

**EXPRESIÓN DIFERENCIAL ENTRE FENOTIPOS SENSIBLE Y RESISTENTE
“*IN VITRO*” A BENZNIDAZOL DE ESTADIOS DE *T.CRUZI I***

DORA MILENA VILLAMIL DELGADO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE MICROBIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA
2015**

**EXPRESIÓN DIFERENCIAL ENTRE FENOTIPOS SENSIBLE Y RESISTENTE
“IN VITRO” A BENZNIDAZOL DE ESTADIOS DE *T.CRUZI* I**

DORA MILENA VILLAMIL DELGADO

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

**Directora:
CLARA ISABEL GONZÁLEZ RUGELES
Bactrióloga, MSc, *PhD***

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE MICROBIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA
2015**

Dedico este logro a Dios quien es el motor de mi vida, a mi madre, padre, hermana y novio que los amo con todo mi corazón y a mi sobrinita María Paula quien es la luz de nuestra familia.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Clara Isabel por haberme dado la oportunidad de conocer el mundo de la investigación y por haber sido mi tutora en este trabajo. Igualmente, al apoyo y amor incondicional de mi madre, los consejos de mi hermana, amiga, novio y cuñado, quienes siempre han estado ahí regalándome una sonrisa. También a mis amigas que en este momento están lejos, gracias por enseñarme a ser una mejor persona y finalmente agradezco a mis compañeros de laboratorio por compartir conmigo el día a día.

CONTENIDO

	Pág
INTRODUCCIÓN.....	15
1. MARCO TEÓRICO.....	18
1.1 ENFERMEDAD DE CHAGAS.....	18
1.2 EPIDEMIOLOGIA.....	18
1.3 MECANISMOS DE TRANSMISION.....	20
1.3.1 Vectorial.....	20
1.3.2 Transfusional.....	21
1.3.3 Trasplante de órganos.....	21
1.3.4 Congénita.....	21
1.3.5 Oral.....	22
1.3.6 Accidental.....	22
1.4 FASES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.....	22
1.4.1 Fase aguda.....	23

1.4.2 Fase indeterminada.....	23
1.4.3 Fase crónica.....	23
1.4.3.1 Cardiomiopatía chagásica crónica.....	24
1.4.3.2 Megasíndrome digestivo.....	24
1.5 TRYPANOSOMA CRUZI.....	25
1.5.1 Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	25
1.5.2 Morfología de <i>T. cruzi</i>	27
1.5.2.1 Amastigote.....	27
1.5.2.2 Epimastigote.....	27
1.5.2.3 Tripomastigote.....	28
1.6 GENÉTICA DE <i>T. cruzi</i>	28
1.6.1 ADN extranuclear.....	29
1.6.2 Control de la expresión génica.....	29
1.6.3 Transcripción policistrónica.....	30
1.6.4 Edición del ARN mitocondrial.....	30

1.7 TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.....	31
2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	36
3 OBJETIVOS.....	38
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	38
3.1.2 Objetivos específicos.....	38
4 METODOLOGIA.....	39
4.1 PARASITOS.....	39
4.2 OBTENCION DE LOS ESTADIOS.....	39
4.2.1 Tripomastigote metacíclico.....	39
4.2.2 Tripomastigote sanguíneo.....	40
4.2.3 Amastigote.....	40
4.3 EXTRACION DE PROTEINAS.....	40
4.4 ELECTROFORESIS EN DOS DIMENSIONES (EF-2D).....	41
4.5 ANALISIS DE IMAGEN.....	41
4.6 ANALISIS DE ESPECTROMETRIA DE MASAS MALDI TOF/TOF.....	42

4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	43
5 RESULTADOS.....	44
5.1 ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS.....	44
5.1.1 Amastigote sensible vs resistente.....	44
5.1.2 Tripomastigote sanguíneo sensible vs resistente.....	46
5.1.3 Tripomastigote metacíclico sensible vs resistente.....	48
6. DISCUSION.....	52
7. CONCLUSIONES.....	65
BIBLIOGRAFIA.....	66

LISTA DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Proteínas con expresión diferencial identificadas en el estadio de amastigote sensible vs resistente.....	46
Tabla 2. Proteínas con expresión diferencial identificadas en el estadio de tripomastigote sanguíneo sensible vs resistente.....	48
Tabla 3. Proteínas con expresión diferencial identificadas en el estadio de tripomastigote metacíclico sensible vs resistente.....	50
Tabla 4. Categoría funcional de proteínas expresadas diferencialmente en los estadios de amastigote y tripomastigote metacíclico y sanguíneo.....	51

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Número estimado de inmigrantes con infección por <i>T. cruzi</i> que viven en países no endémicos.....	19
Figura 2. Distribución geográfica de los principales vectores de la ECh.....	21
Figura 3. Historia natural de la ECh en el hombre.....	25
Figura 4. Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	26
Figura 5. Estadios de <i>T. cruzi</i>	27
Figura 6. Transcripción de ARNm y procesamiento en tripanosomátidos....	31
Figura 7. Estructura de los fármacos usados para tratar la ECh.....	32
Figura 8. EF-2D de amastigote.....	44
Figura 9. Intensidad media de la señal de la mancha exclusiva en cada fenotipo.....	45
Figura 10. EF-2D de tripomastigote sanguíneo.....	47
Figura 11. EF-2D de tripomastigote metacíclico.....	49
Figura 12. Proteínas expresadas diferencialmente en los estadios de amastigote, tripomastigote metacíclico y sanguíneo resistentes a BZN.....	64

RESUMEN

TITULO:

EXPRESIÓN DIFERENCIAL ENTRE FENOTIPOS SENSIBLE Y RESISTENTE “*IN VITRO*” A BENZNIDAZOL DE ESTADIOS DE *T. CRUZI I**

AUTOR:

VILLAMIL DELGADO, Dora Milena**

PALABRAS CLAVES:

Benznidazol, *T. cruzi*, mecanismo de resistencia, expresión diferencial, EF-2D, MALDI TOF/TOF.

DESCRIPCIÓN:

El tratamiento de la Enfermedad de Chagas cuenta con solo dos fármacos: Nifurtimox y Benznidazol, los cuales son efectivos en un 70% en fase aguda de la enfermedad, sin embargo en fase crónica no ha sido completamente establecida su utilidad. Adicionalmente, estos fármacos presentan efectos secundarios adversos, eficacia terapéutica variable y se ha reportado cepas de *T. cruzi* naturalmente resistentes al tratamiento, hecho que resalta la importancia de la búsqueda de blancos terapéuticos que permitan el diseño de fármacos alternativos. Teniendo en cuenta que se conocen parcialmente los mecanismos moleculares de *T. cruzi* responsables de la resistencia al Benznidazol en epimastigotes, en este estudio se realizó un análisis comparativo de expresión génica entre un aislado de *T. cruzi I* con resistencia inducida “*in vitro*” al Benznidazol y el aislado susceptible de los estadios de amastigote, tripomastigote metacíclico y sanguíneo, formas del parásito que están directamente relacionadas con el hombre y que son los principales blancos de acción del fármaco. Este análisis se realizó utilizando la técnica de electroforesis en dos dimensiones (EF- 2D) y espectrometría de masa tipo MALDI-TOF/TOF. En general, los geles del fenotipo sensible y resistente mostraron un promedio de 117 manchas peptídicas, detectándose expresión diferencial de 7 manchas en los estadios de amastigote y tripomastigote sanguíneo y 10 en tripomastigote metacíclico. En total 24 proteínas fueron identificadas por espectrometría de masas y agrupadas en tres categorías funcionales relacionadas con el metabolismo del parásito, ensamblaje de citoesqueleto y defensa celular. Las proteínas *triparedoxina*, *triparedoxina peroxidasa*, *biosíntesis lipofosfoglican*, *proteína de choque térmico 83*, *adenilato quinasa*, *tubulina beta* y *barra paraflagelar* tuvieron expresión diferencial en el fenotipo resistente y dado su papel en la protección de *T. cruzi* de los efectos citotóxicos producidos por el fármaco podrían estar implicadas en el mecanismo de resistencia *in vitro* a Benznidazol. *

*Proyecto de grado

** Departamento de Ciencias Básicas. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Directora: Clara Isabel González Rugeles, MSc, PhD.

SUMMARY

TITLE:

DIFFERENTIAL EXPRESSION BETWEEN SENSITIVE AND RESISTANT "IN VITRO" PHENOTYPES TO BENZNIDAZOLE OF *T. CRUZI* / STAGES*

AUTHOR:

VILLAMIL DELGADO, Dora Milena**

KEYWORDS:

Benznidazole, *T. cruzi*, resistance mechanism, differential expression, EF-2D, MALDI TOF/TOF.

DESCRIPTION:

Treatment of Chagas disease has only two drugs: nifurtimox and benznidazole, which are 70% effective in the acute phase of the disease, but in the chronic phase its usefulness has not been fully established. Moreover, these drugs have adverse side effects, variable therapeutic efficacy and it has been reported the existence of *T. cruzi* strains naturally resistant to treatment. All this evidence point out the importance of finding therapeutic targets which enable the development of alternative drugs, given that the molecular mechanisms responsible to resistance of *T. cruzi* to benznidazole is known partially in epimastigotes.

In this study was performed a comparative analysis of gene expression between a Benznidazole-susceptible *T. cruzi* isolate and a Benznidazole-resistant isolate obtained by *in vitro*. This analysis was made in the forms of the parasite that are directly related to man and which are the main targets of drug action: amastigote, metacyclic and blood trypomastigote stages. The comparative analysis was achieved using two-dimensional electrophoresis (2D EF-) and MALDI TOF/TOF Tandem Mass Spectrometry. In summary, the gels of sensitive and resistant phenotypes showed an average of 117 peptide spots of which 7 showed differential expression for amastigote and trypomastigote blood stages and 10 peptide spots for metacyclic trypomastigotes. A total of 24 proteins were identified by mass spectrometry and were grouped into functional categories related to parasite metabolism, cytoskeleton assembly and cell defense.

Some genes with a demonstrated role in the protection of *T. cruzi* against cytotoxic effects produced for the benznidazole were identified as differentially expressed between the phenotypes. Genes such as triparedoxin, peroxidase triparedoxin, lipofosfoglican biosynthesis, heat shock protein 83, adenylate kinase, tubulin beta and paraflagellar bar could be involved in the mechanism of resistance "*in vitro*" to benznidazole.

* Proyecto de grado

** Departamento de Ciencias Básicas; Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas; Directora: Clara Isabel González Rugeles. MSc. PhD.

INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Chagas (ECh) es producida por el parásito protozoario intracelular *Trypanosoma cruzi*. Esta enfermedad está ampliamente distribuida por todo el continente Americano donde 8 millones de personas están infectadas y más de 25 millones están en riesgo de padecer la infección a pesar de las estrategias de control de la infección [OMS, 2015]. En Colombia 1.3 millones de personas están infectadas y 3.6 millones de individuos están expuestos a la infección [Moncayo, 2009].

El parásito *T. cruzi* es un tripanosomátido del orden *Kinetoplastidae*, tiene un ciclo de vida que involucra un insecto vector y un hospedero mamífero. Los epimastigotes representan las formas de replicación encontradas en el vector, los cuales se diferencian a tripomastigotes metacíclicos que son las formas infecciosas transmitidas al hospedero vertebrado incluyendo el hombre, estos invaden las células de diferentes tejidos y se diferencian a amastigotes que se replican por fisión binaria y nuevamente se diferencian a tripomastigotes sanguíneos que rompen las células infectadas e invaden nuevas célula [Rassi, 2010]. La ECh puede ser adquirida a través de las heces de insectos triatominos, transfusión de sangre, transplante de órganos, transmisión congénita, vía oral y por accidente de laboratorio [Rassi, 2010].

La ECh tiene una presentación clínica variable con una fase aguda generalmente asintomática, seguida por la forma indeterminada de la fase crónica sin sintomatología que puede persistir indefinidamente o evolucionar décadas después en un 10% a 30% de los individuos a la fase crónica con síntomas característicos como cardiomiopatía o megasíndromes digestivos [Dutra, 2009]. La razón de esta variabilidad clínica podría estar relacionada con la variabilidad genética del parásito, dado que ésta puede ser un determinante para el tropismo diferencial a tejidos y

consecuentemente, para las formas clínicas de la enfermedad [Mejía, 2005] o por la variabilidad genética del hospedero [Flórez, 2012], [Criado L, 2012].

En la actualidad el tratamiento utilizado en la práctica médica para tratar la infección por *T. cruzi* está centrado en dos fármacos: Nifurtimox (5-nitrofurán) y Benznidazol (2-nitroimidazol). Estos fármacos cuando se administran en la fase aguda de la enfermedad llevan a cura parasitológica en aproximadamente un 70% de los pacientes tratados [Caldas, 2008]. Sin embargo, a pesar de la alta parasitemia de esta fase, en muchos casos la enfermedad no es detectada porque usualmente es asintomática, por lo tanto progresa a una fase crónica donde el tratamiento no produce la erradicación completa del parásito, mostrando una variable actividad tripanocida [Hidron, 2010]; [Rassi, 2010]. Adicionalmente, estos fármacos poseen la desventaja de presentar efectos secundarios adversos, requerir largos periodos de tratamiento y tener una eficacia terapéutica variable [Castro, 2006]. Así mismo, algunas cepas de *T. cruzi* han demostrado ser naturalmente resistentes a estos compuestos, esta resistencia podría ser un factor importante que explique las bajas tasas de cura detectadas en pacientes chagásicos tratados. [Filardi, 1987], [Mejía, 2012]. Dicha resistencia también puede ser inducida experimentalmente por mantenimiento del parásito bajo presión prolongada del fármaco [Nirde, 1995] [dos Santos, 2008].

Dada la toxicidad de estos fármacos, la existencia de cepas naturalmente resistentes al tratamiento y su baja eficacia en las formas crónicas de la enfermedad, surge la necesidad de investigar nuevas dianas quimioterapéuticas. Una estrategia muy utilizada para esta búsqueda ha sido el análisis proteómico mediante electroforesis en dos dimensiones y posterior identificación de las proteínas por espectrometría de masas. Esta técnica en los tripanosomátidos es particularmente importante para el estudio global de la expresión génica debido a que estos organismos no utilizan la iniciación de la transcripción como un paso obligado para controlar la expresión de genes, dado que la regulación de la expresión génica se

da posterior a la transcripción por mecanismos de “*transplicing*”, control de estabilidad o traducción de los RNAm específicos [Clayton, 2007].

1. MARCO TEORICO

1.1 ENFERMEDAD DE CHAGAS

T. cruzi el agente causal de la ECh es un parásito protozoario intracelular, perteneciente al Orden: Kinetoplastida, Familia: Tripanosomatidae, Género: *Trypanosoma* y Grupo: *Stercolaria*.

Esta enfermedad es una zoonosis en la cual el hombre ha entrado accidentalmente a formar parte de su ciclo. Fue descubierta en 1909 por el médico brasileño Carlos Chagas, quien ha sido el único investigador en la historia de la medicina en describir de una forma completa una nueva enfermedad infecciosa, su patógeno, su vector, su hospedador, sus manifestaciones clínicas y su epidemiología [Romaña, 1956].

