



**EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS EN DOS AISLADOS DE
Trypanosoma cruzi I**

ROCÍO DEL PILAR NIÑO MOYANO

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE SALUD

ESCUELA DE MEDICINA

BUCARAMANGA

2010



**EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS EN DOS AISLADOS DE
*Trypanosoma cruzi***

ROCÍO DEL PILAR NIÑO MOYANO

TRABAJO DE GRADO:

Para optar el título de Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas

DIRECTOR

RODRIGO GONZALO TORRES SÁEZ

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE SALUD

ESCUELA DE MEDICINA

BUCARAMANGA

2010

Dedicatoria

**A Dios y a los cuatro ángeles de la guarda que me envió:
mis padres; Pia y José, mi esposo y amigo; Mario y mi
razón de ser; mi hijo, Mateo.**

Porque mi dedicación fue la suya propia.

Agradecimientos

- Al Dr. Rodrigo Gonzalo Torres Sáez, director de tesis e investigador principal del grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología, por sus enseñanzas, por las oportunidades que constantemente me brindó para crecer como profesional y especialmente por su apoyo incondicional durante el desarrollo del trabajo.
- A Dra. Clara Isabel González, del grupo de Investigación en Inmunología y Epidemiología Molecular por valiosas enseñanzas.
- A Martha Lucía Díaz, del grupo de Investigación en Inmunología y Epidemiología Molecular, por su acompañamiento, constante, durante el manejo de los cultivos.
- Al Dr. Aldo Solari Illescas, del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Chile por sus enseñanzas y por la donación de los aislados de *Trypanosoma cruzi*; utilizados para el desarrollo de la investigación.
- Al Dr. Jesús Vásquez, a la Dra. Anabel Marina y demás integrantes del Servicio de Proteómica (Dany, Espe, Yoli y Merche) del CBMSO por recibirme en su laboratorio, como una integrante más, y por todas las instrucciones que fueron necesarias para el éxito de éste trabajo.
- Al Dr. Omar Triana Chávez y a la Dra. Patricia Escobar Rivero por aceptar realizar la evaluación del trabajo y por sus significativas recomendaciones.
- A Colciencias, a la Universidad Industrial de Santander y al Departamento de Ciencias básicas Biomédicas; por el financiamiento.
- Compañeros, amigos y familiares que hicieron posible que se llevara a cabo éste trabajo; de forma especial a: A mis padres, a Yeny Bueno, Ciro Rozo, Mario Barón, Diana Angarita, Mónica Flores, Lucas Agudelo, Federico Moreno y Víctor Hernández.

CONTENIDO

Pág.

INTRODUCCIÓN	19
1. MARCO TEÓRICO	24
1.1. Enfermedad de Chagas	24
1.1.1. Epidemiología	25
1.1.2. Manifestaciones clínicas	25
1.1.3. Diagnóstico y Tratamiento.....	28
1.2. <i>Trypanosoma cruzi</i>	34
1.3. Interacción hospedero-parásito	38
1.4. Proteómica	39
1.4.1. Importancia de la proteómica en el descubrimiento de nuevas dianas para medicamentos y vacunas	41
1.4.2. Electroforesis de proteínas en dos dimensiones (2D)	42
1.4.3. Espectrometría de masas para la caracterización de proteínas en proteómica	45
1.4.4. Proteómica y <i>Trypanosoma cruzi</i>	52
2. MATERIALES Y MÉTODOS	54
2.1. Material Biológico	54
2.2. Clonación	54
2.3. Cultivo y crecimiento de los clones	55
2.4. Extracción de las proteínas por lisis celular	55
2.5. Cuantificación de proteínas solubles totales	56
2.6. Electroforesis de Proteínas en una dimensión (1D)	57
2.7. Electroforesis de proteínas en dos dimensiones (2D)	59
2.8. Análisis bioinformático de los “spots” de los geles de electroforesis 2D	61
2.9. Espectrometría de Masas MALDI-TOF	61
2.10. Espectrometría de masas con trampa iónica (Sistema LC/MS/MS)	62
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
3.1. Extracción y cuantificación de proteínas de epimastigotes de <i>T.cruzi</i>	63

3.2. Electroforesis unidimensional de proteínas de epimastigotes de los aislados de <i>T.cruzi I</i>	65
3.3. electroforesis bidimensional de proteínas de epimastigotes de <i>T.cruzi I</i>	68
3.3.1. Estandarización de la técnica	68
3.3.2. Análisis proteómico comparativo	77
3.4. Identificación de las proteínas expresadas diferencialmente por espectrometría de masas	78
3.4.1. Correlación de las proteínas identificadas con del desarrollo clínico de la enfermedad de Chagas	81
4. CONCLUSIONES	91
5. RECOMENDACIONES	93
6. ESTRATEGIAS DE PUBLICACIÓN	95
7. BIBLIOGRAFÍA	96
Anexos	103

