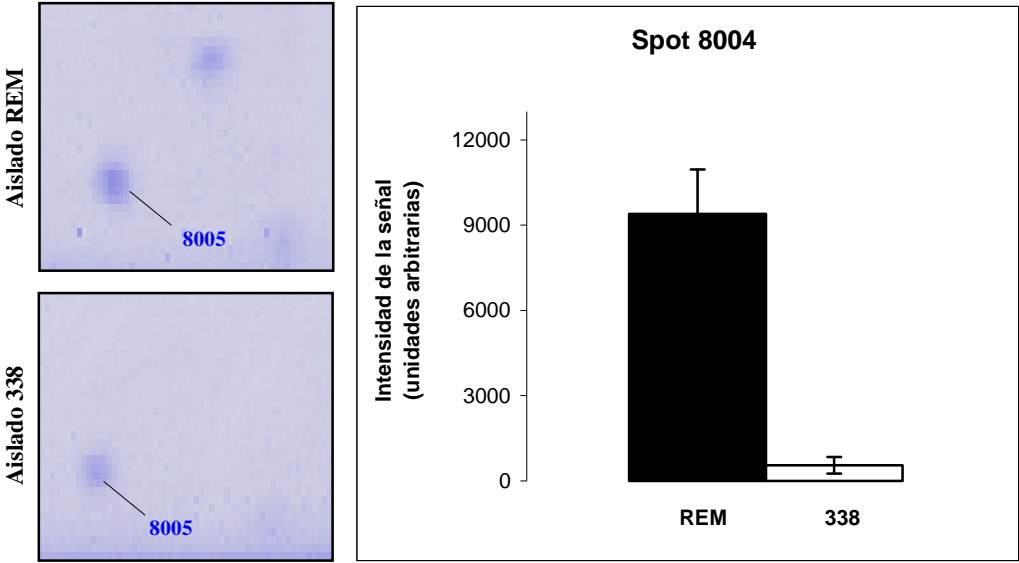
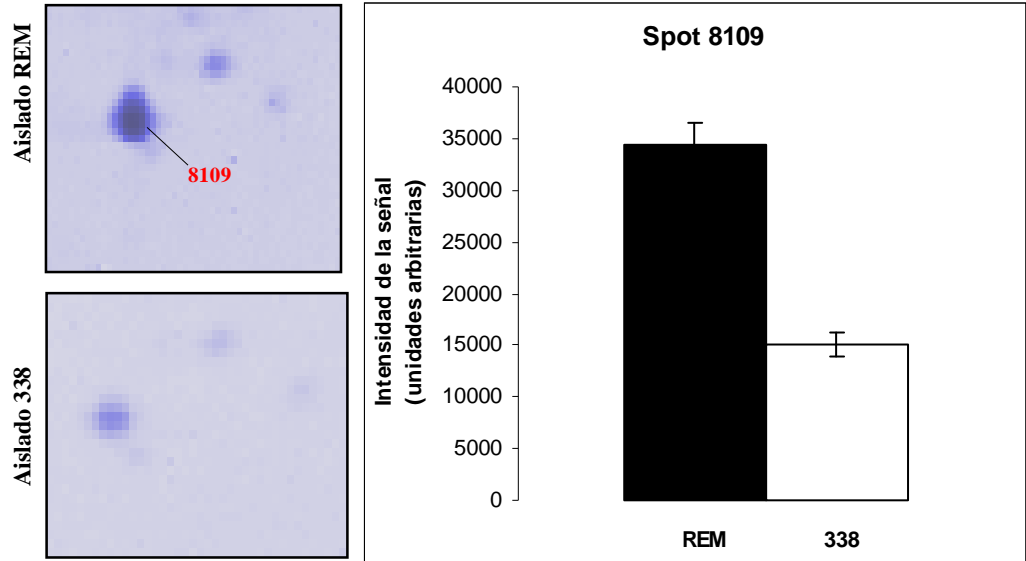
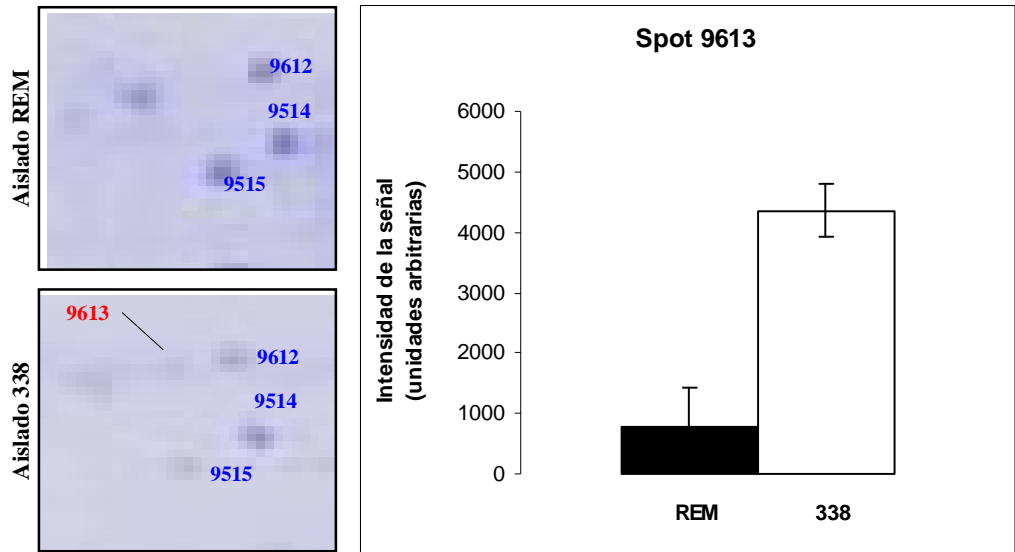


Figura 15. (Continuación)

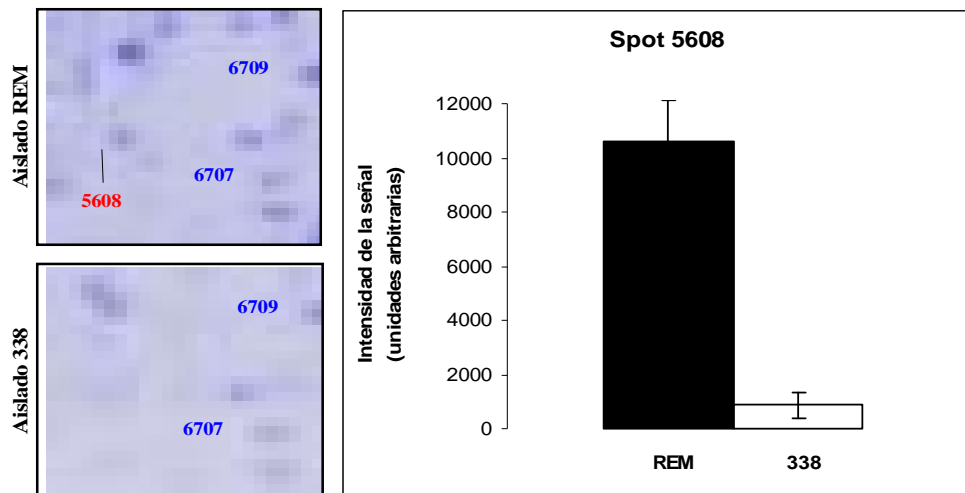
D



E



F



(A) Geles de E-2D del extracto proteico soluble del estadio tripomastigote de *T. cruzi* I de los aislados agudo y crónico en un rango de pH de 5-8. (B) El gel maestro obtenido utilizando el software PDQuest muestra un total de 20 manchas entre los aislados agudo y crónico, 12 exclusivas, 2 sobreexpresadas en el aislado agudo y 6 exclusivas en el aislado crónico. En el gel maestro se identifican las manchas que presentaron una intensidad en la señal  $\geq 2$  veces. Los cuadros vacíos y rellenos muestran las manchas diferencialmente expresadas en el aislado agudo y crónico respectivamente. (C-F) Las regiones magnificadas de los geles muestran las manchas 5608, 8109 y 8004 expresadas diferencialmente en el estadio de tripomastigote del aislado agudo comparado con el crónico; Por el contrario, la mancha 9613 fue expresada diferencialmente en el aislado crónico. El histograma representa el promedio de la intensidad de la señal en unidades arbitrarias  $\pm$  las desviaciones estándar. Los geles de E-2D se realizaron en tres ensayos independientes. Las fotografías representan una de las réplicas de los geles teñidos con azul de Coomassie.

**9.4.1 Identificación de las proteínas expresadas diferencialmente entre los tripomastigotes del aislado agudo vs. crónico utilizando MALDI-TOF y LC-MS/MS.** Se identificó un total de 20 proteínas entre los aislados agudo y crónico. Las proteínas ubicadas en las manchas 4818,5608,6114,6409,6410,6613,7104 7208, 7210, 8004, 8126 y 8409 fueron identificadas en el aislado agudo y las proteínas ubicadas en las manchas 5507, 6115,7518,8612,9613 y 9804, fueron identificadas en el aislado crónico (ver Tabla 2); por último las manchas 8109 y 7412 estuvieron sobreexpresadas en el aislado agudo.