1.2 EPIDEMIOLOGÍA

El origen y distribución de la ECh en América Latina data de la época precolombina, dado que, se encontraron indicios de presencia de *T. cruzi* en momias de más de 4000 años de antigüedad. [Gulh, 2000]. Sin embargo se cree que la asociación de *T. cruzi*-triatominos-seres humanos se originó 2000 años A.C, cuando los humanos comenzaron a convivir con los triatominos al irrumpir en su ambiente mediante procesos de deforestación, construcción de viviendas y disminución del número de animales salvajes, lo que obligó a estos vectores a buscar nuevos nichos en áreas domésticas y a utilizar al hombre como una fuente de alimento. Esta enfermedad está fuertemente asociada a la pobreza y al limitado desarrollo socioeconómico de las poblaciones humanas afectadas, en particular, a pobres condiciones habitacionales.

La ECh es considerada un problema de salud pública de importancia mundial, dado que está ampliamente distribuida por todo el continente Americano y como consecuencia de los procesos migratorios y de globalización de la población mundial

ocurrida en las últimas décadas, en zonas que antes se consideraban no endémicas, como Canadá, Estados Unidos y algunos países de Europa y Asia [Rassi, 2010] (Figura 1).

Reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) estiman que entre 6 y 8 millones de personas están infectadas y más de 25 millones están en riesgo de padecer la infección [OMS, 2015]. En Colombia cerca del 5% de la población está infectada y 20% está en riesgo de transmisión [DE, T. D. L. E, 2015].

La infección por *T. cruzi* en Colombia, se ha detectado con frecuencia a lo largo del valle del río Magdalena, en la región del Catatumbo, la Sierra Nevada de Santa Marta, el piedemonte de los llanos orientales y la serranía de la Macarena. Los departamentos que presentan una mayor endemia son: Casanare, Arauca, Santander, Norte de Santander, Cundinamarca, Boyacá, Meta, Tolima, Huila y Bolívar [Gulh, 2007].

Figura 1. Número estimado de inmigrantes con infección por *T. cruzi* que viven en países no endémicos.



Fuente: Rassi, 2010

1.3 MECANISMOS DE TRANSMISIÓN

La infección puede ser adquirida a través de las heces de insectos triatomínicos, transfusión de sangre, trasplante de órganos, transmisión congénita, vía oral y por accidente de laboratorio.

1.3.1 Vectorial. La transmisión vectorial se considera el mecanismo primario de difusión de la ECh, ya que de él dependen las otras formas de transmisión. En esta vía el hombre o animales domésticos y silvestres son infectados por heces liberadas por triatomínicos que son puestas sobre la piel y penetran al torrente sanguíneo a través de la herida producida por la picadura del insecto o por penetración directa a mucosas de ojos, boca y nariz.

Existen más de 140 especies de triatomínicos identificados pero solo unos pocos son vectores competentes para *T. cruzi*, entre ellos *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis* y *Panstrongylus megistus*, que se encuentran distribuidos en países del cono sur; *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* en la región Andina y partes de América central y *Triatoma dimidiata* y *barberi* en Méjico [Rassi, 2012]. La probabilidad de que estos triatomínicos sean infectados con *T. cruzi* aumenta de acuerdo con el número de ingestas de sangre, por lo tanto, los estadios más viejos y los adultos tienden a tener las tasas más altas de infección [Rassi, 2010] (Figura 2).

T. cruzi se transmite a más de 150 reservorios domésticos (perros y gatos) y silvestres (zarigüeyas, micos, macacos y armadillos, entre otros), a través de las heces de vectores infectados y mediante la ingesta de alimentos contaminados.

Figura 2. Distribución geográfica de los principales vectores de la ECh.



Fuente: Gulh, 2007

1.3.2 Transfusional. La ECh puede ser transmitida al hombre por mecanismos no vectoriales como la transfusión de sangre contaminada. En esta vía el riesgo de adquirir la enfermedad es menor de un 10-20%, dado que esto depende de varios factores como la concentración de parásitos en la sangre del donante, el componente de sangre transfundida y la cepa infectante [Schmunis, 1999].

1.3.3 Trasplante de órganos. La transmisión de la ECh por esta vía se ha reportado principalmente en trasplante de riñón de donadores infectados. Otras posibles causas de transmisión son el trasplante de corazón, médula ósea y páncreas de donantes vivos y muertos. Estos casos se han notificado en Argentina, Brasil, Chile y Venezuela [OMS, 2002].

1.3.4 Congénita. La transmisión congénita ocurre más o menos en el 5% de los embarazos de mujeres con infección crónica. La transmisión por esta vía depende

de la cepa infectante, estado inmunológico de madres infectadas y factores placentarios. El diagnóstico precoz y el tratamiento temprano de los niños infectados es vital, dado que el índice de curación alcanza un 90% cuando el tratamiento se inicia rápidamente, pero cuando el niño no es tratado un 10-40% de estos desarrollan cardiomiopatía crónica y están sujetos a morbilidad y mortalidad significativa. Esta vía es relativamente más frecuente en aquellas regiones donde el control de la transmisión vectorial y transfusional están resueltos.

1.3.5 Oral. La ECh transmitida por vía oral es generalmente responsable de brotes regionales de infección aguda en zonas desprovistas de domiciliación de insectos vectores. La ingestión de alimentos contaminados como el jugo de la caña de azúcar, jugo de fruta açai, o carne cruda se asocia generalmente con infestación parasitaria masiva, lo que resulta en un cuadro clínico agudo severo y alta mortalidad, presentando peor pronóstico mientras menor sea la edad del paciente [Toso, 2011].

1.3.6. Accidental. Ocurre en personas que tienen contacto directo con el parásito en los laboratorios clínicos o de investigación y que fortuitamente presentan un accidente biológico con las formas infectantes de *T. cruzi*. Si la infección se confirma se debe iniciar tratamiento en forma inmediata y se debe realizar estudio serológico a los 15, 30 y 60 días después del accidente.

1. 4 FASES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

La ECh presenta un cuadro clínico variable con tres etapas de infección: aguda, indeterminada y crónica. Dicha variabilidad podría estar relacionada con la inestabilidad genética del parásito [Teixeira, 2011].

1.4.1. Fase aguda (FA). La fase aguda, se caracteriza por presentar alta parasitemia que persiste generalmente durante 4-8 semanas y se resuelve espontáneamente. En la mayoría de los individuos la infección aguda es asintomática por su baja carga parasitaria y por la competencia del sistema inmune, sin embargo, un pequeño porcentaje de pacientes (5-10%), principalmente niños menores de 10 años desarrollan manifestaciones clínicas importantes como malestar general, fiebre prolongada, edema, hepatomegalia, esplenomegalia y linfadenopatias o síntomas graves como insuficiencia cardiaca y meningoencefalitis que pueden comprometer la vida del paciente.

En esta fase inicial aguda, cuando la transmisión es vectorial la persona afectada presenta signos de puerta de entrada de *T. cruzi*, si el ingreso es a través de la piel se despliega una reacción inflamatoria o nódulo conocido como “Chagoma” y si la infección se localiza en las mucosas oculares se desarrolla una lesión local conocida como “signo de Romaña”. Esta lesión se caracteriza por edema indoloro unilateral del párpado y de los tejidos perioculares [Coura, 2007].

Aproximadamente 2 meses después de la primo infección el balance inmunológico entre el parásito y el hospedador reduce el número circulante de tripomastigotes sanguíneos, por lo tanto la fase aguda pasa a un periodo de latencia o forma indeterminada de la fase crónica.

1.4.2. Fase indeterminada (FI). Etapa clínicamente infecciosa, sin síntomas o anomalías electrocardiográficas y/o radiológicas en el corazón, esófago o colon. Esta fase puede persistir indefinidamente o evolucionar décadas después, en un 10-30% de los pacientes a la fase crónica.

1.4.3. Fase crónica (FC). En esta fase de la enfermedad el paciente 10–20 años después de la infección inicial presenta síntomas característicos como cardiomiopatía o mega-síndromes digestivos o ambos. La gran diversidad de formas

clínicas, severidad y naturaleza de la infección crónica en la ECh son atribuibles a una serie de interacciones complejas entre la constitución genética del parásito, del hospedador humano y factores ambientales [Campbell, 2004].

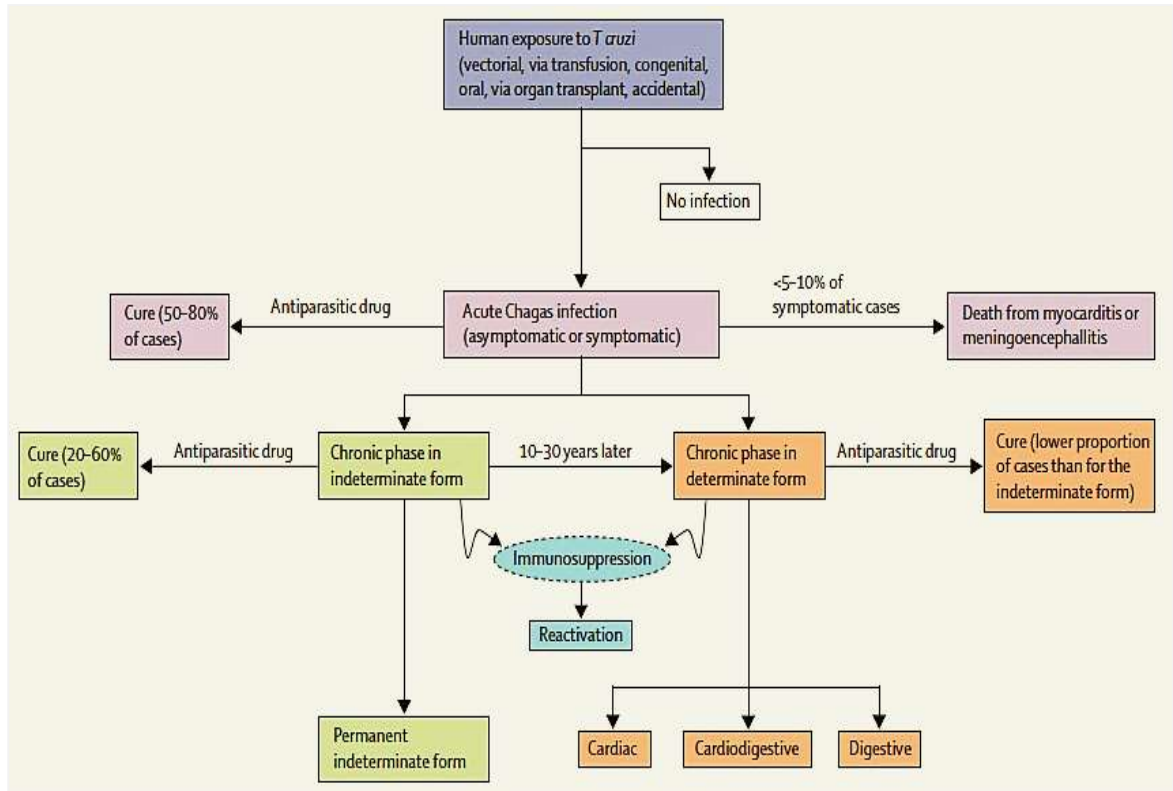
1.4.3.1 Cardiomiopatía chagásica crónica (CCC). Es la manifestación clínica más grave de la ECh, es una forma inflamatoria de miocardiopatía dilatada que conduce a una amplia fibrosis cardíaca y un deterioro progresivo de la función contráctil ventricular. Estudios anatomopatológicos demuestran una notable despoblación neuronal en esta fase, asociada a una regulación anormal del sistema autónomo cardíaco que desencadenan en el paciente arritmias malignas y muerte súbita. Dichas alteraciones cardiovasculares son consecuencia de tres procesos patológicos: inflamación, muerte celular y fibrosis [Marin-Neto, 2009]. Adicionalmente, la CCC expresa tres síndromes principales que puede coexistir en el mismo paciente: insuficiencia cardíaca, disritmia cardíaca y tromboembolia sistémica y pulmonar, que conllevan a disnea, palpitaciones, mareo, síncope, dolor torácico, fatiga y edema. Actualmente, se está desarrollando el proyecto *BENZnidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis* (BENEFIT), que examina científicamente el tratamiento usado en primera línea para tratar la ECh (Benznidazol) en pacientes con CCC [Marin-Neto, 2009].

1.4.3.2 Megasíndrome digestivo. Es un estado patológico que involucra un aumento del tamaño del esófago (megaesófago) y del colon (megacolon) con importante hipertrofia de la capa muscular de estos órganos. El cuadro clínico digestivo de los pacientes chagásicos crónicos puede consistir en disfagia, vómitos, epigastralgia, constipación, odinofagia y sialosis, que se presentan en forma aislada o asociada.

Los síndromes clínicos predominantes dependerán del sector digestivo más comprometido, originándose trastornos de la deglución si el más afectado es el esófago, trastornos de la secreción en el caso del estómago y glándulas salivales,

trastornos de la absorción si el duodeno e intestino están alterados y trastornos de la eliminación en el caso de que el colon sea el órgano enfermo [Coura, 2007].

Figura 3. Historia natural de la ECh en el hombre.

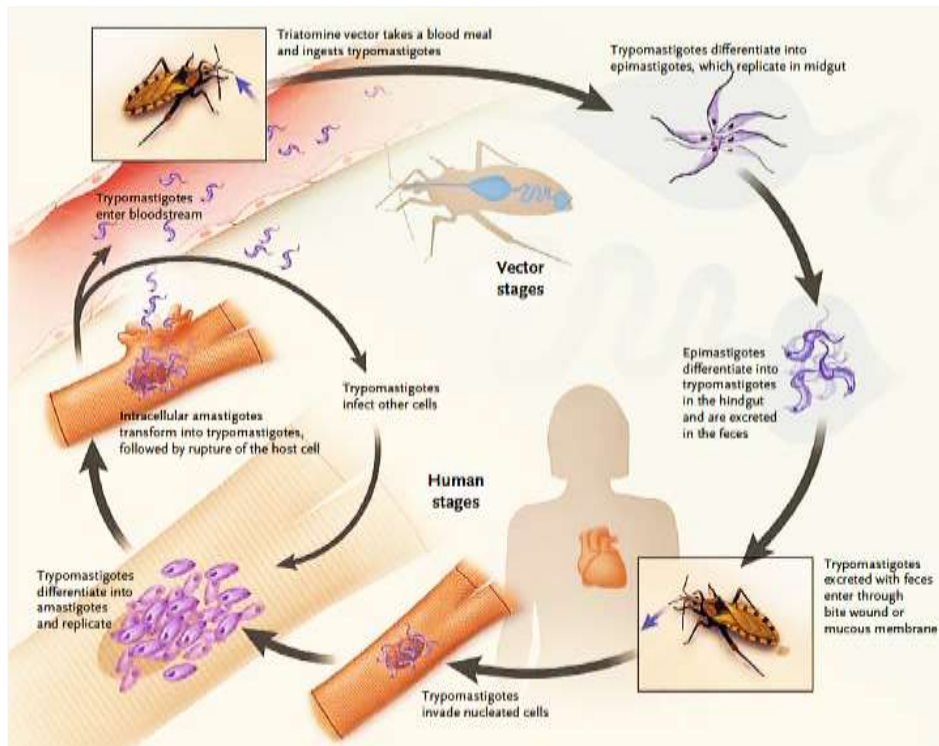


Fuente: Rassi, 2010

1.5 TRYPANOSOMA CRUZI

1.5.1 Ciclo de vida de *T. cruzi*. El parásito intracelular *T. cruzi* tiene un ciclo de vida complejo que involucra un insecto vector y un hospedero vertebrado (entre los que se encuentra diversas especies de mamíferos). Durante este ciclo presenta cuatro formas o estadios principales (epimastigote, tripomastigote metaciclífico, amastigote y tripomastigote sanguíneo), [Tyler, 2001].