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1.1. Ciclo de vida del <i>Trypanosoma cruzi</i> .	36
Figura 1.2. Analizadores de masa.	46
Figura 3.1. Gel de SDS-PAGE al 12% de los extractos proteicos de epimastigotes del aislado 338 de <i>T.cruzi</i> lisados por los métodos descritos en la tabla 3.1.	66
Figura 3.2. Gel de electroforesis SDS-PAGE-1D al 12% de los clones LQ, MF y 338 lisados utilizando el buffer de lisis.	67
Figura 3.3. Gel de electroforesis SDS-PAGE-2D al 12% de las proteínas de epimastigotes de <i>T.cruzi</i> del clon 338 usando tiras con gradiente de pH 3-10.	69
Figura 3.4. Análisis de los spots de las imágenes de los geles SDS-PAGE-2D de las proteínas de epimastigotes del clon 338 de <i>T.cruzi</i> .	69
Figura 3.5. Geles de electroforesis SDS-PAGE-2D al 12% de las proteínas de los clones provenientes de los aislados LQ (CC) y MF (Asintomático)	71
Figura 3.6. Análisis comparativo de imágenes de los mapas proteómicos de los clones LQcl1 y MFcl1.	71
Figura 3.7. Imagen del gel de electroforesis SDS-PAGE-2D al 12 % indicando las proteínas del clon LQcl1 analizadas por espectrometría de masas MALDI-TOF.	72
Figura 3.8. Análisis de imágenes de los geles SDS-PAGE-2D de las proteínas del clon 338.	74
Figura 3.9. Análisis de imágenes de los geles SDS-PAGE-2D de las proteínas del clon 338.	75
Figura 3.10. Imagen del Gel "Master" generado por el programa PD-QUEST de los mapas proteicos del clon 338 correspondiente al análisis de los segundos fragmentos de las tiras.	75

Figura 3.11. Imágenes de los primeros fragmentos de los geles de electroforesis SDS-PAGE-2D al 12% de los clones de <i>T. cruzi</i> .	77
Figura 3.12. Análisis proteómico comparativo entre las réplicas de los clones de <i>T. cruzi</i> / LQcl1 MFcl1.	78
Figura 3.13. Imagen de gel de electroforesis bidimensional del clon MFcl11 (asintomático) indicando las proteínas con niveles de expresión aumentados con respecto al clon LQcl1 (CC).	79
Figura 3.14. Imagen de gel de electroforesis bidimensional del clon LQcl1 (CC) señalando las proteínas identificadas con niveles de expresión aumentados con respecto al clon MFcl1 (Asintomático).	80
Figura 3.15. Histograma de la expresión diferencial de la enolasa mostrado en el gel "Master".	81
Figura 3.16. Histograma de la expresión diferencial de la HSP60 mitocondrial mostrado en el gel "Master".	83
Figura 3.17. Histograma de la expresión diferencial de la proteína de choque térmico mitocondrial mostrado en el gel "Master".	84
Figura 3.18. Histograma de la expresión diferencial de la Proteína quinasa C activada mostrado en el gel "Master".	85
Figura 3.19. Histogramas de la expresión diferencial de las metalocarboxipeptidasas mostrados en el gel "Master".	87
Figura 3.20. Histogramas de la expresión diferencial de las cistationa beta-sintasas mostrados en el gel "Master".	89

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 3.1. Efecto del tipo de lisis celular sobre la extracción de proteínas de epimastigotes del aislado 338.	63
Tabla 3.2. Concentración de proteínas totales obtenidas mediante lisis química de los epimastigotes de los clones LQ, MF y 338.	64
Tabla 3.3. Reporte del análisis de las réplicas correspondientes a las proteínas de epimastigotes del clon 338.	70
Tabla 3.4 Reporte del análisis de los primeros fragmentos del gel (Tira cortada pH 5-8) correspondiente a las proteínas de epimastigotes del clon 338.	74
Tabla 3.5. Reporte del análisis de los segundos fragmentos del gel correspondiente a las proteínas de epimastigotes del clon 338.	76
Tabla 3.6. Proteínas identificadas con el motor de búsqueda Phenyx.	80