**Tabla 2.** Proteínas identificadas en el estadio tripomastigote en los aislados agudo vs. Crónico

Tabla 2- Proteínas identificadas en el estadio tripomastigote utilizando MALDI-TOF o LC-MS/MS									
Spot	No. NCBI / UniProt	Proteína identificada	KDa Te..	pI Te	Secuencia del péptido	Score Mascot®	CS (%) Mascot®	PC / PI Sequest®	Log <sub>2</sub> REM / 338
4818	Q4D030	<i>Lectin, putative</i>	42.0	5.4	R.DNPVYVLFNDETQR.N R.TLNQEVESPR.I K.DFKGEYVGR.C R.DNPVYVLFNDETQR.N R.ILLFPEGNOEEIRR.H K.DFKGEYVGR.C R.TLNQEVESPR.I	83	34.6	7/7	3.56
5608	gi:71415978	<i>T- complex protein 1 Beta subunit</i>	58.0	5.7	R.SIHDALCVISQTINETR.T K.ALGADVLSQFDETEK.V K.ALGADVLSQFDETEK.V K.VRVDSVAQLAEVEASEK.E K.VRVDSVAQLAEVEASEKEK.M R.GTSQHILDEAER.S K.HDINCFINR.Q R.GTSQHILDEAER.S K.SLFM*DNPAGK.I K.IITVEKDHFAK.L K.LCVDAVLR.L K.HDINCFINR.Q R.VTNDGATILK.S K.SLFM*DNPAGK.I K.GSGNLEM*INIM*K.K R.FSGLPQGEACTIWR.G R.VDSVAQLAEVEASEKEK.M	80	32.7	26/17	3.62
6409	gi : 71659493	<i>Aminotransferasa tyrosine</i>	46.1	5.8	EAVATWNRN*SFVHKEELK	99	22.4	-	4.13

**Tabla 2. (Continuación)**

Spot	No. NCBI / UniProt	Proteína identificada	KDa Te..	pI Te	Secuencia del péptido	Score Mascot®	CS (%) Mascot®	PC / PI Sequest®	Log <sub>2</sub> REM / 338
6410	P33447	<i>Aminotransferasa tyrosine</i>	46.1	5.8	K.GKDPNATFTSVADFETTVP.R.V K.LLEEENVQVLPGTIFHAPGFTR. K.LLIVTNPSNPGSNFSR.K K.LLIVTNPSNPGSNFSR.K K.LSVGDPTLDKNLLTSAAQIK.K K.GKDPNATFTSVADFETTVP.R.V R.NSFVHKEELK.S K.NLLTSAAQIK.K K.LSVGDPTLDKNLLTSAAQIK.K K.HVEDIVR.L R.DIKTDVEFFEK. K.LSVGDPTLDKNLLTSAAQIK.K	-	-	12/12	2.65
6114	Q4CLM9_TRYCR	<i>Repetition Rich leucine proteins</i>	26.4	5.8	R.LAEYDALHSSVKPSSPSS R.WLNVSYCR.L K.SLEELRLDNNKLR.V K.SLEELRLDNNK.L R.LQSLPM*EFWQLK.S R.FLDAVEK.A R.FLDAVEK.A K.SLEELRLDNNK.L R.FLDAVEK.A R.LAEYDALHSSVKPSSPSS	-	-	10/10	2.88

**Tabla 2. (Continuación)**

Spot	No. NCBI / UniProt	Proteína identificada	KDa Te..	pI Te	Secuencia del péptido	Score Mascot®	CS (%) Mascot®	PC / PI Sequest®	Log <sub>2</sub> REM / 338
6613	Q4DZD3_TRYCR	<i>Putative uncharacterized protein</i>	21.0	7.8	R.AFONDSEAMVTLAMSVEQLK.Q R.GTLRTMIHNPLQMAACKLTP R.VPAM*KFAVPVTQSPENDSPCCCV M K.NTFAPMMSGRVSEILIR.V K.FLFPSTLLNLESTILAALQPLLEAR. T K.DASGGGARVR.R R.YFVDLLTSVAGEVDFVCPSLR.A R.DDGANINAFLLQK.R	-	-	17/8	2.0
7104	O96763	<i>Triparedoxin peroxidasa</i>	22.4	6.3	K.SYGLVKEEDGVAYR.G R.GGLGQMNIPILADKTK.C R.GGLGQMNIPILADKTK.C R.GGLGQMNIPILADK.T R.KRGGLGQMNIPILADK.T R.GGLGQMNIPILADK.T K.SYGLVKEEDGVAYR.G R.GGLGQM*NIPILADKTK.C K.RGGLGQM*NIPILADK.T R.GGLGQMNIPILADKTK.C K.RGGLGQM*NIPILADK.T K.SKEYFGAVA R.DVDEALR.L K.LNHPAPDFNETALMPNGTFK.K R.GGLGQM*NIPILADKTK.C	-	-	25/15	3.93

**Tabla 2. (Continuación)**

Spot	No. NCBI / UniProt	Proteína identificada	KDa Te..	pI Te	Secuencia del péptido	Score Mascot®	CS (%) Mascot®	PC / PI Sequest®	Log <sub>2</sub> REM / 338
7208	Q4CM87	<i>Surface protease GP63 putative</i>	72.0	7.2	R.GRPVWGVINYNPR.H R.VAVHEM*AHALGFIVTDM*EGQAL VK.R R.VAVHEM*AHALGFIVTDM*EGQAL VK. R.NVGEVTGGEEPASPVTVSVGSDW APLR.I R.LLVRPLDGPLVVPR.F K.VDILENVILSEAAK.M R.LLVRPLDGPLVVPR.F R.GRPVWGVINYNPR.H R.LLVRPLDGPLVVPR.F R.FREGSVC GK.F R.NVGEVTGGEEPASTVTVSVGSDW APLR. R.SSVHVVNSR.N R.FREGSVC GK.F	-	-	15/13	2.76
7210	Q4D360_TRYCR	<i>Pyridoxal kinase putative</i>	33.4	5.9	R.MDLOEYETLM*EGM*R.A R.YIITGYINNADIVR.R R.NEGGDGTSSLMNR.E K.TILSIQSYVTHGYVGNK.A R.FTGVPYHEGR.Y R.NEGGDGTSSLM*NR.E R.MDLOEYETLM*EGMR.A R.FTGVPYHEGR.Y R.NEGGDGTSSLM*NR.E K.SVQSLLN PATVAEVKPM	-	-	13/10	3.32
8004	gi.71410853	<i>Heat Shock Protein</i>	10.7	9.0	LOPLQQR	92	60%	-	4.08

**Tabla 2. (Continuación)**

Spot	No. NCBI / UniProt	Proteína identificada	KDa Te..	pI Te	Secuencia del péptido	Score Mascot®	CS (%) Mascot®	PC / PI Sequest®	Log <sub>2</sub> REM / 338
8126	Q4D2I4_TRYCR	<i>ADP-ribosylation factor 3, putative</i>	20.1	5.9	R.RLDETASELENLLOEEKL.R.E R.LDETASELENLLOEEK.L K.TGEGHAGLEWAVK.N R.LDETASELENLLOEEKL.R.E R.RLDETASELENLLOEEK. R.RLDETASELENLLOEEK. R.LDETASELENLLOEEKL.R.E K.TGEGHAGLEWAVK.N R.RLDETASELENLLOEEK.	-	-	17/9	2.37
8409	096507	<i>Arginine kinase</i>	40.1	6.7	R.LVTAVGVIEEK.V R.VKGOLESM*SGELR.G R.LVTAVGVIEEK.V R.GTAGEHSDSPDGVYDISNK.R R.GTAGEHSDSPDGVYDISNK.R K.GOLESMSGELR.G R.GKYYPLTGM*TK.E R.SLEGYPFNPCLK.K K.GGNLKEVFGR.L R.SLEGYPFNPCLKK.Q R.GTAGEHSDSPDGVYDISNKR.R R.VKGOLESM*SGELR.G R.LGLSEYEAVK.E K.EVFDQLKGK.Q K.EVFDQLK.G	-	-	16/15	2.63
5507	gi : 61207142	<i>actine</i>	42.0	5.4	MSDEEQSAIV YDNGSGMVKA				-0.55

**Tabla 2. (Continuación)**

Spot	No. NCBI / UniProt	Proteína identificada	KDa Te..	pI Te	Secuencia del péptido	Score Mascot®	CS (%) Mascot®	PC / PI Sequest®	Log <sub>2</sub> REM / 338
6115	Q4CLM9_TRYCR	<i>Leucine-rich repeat protein, putative</i>	18,7	5.8	R.LAEYDALHSSVKPSSPSS K.AYNDKSPPLYFSYDEDELEAIPVAIK. A R.WLNVSYCR.L K.SLEELRLDNNK.L R.FLDAVEK.A K.SLEELRLDNNKLR.V	-	-	6/6	-2.45
7518	Q4DZ98_TRYCR	<i>Enolase</i>	46.44	5.92	K.AQVVGDDLTVTNVSR.I K.FGFPAWS K.QLAETYAK.W K.AQVVGDDLTVTNVSR.I R.DLDGTPNKS.K.L K.NVNDVLAPALVGKDELOQSTLDK. M*R.D K.NVNDVLAPALVGKDELOQSTLDK. L K.DELOQSTLDKLMR.D K.NVNDVLAPALVGKDELOQSTLDK. L R.M*GAEVYHSLK.S K.INQIGTITEAIEASK.F R.SAVPSGASTGIHEACELR.D	-	-	18/12	-4.59
8612	EF1A_TRYBB	<i>Factor elongation 1 α</i>	49.10	9.0/8.0	R.VETGTM*KPGDVVTFAPANVTTEV K.S R.VETGTM*KPGDVVTFAPANVTTEV K.S K.SIEMHHEQLAEATPGDNVGFNVK. N R.VETGTM*KPGDVVTFAPANVTTEV K.S	-	-	12/4	-4.28

**Tabla 2. (Continuación)**

Spot	No. NCBI / UniProt	Proteína identificada	KDa Te..	pI Te	Secuencia del péptido	Score Mascot®	CS (%) Mascot®	PC / PI Sequest®	Log <sub>2</sub> REM / 338
9613	TYTR_TRYCR	<i>Trypanothione reductase</i>	53.86	6.25	K.DLQLQNAGVM*IK.N R.GFDHTLREELTK.Q K.ISDFYNTIGVHPTSAEELCSM*R.T K.DGGVQVDEYSR. R.TKDLQLQNAGVM*IK.N K.DLQLQNAGVMIK.N K.ENPAKVELNADGSK.S R.TNVSNIYAIGDVTNR.V R.TNVSNIYAIGDVTNR.V K.KLIAVKDEAVLNINK.S	-	-	10/10	-2.49
9804	Q4CRW0_TRYCR	<i>Subunit dependent ATP HSP78</i>	41.47	5.99	R.ILGQDEAIESITNVVR.I R.ADSFLTHDSVTASDIAQVIAR.A R.LQQESKPEQLDSVER.E R.IAERQDEYDALEAR.W	-	-	8/4	-2.32
8109	gi.17224953	<i>Triparedoxina peroxidasa</i>	22.2	5.9	RGGLGQMNLPILADKTK	130	47.7	-	1.2