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



Fuente: Caryn Bern, 2011

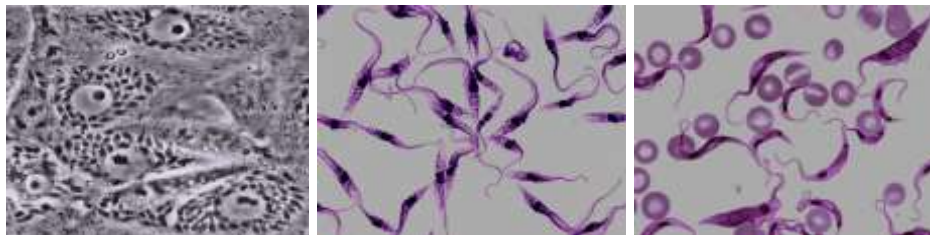
Los insectos se infectan al ingerir sangre de animales o seres humanos con tripomastigotes circulantes. En el tracto digestivo de los triatóminos, los tripomastigotes se diferencian en epimastigotes y luego a tripomastigotes metacíclicos en la parte final del intestino. La infección de los mamíferos se produce cuando entran en contacto con los tripomastigotes metacíclicos infecciosos, formas del parásito que son eliminadas con las heces de los triatóminos después de la alimentación. Este contacto se produce a través de la mucosa o por lesión causada por la picadura. Una vez en el hospedero vertebrado, los tripomastigotes metacíclicos invaden las células locales del tejido retículo endotelial y conectivo y se diferencian en amastigotes que empiezan a replicarse por fisión binaria y luego cuando la célula se llena, se diferencian de nuevo en tripomastigotes que rompen las células e invaden tejidos adyacentes y se distribuyen a través de los vasos sanguíneos a sitios distantes, principalmente las células del músculo cardíaco, liso

y esquelético y células ganglionares, donde experimentan ciclos adicionales de multiplicación intracelular. El ciclo de transmisión se completa cuando los tripomastigotes circulantes son absorbidos en la sangre ingerida por vectores [Rassi, 2012]. (Figura 4).

1.5.2 Morfología de *T. cruzi*. El protozooario *T. cruzi* tiene tres formas evolutivas morfológicamente identificadas por microscopía óptica: amastigotes, epimastigotes y tripomastigotes. Estas formas del parásito se diferencian en la posición del cinetoplasto en relación al núcleo de la célula y en la aparición del flagelo.

1.5.2.1 Amastigote. Forma intracelular y replicativa de *T. cruzi*. Mide aproximadamente 4 micras de diámetro, carece de un flagelo externo y una membrana ondulante, por lo que su movimiento es solo rotativo y se multiplica por fisión binaria longitudinal cada 12 horas y antes de romper las células de los hospederos vertebrados se transforma en tripomastigotes sanguíneos. El cinetoplasto se ve como un cuerpo oscuro cerca del núcleo (Figura 5A).

Figura 5. Estadios de *T. cruzi*



Fuente: **A.** Amastigotes intracelulares, desde infección “*in vitro*” de células Vero [GIEM]. **B.** Epimastigotes de *T. cruzi*, desde cultivo líquido. **C.** Tripomastigotes de *T. cruzi*, desde sangre periférica. [<http://www.cdc.gov.html>]

1.5.2.2 Epimastigote. Forma intracelular y replicativa de *T. cruzi* presente en el tracto digestivo de los triatominos y en las glándulas anales de las zarigüeyas. Presenta un flagelo libre y una membrana ondulante que mide aproximadamente de 20-40 micras, su cinetoplasto se encuentra anterior al núcleo y el nucleolo se ubica

en la parte central de este. Estas formas de *T. cruzi* son bastantes móviles, por lo cual presentan una intensa actividad replicativa. (Figura 5B).

1.5.2.3 Tripomastigote. Forma extracelular, no replicativa e infectiva.

Existen dos clases de tripomastigotes: el **tripomastigote sanguíneo** que se encuentra en el hospedero vertebrado y se observa en sangre y otros fluidos corporales como el líquido cefalorraquídeo (LCR) y el **tripomastigote metacíclico** que se encuentra en las porciones finales del intestino (tubos de Malpighi) del insecto vector. Estos tripomastigotes se asemejan morfológicamente, dado que ambos poseen un flagelo que emerge del corpúsculo basal, el cinetoplasto se encuentra localizado posterior al núcleo y una membrana ondulante, pero tienen grandes diferencias a nivel de expresión génica (Figura 5C).

1.6 GENÉTICA DE *T. CRUZI*

Al inicio de los años 90 con el advenimiento de los proyectos genomas de diversos organismos, la comunidad científica que trabajaba con *T. cruzi*, *Leishmania* y *T. brucei* comienza a discutir la posibilidad de iniciar proyectos genoma de estos parásitos. Posteriormente, en abril de 1994, el *grupo de Chagas* decide iniciar el proyecto, seleccionando como cepa blanco a la CL (“clon F11F5”), en adelante denominado CL-Brener, en homenaje al Dr. Zigman Brener, que aisló la cepa y el clon. Esta elección se basó en que este clon era estable y disponible, estaba bien caracterizado bioquímica y parasitológicamente, era aislado de caso humano o de ciclo doméstico, era de fácil cultivo *in vitro*, sensible a las drogas utilizadas en el tratamiento de la ECh y era considerado representativo para el universo de cepas circulantes de *T. cruzi* [El-Sayed, 2005].

La secuencia genómica de *T. cruzi* CL-Brener es oficialmente publicada junto con las secuencias genómicas completas de *L. major* y *T. brucei*, en la revista *Science*

en 2005 [El-Sayed, 2005]. El montaje del genoma fue apenas parcial, debido a muchas dificultades con las secuencias repetitivas y con la heterocigosis del clon.

En particular, el trabajo en *T. cruzi* reveló la naturaleza diploide de su genoma y estimó que comprende aproximadamente 110 Mpb, en las cuales inicialmente se identificaron 22.570 marcos de lectura abierto, de estos a la mitad, no se les ha asignado ninguna función basada en homología de proteínas. Así mismo, este genoma mostró un alto contenido de secuencias repetidas, alcanzando un 50% del mismo, estas secuencias en repetición en su mayoría son familias de genes que codifican para proteínas de superficie del parásito, como las trans-sialidasas, mucinas, gp63 proteasa y proteínas asociadas a mucinas (MASP), que representan cerca de 18% de todas las secuencias codificantes [El-Sayed, 2005].

1.6.1 ADN extranuclear. *T. cruzi* y otros tripanosomátidos poseen una malla o red de ADN extra nuclear localizada en la mitocondria llamado cinetoplasto. Este ADN celular (ADNk) representa el 10-20% de ADN total y está estructurado por la concatenación de dos tipos de moléculas circulares: los minicírculos y los maxicírculos: los minicírculos forman la mayor parte de la estructura (5000-10 000 moléculas por célula), son moléculas circulares de ADN que codifican pequeños ARNs que participan en el procesamiento (por edición) de ARNs mensajeros mitocondriales. Los maxicírculos son moléculas mayores de ADN, que se encuentran en menor número que los minicírculos (50 copias por célula) y representan el equivalente al ADN mitocondrial de otros eucariotas, dado que codifican para proteínas y ARNr. Los ARNt mitocondriales son codificados en el núcleo e importados a la mitocondria [Simpson, 2000].

1.6.2 Control de la expresión génica en tripanosomátidos. La organización genética y las secuencias génicas de tripanosomátidos contienen numerosas particularidades que sitúan a estos organismos en el “borde genético” entre los organismos eucariotas y procariotas. Estos comparten características con

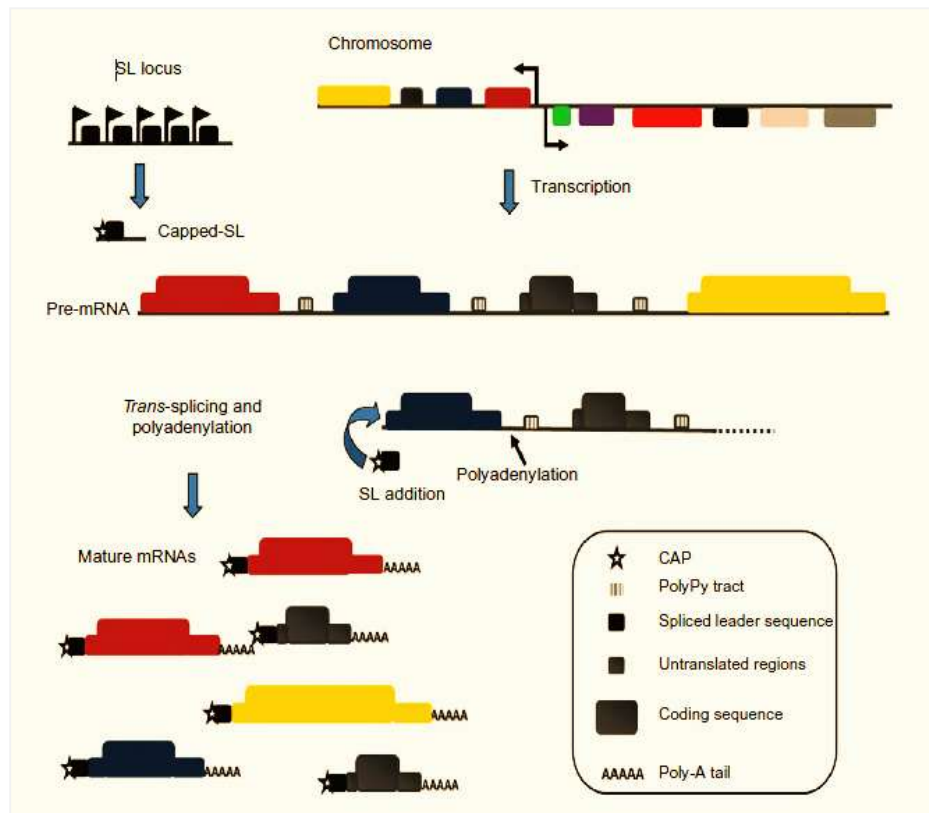
procariotas como genes sin intrones y transcripción policistrónica y con eucariotas como procesamiento del pre-ARNm y otras características individuales inherentes a esta familia como son los genes codificantes de proteínas sin promotores [El-Sayed, 2005]. Por tanto, debido a que los genes codificantes de proteínas de tripanosomátidos poseen largas unidades policistrónicas, los niveles de control de la expresión génica actúan a niveles post-transcripcionales mediante un mecanismo de corte y empalme denominado ‘trans-splicing’ y edición del ARNm.

1.6.3 Transcripción policistrónica. El genoma de *T. cruzi* está organizado en grandes agregados o grupos de genes codificantes de proteínas, los cuales, a diferencia de los operones de procariotas, no están compuestos por genes funcionalmente relacionados entre sí [Palenchar, 2006]. Estos grupos son sustrato de la ARN polimerasa II, la cual da lugar a grandes transcritos policistrónicos que luego deben ser procesados a ARNm monocistrónicos maduros para poder ser traducidos. El procesamiento de estos mensajeros implica la adición de un ARN líder (o “Splice Leader SL”) o mini-exón en el extremo 5' de cada futuro ARNm maduro mediante trans-splicing, evento de corte y empalme que involucra dos moléculas diferentes de ARN. Este ARN líder aporta la caperuza 5' del mensajero maduro. Los genes del ARN líder forman grandes grupos repetidos en tándem a lo largo del genoma, cada copia posee su promotor individual para la ARN polimerasa II y da lugar a un transcrito precursor de 140 nt que luego del proceso de maduración resulta en alrededor de 39 bases en el 5' UTR del ARNm maduro, este fenómeno trans-splicing está acoplado a la poli-adenilación del extremo 3' del transcrito codificante adyacente previo en el policistrón. De esta forma se obtienen como producto los diferentes ARNm maduros individuales [Haile, 2007].

1.6.4 Edición del RNA mitocondrial. Es un mecanismo de maduración a través de ARNs guías (ARNg) que consiste en la inserción o delección de uridinas (U) del pre-ARNm mitocondrial como proceso post transcripcional. La función de los ARNg,

luego de muchos años de investigación, fue atribuida a las secuencias codificadas en los minicírculos [Simpson, 2000].

Figura 6. Transcripción de ARNm y procesamiento en tripanosomátidos.



Fuente: Araujo, 2011

1.7 TRATAMIENTO DE LA ECh

En la actualidad la ECh no dispone de vacuna y su tratamiento está limitado a solo dos fármacos disponibles: Nifurtimox, 5-nitrofurán (NFX), (Bayer) y Benznidazol, 2-nitroimidazol, (BZN), (Roche). Estos agentes son compuestos nitroheterocíclicos que contienen en su estructura un grupo nitro estable unido a un anillo de furano (NFX) o a un anillo de imidazol (BZN) (Figura 7) y actúan como profármacos. Es decir, requieren ser activados dentro del parásito por una enzima nitroreductasa

Adicionalmente, este tipo de enzima NTR además de reducir los derivados nitroimidazólicos como el BZN y nitrofuranos como el NFX también participa en la reducción de otros nitrocompuestos como los nitrobencenos, nitrofenoles, nitrobenzoatos y nitrotoluenos.

La segunda enzima NTR que participa en el metabolismo de compuestos nitroheterocíclicos es la NTR tipo II, sensible al oxígeno. Esta enzima media la reducción de un electrón del grupo nitro estable generando un radical nitro anión, molécula que en presencia de oxígeno es reoxidada de nuevo al compuesto original por un ciclo redox o futil, produciendo concomitantemente aniones superóxido que causan daño celular oxidativo [Alsford, 2013]; [Hall, 2012]; [Wilkinson, 2008]. Investigaciones iniciales apuntaban a que el daño que causaban estos fármacos nitroheterocíclicos en el parásito, estaba dado por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), moléculas que se creía podían resultar perjudiciales para este, incluso llevándolo a su muerte. Sin embargo, ahora se sabe que *T. cruzi* posee defensas antioxidantes que lo hacen refractable a ambientes oxidativos, por lo que es poco probable que la producción de ROS afecte su viabilidad. Adicionalmente la activación del BZN en *T. cruzi* no lleva a la producción de ROS [Mejía, 2012].

El tratamiento de la ECh es efectivo en la fase aguda, con cura en aproximadamente un 70% de los pacientes tratados oportunamente, mientras en fase crónica su actividad tripanocida es variable [Hidron, 2010], [Rassi, 2010]. Esta diferencia en la actividad antiparasitaria entre las fases aguda y crónica de la enfermedad es desconocida, pero podría estar relacionada con una mayor eficacia contra las formas extracelulares de *T. cruzi* presentes en la fase aguda, que contra las intracelulares que causan la enfermedad crónica [Caldas, 2008]. Adicionalmente, estos fármacos poseen la desventaja de presentar efectos secundarios adversos, requerir tratamientos prolongados y tener una eficacia terapéutica variable. Entre los efectos secundarios se incluyen la toxicidad del sistema nervioso central,

leucopenia, debilidad muscular y dermatitis severa [Coura, 2002]; [Castro, 2006]; [Wilkinson, 2009].