Lista de anexos

	Pág.
Anexo 1. Curva de calibración para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford.	103
Anexo 2. Identificación de la proteína HSP 60 utilizando MASCOT como motor de búsqueda.	104
Anexo 3. Identificación de la proteína Kinasa C activada utilizando MASCOT como motor de búsqueda.	105
Anexo 4. Análisis por LC-MS/MS del “spot” marcado como 3307 en el gel de electroforesis bidimensional correspondiente a los extractos proteicos del clon LQcl1 y búsqueda en bases de datos utilizando los motores de búsqueda de búsqueda Sequest y Phenyx.	106
Anexo 5. Análisis por LC-MS/MS de los “spot” marcado como 3612 en el gel de electroforesis bidimensional correspondiente a los extractos proteicos del clon LQcl1 (figura 3.14) y búsqueda en bases de datos utilizando los motores de búsqueda de búsqueda Sequest y Phenyx.	107
Anexo 6. Análisis por LC-MS/MS del “spot” marcado como 5310 en el gel de electroforesis bidimensional correspondiente a los extractos proteicos del clon LQcl1 (figura 3.14) y búsqueda en bases de datos utilizando los motores de búsqueda de búsqueda Sequest y Phenyx.	108
Anexo 7. Análisis por LC-MS/MS del “spot” marcado como 5712 en el gel de electroforesis bidimensional correspondiente a los extractos proteicos del clon LQcl1 (figura 3.14) y búsqueda en bases de datos utilizando los motores de búsqueda de búsqueda Sequest y Phenyx.	109
Anexo 8. Análisis por LC-MS/MS del “spot” marcado como 7509 en el gel de electroforesis bidimensional correspondiente a los extractos proteicos del clon LQcl1 (figura 3.14) y búsqueda en bases de datos utilizando los motores de búsqueda de búsqueda Sequest y Phenyx.	110
Anexo 9. Análisis por LC-MS/MS del “spot” marcado como 8410 en el gel de electroforesis bidimensional correspondiente a los extractos proteicos del clon LQcl1 (figura 3.14) y búsqueda en bases de datos utilizando los motores de búsqueda de búsqueda Sequest y Phenyx.	111

Anexo 10. Análisis por LC-MS/MS del “spot” marcado como 6614 en el gel de electroforesis bidimensional correspondiente a los extractos proteicos del clon LQcl1 (figura 3.14) y búsqueda en bases de datos utilizando los motores de búsqueda de búsqueda Sequest y Phenyx. **112**

Anexo 11. Análisis por LC-MS/MS del “spot” marcado como 6613 en el gel de electroforesis bidimensional correspondiente a los extractos proteicos del clon LQcl1 (figura 3.14) y búsqueda en bases de datos utilizando los motores de búsqueda de búsqueda Sequest y Phenyx. **113**

Anexo 12. Memorias del trabajo presentado en el congreso de Proteómica 2009 “Joint Congress SEProt-LAHUPO. Proteomics and Human Proteome-from bench to bedside”. Pamplona (España), 2009. **114**

Anexo 13. Memorias del trabajo presentado en el XIV Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical y X Simposio PECET. Medellín, 2009. **116**

Abreviaturas

1D	Una dimensión
2D	Dos dimensiones
2DE	Electroforesis en dos dimensiones
3D	Tridimensional
APCI	Ionización química a presión atmosférica
B	Analizadores de sectores magnéticos
BHI	Infusión de hígado y corazón
BSA	Solución de albúmina de bovino
CBS	Cistationa beta-sintasas
CC	Cardiopatía Chagásica
CCC	La cardiopatía chagásica crónica
CHAPS	3-(cloroamido propil)-dimetilamonio-1 propanosulfato
CS	Cisteína sintetasa
DHB	Ácido 2,5-di-hidroxi Benzoico
E	Analizadores de sectores eléctricos
EC	Enfermedad de Chagas
ESI	Ionización suave electrospray
FAB	Ionización por bombardeo con átomos rápidos
FD	Desorción por campo eléctrico
FT	Transformada de Fourier
HSP	Proteínas de choque térmico mitocondrial
IC	Insuficiencia cardíaca
ICR	Analizadores de resonancia ciclotrónica de iones