**Tabla 2. (Continuación)**

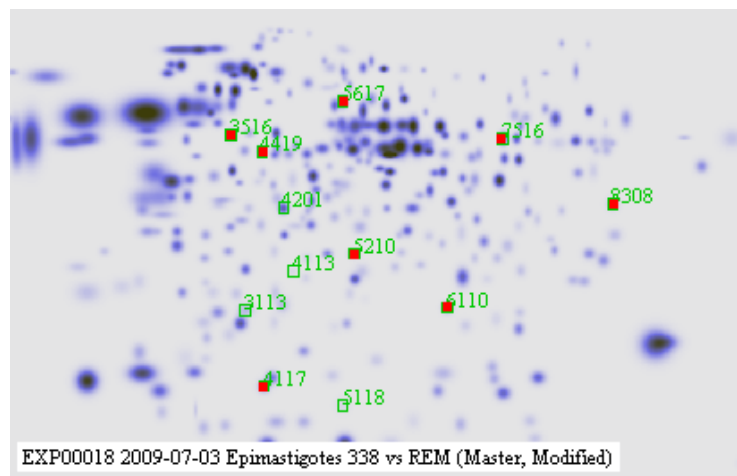
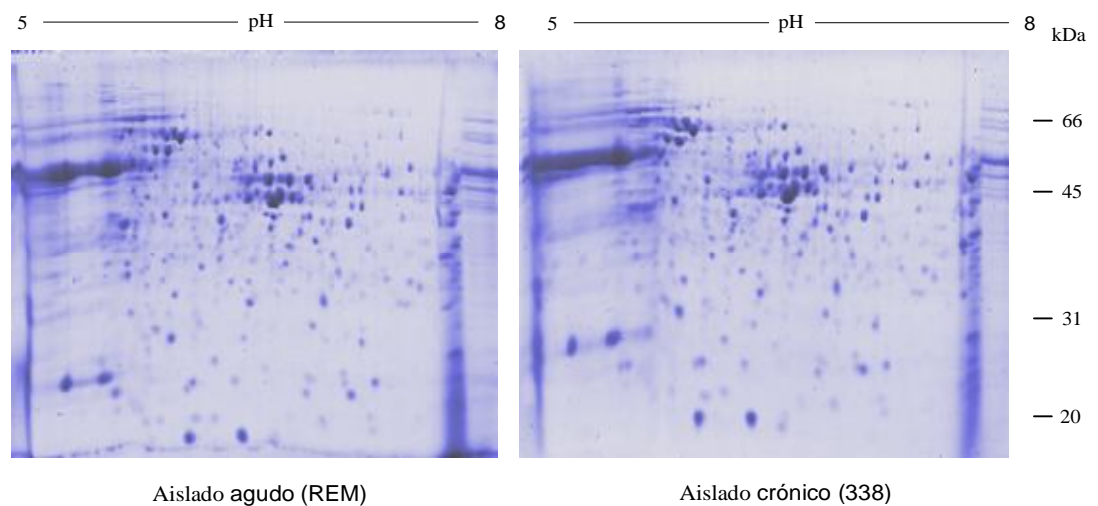
Spot	No. NCBI / UniProt	Proteína identificada	KDa Te..	pI Te	Secuencia del péptido	Score Mascot®	CS (%) Mascot®	PC / PI Sequest®	Log <sub>2</sub> REM / 338
7412	Q26875_TRYCR	<i>Dehidrogenase</i>	42.28	6.0	K.ISNLRDYFEEADQQIR.E R.CQATEDGHVPR.T R.YDFEADQQIR.E R.CQATEDGHVPR.T K.SVCDAVGSDR.V K.SDQDPLAGR.L R.YDFEADQQIR.E K.ETYGVPEELTDDEV.R K.ISNLRDYFEEADQQIR.E R.LLAASAIPIKDR.I K.ISNLRDYFEEADQQIR.E R.CQLIYDVK.S R.QSGPYAGTTIDTR.C R.LLAASAIPIKDR.I K.FIANPDLVER.A R.QSGPYAGTTIDTR.C K.VDAVAFGAK.F K.SVCDAVGSDR.V	-	-	18/18	1.13

La tabla 2 muestra la lista de las proteínas identificadas en el estadio tripomastigotes del aislado agudo y crónico. Las proteínas analizadas mediante MALDI-TOF y LC-MS/MS fueron identificadas utilizando la plataforma de búsqueda NCBI y UniProt, respectivamente. Los números de las manchas corresponden a las manchas identificadas en la figura 13B. El puntaje de Mascot (Score Mascot) y el porcentaje de cubrimiento de secuencia (CS Mascot) corresponden a las proteínas analizadas por MALDI-TOF. La relación entre los péptidos identificados exclusivamente en *T. cruzi* y los péptidos con homología para familia *Kinetoplastidae* (PC/PI Sequest) corresponden a las proteínas analizadas por LC-MS/MS. La tabla incluye la masa molecular (KDa), el punto isoeléctrico (PI), la secuencia de los péptidos identificados y la relación de la intensidad de la señal de las manchas identificadas en la figura 13B en términos del Log<sub>2</sub> agudo/crónico.

## 9.5 ANALISIS COMPARATIVO DE LA EXPRESION DE PROTEINAS ENTRE EPIMASTIGOTES DE LOS AISLADOS AGUDO vs. CRONICO

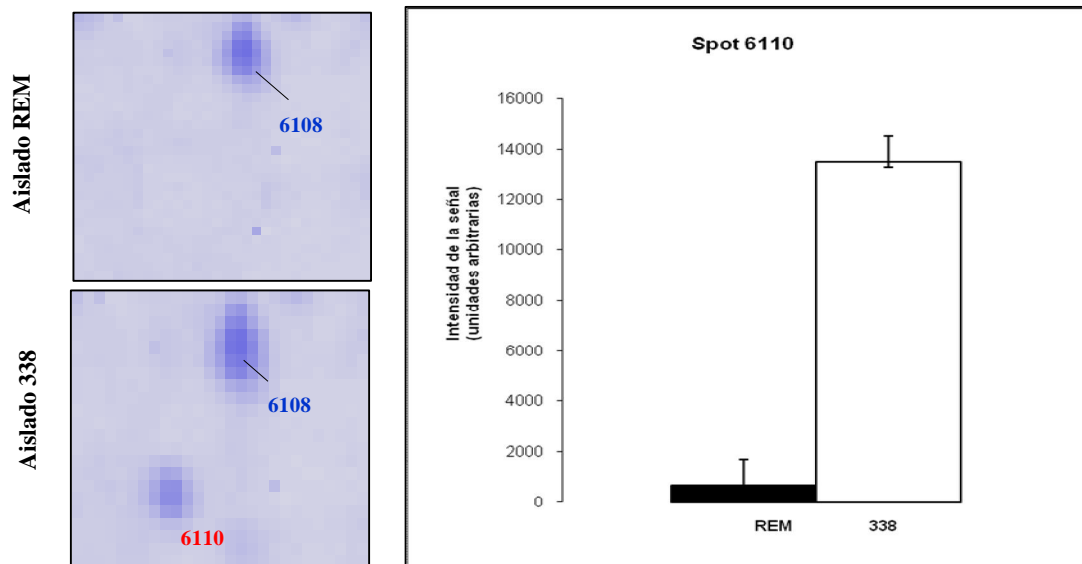
La figura 16 A muestra imágenes representativas de los geles en 2D de las proteínas del estadio epimastigote de los aislados agudo y crónico. 646 manchas peptídicas fueron detectadas en ambos geles. Los análisis de imagen fueron realizados por medio de la comparación de tres geles representativos que fueron obtenidos de tres suspensiones diferentes del parásito para cada aislado.

**Figura 16.** E-2D de proteínas solubles en Epimastigotes de los aislados agudo vs. crónico.

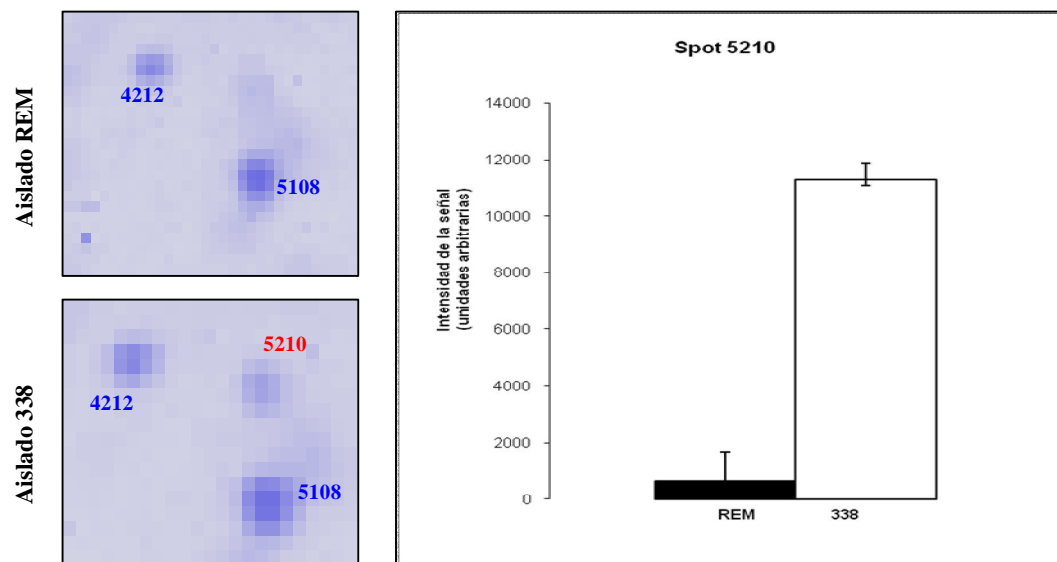


Los perfiles proteicos en 2D obtenidos de estas preparaciones fueron altamente reproducibles en términos del número total de manchas, intensidad y posición relativa. La comparación automática de los geles pareados mostró algunas diferencias entre los perfiles proteicos de los aislados agudo y crónico. La figura 16B muestra las manchas que fueron identificadas y las proteínas correspondientes son listadas en la tabla 3.