Se ha demostrado que ciertas cepas de *T. cruzi* presentan resistencia natural al NFX y BNZ [Filardi, 1987] [Mejía, 2012], esta resistencia podría ser un factor importante que explique las bajas tasas de cura detectadas en pacientes chagásicos tratados. Dicha resistencia también puede ser inducida por el mantenimiento del parásito bajo presión prolongada del fármaco [dos Santos, 2008]. Así mismo, Se ha reportado falla terapéutica en ECh aguda vía transmisión oral en países de Venezuela y Brasil, ya que se detectaron serologías persistentemente positivas en algunos pacientes infectados años atrás [das Neves Pinto, 2013].

Las bases moleculares de la resistencia en *T. cruzi* no se entienden en su totalidad, estudios de resistencia a fármacos realizados en epimastigotes han reportado la participación de proteínas asociadas con el metabolismo del parásito [Campos, 2009]; [dos Santos, 2012] y la defensa antioxidante [Andrade, 2008], [Nogueira, 2009]. También se han observado alteraciones en la expresión de proteínas relacionadas con el metabolismo del fármaco, como la pérdida de una copia del gen que codifica la TcNTR que causa resistencia cruzada a una alta gama de fármacos [Wilkinson 2008] y mutaciones puntuales independientemente adquiridas en este mismo gen, que se correlacionan con la incapacidad de unión de TcNTR con su cofactor el FMN y a su vez con la no activación de estos compuestos [Mejía, 2012]. Adicionalmente, en este fenotipo de resistencia también se ha reportado la asociación de la bomba de eflujo de la glicoproteína P, una bomba dependiente de energía que transporta sustancias a través de la membrana y que está asociada con el fenotipo de resistencia a múltiples fármacos (MDR). En *T. cruzi*, los parásitos con resistencia inducida al BZN mostraron una mayor actividad de la bomba de eflujo y una mayor expresión de los genes que codifican dicha proteína [Campos, 2013]. En conclusión, existe más de un mecanismo en *T. cruzi* que actúa en concierto para proporcionar resistencia a los medicamentos [Campos, 2014].

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el tratamiento de la ECh se dispone de solo dos fármacos, los cuales presentan eficacia limitada en fase crónica y efectos secundarios adversos. Adicionalmente, se ha descrito una baja actividad anti-parasitaria por la existencia de parásitos naturalmente resistentes a ellos. Es por eso que numerosas investigaciones se han enfocado en conocer los mecanismos de resistencia de *T. cruzi* para diseñar nuevos fármacos que inhiban rutas propias del parásito y que no estén presentes en el humano. Sin embargo, la mayoría de estas investigaciones se han realizado en el estadio de epimastigote que es la forma parasitaria del vector y del cultivo y no la que está presente en el hospedero. Por esta razón, en el presente estudio se trabajaron los estadios de amastigote y tripomastigote metacíclico y sanguíneo, formas del parásito directamente relacionadas con el hombre, y por tanto importantes como principales blancos de acción del fármaco. Adicionalmente, en este trabajo por primera vez en este tipo de estudios se utilizó un clon de un aislado de caso agudo humano de posible transmisión oral, dado que se ha reportado falla terapéutica en brotes presentados en Brasil y Venezuela a pesar de tratamientos prolongados.

Teniendo en cuenta que no se conocen completamente los mecanismos moleculares de *T. cruzi* responsables de la resistencia a BNZ y que las proteínas son finalmente las responsables del fenotipo celular, en este estudio se realizó un análisis comparativo de expresión génica en los estadios de amastigote y tripomastigote metacíclico y sanguíneo de un aislado de *T. cruzi* I con resistencia inducida “*in vitro*” al Benznidazol y el aislado susceptible, utilizando la técnica de electroforesis en gel de dos dimensiones (EF-2D) y espectrometría de masas (MS). Esta información nos permitiría identificar en una primera etapa, proteínas potencialmente involucradas en la resistencia a este fármaco para hacer estudios

más precisos en aquellas cuya función esté más relacionada con la resistencia y que podrían ser utilizadas como posibles blancos terapéuticos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión diferencial entre el fenotipo susceptible y resistente al Benznidazol de los estadios de amastigote y tripomastigote metaciclístico y sanguíneo de un aislado de *T. cruzi* I obtenido de paciente con Chagas agudo, en el que se indujo resistencia “*in vitro*” al BZN, para identificar las proteínas posiblemente implicadas en el fenotipo de resistencia.

3.1.2 Objetivos específicos

- Identificar las proteínas diferencialmente expresadas entre los fenotipos sensible y resistente “*in vitro*” al Benznidazol, de cada estadio estudiado (amastigote, tripomastigote metaciclístico y sanguíneo).
- Determinar las proteínas potencialmente asociadas con el fenotipo de resistencia.
- Analizar el posible papel de estas proteínas en el fenotipo de resistencia.

4 METODOLOGÍA

4.1 PARÁSITOS

En este estudio se analizó el fenotipo sensible y resistente “*in vitro*” a Benznidazol [48uM] del clon 1 (cl1) obtenido a partir del aislado MHOM/CO/08/JCR, proveniente de un paciente con Chagas agudo residente en región endémica del departamento de Santander, Colombia, previamente caracterizado como *T. cruzi I* por técnicas moleculares.

4.2 OBTENCIÓN DE LOS ESTADIOS

4.2.1 Tripomastigote metacíclico. Epimastigotes sensibles y resistentes “*in vitro*” al BNZ se diferenciaron a tripomastigotes metacíclicos en medio TAU. Para ello los epimastigotes se cultivaron en medio LIT por 14 días, manteniendo la concentración del fármaco para los parásitos resistentes, luego se centrifugaron y el precipitado se resuspendió en 20 ml de TAU. Tras contar en hemocitómetro y ajustar la cantidad de parásitos (6×10^8 parásitos/ml), se incubó por 2 horas a 37°C; finalmente dicha concentración se resuspendió en 89 ml de medio TAU + 10ml de TAU 3AAG para ser incubados a 28°C por 72 horas. A partir de este tiempo se recuperaron las formas metacíclicas y se purificaron mediante la columna de afinidad DEAE. El control de crecimiento y transformación se realizó mediante recuento en hemocitómetro y determinación de la proporción de tripomastigotes metacíclicos. Dado que, en el proceso de diferenciación de epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos los parásitos no estuvieron bajo presión del medicamento por 72 horas, al término de estas cuando se obtuvieron las formas diferenciadas se verificó el mantenimiento del fenotipo de resistencia a BZN, tal como se ha descrito en la literatura con la conservación del fenotipo resistente luego de seis meses de subcultivo sin la presión del fármaco [Nirdé, 1995] [León, 2013],

4.2.2 Tripomastigote sanguíneo. La obtención de los tripomastigotes sanguíneos se realizó a partir de la infección de células Vero (ATCC CCL81) con 5×10^6 tripomastigotes resuspendidos en medio DMEM. Los tripomastigotes infectivos fueron el resultado de la diferenciación de los epimastigotes cuando se sometieron a estrés nutricional. Pasados 4 días de la infección con el clon sensible y 10 días con clon resistente se obtuvieron en el sobrenadante los tripomastigotes sanguíneos que fueron recogidos por centrifugación diferencial y almacenados a -70°C hasta su uso. Los clones resistentes en cultivo celular estuvieron permanentemente expuestos a BZN.

4.2.3 Amastigote. Los amastigotes fueron obtenidos por incubación de los tripomastigotes sanguíneos en medio LIT suplementado con 10% de SBF a 37°C en 5% de CO_2 . El tiempo de incubación necesario para la amastigogénesis del clon resistente fue de 18 horas y del clon sensible de 22 horas. Los clones resistentes fueron expuestos al fármaco permanentemente.

4.3 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Los parásitos sensibles y resistentes '*in vitro*' a BNZ de cada estadio, se recolectaron por centrifugación y los precipitados se lavaron tres veces con PBS a pH 7,4 y 0,9 % de NaCl a 4°C . Las proteínas se extrajeron por incubación de los parásitos en solución tampón de lisis que contiene 40 mM de Tris base, 7 M de úrea, 2 M de tioúrea, 4 % de CHAPS y 1 mM de PMSF. Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente con agitación constante, los parásitos lisados se centrifugaron por 30 minutos a 13.000 rpm, para remover todo el material particulado y el sobrenadante resultante se utilizó para realizar el isoelectroenfoque. Las proteínas se cuantificaron siguiendo el método de Bradford [Bradford, 1976].

4.4 ELECTROFORESIS EN DOS DIMENSIONES (EF- 2D)

Los extractos solubles de proteínas se aplicaron a tiras con gradiente de pH inmovilizado de 7 cm, con un rango de pH de 5 a 8. Las tiras se rehidrataron durante 16 horas a temperatura ambiente. Después de la rehidratación, se llevó a cabo el isoelectroenfoco sobre un sistema IEF (BioRad) a 22°C, usando el siguiente protocolo: 20 minutos a 250 V y 2 horas a 4.000 V, hasta alcanzar 80.000 V/hora. Antes de la electroforesis en poliacrilamida, las tiras IPG (gradiente inmovilizado de pH) se sometieron a reducción y alquilación, incubándolas durante 15 minutos en una solución con 6 M de úrea, 30% de glicerol, 2% de SDS y 125 mM de DTT y 15 minutos en la misma solución tampón en la que se reemplazó el DTT por 125 mM de iodoacetamida.

Posteriormente, las proteínas se separaron en función de su masa molecular (segunda dimensión), colocando las tiras equilibradas sobre geles de poliacrilamida al 12% en presencia de SDS. La electroforesis se llevó a cabo usando el sistema Miniprotean® (BioRad, Hércules, CA, USA), a un voltaje de 150 V a 20°C. Los geles se colorearon con azul de Coomassie coloidal G-250 y se documentaron usando un densitómetro (BioRad).

4.5 ANÁLISIS DE IMAGEN

Tres réplicas de geles teñidos de cada estadio y fenotipo de *T. cruzi* estudiado, fueron digitalizados utilizando el sistema de imagen ChemiDoc™ MP (BioRad). Las imágenes generadas se analizaron utilizando el software de análisis PDQuest 8.0.1 (BioRad). En este análisis todas las imágenes fueron editadas bajo el mismo patrón y un gel maestro fue creado usando tres réplicas de cada muestra. La intensidad de la señal se calculó teniendo en cuenta el área y la intensidad de cada mancha seguida por normalización, en donde la cantidad de cada mancha en un gel es dividida por el valor total de la intensidad de todos los píxeles en la imagen.

El análisis de los datos se realizó mediante la comparación de la expresión de proteínas entre tres grupos establecidos: tripomastigotes metacíclicos sensibles vs tripomastigotes metacíclicos resistentes, tripomastigotes sanguíneos sensibles vs tripomastigotes sanguíneos resistentes y amastigotes sensibles vs amastigotes resistentes. Una vez determinados los patrones de expresión proteica para cada uno de los grupos, se realizó un estudio comparativo analizando las diferencias cualitativas: presencia/ausencia de manchas en cada uno de los grupos y cuantitativas: niveles de expresión de las manchas, en este análisis se aplicó la prueba estadística *T de student*, con el fin de comparar e identificar en los tres grupos un conjunto de proteínas con diferencias estadísticamente significativas.

4.6 ANÁLISIS DE ESPECTROMETRÍA DE MASA (MS) TIPO MALDI-TOF/TOF

Previo al análisis de espectrometría de masas, las manchas proteicas sobre-expresadas en geles sensibles y resistentes “*in vitro*” al Benznidazol fueron fragmentadas por digestión enzimática (tripsina), con el fin de generar en análisis de masas un péptido más fino o “huella digital” de la proteína (Espectro de masa MS). La identificación de la huella peptídica se hizo usando un espectrómetro de masas Autoflex™ (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), con el reflectrón en modo de iones y empleando ácido 2,5-dihidroxibenzoico como matriz y una placa AnchorChip™ (Bruker Daltonics). A partir de esta huella peptídica y mediante la selección de precursores abundantes presentes en su espectro, se usó el software Flexanalysis™, versión 2.2 (Bruker Daltonics) para realizar dentro del equipo una segunda fragmentación que generó espectros de masas MS/MS o en tándem.

La búsqueda en las bases de datos se realizó mediante MASCOT <http://matrixscience.com> (17) que compara datos experimentales con datos teóricos disponibles en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Se utilizaron los siguientes parámetros de búsqueda: tolerancia de dos sitios de clivaje y carbamidometilación (Cys) y oxidación (Met) como modificaciones

variables. Este análisis generó una lista de proteínas con significancia estadística y con mayor concordancia u homología con las secuencias de los péptidos fragmentados. Las proteínas identificadas fueron clasificadas en categorías funcionales de acuerdo a su función principal anotadas en la herramienta *Gene Ontology* (GO).

4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las manchas proteicas fueron evaluadas en el análisis PDQuest por la prueba estadística *T de Student* con nivel de confianza del 98% (*T-Student 98%*) y nivel de significancia de <0.05 ($p<0.05$) para determinar las manchas con expresión diferencial entre los fenotipos sensible y resistente. Igualmente, para confirmar estos resultados se determinó la relación LOG_2 del fenotipo resistente/sensible, en donde puntuaciones mayores de 1,2 se consideraron estadísticamente significativas.