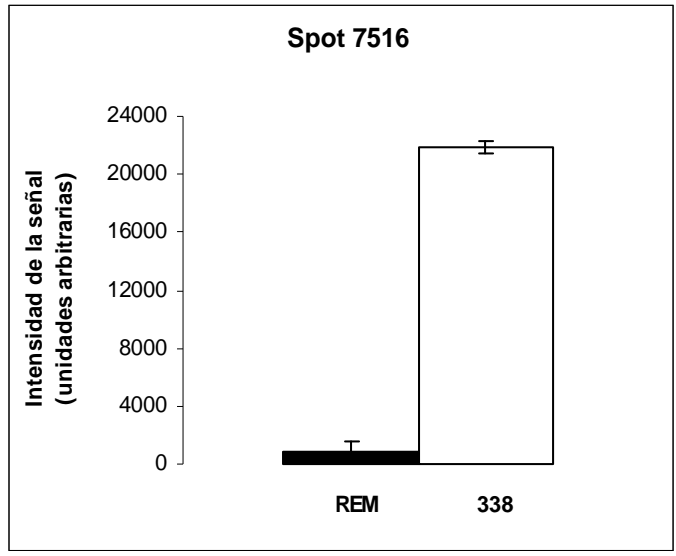
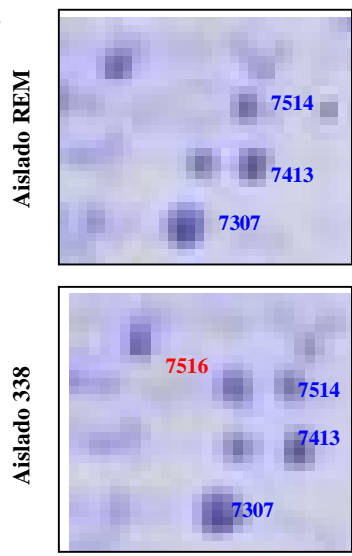
C



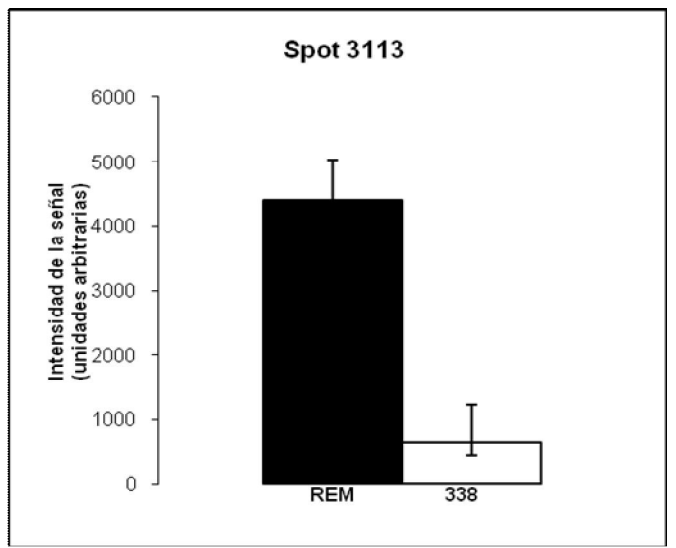
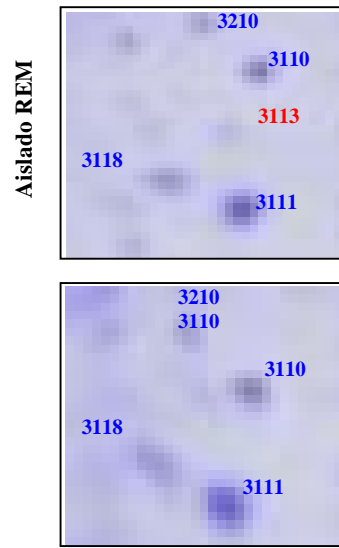
D

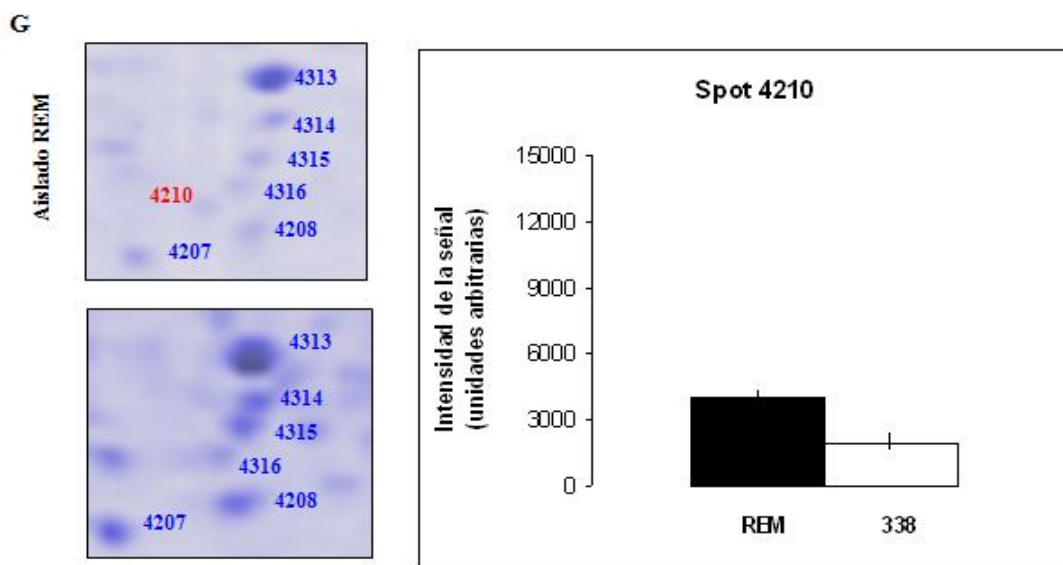


**E**



**F**





(A) Geles de E-2D del extracto proteico soluble del estadio epimastigote de *T. cruzi* I de los aislados agudo y crónico en un rango de pH de 5-8. (B) El gel maestro obtenido utilizando el software PDQuest muestra un total de 13 manchas entre los aislados agudo y crónico, 4 exclusivas en el aislado agudo y 9 exclusivas en el aislado crónico. En el gel maestro se identifican las manchas que presentaron una intensidad en la señal  $\geq 2$  veces. Los cuadros vacíos y rellenos muestran las manchas peptídicas diferencialmente expresadas en el aislado agudo y crónico, respectivamente. (C-G) Las regiones magnificadas de los geles muestran las manchas 6110, 5210 y 7516 expresadas diferencialmente en el estadio de epimastigote del aislado crónico comparado con el aislado agudo; las manchas 3113 y 4210 fueron exclusivas en el aislado agudo. El histograma representa el promedio de la intensidad de la señal en unidades arbitrarias  $\pm$  las desviaciones estándar. Los geles de E-2D se realizaron en tres ensayos independientes. Las fotografías representan una de las réplicas de los geles teñidos con azul de Coomassie.

**9.5.1 Identificación de las proteínas expresadas diferencialmente entre los epimastigotes del aislado agudo vs. crónico utilizando MALDI-TOF y LC-MS/MS.** Se identificó un total de 11 proteínas entre los aislados agudo y crónico. Las proteínas ubicadas en las manchas 3113 y 4210, fueron identificadas en el aislado agudo y las proteínas ubicadas en las manchas 4419, 6110, 6111, 5210, 3516, 7516, 8303, 4117 y 5617, fueron identificadas en el aislado crónico (ver Tabla 3).

**Tabla 3.** Proteínas identificadas en el estadio epimastigote en los aislados agudo vs. Crónico

Tabla 3- Proteínas identificadas en el estadio epimastigote utilizando MALDI-TOF o LC-MS/MS									
Spot	No. NCBI / UniProt	Proteína identificada	KDa Te..	pI Te	Secuencia del péptido	Score Mascot®	CS (%) Mascot®	PC / PI Sequest®	Log <sub>2</sub> REM / 338
4210	HSP70_TRYCR	<i>HSP70</i>	73.0	5.1	K.NQVAMNPTNTVFDK.R R.IINEPTAAAIYGLDKVEDGKER.N K.MKEIAESYLKQ.Q	-	-	17/9	1.18
4419	B5U6T2	<i>Factor elongation</i>	86.06	5.7	R.ETVTDVSSIQCLSK.S R.VFYACCLTAAPR.L K.SQANTLTL SVR.Q R.ETVTDVSSIQCLSK.S R.GAPLTEELCVEMEEGLNAGSEAD PKVR.A R.GAPLTEELCVEMEEGLNAGSEAD PKVR.A K.SQANTLTL SVR.Q R.RVFYACCLTAAPR.L	-	-	17/8	-3.62
6110	Q4D586	<i>Proteína sin caracterizar</i>	21.2	6.9	R.LAKELLVDETPFVEK.A K.ELLVDETPFVEK.A R.LAKELLVDETPFVEK.A K.ELLVDETPFVEK.A K.IPSHVHWSTDPVVR.C K.IPSHVHWSTDPVVR.C R.LAKELLVDETPFVEK.A K.IPSHVHWSTDPVVR.C K.TVTCYPAM*K.E K.KILEEMR.S R.SLLEFIREEYQSLPK.K R.VEGDAVQERR.C K.ELLVDETPFVEK.A	-	-	18/12	-4.37

**Tabla 3. (Continuación)**

Spot	No. NCBI / UniProt	Proteína identificada	KDa Te..	pI Te	Secuencia del péptido	Score Mascot®	CS (%) Mascot®	PC / PI Sequest®	Log <sub>2</sub> REM / 338
6111	Q4DK88	<i>Methionine sulfoxido reductasa</i>	19,9	7.1	K.AFGDAQVATSLEK.A R.SAIFYHDDQQLK.E K.KGTTGHAEVLHVK.Y R.SAIFYHDDQQLK.E K.GTTGHAEVLHVK.Y R.LHVAEDYHQMYLEK.N K.KGTTGHAEVLHVK.Y K.GTTGHAEVLHVK.Y K.KGTTGHAEVLHVK.Y R.LHVAEDYHQMYLEK.N R.IHNPTTVNR.Q R.LNGADPALR.E	-	-	16/12	-4.18
5210	Q4D729	<i>Subunit complex proteolytic</i>	22.8	6.7	K.LENKVGEFPQQLTR.A R.KGDTVVLIGDR.Q R.ALIDVDGYDAEKIAR.K R.ALIDVDGYDAEK.I	-	-	8/4	-4.16
3516	P08562	<i>Tubulin beta chain</i>	49.57	4.7	R.AVLIDLEPGTM*DSVR.A R.MSTKEVDEQMLNVQNK.N R.GLSVPELTQQMFDK.N R.INVYFDEATGGR.Y R.GSQQYRGLSVPELTQQM*FDK.N	-	-	8/5	-0.23

**Tabla 3. (Continuación)**

Spot	No. NCBI / UniProt	Proteína identificada	KDa Te..	pI Te	Secuencia del péptido	Score Mascot®	CS (%) Mascot®	PC / PI Sequest®	Log <sub>2</sub> REM / 338
7516	Q4CPW5	Glutamamyl carboxypeptidase	43.6	6.25	R.NKANLWATLPGDGGVTK.G R.SMDHTQWLAK.L R.NSNLELIHYCKDYLEGLGVK K.GGILSGHTDVVPVDGQK.W R.AEGCIIEPTGMTVVIHK.G K.G.GILSGHTDVVPVDG K.WSDPFLLTER.D R.NKANLWATLPGDGGVTK.G R.SM*DHTQWLAK.L R.NETPSFEGSEEAPLTK.L K.LACAINNDYKVVK.K R.NETPSFEGSEEAPLTK.L	-	--	28/12	-4.57
8303	Q4DFE2	2-hydroxy-3-oxopropionate reductase,	31.9	6.4	K.TITYIGESGAGQVCK.A K.AALQNKDLSIVMDTAR.E R.CLDAPVSGGDIGAK.N R.TTSKM*EELVQQGAQAAVSPADLA SK R.CLDAPVSGGDIGAK.N K.TITVIGESGAGQVCK.A K.DLSIVM*DTAR.E K.AALQNKDLSIVMDTAR.E K.DLSIVMDTAR.E R.V K.AGFPLVVFNR.T K.AGFPLVVFNR.T	-	-	20/11	-2.77
4117	Q1HMI3	Putative cofilin	15.7	5.7	R.YVMLHIIDQK.N K.VNEGTVVAVAATK.D	-	-	3/2	-2.50