5 RESULTADOS

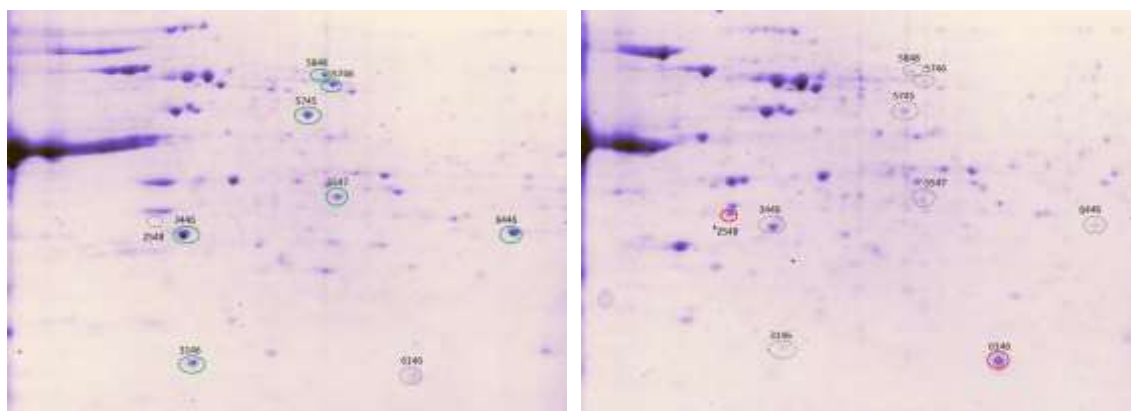
5.1 ANALISIS COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

5.1.1 Amastigote sensible vs resistente. Se observó un promedio de 98 manchas proteicas en geles 2D del estadio de amastigote fenotipo sensible y 99 manchas en el fenotipo resistente, 7 manchas fueron diferencialmente expresadas en el fenotipo resistente ($\text{LOG}_2 \text{R/S} > 1,4$), 1 de forma exclusiva, 1 con mayor intensidad y 5 con baja expresión (Figura. 8)

Figura 8. Gel de EF-2D de amastigote

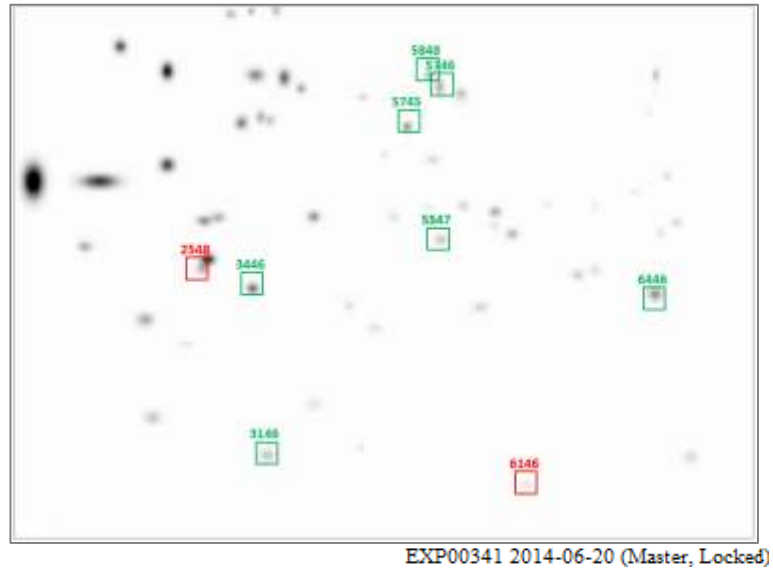
A. Amastigote sensible

B. Amastigote resistente



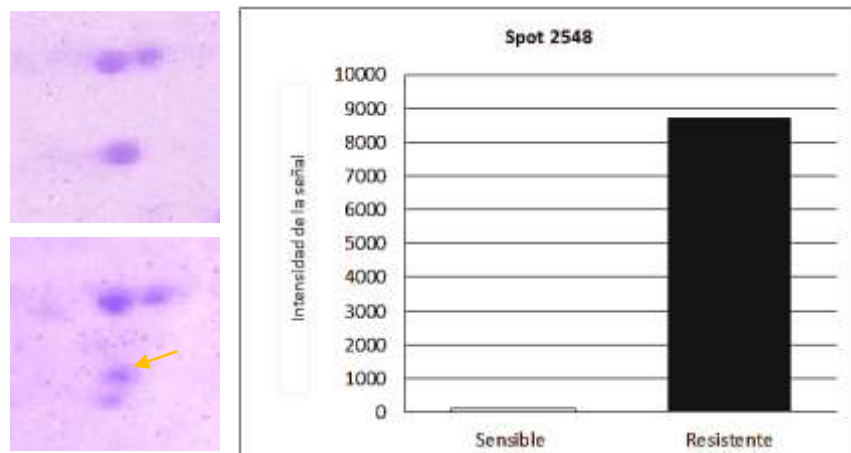
Los círculos de color verde representan las manchas expresadas diferencialmente en el fenotipo sensible y los de color rojo en el fenotipo resistente. Los círculos negros se ubicaron para facilitar la observación y comparación de las manchas.

C. Gel maestro obtenido del análisis de imagen PDQuest.



En el gel maestro se identifican las manchas que presentan intensidades estadísticamente significativas con nivel de confianza de 98% y significancia de 0,05.

Figura 9. Intensidad media de la señal de la mancha exclusiva en cada fenotipo.



La flecha indica la mancha exclusiva presente en el estadio amastigote fenotipo resistente. El histograma representa el promedio de la intensidad de la señal en unidades arbitrarias \pm las desviaciones estándar.

Las 7 proteínas diferencialmente expresadas en el estadio de amastigote fenotipo resistente fueron identificadas por MS, mostrando puntuaciones altamente significativas de acuerdo al algoritmo de MASCOT, lo que significa que su identificación no es un evento al azar.

Tabla 1. Proteínas con expresión diferencial identificadas en el estadio de amastigote sensible vs resistente.

# Mancha	N. NCBI	Proteína identificada	Masa (KDa)	PI	Score MASCOT	% Cobertura secuencia	Ratio R/S
2548 ^a	gi407840227	<i>HSP83</i>	80.6	5.15	167	26	nd
6146 ^a	gi17224953	<i>Triparedoxina peroxidasa</i>	22.2	5.96	74	20	4.03
6446 ^b	gi407841924	<i>dTDP-glucosa 4,6-deshidratasa</i>	41.9	7.24	61	38	-4.51
5547 ^b	gi407848897	<i>Tirosina aminotransferasa</i>	46.1	5.82	172	31	-2.95
3146 ^b	gi71412456	<i>Citocromo C oxidasa subunidad V</i>	22.2	5,97	58	25	-2.68
5745 ^b	gi497849060	<i>Dihidrolipoamida acetiltransferasa</i>	49.7	6.57	107	24	-2.46
5848 ^b	gi407410649	<i>Barra paraflagelar</i>	68.7	6.26	114	37	-2.25

Masa (KDa): Masa molecular teórica

PI: Punto isoeléctrico

Score MASCOT: Puntuación MASCOT

Ratio R/S: Relación de la intensidad media en términos de Log₂ de la señal de las manchas identificadas entre amastigote resistente/ sensible.

*: Puntuación no significativa de acuerdo con el algoritmo de MASCOT

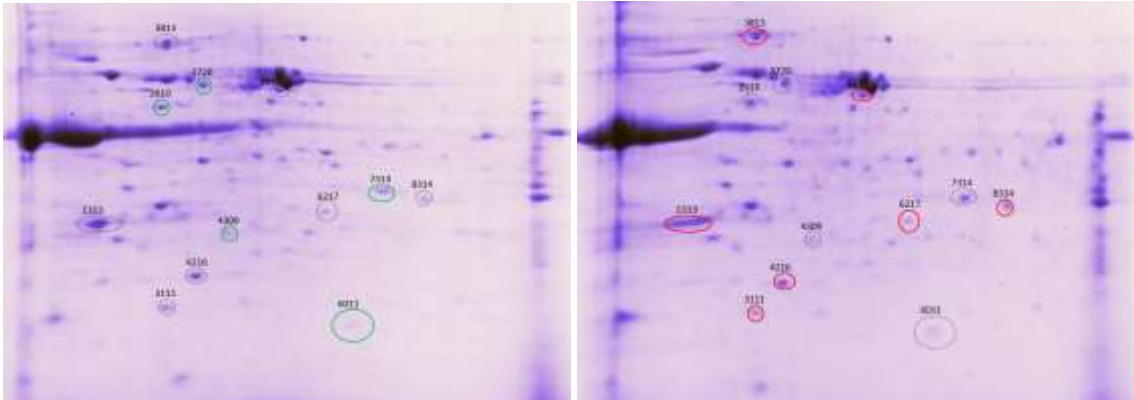
a: fenotipo resistente “*in vitro*” al BZN

b: fenotipo sensible

5.1.2 Tripomastigote sanguíneo sensible vs resistente. El análisis comparativo de geles 2D de clon sensible vs resistente “*in vitro*” al BZ del estadio de tripomastigote sanguíneo mostró un promedio de 112 manchas peptídicas en cada fenotipo, 7 manchas fueron expresadas diferencialmente en el fenotipo resistente (LOG₂ R/S > 1,4), 3 sobre-expresadas y 4 con menor expresión (figura 10).

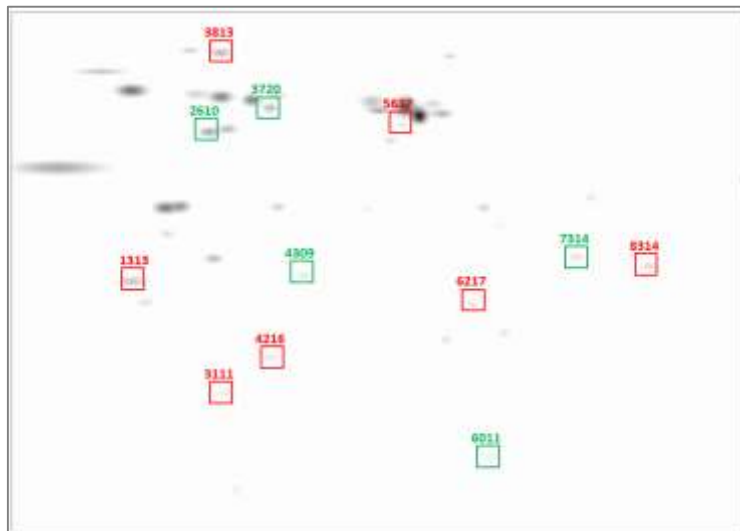
Figura 10. EF-2D de tripomastigote sanguíneo

A. Tripomastigote sanguíneo sensible **B.** Tripomastigote sanguíneo resistente



Los círculos de color verde representan las manchas expresadas diferencialmente en el fenotipo sensible y los de color rojo en el fenotipo resistente. Los círculos negros se ubicaron para facilitar la observación y comparación de las manchas.

C. Gel maestro obtenido del análisis de imagen PDQuest.



EXP00348 2014-06-20 (Master, Locked)

En el gel maestro se identifican las manchas que presentan intensidades estadísticamente significativas con nivel de confianza de 98% y significancia de 0,05.

Las 7 manchas proteicas expresadas diferencialmente en el estadio de tripomastigote sanguíneo fenotipo resistente fueron identificadas por MS mostrando puntuaciones altamente significativas de acuerdo al Score de MASCOT.

Tabla 2. Proteínas con expresión diferencial identificadas en el estadio de tripomastigote sanguíneo sensible vs resistente.

# Mancha	N. NCBI	Proteina identificada	Masa (KDa)	PI	Score MASCOT	% Cobertura secuencia	Ratio R/S
3111 ^a	gi37727511	<i>Adenilato quinasa</i>	29.3	5.56	91	34	1.64
1313 ^a	gi18568139	<i>Tubulina beta 1.9</i>	49.7	4.74	115	33	1.44
5617 ^a	gi162179	<i>Barra paraflagelar</i>	69.5	5.85	60	13	1.26
3720 ^b	gi25553516	<i>HSP70 mitocondrial</i>	70.9	5.7	105	12	-4.86
4309 ^b	gi91983201	<i>Tubulina beta</i>	42.8	5.29	65	15	-2.18
7314 ^b	gi71410849	<i>Disulfuro isomerasa</i>	29.6	7.79	131	23	-1.49
2610 ^b	gi295363	<i>Chaperona HSP60</i>	59.3	5.24	109	22	-1.44

Masa (KDa): Masa molecular teórica

PI: Punto isoeléctrico

Score MASCOT: Puntuación MASCOT

Ratio S/R: Relación de la intensidad media en términos de \log_2 de la señal de las manchas identificadas entre tripomastigote sanguíneo resistente/sensible

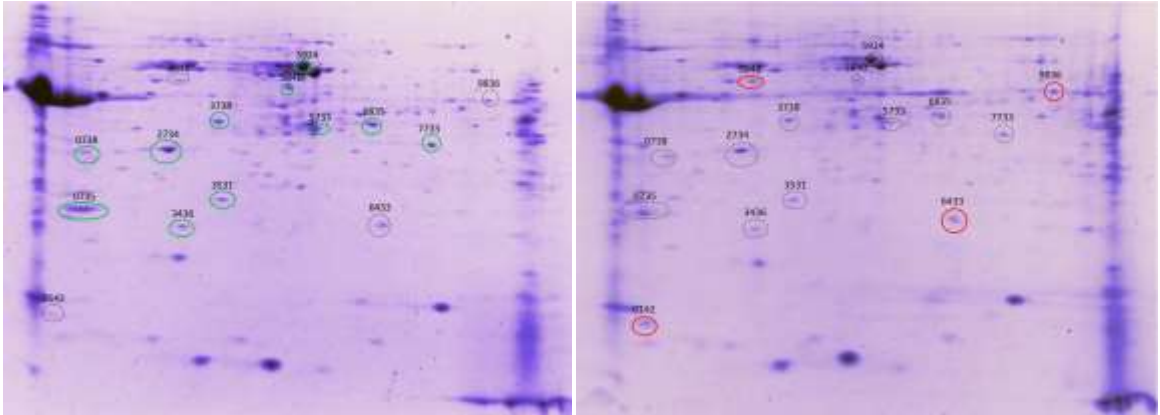
a: fenotipo resistente "in vitro" al BZN

b: fenotipo sensible

5.1.3 Tripomastigote metacíclico sensible vs resistente. La electroforesis en 2D del estadio de tripomastigote metacíclico, mostró un promedio de 138 manchas peptídicas en cada fenotipo. El análisis de imagen comparativo de ambos fenotipos detectó 10 manchas expresadas diferencialmente en el fenotipo resistente (\log_2 R/S > 1,4), 2 fueron expresadas con mayor intensidad y 8 con baja expresión (figura.11).

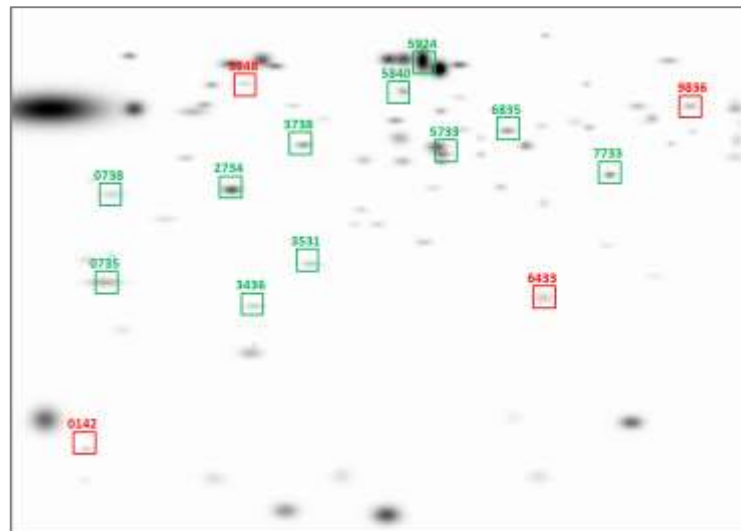
Figura 11. EF-2D de tripomastigote metacíclico

A. Tripomastigote metacíclico sensible **B.** Tripomastigote metacíclico resistente



Los círculos de color verde representan las manchas expresadas diferencialmente en el fenotipo sensible y los de color rojo en el fenotipo resistente. Los círculos negros se ubicaron para facilitar la observación y comparación de las manchas.

C. Gel maestro obtenido del análisis de imagen PDQuest.



EXP00347 2014-06-20 (Master, Locked)

En el gel maestro se identifican las manchas que presentan intensidades estadísticamente significativas con nivel de confianza de 98% y significancia de 0,05.

Las 10 proteínas diferencialmente expresadas fueron identificadas por masas, presentando puntuaciones altamente significativas de acuerdo al algoritmo de MASCOT.

Tabla 3. Proteínas con expresión diferencial identificadas en el estadio de tripomastigote metacíclico sensible vs resistente.

# Mancha	N. NCBI	Proteína identificada	Masa (KDa)	PI	Score MASCOT	% Cobertura secuencia	Ratio R/S
142 ^a	gi19171158	<i>Triparedoxina</i>	16.1	5.27	165	25	1.77
6433 ^a	gi17224953	<i>Triparedoxina peroxidasa</i>	22.2	5.96	157	26	1.22
7733 ^b	gi8099051	<i>Arginina quinasa</i>	40.1	5.89	80	47	-2.55
6835 ^b	gi407406941	<i>Proteína hipotética CSYL VIO_009351</i>	46.9	6.04	94	33	-1.83
2734 ^b	gi71667854	<i>Citocromo C oxidasa subunidad IV</i>	38.9	5.72	219	32	-1.74
5840 ^b	gi557863233	<i>Dihidrolipoamida acetiltransferasa</i>	49.7	6.57	207	21	-1.61
3738 ^b	gi407405092	<i>Actina</i>	33.2	5.58	90	47	-1.58
5733 ^b	gi407848897	<i>Tirosina aminotransferasa</i>	46.1	5.82	196	26	-1.56
735 ^b	gi4388655	<i>Peroxiredoxina</i>	25.5	7.62	62	41	-1.47
3436 ^b	gi71412456	<i>Citocromo C oxidasa subunidad V</i>	22.2	5.97	83	21	-1.45

Masa (KDa): Masa molecular teórica

PI: Punto isoelectrico

Score MASCOT: Puntuación MASCOT

Ratio S/R: Relación de la intensidad media en términos de \log_2 de la señal de las manchas identificadas entre tripomastigote metacíclico resistente/ sensible

a: fenotipo sensible

b: fenotipo resistente "in vitro" al BZN

De las 24 proteínas identificadas por MS tipo MALDI TOF/TOF, 19 son proteínas diferentes, de estas 8 mostraron sobre-expresión en más de un estadio y 11 lo hicieron en uno solo de los estadios estudiados. Estas proteínas fueron agrupadas en tres categorías funcionales de acuerdo a su función principal anotadas en GO (Tabla 4).

Tabla 4. Categoría funcional de las proteínas expresadas diferencialmente en los estadios de amastigote y tripomastigote sanguíneo y metacíclico.

Categoría funcional	Proteínas identificadas
Defensa celular	<i>Triparedoxina peroxidasa</i>
	<i>Triparedoxina</i>
	<i>Hsp83</i>
	<i>Adenilato quinasa</i>
	<i>Lipofosfoglicano</i>
	<i>Peroxiredoxina</i>
	<i>Chaperonina mitocondrial Hsp60</i>
<i>Hsp70 mitocondrial</i>	
Ensamblaje de citoesqueleto	<i>Tubulina beta</i>
	<i>Barra paraflagelar</i>
	<i>Actina</i>
Metabolismo	<i>Citocromo C oxidasa subunidad IV</i>
	<i>Citocromo C oxidasa subunidad V</i>
	<i>Arginina quinasa</i>
	<i>Tirosina aminotransferasa</i>
	<i>Dihidrolipoamida acetiltransferasa</i>
	<i>dTDP-glucosa 4,6-deshidratasa</i>
<i>Disulfuro isomerasa</i>	

6. DISCUSIÓN

Los fármacos utilizados para tratar la Ech presentan varios inconvenientes que llevan a una eficacia limitada en fase crónica, efectos tóxicos secundarios, tratamiento prolongado, alto costo y la presencia de cepas de *T. cruzi* naturalmente resistentes al tratamiento. Este fenotipo de resistencia que se interpreta como una reducción hereditaria en la sensibilidad de una población de microorganismos a la acción de un fármaco, es un reto importante para el estudio del tratamiento en la ECh, ya que junto con la diversidad genética del parásito y de su hospedero tiene un fuerte impacto en el aumento de los fracasos terapéuticos.

En tripanosomátidos un método ampliamente usado para estudiar la expresión diferencial de los genes implicados en la resistencia de las células a los fármacos, es el análisis proteómico, ya que la regulación de la expresión génica en estos flagelados está dada principalmente a nivel pos-transcripcional, característica que hace que no siempre haya una correlación entre los niveles de RNAm y proteínas.

Para el estudio de expresión proteómica diferencial se utilizan diferentes aproximaciones como la electroforesis 2D y la electroforesis bidimensional diferencial en gel (2D-DIGE). En este trabajo utilizamos la electroforesis 2D como un método eficiente que permite separar mezclas complejas en un solo gel y ofrece información estimada del punto isoelectrónico, masa molecular y cantidad relativa de cada proteína. Adicionalmente, tiene la capacidad de detectar isoformas y modificaciones postraduccionales, sin embargo, tiene baja capacidad de resolver proteínas hidrofóbicas de membrana. Por su parte, la técnica de 2D-DIGE combina el poder resolutivo de la electroforesis bidimensional con la sensibilidad de marcajes fluorescentes y análisis de imagen con softwares específicos.

En el presente estudio se analiza la expresión diferencial de los estadios amastigote y tripomastigote tanto metacíclico como sanguíneo los cuales están involucrados en la interacción del parásito con el hospedero vertebrado, por tanto son las formas celulares de *T. cruzi* responsables de la patología en el hombre y en consecuencia las principales dianas del mecanismo de acción del fármaco. Así mismo, se utilizó un clon proveniente de un aislado de un paciente con Chagas agudo involucrado en un microbrote ocurrido en el departamento de Santander. Este brote presentó una alta morbilidad y mortalidad, característica de este tipo de eventos de probable transmisión oral, en los cuales se observa una alta virulencia del parásito responsable.

Defensa celular

En este trabajo se observó expresión diferencial en proteínas relacionadas con defensa celular entre las cuales cabe destacar:

Triparedoxina peroxidasa y triparedoxina

En el sistema de defensa antioxidante de los tripanosomátidos participan las proteínas *triparedoxina*, *triparedoxina peroxidasa*, *tripanotión* y *tripanotión reductasa*. Proteínas ditiol de bajo peso molecular que trabajan secuencialmente en diferentes compartimientos sub-celulares del parásito para promover la detoxificación de hidroperóxidos, por lo tanto son esenciales para la supervivencia del mismo. Este sistema metabólico dependiente de tripanotión es encontrado exclusivamente en los tripanosomátidos, por lo que su ausencia en mamíferos hace de este un blanco prometedor para la quimioterapia contra estos parásitos [Arias, 2013].

La *triparredoxina peroxidasa* (TXPNx) es una peroxiredoxina altamente conservada que se localiza en el citosol (TXNPx-c) y en la mitocondria (TXNPx-m) celular y actúa catalizando la reducción de equivalentes derivados de tripanotión a ditiol como el peróxido de hidrogeno (H₂O₂) o pequeñas cadenas orgánicas de hidroperóxidos que se reducen a agua y alcohol respectivamente [Nogueira, 2009].

Esta enzima antioxidante mostró una sobre-expresión en dos de los tres estadios de *T. cruzi* estudiados (tripomastigote metacíclico y amastigote) con resistencia inducida “*in vitro*” a BZN. Estos resultados sugieren que está involucrada en el mecanismo de resistencia frente al BZN, protegiendo al parásito del ambiente oxidativo generado por el fármaco [Maya, 1997]; [Nogueira, 2009].

En concordancia con estos resultados, estudios previos realizados en parásitos como *Leishmania*, *T. cruzi* y otros microorganismos han reportado la participación de esta enzima antioxidante (TXNPx) en el mecanismo de resistencia a fármacos, sugiriendo que su sobre-expresión se da en respuesta a radicales de oxígeno tóxico generados por el metabolismo del fármaco y/o por la respuesta inmune. Es así como, un estudio reciente de análisis proteómico indicó que 7 manchas de la proteína correspondiente a TXNPx-c eran de 2 a 5 veces más abundante en cepas de *L. braziliensis* y *L. infantum* resistentes al antimonio que en sus cepas parentales [Matrangolo, 2013]. Igualmente, estudios posteriores revelaron un aumento en los niveles de RNAm TXNPx-c (2-5 veces) en cepas resistentes [Andrade 2014]. Otros estudios, también han señalado la intervención de esta proteína en el fenotipo de resistencia, mostrando un aumento en la expresión de RNAm y/o proteína en parásitos de *T. cruzi* resistentes a BZN [Nogueira, 2009], en *Entamoeba histolytica* resistente a metronidazol [Wassmann, 1999] y en *L. infantum* resistente a gentamicina [Daneshvar, 2012].

Por otra parte, cabe resaltar la importancia de esta proteína anti-oxidante la cual fue identificada por nuestro grupo en un estudio previo, en donde se reportó expresión diferencial de TXNPx en parásitos obtenidos de un caso agudo comparado con los

de uno crónico ocurridos en el departamento de Santander, indicando que esta proteína podría estar asociada con el desarrollo de la forma aguda de la enfermedad, porque su función antioxidante es crítica para la supervivencia del parásito dentro de la célula hospedera y el establecimiento de la infección [Díaz, 2011].

Una segunda proteína perteneciente a este mismo sistema antioxidante como es la **triparredoxina** (TXN) también se encontró sobre-expresada en tripomastigotes metacíclicos resistentes. Resultado que destaca la importancia de este sistema antioxidante en el mecanismo de resistencia a BZN dado que su función está implicada en la transferencia de equivalentes reductores desde el tripanotión a la tripanotión peroxidasa. Estos resultados son semejantes a los reportados por otros autores en los que muestran un aumento metabólico de TXN en cepas de *L. tarentolae* resistentes al antimonio [Wyllie, 2008] y cepas de *L. infantum* resistentes a gentamicina [Daneshvar, 2012].

Proteína de choque térmico 83

En este mismo grupo de proteínas relacionadas con defensa celular se identificó de forma exclusiva la proteína de choque térmico 83 (Hsp83) en amastigotes de *T. cruzi* resistentes a BZN. Las Hsp son un complejo de proteínas conservadas filogenéticamente, que se producen normalmente en todas las células de los organismos unicelulares y pluricelulares. Su síntesis aumenta cuando se encuentran en un medio ambiente que le provoca cualquier tipo de estrés (calórico, radiaciones, diversos fármacos, infecciones virales, etc), de esta manera confieren protección a las células minimizando los daños producidos por el estrés y volviéndolas resistentes a la apoptosis [Samali, 1996]. Así mismo, las proteínas Hsp intervienen en procesos metabólicos esenciales como la síntesis, plegamiento y ensamblaje de otras proteínas y en funciones de protección como la degradación o reparación de

proteínas anormales, actuando como chaperonas moleculares [Finley, 1985]. Los miembros de esta familia de proteínas se agrupan según su peso molecular. Al ser estas proteínas importantes en la supervivencia celular y al actuar como moléculas protectoras del daño inducido por el estrés, la expresión de la Hsp83 en amastigotes de *T. cruzi* resistentes a BZN podría defender al parásito de los productos del metabolismo del fármaco, impidiendo así el daño al ADN y otras macromoléculas. Estos resultados son contemplados en otras investigaciones en las que postulan que la expresión aumentada de esta proteína en *Leishmania donovani* podría estar confiriendo un mecanismo protector contra la muerte celular programada inducida por el antimonio, evitando la disminución del potencial de membrana mitocondrial que está siendo afectado por el fármaco [Vergnes, 2007]. De manera análoga otra publicación menciona que dicha expresión en *Leishmania* es fundamental para permitir un desarrollo eficiente y específico del mecanismo de resistencia frente al antimonio [Matrangolo, 2013]. Así mismo, otro autor revela la resistencia cruzada que presenta un aislado de *L. donovani* resistente al antimonio con alta expresión de la proteína Hsp83 a otros fármacos no relacionados con *Leishmania* como la mitelfosina y la anfotericina B [Vergnes, 2007].

Adenilato quinasa

En defensa celular se observó también expresión diferencial de la proteína Adenilato quinasa (AK), enzima ubicua presente en todos los organismos vivos. Su función está relacionada con la síntesis de energía, dado que cataliza la interconversión de nucleótidos de adenina, transfiriendo un grupo fosfato desde el ATP al AMP para la síntesis de ADP o viceversa [de Bruin, 2004]. Por lo tanto, su actividad resulta indispensable para conservar la viabilidad celular, manteniendo la homeostasis de nucleótidos de adenosina [Bouvier, 2006].



Así mismo, esta enzima quinasa, se ha asociado con otras funciones energéticas como la regeneración rápida de ATP, constituyendo una fuente adicional de energía durante procesos de alta demanda y con la comunicación energética celular, que corresponde al transporte de enlaces de alta energía por catálisis enzimática a sitios de escasa energía [Bouvier, 2006].

En protozoarios se ha descrito un alto número de isoformas de AK en diferentes localizaciones estructurales. En el caso de *T. cruzi* se han identificado 6 isoformas con posibles localizaciones mitocondriales, citoplasmáticas, glicosomales y flagelares [de los Milagros, 2013]. El elevado número de estas isoformas en este parásito, podría ser consecuencia de su complejo ciclo de vida, ya que implica distintas etapas morfológicas y afronta ambientes hostiles con diferentes fuentes y disponibilidad de nutrientes. Así lo señala de Bruin, en un estudio en el que demuestra un aumento de AK en la fase estacionaria de crecimiento de *T. cruzi* sugiriendo un papel clave en la gestión de energía en condiciones de estrés nutricional [de Bruin, 2004]. Adicionalmente, otro estudio revela que la AK nuclear en este flagelado además de estar regulada por la disponibilidad de nutrientes, también lo está por la biogénesis de los ribosomas, la integridad del DNA y el estrés oxidativo [Pereira, 2013]. Así mismo, en *S. cerevisiae* esta enzima quinasa ha sido relacionada con resistencia al arsenito [Juhnke, 2000], [Takahashi, 2010].

En base a lo descrito por la literatura, se sugiere que la alta expresión de la AK en los tripomastigotes sanguíneos resistentes a BZN, se da para ampliar el estado energético de la célula y así cubrir la demanda de ATP que requieren estos parásitos para su movimiento durante la invasión de nuevas células. Igualmente, se propone que la sobre-expresión de esta enzima quinasa en los tripomastigotes sanguíneos resistentes se da también en respuesta al estrés resultante de un exceso de radicales libres de oxígeno generados por el fármaco.

Lipofosfoglicano

Igualmente, en relación con defensa celular pero en el estadio de tripomastigote sanguíneo, se observó sobre-expresión en el fenotipo de resistencia del lipofosfoglicano (LPG3), una glicoproteína situada en la superficie celular de los kinetoplastidos. Su función está relacionada con el anclaje glicosilfosfatidilinositol (GPI), por lo tanto contribuye al contacto entre el parásito y las células del hospedero vertebrado e invertebrado [Singh, 1994].

Diferentes autores han validado la participación de esta glicoproteína en el reconocimiento de la célula hospedera e incluso han demostrado su intervención en otras funciones relacionadas con la virulencia en la infección de Leishmania [Srivastava, 2013]. En este caso lleva a la inducción de IL-10 y TGF-B, citoquinas que suprimen el estallido oxidativo en los macrófagos dando como resultado la supervivencia del parásito dentro de las células inmunitarias. Teniendo en cuenta estas funciones se sugiere que su sobre-expresión en el fenotipo de resistencia le estaría confiriendo a estas formas sanguíneas una mayor capacidad de supervivencia en el hospedero, al actuar como un factor de virulencia por su implicación en la desactivación de macrófagos y en la invasión de nuevas células.

Ensamblaje de citoesqueleto

En relación con el ensamblaje de citoesqueleto se observó expresión diferencial de las siguientes proteínas:

Tubulina beta

Las tubulinas son una familia de proteínas globulares formada por tres subunidades: alfa, beta y gama. En tripanosomátidos los polímeros lineales de las tubulinas alfa y beta son los componentes principales de los microtúbulos, los cuales se adosan

internamente a la membrana citoplasmática en forma de dímeros y actúan en procesos de división celular y cambios en la organización del citoesqueleto.