**Tabla 3. (Continuación)**

Spot	No. NCBI / UniProt	Proteína identificada	KDa Te..	pI Te	Secuencia del péptido	Score Mascot®	CS (%) Mascot®	PC / PI Sequest®	Log <sub>2</sub> REM / 338
5617	Q4DZJ3	Aminopeptidase, putative	56.0	6.0	R.VLVGEVPSEASR.T R.GYCDNCVR.L R.GYGGIYVVGK.A R.VLVGEVPSEASR.T	-	-	6/4	-3.39
3113	Q27352	Cadena alpha tubulina	49,7	5.0	R.AVFLDLEPTVVDEIR.T R.AVFLDLEPTVVDEIR.T R.AVFLDLEPTVVDEIRTGTYR.Q	-	-	10/7	2.77

La tabla 3 muestra la lista de las proteínas identificadas en el estadio epimastigote del aislado agudo y crónico. Las proteínas analizadas mediante MALDI-TOF y LC-MS/MS fueron identificadas utilizando la plataforma de búsqueda NCBI y UniProt, respectivamente. Los números de las manchas corresponden a las manchas identificados en la figura 14B. El puntaje de Mascot (Score Mascot) y el porcentaje de cubrimiento de secuencia (CS Mascot) corresponden a las proteínas analizadas por MALDI-TOF. La relación entre los péptidos identificados exclusivamente en *T. cruzi* y los péptidos con homología para la familia *Kinetoplastidae* (PC/PI Sequest) corresponden a las proteínas analizadas por LC-MS/MS. La tabla incluye la masa molecular (KDa), el punto isoelectrico (PI), la secuencia de los péptidos identificados y la relación de la intensidad de la señal de las manchas identificadas en la figura 14B en términos del Log<sub>2</sub> agudo/crónico

Las 40 proteínas identificadas en todos los estadios, fueron agrupadas en categorías funcionales de acuerdo a "Functional catalogue 2007"(tabla 4). Las proteínas fueron agrupadas en 7 categorías. (1) metabolismo, (2) Ensamblaje de citoesqueleto (3) Proteínas de destino, (4) Defensas antioxidantes, (5) Proteínas de síntesis y de ciclo celular, (6) Catabolismo, (7) Adhesión

**Tabla 4.** Tabla de categorías funcionales de los péptidos identificados

<b>Categoría funcional</b>	<b>Proteína</b>
Metabolismo	<i>Tirosine aminotransferase</i> <i>Arginina kinase</i> <i>Enolase</i> <i>Dehydrogenase</i> <i>Piridoxal kinase</i>
Ensamblaje de citoesqueleto	<i>B-tubulin</i> <i>Actin</i>
Proteínas de destino	<i>Heat Shock Protein 70</i>
Defensas antioxidantes	<i>Tryparedoxin Peroxidasa</i> <i>Heat shock protein</i> <i>ATP-dependent Clp Protease</i> <i>Subunit, Heat Shock Protein 78, putative</i> <i>Dihydrolipoamide</i> <i>Dehydrogenase</i> <i>Trypanotioin Reductase</i>
Proteínas de síntesis y de ciclo celular	<i>Helycase RNA</i>
Catabolismo	<i>Elongation factor 1</i>
Adhesión	<i>Surface protease GP63, putative</i>

## 10. DISCUSIÓN

Los organismos unicelulares se adaptan a cambios en su ambiente por ajustes en su expresión génica y el punto de control más importante es el inicio de la transcripción. Esto es cierto para todos los organismos excepto para los tripanosomátidos. La regulación de la expresión génica en *Trypanosoma cruzi* al igual que en otros tripanosomátidos está dada principalmente a nivel postranscripcional mediante un mecanismo de procesamiento (transplicing), estabilidad del ARNm y mediante modificaciones postraduccionales que modulan la función biológica y bioquímica de las proteínas en estos parásitos (Clayton, 2002). Estas características particulares del parásito podrían estar influyendo, al igual que el genoma del mismo en las diferencias a nivel de la presentación clínica de la EC, ya que podrían representar determinantes importantes durante la infección y supervivencia del parásito generando mecanismos de patogenicidad y como consecuencia influir en el curso clínico de la enfermedad.

El análisis de expresión diferencial entre estadios de parásitos del linaje Tc I aislados de paciente agudo y crónico adelantado en este trabajo, nos permitió identificar una expresión diferencial del 14 % del total de proteínas en los estadios de amastigote, tripomastigote y epimastigote. En el caso del aislado que generó el Chagas agudo, las proteínas identificadas están involucradas en metabolismo, defensa antioxidante y citoesqueleto, mientras en el caso del aislado del paciente con cardiomiopatía chagásica crónica fueron principalmente proteínas de metabolismo y citoesqueleto.

### **Triparedoxin Peroxidasa**

La triparedoxin peroxidasa (TXNPx) es una proteína que ha sido implicada en los procesos de detoxificación de los hidroperóxidos, cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) o hidroperóxidos orgánicos de cadena pequeña a

moléculas de agua y alcohol, respectivamente (Trujillo, 2004; Nogueira, 2009). En el caso de la infección con *T. cruzi* en un modelo murino se evidenció que la sobreexpresión de TXNPx protegió a los parásitos del daño oxidativo mediado por el peróxido (Wilkinson, 2000). Resultados similares fueron observados con parásitos transfectados con la TXNPx, los cuales fueron más eficientes en la infección y tuvieron una mayor supervivencia dentro de la célula hospedera (Piñeyro, 2008).

La sobreexpresión de tres veces más concentración de proteína en el aislado del caso agudo observada en nuestro estudio, se correlaciona con los hallazgos reportados y es consistente con el hecho de que una mayor expresión de TXNPx en el aislado responsable del Chagas agudo, le estaría confiriendo al parásito una mayor capacidad de supervivencia, una mayor replicación y por consiguiente se traduciría en una mayor carga parasitaria la cual es característica de esa fase de la enfermedad. Esta supervivencia se relaciona con el hecho de que durante la invasión, los tripomastigotes localizados temporalmente dentro de la vacuola parasitófora, donde son sometidos a la toxicidad de las especies reactivas de oxígeno, detoxifican rápidamente el ambiente oxidativo, adaptación que les permite sobrevivir y favorece el proceso infectivo (Burleigh y Andrews, 1995). En consonancia con estos resultados, recientemente otros autores han demostrado una correlación entre los niveles aumentados de diversas enzimas antioxidantes (triparedoxin peroxidasa, superóxido dismutasa y peroxiredoxinas) y la virulencia del parásito (Piacenza, 2009). Adicionalmente, estudios proteómicos, han evidenciado altos niveles de expresión de TXNPx en poblaciones de *T. cruzi* resistentes al beznidazole (Andrade, 2008 y Nogueira, 2009). Cabe resaltar que la sobreexpresión de la proteína fue observada únicamente en el estadio tripomastigote que es el estadio infectante del parásito y como lo reporta Atwood, estos cambios representarían una preadaptación de las formas metacíclicas para resistir el estallido respiratorio en las células fagocíticas del hospedero (Atwood 2005).

## **Proteínas De Choque Térmico Hsp (Hsp70 Y Hsp10)**

Las HSPs constituyen una familia de proteínas conservadas a lo largo de la escala evolutiva. Estas proteínas son constituyentes normales de las células y su síntesis se incrementa principalmente con la exposición a varias formas de estrés celular. En los kinetoplastidos se ha reportado que las HSP también participan como chaperonas en el plegamiento, ensamble, localización intracelular, regulación y degradación de proteínas (Young, 2004, Hartl, 1996), así como también en el procesamiento de antígenos, traducción de señales, regulación del ciclo celular y muerte celular programada (Mayer & Bakau 2005).

El modelo de ratón ha sido ampliamente utilizado para estudiar la infección por *T. cruzi*. En este modelo la fase aguda de la enfermedad se caracteriza tempranamente por una marcada activación de la respuesta inmune, tanto innata como adaptativa, acompañada de esplenomegalia, aumento del tamaño de los nódulos linfoides y activación policlonal de linfocitos T y B (Minoprio et al, 1986 y Minoprio, 2001). Después, durante el periodo tardío se observa una depleción de los linfocitos T y B en los órganos linfoides principales (ganglio y bazo), probablemente debido a la activación de los mecanismos de muerte celular programada ó apoptosis (Dos Reis, 2005).

La proliferación y apoptosis de los linfocitos T y B se ha relacionado tanto con moléculas presentes en las células del hospedero como con moléculas liberadas por el parásito (De Meis, 2006). En este sentido, existe evidencia experimental que muestra que linfocitos proliferantes expuestos a la proteína HSP70 presentan diferencias en su respuesta en función del tiempo de exposición; durante periodos cortos de tiempo se favorecía la activación y durante periodos largos de exposición se inducía la muerte por apoptosis de los linfocitos (Marañón et al. 2000). Igualmente ésto ha sido observado cuando la exposición se hace con la transialidasa que es una glicoproteína de membrana de *T. cruzi* (Gao et al, 2001).

Con base en estas evidencias podemos sugerir que la sobreexpresión de la proteína HSP70 en el parásito aislado de caso agudo podría estar cumpliendo un papel inmunomodulador, posiblemente por la inducción de la muerte celular por apoptosis, tanto de linfocitos B como de células T generada después de una marcada activación policlonal y proliferación celular. Esta apoptosis de las células de la respuesta inmune adaptativa tendría como consecuencia el incremento de la parasitemia que se observa en los casos sintomáticos de Chagas agudo. A este respecto se reportó que la inoculación de células apoptóticas a ratones infectados con *T. cruzi* favorece el incremento de la parasitemia en este modelo experimental (Freire-de-Lima CG, 2000).