Nuestros resultados mostraron sobre-expresión de la tubulina beta en el estadio de tripomastigote sanguíneo fenotipo resistente. En concordancia con esta observación, un estudio proteómico previo reportó un aumento en la expresión de tubulina alfa y beta en cepas de *L. infantum* y *L. brasiliensis* resistentes al antimonio comparado con los parásitos susceptibles [Matrangolo, 2013]. De modo similar, se observó sobre-expresión en cepas de *L. donovani* resistentes al arsenito [Sharma, 2009] y *L. panamensis* resistente a gentamicina [Daneshvar, 2012]. Por lo tanto, nuestros resultados nos permiten sugerir que la tubulina beta también podría estar implicada en el mecanismo de resistencia de *T. cruzi* frente a BZN relacionado con el hecho de que alteraciones en la estructura de los microtúbulos podrían estar involucradas en una sensibilidad disminuída a los fármacos [Dumotet, 1999].

Proteína estructural de la barra paraflagelar

La barra paraflagelar (PFR) es un importante componente estructural del flagelo de *T. cruzi*, ya que se identifica como una estructura filamentosa con características ultra-estructurales únicas que lo hacen diferente a los principales sistemas filamentosos de las células eucariotas [Gadelha, 2005].

Investigaciones iniciales apuntaban a que la proteína PFR solo le daba atributos físicos al flagelo [Fuge, 1969]. Ahora se sabe que presenta funciones metabólicas, por estar directamente relacionada con el bolsillo flagelar, el cual se encarga de controlar el metabolismo del parásito. Del mismo modo, se le atribuyen funciones reguladoras, ya que controla la regulación de los genes por mecanismos post-transcripcionales y transcripción del ARN y funciones de señalización de calcio, pues interactúa específicamente con la calmodulina, proteína capaz de movilizar iones de calcio, requisito indispensable para el desplazamiento del parásito [Portman, 2010]. Adicionalmente, varios grupos de trabajo han identificado a las

proteínas PFR como blancos atractivos para generar inmunidad protectora contra varias especies de tripanosoma [Michailowsky, 2003]; [Luhrs, 2003]; [Morell, 2006].

En el presente estudio, se identificó la PFR en los tripomastigotes sanguíneos resistentes, resultados que están de acuerdo con los presentados por Murta, en los que muestra un aumento de esta proteína flagelar en parásitos de *L. braziliensis* resistentes al antimonio [Matrongolo, 2013]. Aunque, esta es la única evidencia experimental reportada en la literatura en donde se vincula esta proteína con el fenotipo de resistencia y dadas las funciones tanto estructurales como su participación en metabolismo, regulación y movilidad del parásito esta proteína podría estar jugando un papel importante en el mecanismo de resistencia a BZN.

Metabolismo

Por último, en el fenotipo resistente de los tres estadios de *T. cruzi* analizados, se observó expresión diferencial de algunas proteínas involucradas en el metabolismo del parásito, entre las cuales cabe destacar:

Citocromo c oxidasa subunidades IV y V

La proteína transportadora de electrones Citocromo C Oxidasa (CCO) junto con otros transportadores (NAD, coenzima Q y demás citocromos) y complejos enzimáticos (I-V) integran la cadena respiratoria mitocondrial y actúan en reacciones de óxido reducción para la síntesis de ATP. Específicamente, CCO transporta electrones al complejo IV para generar un proceso denominado fosforilación oxidativa en donde el oxígeno es reducido a agua y la energía liberada promueve la fosforilación de ADP a ATP.

En *T. cruzi*, un estudio en el que compara la función mitocondrial de los estadios de epimastigote y tripomastigote sanguíneo, reveló que las formas sanguíneas exhiben un potencial de membrana reducido en comparación con los epimastigotes. Es

decir, que estas formas parasitarias son menos dependientes de la cadena transportadora de electrones ya que utilizan la vía glucolítica como fuente principal de energía [Goncalves, 2011]. Consistente con estas observaciones, otros autores revelaron que los tripomastigotes sanguíneos tienen acceso de forma constante a los hidratos de carbono y consecuentemente presentan un aumento en la captación de glucosa en comparación con los epimastigotes que por su ambiente (insecto vector) poseen un metabolismo de glucosa reducido [Silber, 2009].

En correlación con estas investigaciones, se sugiere que la alta-expresión de CCO en el fenotipo sensible de los estadios: tripomastigote metacíclico y amastigote se da gracias a los niveles bajos de glucosa en su ambiente, ya que durante su ciclo de vida estas formas parasitarias habitan respectivamente, en el intestino del insecto vector y en el citoplasma de las células hospederas, entornos carentes de glucosa libre [Silber, 2009]. Adicionalmente, se plantea que el agotamiento normal de los carbohidratos en el medio de cultivo al final de la diferenciación morfológica también podría estar jugando un papel importante en el metabolismo energético de estos parásitos.

Arginina quinasa

Otra proteína relacionada con defensa celular y que se encontró sobre-expresada, en este caso en el fenotipo sensible del tripomastigote metacíclico, es la Arginina quinasa. Esta enzima cataliza la reacción reversible de:



En *T. cruzi* la arginina quinasa puede ser utilizada como reserva de energía, ya que en su forma fosforilada (fosfoarginina) acumula un fosfato de alta energía que se transfiere al ADP para generar ATP en situaciones de alto consumo energético [Pereira, 2002]. Esta característica en tripanosomátidos es particularmente importante porque carecen de sustancias de reserva en formas de hidratos de carbono [Miranda, 2006]. Igualmente, esta enzima quinasa se ha relacionado con la

adaptación del parásito a los cambios ambientales como se demostró en un estudio en el cual su sobre-expresión mejora la capacidad de las células transfectantes de crecer y resistir condiciones de estrés nutricional y de pH [Pereira, 2003]. En base a esta característica funcional, se sugiere que la expresión diferencial de la arginina quinasa observada en los tripomastigotes metacíclicos, fenotipo sensible, obedece más a una respuesta al estrés nutricional generado durante la primera etapa de metaciclogénesis inducida, dado que los parásitos son sometidos por 2 horas a un medio escaso en nutrientes (medio TAU).

Tirosina aminotransferasa

Otra enzima importante en el metabolismo de *T. cruzi* es la enzima tirosina aminotransferasa (TAT) dado que participa en la re-oxidación citosólica de NADH, la biosíntesis de aminoácidos aromáticos y el reciclaje de metionina [Rego, 2008]. Así mismo, gracias a su importancia metabólica y sus diferencias en la especificidad de sustrato, propiedades catalíticas y papel funcional con su análogo de mamíferos, esta proteína se considera un buen candidato para el desarrollo de fármacos alternativos contra la ECh y otras enfermedades causadas por tripanosomátidos [Nowicki, 2001], salvo *T. brucei* que curiosamente parece tener ausente este gen [Moreno, 2014].

Estudios en *Leishmania*, han revalidado la importancia del metabolismo de los aminoácidos a lo largo de la diferenciación de promastigotes a amastigotes y en el interior del intestino del insecto vector hematófago, lugar en donde los nutrientes principales son los aminoácidos y los lípidos [Rosenzweig, 2008]. Igualmente, han reportado sobre-expresión de TAT en formas de amastigote de *L. infantum* y en promastigote de *L. chagasi* resistente al óxido nítrico. En base a estos datos, los autores plantean que en los tripanosomátidos esta enzima transferasa puede desempeñar un papel importante en la infectividad del parásito y en su resistencia contra la quimioterapia [Moreno, 2014].

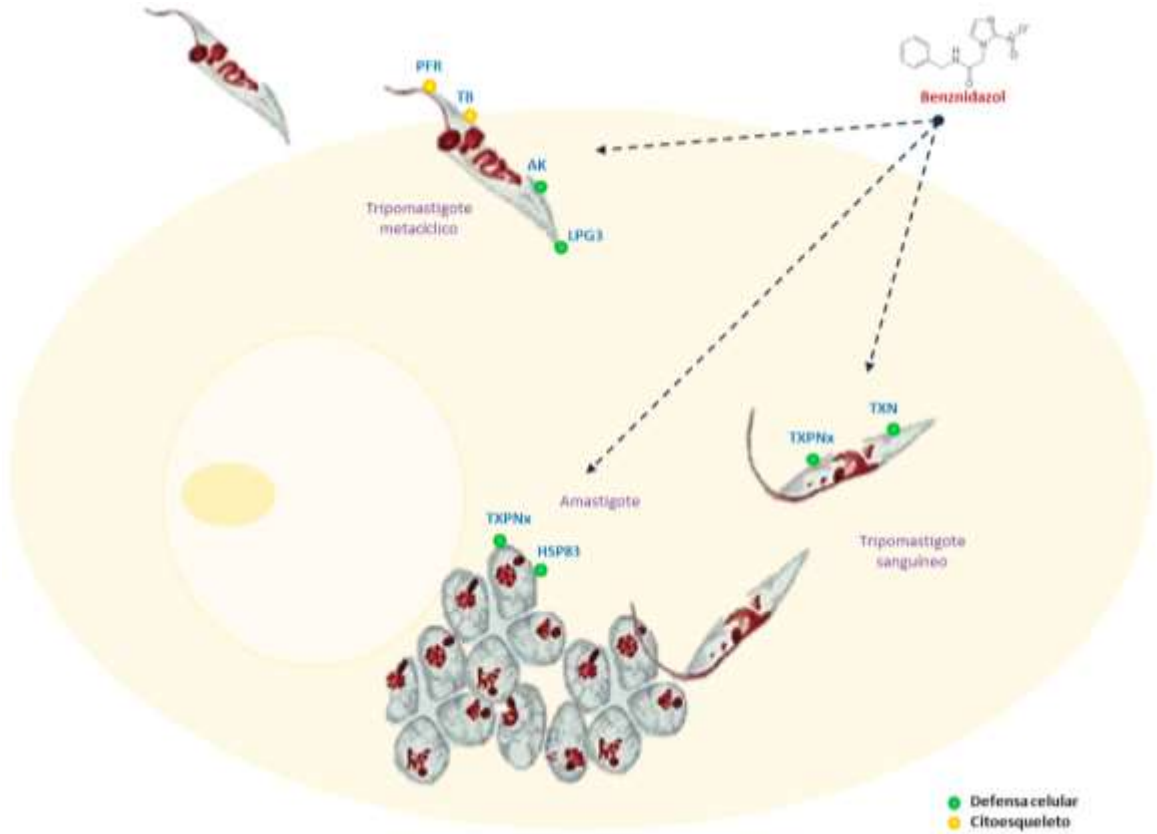
Sin embargo, otro estudio que compara poblaciones de *T. cruzi* susceptibles y resistentes a BZN, caracterizaron el gen TcTAT. De las 6 cepas resistentes analizadas, solo 1 mostró sobre- expresión en el número de copias de este gen en comparación con su cepa susceptible. Así mismo, en el análisis de localización cromosómica y niveles de expresión de proteínas ninguna población mostró expresión diferencial. En consecuencia, con estos resultados los autores sugieren que la TcTAT no está directamente relacionada con el fenotipo de resistencia a los medicamentos, pero sí podría actuar como un factor de respuesta al estrés [Rego, 2008]. Igualmente, otro estudio reveló que los amastigotes de *T. cruzi* durante el proceso de infección recurren al catabolismo de aminoácidos aromáticos como fuente de energía y carbón, dado que estas formas parasitarias se localizan en el citoplasma de la célula, lugar en donde los niveles de glucosa son muy bajos [Silber, 2009].

En relación con estas afirmaciones, en nuestro estudio no se observó expresión diferencial de la proteína TAT en el fenotipo resistente de los tres estadios de *T. cruzi* analizados, hecho que ratifica lo planteado por Rego en donde indica que en este parásito la TAT no es un componente clave del mecanismo de resistencia a fármacos [Rego, 2008]. No obstante, sí se observó sobre-expresión de esta enzima en el fenotipo sensible de los estadios de amastigote y tripomastigote metacíclico, resultado que confirma el comportamiento metabólico de *T. cruzi* frente a la escasez de glucosa, al utilizar los aminoácidos aromáticos como un recurso energético alternativo.

Por último, cabe resaltar que en este trabajo al compararlo con otros reportes se detectó un bajo número de manchas proteicas en el perfil de expresión de proteínas de cada fenotipo y estadio de *T. cruzi* estudiado, esta baja detección posiblemente se deba al colorante utilizado, dado que el azul de Coomassie G-250 es 10 veces menos sensible que la tinción con nitrato de plata, sin embargo, es más reproducible

y compatible con la técnica de MS. Se sugiere utilizar en investigaciones futuras un modelo de tinción más sensible comparable a la tinción de plata y compatible con masas como lo es la tinción fluorescente (SYPRO).

Figura 12. Proteínas expresadas diferencialmente en los estadios de amastigote, tripomastigote metacíclico y sanguíneo resistentes a BZN.



7. CONCLUSIONES

Las proteínas identificadas en este estudio fueron clasificadas en tres categorías funcionales relacionadas con metabolismo del parásito, ensamblaje de citoesqueleto y defensa celular. La *triparedoxina*, *triparedoxina*, *peroxidasa*, *lipofosfoglicano*, *proteína de choque térmico 83*, *adenilato quinasa*, *tubulina beta* y *barra paraflagelar* estarían implicadas en el mecanismo de resistencia *in vitro* frente al BZN, por mostrar altos niveles de expresión en parásitos resistentes y por su función, ya que, dichas proteínas participan en el sistema de defensa antioxidante, defensa frente al estrés, síntesis de energía, anclaje GPI y ensamblaje de citoesqueleto, funciones que protegen al parásito de *T. cruzi* de los efectos citotóxicos producidos por este fármaco. Igualmente, se identificó expresión diferencial en el fenotipo sensible de proteínas principalmente relacionadas con el metabolismo del parásito, que actúan en procesos de diferenciación celular y en la síntesis de ATP y aminoácidos aromáticos, con el fin de proporcionar al parásito una mayor capacidad de supervivencia dentro del ambiente hostil del hospedero vertebrado.

Estos resultados confirman que la resistencia a los medicamentos es la suma de múltiples factores en los que participa más de una proteína. Así mismo, representan un aporte importante para el estudio de resistencia a fármacos en *T. cruzi*, dado que las proteínas identificadas en este análisis pertenecen a formas del parásito que están directamente relacionadas con el hombre y por tanto podrían ser blancos de acción del fármaco.

BIBLIOGRAFIA

AGUAYO-ORTIZ, R., *et al.* Molecular basis for benzimidazole resistance from a novel β -tubulin binding site model. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* [online]. 2013. Vol 45 p. 26-37.

ALSFORD, S, *et al.* Genetic dissection of drug resistance in trypanosomes. *Parasitology* [online]. 2013. Vol 140(12) p. 1478-1491.

ANDRADE, H, *et al.* Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* resistance to Benznidazole. *Journal of proteome research* [online]. 2008. Vol 7(6) p. 2357-2367.

ANDRADE, J. M. and S. Murta. Functional analysis of cytosolic tryparedoxin peroxidase in antimony resistant and susceptible *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* lines. *Parasit Vectors* [online].2014. Vol 7 p. 406.