En *T. cruzi* la proteína HSP10 hace parte de un grupo altamente conservado de chaperonas moleculares que se encuentran en bacterias, mitocondria y cloroplastos. Estas proteínas son necesarias para un plegamiento eficiente de muchas otras proteínas en condiciones normales y de stress y se han encontrado asociadas con el desarrollo de algunas enfermedades humanas (La verda, 2000). Es sabido que las proteínas HSP 10 junto con la HSP60 forman complejos proteicos en forma de barril con una cavidad central donde se realiza el plegamiento de las proteínas. También ha sido reportada capacidad inmunogénica de HSP10 en varios patógenos como *M. tuberculosis* (Ragno, 1996).

En el genoma de *T. cruzi* se han identificado 3 genes que codifican para HSP10, los cuales se encuentran organizados en tándem y separados por una región intergénica inusualmente larga. El análisis de secuencia de aminoácidos mostró un alto porcentaje de identidad (83%) con la secuencia de la HSP10 de *T. brucei* y uno muy bajo (28%) con la secuencia de la HSP10 de *E. coli*. La HSP10 es necesaria para la actividad de la HSP60, estas chaperoninas actúan coordinadamente en el plegamiento de las proteínas y ha sido reportado, tanto en vivo como in vitro, la asociación y activación de la pro caspasa 3 (Kregel, 2002).

Por otra parte, estudios recientes sugieren un papel antiapoptótico de la HSP10 y HSP60 en varios tipos de células. En el modelo experimental de la cardiomiopatía generada por doxorubicina en cardiomiocito humano, la sobreexpresión de estas dos proteínas produjo una inhibición de la activación de la apoptosis y además se demostró que la HSP10 y HSP60 podrían modular la abundancia de la proteína de la familia Bcl2 a través de modificaciones pos traduccionales. Teniendo en cuenta que en nuestro trabajo se observó una mayor expresión de HSP10 en el aislado agudo podríamos pensar que esta proteína podría favorecer los procesos antiapoptóticos de células como el cardiomiocito, que le permitiría al parásito persistir en la célula hospedera y así garantizar la infección sin el reconocimiento de las células del sistema inmune.

### **Tirosin Amino Transferasa Y NADH**

La proteína tirosin aminotransferasa (TAT) es una enzima que transamina algunos aminoácidos aromáticos como alanina, leucina y metionina (Montemartini, 1993) y ha sido implicada en la síntesis de poliaminas. Las poliaminas son un grupo de sustancias de bajo peso molecular, dentro de las que se encuentran la putrescina, espermidina y espermina, las cuales en modelos murinos se ha visto que cumplen un papel importante en la proliferación y diferenciación celular (Pegg, 1988). En los tripanosomátidos la unión de la espermidina con el glutatión conduce a la formación del tripanotión un agente reductor el cual media los procesos de detoxificación en tripanosomátidos y en *C. fasciculata* (Nogoceke, 1997). Este componente es esencial para mantener el equilibrio redox y llevar a cabo funciones metabólicas y antioxidantes (Fairlamb, 1992). El hecho de encontrar expresión de TAT en el estadio tripomastigote del aislado de Chagas agudo y no expresión en el caso del Chagas crónico, reforzaría el papel de esta proteína como un posible factor de virulencia asociado con su papel en la resistencia del parásito frente al sistema oxidativo de las células de defensa del hospedero. Nuevamente cabe resaltar que se ha reportado la sobreexpresión de TAT en cepas

de *T. cruzi* resistentes al beznidazole, por lo tanto esta proteína podría también estar favoreciendo la supervivencia del parásito en presencia de fármacos (Rego, 2000).

En el modelo de *T. cruzi* empleando epimastigotes se ha reportado que la TAT cataboliza los aminoácidos mencionados anteriormente, convirtiéndolos en piruvato, el cual posteriormente es reducido por la NADH a fenil lactato y p-hidroxifenil lactato; derivados del indol. En esta reacción participa NADH como co-substrato. Teniendo en cuenta, que el catabolismo de los aminoácidos es una fuente importante de carbón y energía para tripanosomátidos, nuestra evidencia experimental sugiere que la sobreexpresión de NADH en el estadio de tripomastigote del aislado agudo, estaría favoreciendo la proliferación del parásito asociada con la fase aguda de la enfermedad. Sin embargo, estudios de expresión diferencial empleando microarreglos de ADN entre aislados de *T. cruzi* linaje II obtenidos de pacientes cardíacos y asintomáticos en fase crónica, mostraron que la subunidad ND7 del gen de la dehidrogenasa (NADH) fue sobreexpresado 30 veces más en el aislado cardíaco crónico que en el asintomático (Baptista, 2006). El secuenciamiento de este gen mostró una delección de 455 pares de bases en la zona media de la región codificante del ND7 del aislado asintomático. Esta delección resulta en un ARNm truncado y es responsable de la transcripción diferencial observada en el experimento.

### **Proteína gp63**

La invasión a las células hospederas no fagocíticas, por parte del *T. cruzi*, parece ser un proceso activo que involucra el reclutamiento de lisosomas y la activación de una vía de señalamiento intracelular la cual resulta en una amplia movilización de calcio, tanto en el parásito como en la célula. Estudios previos han descrito una gran variedad de moléculas del parásito que facilitan esta unión, entre éstas son

importantes las transialidasas solubles o de membrana y algunas proteínas de superficie.

La proteína de superficie gp63 pertenece a la familia de las metaloproteasas dependientes de zinc. En *T. cruzi*, la gp63 es una enzima con actividad de metaloproteasa unida a la membrana por una molécula de GPI. Análisis genómicos y proteómicos han mostrado un grupo de genes de Tcgp63 (174 copias) que codifican al menos 29 diferentes proteínas, muchas de éstas expresadas en múltiples estadios, mientras que otras fueron específicas de fase (Atwood, 2005). En *T. brucei* estas proteínas funcionan liberando glicoproteínas variables de superficie (VSG) durante el proceso de la variación antigénica (La Count, 2003). Por último, en el modelo de Leishmania, su abundancia ha sido correlacionada con la virulencia del parásito, ya que ésta provee resistencia ante la lisis mediada por el complemento y facilita la adherencia y promueve la supervivencia intracelular de los parásitos fagocitados dentro del macrófago (Grandgenett, 2000). Dado que la gp63 cumple diversos roles en la interacción hospedero parásito podría pensarse que su presencia en el aislado agudo y su ausencia en el aislado crónico podría estar actuando como un factor de virulencia al favorecer el proceso infectivo de las células hospederas y como en el caso de leishmania podría estar promoviendo su supervivencia en las células fagocíticas. Otro posible papel de esta proteína ha sido reportado recientemente y se relaciona con el hecho de estar involucrada en la entrada de *T. cruzi* a células hospederas (Cuevas, 2003, Kulkarni, 2009).

### **Lipoamida deshidrogenasa (LipDH)**

Esta enzima hace parte de las oxidoreductasas dependientes de flavin adenin dinucleótido (FAD), junto a otras proteínas como glutathion reductasa, tioredoxin reductasa y la tripanotion reductasa (William 1990). Esta enzima, es un componente esencial de los complejos multienzimáticos piruvato,  $\alpha$  ceto glutarato

y  $\alpha$  ceto ácidos de cadena ramificada deshidrogenasas, posee dos centros catalíticos, el FAD y el disulfuro redox. En el modelo de *T. cruzi*, LipDH cataliza la reacción reversible de la lipoamida,  $L(S)_2$  por el NADH, (Reacción1), a dihidrolipoamida,  $L(SH)_2$ .



La dihidrolipoamida funciona como un removedor universal de radicales libres, ya que elimina el radical peroxil (ROO) del citosol y de la membrana (Kagan, 1992). En el modelo de *E. coli* *lipdh*<sup>-/-</sup> se observó que esta proteína está implicada en los procesos de captura de manosa y galactosa (Richarme and Heine, 1986). Así mismo se ha encontrado asociada a la membrana en las formas sanguíneas de *T. brucei* y se sugiere que esta enzima podría estar involucrada con la captura de glucosa en los tripanosomas africanos (Lohrer, 1990) De otro lado, cabe resaltar que la proteína LipDH mostró mayor expresión en el estadio amastigote del aislado agudo en comparación con el mismo estadio del aislado del caso crónico, lo cual podría favorecer una mayor supervivencia, dada su actividad antioxidante así como pudiera sugerirse un posible papel de la LipDH como una fuente de energía que aseguraría su reproducción intracelular.

Se han evidenciado diferencias estructurales significativas entre la enzima LipDH del parásito y de mamífero, adicionalmente, estudios in vitro sobre la LipDH en mamíferos han mostrado la capacidad de esta flavoenzima para catalizar la producción de anión superóxido de los derivados del nitrofurano incluyendo la droga nifurtimox. Estas razones han fundamentado la propuesta del diseño de inhibidores específicos de la enzima LipDH de *T. cruzi*, como un blanco prometedor para el desarrollo de nuevas drogas anti parasíticas (Gutierrez, 2006).

## **Proteínas del aislado crónico**

La progresión de la enfermedad a la fase crónica se considera un proceso multifactorial que depende de la combinación de los factores genéticos del hospedero, el parásito y factores ambientales (Baptista, 2006). Aunque la participación del *T. cruzi* en la patogénesis de la fase aguda de la enfermedad de Chagas es ampliamente aceptada (Brenner and Gazzinelli, 1997; Cançado, 1999), los mecanismos moleculares de la patogénesis de la fase crónica son poco conocidos aunque se acepta la relevancia de la respuesta inmune y de un proceso inflamatorio crónico. En esta fase la persistencia del parásito, aún en pequeñas cantidades, actuaría como un estímulo manteniendo la inflamación crónica responsable del daño y remodelamiento tisular que afectaría la funcionalidad de los órganos afectados (Zhang, 1999).

En el aislado crónico la expresión diferencial observada involucró proteínas relacionadas en diferentes funciones metabólicas, dentro de éstas encontramos HSP78 y el factor de elongación  $1\alpha$ , el cual se asocia con el retículo endoplásmico y el aparato mitótico. Este factor de elongación tiene funciones en el control genético de la muerte celular y se conoce que participa solo o en combinación con otros factores celulares para coordinar el ciclo celular. Por su parte la HSP78 participa en la renaturalización de las proteínas denaturadas como parte de la función de termoprotección de la mitocondria y el mantenimiento de la funcionalidad de la misma (Krzewska, 2001). Lo anterior nos permite sugerir que la sobreexpresión de estas dos proteínas en el estadio amastigote y tripomastigote respectivamente, podría favorecer la persistencia parasítica en células infectadas en la fase crónica. Estos resultados serían concordantes con los hallazgos histopatológicos y con la fisiopatogenia de la CCC que se caracteriza por la escasa presencia de parásitos tanto en tejido como en el torrente sanguíneo. Por ello las proteínas expresadas diferencialmente en este estudio se relacionarían principalmente con el sostenimiento de la presencia del parásito en un estado

latente más que con la replicación e invasión de nuevas células en el tejido afectado.

En conclusión, los análisis comparativos del perfil proteico de estadios entre los aislados agudo y crónico, mostraron diferencias cualitativas y cuantitativas en el perfil de proteínas de este parásito. En este sentido cabe resaltar que la mayoría de las proteínas con expresión diferencial identificadas en los tres estadios del aislado agudo, forman parte del sistema antioxidante y anti stress del parásito. Por lo tanto, estas proteínas le estarían permitiendo al parásito evitar la acción de las moléculas generadas en el estallido respiratorio dirigidas a su eliminación y por lo tanto sobrevivir dentro de las células fagocíticas. Esta capacidad estaría haciendo que este clon de parásitos en particular, fuera más patogénico y explicaría por lo menos en parte, su virulencia al generar un brote de Chagas agudo con dos desenlaces fatales, en los cuales se observó un gran número de nidos de amastigotes en el tejido analizado, un infiltrado inflamatorio severo con compromiso y daño tisular que finalmente llevó a la falla cardíaca.

## CONCLUSIONES

El análisis proteómico comparativo entre *T. cruzi* aislado de un caso agudo y uno crónico mostró diferencias cualitativas significativas en el perfil de proteínas de estos parásitos.

Se identificaron 41 proteínas expresadas diferencialmente entre los aislados agudo y crónico. La mayoría de las proteínas identificadas corresponden a tres principales categorías funcionales: defensa antioxidante, metabolismo y citoesqueleto.

Se observó un mayor nivel de expresión en las enzimas antioxidantes en todos los estadios de *T. cruzi* aislado del Chagas agudo, sugiriendo que tales diferencias podrían estar relacionadas con factores de patogenicidad inherentes al parásito.

Las proteínas Triparedoxin peroxidasa y Dehidrogenasa fueron sobreexpresadas en el aislado agudo en las formas infectantes, esta sobreexpresión pudiera estar relacionada a una mayor sobrevivencia de este aislado dentro de la célula hospedadora.

## RECOMENDACIONES

Confirmar las proteínas identificadas por Western Blot.

Continuar los estudios para confirmar el papel de estas proteínas en la patogénesis de la enfermedad

Continuar el estudio con las otras proteínas que se sobreexpresaron.

Incorporar los modelos animales para el mantenimiento de las cepas.

## BIBLIOGRAFÍA

ALVES, MJ et al. Partial inhibition of trypomastigote entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*. En: Mol. Biochem Parasitol. Vol.21, (1986);p. 75-82.

ANDREWS, Norma. Microbial subversion of phagocytosis: lysosome recruitment during host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. En:Trends Cell Biol. Vol. 5.(1995). p.133-137.

BARCAN, L et al. Transmission of *T. cruzi* infection via liver transplantation to a non reactive recipient of Chagas' disease. En:Liver transplantation. Vol.11. No.9 (2005);p.1112-1116.

BENZ, C et al. Messenger RNA processing sites in *Trypanosoma brucei*. En:Mol Biochem Parasitol. Vol. 143. No 2 (2005); p. 125-34.

BRENER, Z. y GAZZINELLI, R.T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. En: Int.Arch.Allergy Immunol. Vol.114, (1997);p.103-110

BURLEIGH, Barbara y ANDREWS, Norma. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. En: Annu Rev Microbiol. Vol.49 (1995); p.175-200.

CANÇADO, J.R. Criteria of Chagas disease cure. En: Mem.Inst.Oswaldo Cruz. Vol. 94 No.1(1999); p.331-336.

CLAYTON, C E. Developmental regulation without transcriptional control? From fly to man and back again. En: EMBOJ vol. 21.(2002);p.1881–1888.

CLAYTON, C. Life without transcriptional control? From fly to man and back again, En: The EMBO Journal. Vol. **21** No.8 (2002); p. 1881–1888

CLAYTON, Christine. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. En: EMBO J.vol. 2. No.8 (2002):p. 1881-1888.

COURA, JR. Zigman Brener (7/9/1928 - 23/9/2002). En:Mem Inst Oswaldo Cruz. vol.97No. 7(2002):p.915-916.

CUEVAS, I, CAZZULO, J and SANCHEZ,D Gp63 homologues in Trypanosoma cruzi: surface antigens with metalloprotease activity and a possible role in host cell infection. En: Infect. Immun.vol. 71(2003):p.5739–5749.

CUEVAS, IC et al. Characterization of farnesylated protein tyrosine phosphatase TcPRL-1 from Trypanosoma cruzi. En: Eukaryot Cell. Vol.4.No.9 (2005):p.1550-61.

DASILVA VALENTE, SA et al. Considerations on the epidemiology and transmission of Chagas disease in the Brazilian Amazon En: Mem Inst Oswaldo Cruz. Vol.94. No 1. (1999); p.395-398.

DE MEIS, Juliana et al. Atrophy of mesenteric lymph nodes in experimental Chagas' disease: differential role of Fas/Fas-L and TNFR1/TNF pathways.En: Microbes Infect. 2006 Jan;8(1):221-31.

DIAS, Joao y COURA ,JR. Epidemiologia. In Dias JCP & Coura JR (organ.) Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas.Uma abordagem prática para o mclínico geral. Rio de Janeiro, Editora Fiocruz, 1997 p. 33-66.

DIAS, João Carlos. Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of Triatoma infestans and the interruption of transfusional Chagas

disease. Historical aspects, present situation, and perspectives. En: Mem Inst Oswaldo Cruz. Vol.102 Suppl 1 (2007); p.11-18.

DIAS, Joao Carlos. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease A clinical epidemiological review. En: Rev Soc Bras Med Trop. Vol. 22 No.3 (1989); 147-56.

DOSREIS, GA, Freire-de-Lima CG, Nunes MP, Lopes MF 2005. The importance of aberrant T-cell responses in Chagas disease. Trends Parasitol 21: 237-243.

DUSANIC D.G. In vitro of production metacyclic trypomastigotes of Trypanosoma cruzi Journal of. Parasitol. 66(1980):p. 1046-1049.

DVORAK, James. The natural heterogeneity of Trypanosoma cruzi. Biological and medical implications. En: J Cell Biol. vol.24, (1984); 357-360.

ELIZARI, MV. Chagasic myocardopathy: historical perspective. En: Medicina (B Aires).vol.59 No 2(1999):p.25-40.

EL-SAYED, Najib et al. The genome sequence of Trypanosoma cruzi, etiologic agent of Chagas diseases. En: Science.vol. 30(2005); p.409-415

FAIRLAMB, AH y CERAMI A,. Identification of a novel thiol-containing co-factor essential for glutathione reductase enzyme activity in trypanosomatids. En: Mol.Biochem. Parasitol. Vo.14 (1985):p. 187-198.

FREIRE-DE-LIMA, CG et al. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. En:Nature. vol. 403.No 6766 ( 2000);p. 199-203.

GAO, W y PEREIRA MA. Trypanosoma cruzi trans-sialidase potentiates T cell activation through antigen-presenting cells: role of IL-6 and Bruton's tyrosine kinase. En: Eur J Immunol. 2001 May; 31(5):1503-12.

GOLDBERG SS, CHIARI E. Growth and isolation of single colonies of Trypanosoma cruzi on solid medium. En: Journal of Parasitol; 66 (1980):p.677-679.

GRAHAM, Sheila. Mechanism of stage-regulated gene expression in Kinetoplastida. En: Parasitol Today.vol 11. (1995); p. 217-223.

GRANDGENETT PM., a, B.C. Coughlin b, L.V. Kirchhoff c,d, J.E. Donelson a,b,\* Differential expression of GP63 genes in Trypanosoma cruzi. En: Molecular and Biochemical Parasitology vol. 110 (2000); p. 409–415

GUHL, Felipe. Estado Actual del Control de la Enfermedad de Chagas en Colombia.. Medicina (Buenos Aires).vol. 59 (Supl. II) (1999):103-116.

GUTIERREZ, José. Trypanosoma cruzi Dihydrolipoamide Dehydrogenase as Target for Phenothiazine Cationic Radicals. Effect of Antioxidants. En: Current Drug Targets, Vol 7, No. 9, (2006); p. 1155-1179

HARTL, F-U. Molecular chaperones in cellular protein folding. En:Nature .vol.381 (1996);p.571–580.

HEATH, S., HIIENY, S. and SHER, A. A Cyclic AMP inducible gene expressed during the development of infective stages of Trypanosoma cruzi. Mol Biochem Parasitol 43:133-142.

HERRERA, EM, et al. Mediation of Trypanosoma cruzi invasion by heparan sulfate receptors on host cells and penetrin counter-receptors on the trypanosomes. En: Mol Biochem Parasitol. vol.65 No. 1: (1994); p. 73-83.

HORTON, Tamara L and LANDWEBER, Laura F. Rewriting the information in DNA: RNA editing in kinetoplasts and myxomycetes En:Current Opinion in Microbiology 2002, 5:620–626

KAGAN, V. E. et al. Dihydrolipoic acid-a universal antioxidant both in the membrane and in the aqueous phase. En: Biochem. Pharmacol. Vol.44, (1992);p.1637-1649

KÖBERLE, F. Chagas disease and Chagas syndromes.: the pathology of American trypanosomiasis. En:Advances in Parasitology. Vol. 6 (1968);p.63-116

KRZEWSKA, J, KONOPA G, LIBEREK K. Importance of two ATP-binding sites for oligomerization, ATPase activity and chaperone function of mitochondrial Hsp78 protein. En: J Mol Biol.vol. 314No.4 (2001):p.901-910.

KULKARNI, MM, OLSON CL, Engman DM, McGwire BS. Trypanosoma cruzi GP63 proteins undergo stage-specific differential posttranslational modification and are important for host cell infection. En: Infect Immun. vol.77 No. 5 (2009):p. 2193-200.

LACOUNT, D. J et al. Expression and function of the Trypanosoma brucei major surface protease (GP63) genes. En: J. Biol. Chem. 278 (2003): p.24658–24664.