ARIAS, D. G, *et al.* Redox metabolism in *Trypanosoma cruzi*: Functional characterization of tryparedoxins revisited. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 2013. Vol 63 p. 65-77.

BENTE, M, *et al.* Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Proteomics* [online]. 2003. Vol 3(9) p. 1811-1829.

BOUVIER, L. A, *et al.* An expanded adenylate kinase gene family in the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* [online]. 2006. Vol. 1760(6) p. 913-921.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* [online] 1976. Vol. 72(1) p. 248-254.

CALDAS, I. S, *et al.* Benznidazole therapy during acute phase of Chagas disease reduces parasite load but does not prevent chronic cardiac lesions. *Parasitology research* [online]. 2008. Vol. 103(2) p. 413-421.

CAMPBELL, D. A., S. J. Westenberger and N. R. Sturm. The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics. *Current molecular medicine* [online]. 2004. Vol. 4(6) p. 549-562.

CAMPOS, F. M, *et al.* Characterization of a gene encoding alcohol dehydrogenase in benznidazole-susceptible and-resistant populations of *Trypanosoma cruzi*. *Acta tropica* [online].2009. Vol. 111(1) p. 56-63.

CAMPOS, M. C. O, *et al.* P-glycoprotein efflux pump plays an important role in *Trypanosoma cruzi* drug resistance. *Parasitology research* [online].2013. Vol. 112(6): p. 2341-2351.

CAMPOS, M. C, *et al.* Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi*: Evidence that distinct mechanisms can act in concert. *Molecular and biochemical parasitology* [online]. 2014. Vol. 193(1) p. 17-19.

CASTRO, J. A., M. Montalto deMecca and L. C. Bartel. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Human & experimental toxicology* [online]. 2006. Vol. 25(8) p. 471-479.

CLAYTON, C. and M. Shapira. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Molecular and biochemical parasitology* [online]. 2007. Vol. 156(2) p. 93-101.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed-A background article. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* [online]. 2007. Vol. 102 p. 113-122.

COURA, J. R. and S. L. De Castro A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. [online] 2002. Vol. 97(1) p. 3-24.

CRIADO, L, *et al.* Genetic polymorphisms in TNFA/TNFR2 genes and Chagas disease in a Colombian endemic population. *Cytokine* [online]. 2012. Vol.57(3) p. 398-401.

DANESHVAR, H., S, *et al.* Comparative proteomics profiling of a gentamicin-attenuated *Leishmania infantum* cell line identifies key changes in parasite thiol-redox metabolism. *Journal of proteomics* [online]. 2012. Vol 75(5) p. 1463-1471.

DAS NEVES PINTO, *et al.* Clinical follow-up of responses to treatment with benznidazol in Amazon: a cohort study of acute Chagas disease. *PloS one* [online]. 2013. Vol. 8(5) p. e64450.

DE BRUIN, W., F. Oerlemans and B. Wieringa. Adenylate kinase I does not affect cellular growth characteristics under normal and metabolic stress conditions. *Experimental cell research* [online]. 2004. Vol. 297(1) p.97-107.

DE LOS MILAGROS CÁMARA, *et al.* Molecular and functional characterization of a *Trypanosoma cruzi* nuclear adenylate kinase isoform. *PLoS neglected tropical diseases* [online]. 2013. Vol 7(2): e2044.

DE, T. D. L. E. Gestión para la vigilancia entomológica y control de la transmisión de la enfermedad de Chagas. 2015.

DÍAZ, M., A. Solari and C. González. Differential expression of *Trypanosoma cruzi* I associated with clinical forms of Chagas disease: overexpression of oxidative stress proteins in acute patient isolate. *Journal of proteomics* [online]. 2011. Vol. 74(9) p.1673-1682.

DOS SANTOS, F. M, *et al.* "Trypanosoma cruzi: induction of benznidazole resistance in vivo and its modulation by in vitro culturing and mice infection. Experimental parasitology [online]. 2008. Vol. 120(4) p. 385-390.

DOS SANTOS, P. F, *et al.* Molecular characterization of the hexose transporter gene in benznidazole resistant and susceptible populations of Trypanosoma cruzi. Parasites & vectors [online]. 2012. Vol. 5(1) p.161.

DRUMMELSMITH, J., *et al.* Proteome mapping of the protozoan parasite Leishmania and application to the study of drug targets and resistance mechanisms. Molecular & Cellular Proteomics [online]. 2003. Vol. 2(3) p.146-155.

DUMONTET, C. and B. I. Sikic. Mechanisms of action of and resistance to antitubulin agents: microtubule dynamics, drug transport, and cell death. Journal of Clinical Oncology [online]. 1999. Vol. 17(3) p.1061-1061.

DUTRA, W. O, *et al.* Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz [online]. 2009. Vol. 104 p. 208-218.

EL-SAYED, N. M, *et al.* The genome sequence of Trypanosoma cruzi, etiologic agent of Chagas disease. Science [online]. 2005. Vol. 309(5733) p. 409-415.

EL-SAYED, N. M, et al. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. Science [online]. 2005. Vol 309(5733) p. 404-409.

FILARDI, L. and Z. Brener. Susceptibility and natural resistance of Trypanosoma cruzi strains to drugs used clinically in Chagas disease. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene [online]. 1987. Vol. 81(5) p. 755-759.

FINLEY, D. and A. Varshavsky. The ubiquitin system: functions and mechanisms. Trends in biochemical sciences [online]. 1985. Vol. 10(9) p.343-347.

FLÓREZ, O., J. Martín and C. I. González. Genetic variants in the chemokines and chemokine receptors in Chagas disease. Human immunology [online]. 2012. Vol. 73(8) p. 852-858.

FOLGUEIRA, C. and J. M. Requena. A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. FEMS microbiology reviews [online]. 2007. Vol. 31(4) p. 359-377.

FUGE, H. Electron Microscopic Studies on the Intra-flagellar Structures of Trypanosomes. The Journal of protozoology [online].1969. Vol.16(3) p. 460-466.

GADELHA, C, *et al.* Cryptic paraflagellar rod in endosymbiont-containing kinetoplastid protozoa. Eukaryotic cell [online]. 2005. Vol 4(3) p.516-525.

GONÇALVES, R. L., *et al.* A comparative assessment of mitochondrial function in epimastigotes and bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of bioenergetics and biomembranes* [online]. 2011. Vol. 43(6) p. 651-661.

GUHL, F, *et al.* *Trypanosoma cruzi* DNA in human mummies. *The lancet* [online]. 1997. Vol. 349(9062) p.1370.

GUHL, F, *et al.* Actualización de la distribución geográfica y ecoepidemiología de la fauna de triatominos (Reduviidae: Triatominae) en Colombia. *Biomédica* [online]. 2007. Vol. 27(Suppl 1) p.143-162.

HAILE, S. and B. Papadopoulou. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Current opinion in microbiology* [online]. 2007. Vol 10(6) p.569-577.

HALL, B. S. and S. R. Wilkinson. Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. *Antimicrobial agents and chemotherapy* [online]. 2012. Vol. 56(1) p.115-123.

HIDRON, A, *et al.* Cardiac involvement with parasitic infections. *Clinical microbiology reviews* [online]. 2010. Vol. 23(2): 324-349.

LUHRS, K. A., D. L. Fouts and J. E. Manning. Immunization with recombinant paraflagellar rod protein induces protective immunity against *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine* [online] 2003. Vol. 21(21) p.3058-3069.

MARIN-NETO, J. A. and A. Rassi Jr. Actualización sobre la cardiopatía de la enfermedad de Chagas en el primer centenario de su descubrimiento. *Revista española de cardiología* [online]. 2009. Vol. 62(11) p.1211-1216.

MARIN-NETO, J. A, *et al.* The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* [online]. 2009. Vol 104 p. 319-324.

MATRANGOLO, F. S, *et al.* Comparative proteomic analysis of antimony-resistant and-susceptible *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum chagasi* lines. *Molecular and biochemical parasitology* [online]. 2013. Vol. 190(2) p.63-75.

MAYA, J. D, *et al.* Effects of nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and biochemical parasitology* [online]. 1997. Vol. 86(1) p.101-106.

MEJÍA, A. M. and O. Triana. Análisis por LSSP-PCR de la variabilidad genética de *Trypanosoma cruzi* en sangre y órganos de ratones. *Biomédica* [online]. 2005. Vol. 25(1) p.76-86.

MEJIA, A. M, *et al.* Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi* is a readily acquired trait that can arise independently in a single population. *Journal of Infectious Diseases* [online]. 2012. Vol 331 p.546-549.

MEJÍA-JARAMILLO, A. M, *et al.* Sensibilidad al benznidazol de cepas de *Trypanosoma cruzi* sugiere la circulación de cepas naturalmente resistentes en Colombia. *Biomédica* [en línea]. 2012. Vol. 32(2) p.196-205.

MICHAJLOWSKY, V, *et al.* Humoral and cellular immune responses to *Trypanosoma cruzi*-derived paraflagellar rod proteins in patients with Chagas' disease. *Infection and immunity* [online]. 2003. Vol.71(6) p.3165-3171.

MIRANDA, M. R, *et al.* *Trypanosoma cruzi*: oxidative stress induces arginine kinase expression. *Experimental parasitology* [online]. 2006. Vol. 114(4) p.341-344.

MORELL, M, *et al.* The genetic immunization with paraflagellar rod protein-2 fused to the HSP70 confers protection against late *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine* [online]. 2006. Vol. 24(49) p.7046-7055.

MORENO, M, *et al.* Structure of tyrosine aminotransferase from *Leishmania infantum*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications* [online]. 2014. Vol. 70(5) p. 0-0.

NIRDÉ, P., C. Larroque and C. Barnabé. Drug-resistant epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* and persistence of this phenotype after differentiation into amastigotes. *Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie* [online]. 1995. Vol. 318(12) p.1239-1244.

NOGUEIRA, F. B, *et al.* "Molecular characterization of cytosolic and mitochondrial tryparedoxin peroxidase in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole." *Parasitology research* [online]. 2009. Vol. 104(4) p. 835-844.

NOWICKI, C, *et al.* Recombinant tyrosine aminotransferase from *Trypanosoma cruzi*: structural characterization and site directed mutagenesis of a broad substrate specificity enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* [online]. 2001. Vol. 1546(2) p. 268-281.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of Chagas disease: second report of the WHO expert committee. [online]. [Geneva, Suiza]. W.H.O. 2002. Available from internet: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/42443>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease (*American trypanosomiasis*). (online). [Geneva: Suiza]. W.H.O, 2015. Available from Internet: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>

PABA, J, *et al.* Proteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Proteomics* [online]. 2004. Vol. 4(4) p.1052-1059.

PEREIRA, C. A, *et al.* Arginine kinase overexpression improves *Trypanosoma cruzi* survival capability. *FEBS letters* [online]. 2003. Vol. 554(1) p. 201-205.

PEREIRA, C. A, *et al.* Arginine metabolism in *Trypanosoma cruzi* is coupled to parasite stage and replication. *FEBS letters* [online]. 2002. Vol. 526(1) p.111-114.

PORTMAN, N. and K. Gull. The paraflagellar rod of kinetoplastid parasites: from structure to components and function. *International journal for parasitology* [online]. 2010. Vol. 40(2): p. 135-148.

RASSI, A. and J. A. Marin-Neto. Chagas disease. *The Lancet* [online]. 2010. Vol. 375(9723) p.1388-1402.

RASSI, A. and J. M. de Rezende. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infectious disease clinics of North America* [online]. 2012. Vol. 26(2) p. 275-291.

REGO, J. V, *et al.* *Trypanosoma cruzi*: characterisation of the gene encoding tyrosine aminotransferase in benznidazole-resistant and susceptible populations. *Experimental parasitology* [online].2008. Vol.118(1) p.111-117.

REVOLLO, S, *et al.* *Trypanosoma cruzi*: impact of clonal evolution of the parasite on its biological and medical properties. *Experimental Parasitology* [online]. 1998. Vol.89(1) p. 30-39.

ROMAÑA, C, *et al.* Acerca del ciclo evolutivo del Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi Chagas 1909, en sus fases tisular y hemática." Memórias do Instituto Oswaldo Cruz [online]. 1956. Vol. 54(1) p.255-269.

ROSENZWEIG, D, *et al.* Retooling Leishmania metabolism: from sand fly gut to human macrophage. The FASEB journal [online]. 2008. Vol. 22(2) p.590-602.

SAMALI, A. and T. G. Cotter. Heat shock proteins increase resistance to apoptosis. Experimental cell research [online]. 1996. Vol. 223(1): 163-170.

SCHMUNIS, G. A. *et al.* Riesgo de la enfermedad de Chagas a través de las transfusiones en las Américas. Medicina (Buenos Aires) [En línea]. 1999. Vol. 59(Supl 11) p. 125-134.

SHARMA, S, *et al.* Proteomic analysis of wild type and arsenite-resistant Leishmania donovani. Experimental parasitology [online]. 2009. Vol. 123(4) p.369-376.

SILBER, A. M, *et al.* Glucose uptake in the mammalian stages of Trypanosoma cruzi. Molecular and biochemical parasitology [online]. 2009. Vol.168(1) p.102-108.

SIMPSON, L, *et al.* Evolution of RNA editing in trypanosome mitochondria. Proceedings of the National Academy of Sciences [online]. 2000. Vol. 97(13) p. 6986-6993.

SINGH, B. N, *et al.* Expression of a novel cell surface lipophosphoglycan-like glycoconjugate in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1994. Vol. 269(35) p. 21972-21982.

SRIVASTAVA, S, *et al.* Leishmania expressed lipophosphoglycan interacts with Toll-like receptor (TLR)-2 to decrease TLR-9 expression and reduce anti-leishmanial responses. *Clinical & Experimental Immunology* [online]. 2013. Vol. 172(3) p. 403-409.

TAKAHASHI, T, *et al.* Overexpression of FAP7, MIG3, TMA19, or YLR392c confers resistance to arsenite on *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of toxicological sciences* [online]. 2010. Vol. 35(6) p.945-946.

TEIXEIRA, S. M., N. M. El-Sayed and P. R. Araújo. The genome and its implications. *Adv Parasitol* [online]. 2011. Vol. 75 p. 209-230.

TOSO, M., U. Vial and N. Galanti Oral transmission of Chagas' disease. *Revista medica de Chile* [online]. 2011. Vol.139(2) p.258-266.

TYLER, K. and D. Engman The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International journal for parasitology* [online]. 2001. Vol. 31(5) p.472-481.

VERGNES, B, *et al.* A proteomics screen implicates HSP83 and a small kinetoplastid calpain-related protein in drug resistance in *Leishmania donovani* clinical field

isolates by modulating drug-induced programmed cell death. *Molecular & Cellular Proteomics* [online]. 2007. Vol. 6(1): 88-101.

WASSMANN, C. *et al.* Metronidazole resistance in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* is associated with increased expression of iron-containing superoxide dismutase and peroxiredoxin and decreased expression of ferredoxin 1 and flavin reductase. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1999. Vol. 274(37) p. 26051-26056.

WILKINSON, S. R, *et al.* A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2008. Vol. 105(13) p. 5022-5027.

WYLLIE, S., T. J. Vickers and A. H. Fairlamb. Roles of trypanothione S-transferase and tryparedoxin peroxidase in resistance to antimonials. *Antimicrobial agents and chemotherapy* [online]. 2008. Vol. 52(4) p. 1359-1365.