LAVERDA, David et al. Seroreactivity to Chlamydia trachomatis Hsp10 Correlates with Severity of Human Genital Tract Disease En: Infection and Immunity, Vol. 68, No. 1 (2000), p. 303-309,

LIANG, XH, et al. trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. En: Eukaryot Cell. 2003.vol.2 No. 5 (2003):p.830-40.

LOHRER, Helmut and KRAUTH-SIEGEL, Luise. Purification and characterization of lipoamide dehydrogenase from Trypanosoma cruzi. En: Eur. J. Biochem.vol 194 (1990): p. 863-869

LOPES, Edinson y CHAPADEIRO, Edmundo. Anatomia Patológica da doença de Chagas humana. En:Dias JCP & Coura JR (organ.) Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas.Uma abordagem prática para o mclínico geral. (1997); p. 67-84

LOPEZ, J.A et al. Trypanothione-dependent peroxidase activity in Trypanosoma from Leishmania major.En: Mol.Biochem.Parasitol. vol. 96(2009):p.125!137;

MACEDO, Andréa Mara y Pena, Sergio Danilo. Genetic variability of Trypanosoma cruzi: implications for the pathogenesis of Chagas disease. En: Parasitol Today. Vol. 14, (1998); p. 119-123.

MARAÑÓN, concepción et al. HSP70 from trypanosoma cruzi is endowed with specific cell proliferation potential leading to apoptosis . En:Int Immunol, vol 12. (2000);p. 1685-1693.

MARTINEZ-CALVILLO, S et al. Transcription of Leishmania major Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. En: MolCell vol.11 (2003); p.1291–1299

MAYER, Marcia, BUKAU, Bernd. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. En: Cell Mol Life Sci. Vol.62 No.6 (2005); p. 670-84.

MINOPRIO, P. Parasite polyclonal activators: new targets for vaccination approaches? En: Int J Parasitol. 2001 May 1; 31(5-6):588-91. Review

MINOPRIO, PM, et al. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I. Quantitation of both T- and B-cell responses. En: Scand J Immunol. 1986 Dec;24(6):661-8.

MOMEN, H. Taxonomy of *Trypanosoma cruzi*: a commentary on characterization and nomenclature. En: Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999 94: 181-184.

MONCAYO, Alvaro y SILVEIRA Antonio Carlos. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin América and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. En: Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio Janeiro, Vol 104 (Suppl.1) 2009:p.17-30.

NOGUEIRA, Fernanda et al. Molecular characterization of cytosolic and mitochondrial trypanothione peroxidase in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole. En: Parasitol Res.vol.104. No.4 (2009):p.835-44.

ORTEGA-BARRIA, E, PEREIRA, ME. A novel *T. cruzi* heparin-binding protein promotes fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomes into mammalian cells. En: Cell. Vol.67No. 2 (1991):p. 411-21.

PARODI A, et al. Proteome analysis of the causative agent of chagas disease: *trypanosoma cruzi*.. International Journal for Parasitology; 34 (2004): p.881-886

PIACENZA, Lucía et al. Enzymes of the antioxidant network as novel determiners of *Trypanosoma cruzi* virulence. En:Int J Parasitol.vol.39 No.13( 2009):p.1455-64.

PIÑEYRO, María Dolores et al. Peroxiredoxins from Trypanosoma cruzi: virulence factors and drug targets for treatment of Chagas disease? En: Gene. Vol.408, No31. (2008); p. 45-50.

PRIOTTO, S, et al. Trypanosoma cruzi: participation of cholesterol and placental alkaline phosphatase in the host cell invasion. En: Exp Parasitol. vol.122No. 1(2009):p.70-3.

PUNUKOLLU, Gopikrishna et al. Clinical aspects of the Chagas' heart disease. En: Int J Cardiol. vol.115. No.3 (2007):p. 279-283.

RAGNO, S et al. A synthetic 10-kD heat shock protein (hsp10) from Mycobacterium tuberculosis modulates adjuvant arthritis. En: Clin Exp Immunol. Vol.103. No.3 (1996):p.384-90.

REGO, JV, Murta SM, Nirdé P, Nogueira FB, de Andrade HM, Romanha AJ. Trypanosoma cruzi: characterisation of the gene encoding tyrosine aminotransferase in benznidazole-resistant and susceptible populations En: Exp Parasitol. 2008 Jan;118(1):111-7.

REZENDE JM y MOREIRA H. Forma digestiva da doença de Chagas. En.: Brener Z, Andrade ZA & Barral-Netto M (organ.) Trypanosoma cruzi e doença de Chagas, 2<sup>a</sup>. edição. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan Ed. 2.000, p. 297-343

REZENDE, JM. Chagas disease of the digestive tract (author's transl)] REV Med Chil.vol. 107No.1(1979):p.71-72.

RICHARME, G, HEINE HG. Galactose- and maltose-stimulated lipoamide dehydrogenase activities related to the binding-protein-dependent transport of galactose and maltose in toluenized cells of Escherichia coli. En: Eur J Biochem. vol.156No. 2 (1986):p.399-405.

RUBIO, M. Actividad lítica de sueros normales sobre formas de cultivo y sanguíneas de *Trypanosoma cruzi* . 1956 Boletín Chileno Parasitología 4:62.

SANT' ANNA, Celso et al. All *Trypanosoma cruzi* developmental forms present lysosome – related organelles. En: Histochem Cell Biol Vol. 130; (2008): p. 1187 – 1198.

SCHENKMAN, R.P.F., VANDEKERCKOVE, F. and SCHENKMAN,S. Mammalian cell sialic acid enhances invasion by *Trypanosoma cruzi*. En: Mol. Biochem. Parasitol.vol. 61,(1993);p. 898 -902.

SCHENKMAN, S., E.S. ROBBINS, and V. NUSSENZWEIG. 1991. Attachment of *Trypanosoma cruzi* to mammalian cells requires parasite energy, and invasion can be independent of the target cell cytoskeleton. En: Infect Immun. 59:645- 654.

SCHMIDT, A y KRAUTH-SIEGEL RL. Enzymes of the trypanothione metabolism as targets for antitrypanosomal drug development.Curr Top Med Chem. Vol.2. No.11 (2002):p.1239-59.

SCHMUNIS, A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration En: Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2007 Vol. 102 (Suppl. I): 75-85,

SCHMUNIS, Gabriel. Prevention of transfusional *Trypanosoma cruzi* infection in Latin America. En: Mem Inst Oswaldo Cruz. Vol.94 (1999):p.93-101.

SHAMES, SL, et al. Purification and characterization of trypanothione reductase from *Crithidia fasciculata*, a newly discovered member of the family disulfide-containing flavoprotein reductases. En: Biochemistry. vol.25 (1986);p. 3519-3526.

SHEVCHENKO, A., et al. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. En: Anal Chemistry. 68 (1996):850-858.

SIMÕES, Marcus, SOARES, Fernando, MARIN-NETO José. Severe myocarditis and esophagitis during reversible long standing Chagas' disease recrudescence in immunocompromised host. En: Int J Cardiol.vol.49. No3 (1995); p.271-273.

TANOWITZ, HB. Kirchhoff, LV., Simon, D., Chagas' disease. En:Clin Microbiol Rev. vol. 5. No.4(1992): p.400-19.

TARDIEUX, I et al. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. En: Cell.7 1: (1992):p. 1117-1130

TAYLOR, M.E. Recognition of complex carbohydrates by the macrophage mannose receptor. En: Biochem. Soc. Trans vo. 21. (1993);p. 468-473

TIBAYRENC, Michel et al. Genetic characterization of six parasitic protozoa: Parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. En: Proc Natl Acad Sci U S A. vol 90; No 4(1993); p.1335–1339.

TOMLINSON S, Vandekerckhove F, Frevert U, Nussenzweig V. The induction of Trypanosoma cruzi trypomastigote to amastigote transformation by low pH. En: Parasitology 110: 1995, p. 547-554.

TRUJILLO, Madia et al. Trypanosoma brucei and Trypanosoma cruzi Tryparedoxin Peroxidases Catalytically Detoxify Peroxynitrite via Oxidation of Fast Reacting Thiols En: J Biol Chem, vol.279, No 33.(2004);p. 34175-34182.

TYERS, Mike y MANN, Matthias. From genomics to proteomics. En: Nature.vol. 422, (2003); p.193-197

VANHAMME, Luc y Pays, Etienne. Control of gene expression in trypanosomes. En: Microbiol Rev. vol.59, (1995); p. 223-240

VELAZCO C, Puentes F, Moreno A, Patarroyo M & Puerta C. Adaptación de la cepa munantá de *Trypanosoma cruzi* al cultivo in vitro en células Vero. En: Universitas Scientiarum Vol 4 (1): 1997, p.83-94.

WESTENBERGER S.J., Cerqueira, G.C., El-Sayed, N.M., Zingales, B., Campbell, D.A., Sturm, N.R., *Trypanosoma cruzi* mitochondrial maxicircles display species- and strain-specific variation and a conserved element in the non-coding region. En: BMC Genomics 2006 7, 60.p 184-188

WHO. The world Health Report. Geneva World Health Organization. 2002

WILKINSON, Shane, MEYER, David y KELLY, Jhon. Biochemical characterization of a trypanosome enzyme with glutathione-dependent peroxidase activity. En: Biochem J. vol.352 (2000);p. 755-761.

WILKINSON, SR et al. TcGPXII, a glutathione-dependent *Trypanosoma cruzi* peroxidase with substrate specificity restricted to fatty acid and phospholipid hydroperoxides, is localized to the endoplasmic reticulum. En: Biochem J. vol. 15No. 36 (2002):p.787-94.

WILLIAMS, C. H. Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes, 3, 123, 211, CRC Press, Boca Raton/Ann Arbor/New York(1992),

WOOLSEY, Aaron et al. Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. En: Journal of Cell Science. vol.116. No.17.(2009)

WOOLSEY, AM y BURLEIGH, Barbara . A Host cell actin polymerization is required for cellular retention of Trypanosoma cruzi and early association with endosomal / lysosomal compartments. En: Cellular Microbiology, Vol. 6, No.9, (2004); p. 829-838.

YOSHIDA, Nobuko, y CORTEZ M. Trypanosoma cruzi: parasite and host cell signaling during the invasion process. En: Subcell Biochem. Vol.47 (2008); p.82-91.

YOUNG, J C et al. Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. En: Nat. Rev.Mol. Cell. Biol.vol.5( 2004);p. 781–791

ZHANG, L y TARLETON, RL. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. En: J Infect Dis. Vo.180 No.2 (1999); p.480-486.

ZINGALES, Bianca et al. A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. En: Mem Inst Oswaldo Cruz. vol. 104, No 7. (2009);p. 1051-1054.