ICR	Analizador de resonancia electrónica de iones
IEF	Isoelectroenfoque
LC	Cromatografía líquida
LIT	“Liver Infusión Triptose”
m/z	Maza por unidad de carga
MALDI	Desorción de iones por láser asistida por matriz
MCP	Metalocarboxipeptidasas
MS	Espectrometría de masas
MS (GC/MS)	Sistemas acoplados para cromatografía de gases
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD	Desorción por plasma
pI	Punto isoeléctrico
PKC	Proteína Quinasa C activada
PMSF	“Phenylmethylsulfonyl fluoride”
PR	Fase reversa
Q	Analizadores de cuadrupolo
QIT	Trampa de iones cuadrupolar
SDS	Dodecil sulfato sódico
-SH	Grupos tioles
SIMS	Espectrometría de masas de iones secundarios
S-S	Puentes disulfuro
<i>T.cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TcMCP	Metalocarboxipeptidasas del <i>Trypanosoma cruzi</i>
TEMED	“Tetramethylethylenediamine”
TFA	Ácido trifluoroacético

TOF	Analizadores de tiempo de vuelo
UV	Ultra violeta
Z	Zimodem

Resumen

Título:

Expresión diferencial de proteínas en dos aislados de *Trypanosoma cruzi* I.*

Autor:

Rocío del Pilar Niño Moyano **

Palabras clave:

Análisis proteómico, electroforesis de proteínas 2D, enfermedad de Chagas.

Descripción:

Se investigó un enfoque alternativo que permitiera entender las diferencias en los fenotipos de *T. cruzi* I y la patogénesis de la enfermedad de Chagas. En este sentido, se planteó como hipótesis que estas diferencias podrían ser atribuidas a la expresión diferencial de proteínas de cepas de *T. cruzi* I. Por esta razón, se comparó la expresión de los perfiles proteómicos de dos clones de *T. cruzi* I, obtenidos de un individuo asintomático (clon MF) y un paciente con cardiomiopatía chagásica (CC) (clon LQ). Para determinar los perfiles de expresión proteica de los dos aislados, se utilizó electroforesis bidimensional (2D), para la identificación de las proteínas que fueron expresados diferencialmente entre estos dos clones. A continuación, se realizó un análisis de las imágenes de los geles de proteínas usando el Software PD-Quest (Bio-rad). Los "spots" de interés fueron procesados y analizados por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) y búsqueda en bases de datos (NCBI-nr/all taxa) y (UniProt-euglenozoa) utilizando los motores de búsqueda Phenyx y Sequest; respectivamente. Las proteínas identificadas inequívocamente de forma diferencial entre ambos clones fueron: una enolasa, dos proteínas de choque térmico mitocondriales, dos metalo-carboxipeptidasas, una proteína quinasa C activada y una cistationa beta-sintasa, expresadas en mayor medida en el gel correspondiente aislado obtenido del paciente con CC.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Salud – Escuela de Medicina – Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas – Director TORRES SÁEZ, Rodrigo Gonzalo.

Abstract

Title:

Differential expression of proteins from *Trypanosoma cruzi* I strains *

Author:

Rocío del Pilar Niño Moyano**

Keywords: Proteomic analysis, 2D protein electrophoresis, Chagas disease.

Description:

In this work, we have investigated an alternative approach for understanding differences in both *T.cruzi* phenotypes and Chagas disease pathogenesis. In this sense, we set out as hypothesis that these differences could be attributed to differential expression of proteins from *T.cruzi* strains. For this reason, in this study proteomic expression profiles of two isolates from *T.cruzi* I were compared, whose were obtained from an asymptomatic individue (MF isolated) and a patient with cardiac form of Chagas disease (LQ strain). For determination of protein expression profiles of these two isolates, bidimensional (2D) electrophoresis for identification of protein differentially expressed between these two strains was used. Later, analyses of protein gel images were carried out using PD-Quest Software (Bio-rad). Spots of interest were processed and analyzed by liquid chromatography with *tandem* mass spectrometry detection (LC-MS/MS) using *NCBI* and UniProt databases and two different search engines, namely PHENYX and SEQUEST, respectively for the identification and characterization of proteins and peptides. The unequivocally spots identified from a differential form between both type of strains were: a enolase, two mitochondrial heat shock proteins, a kinase protein C receptor, two isoforms of metallo-carboxipeptidases and two isoforms of cyathionine beta-synthases; expressed in major extension in a patient with chagasic cardiomyopathy.

* Thesis

** Faculty of Health –School of Medicine– Mastery in Basic Biomedical Science – Director TORRES SÁEZ, Rodrigo Gonzalo.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas (EC) o tripanosomiasis Americana es una enfermedad endémica en América Latina, donde aproximadamente entre 13 y 15 millones de personas se ven afectadas (WHO, 2005). En Colombia, alrededor del 5% de la población, de las zonas endémicas, está infectada (Salazar, 2006) y Santander es una de las divisiones territoriales donde la prevalencia de la infección es más alta (Gutierrez, 2004 y Moncayo, 2003). Esta enfermedad es causada por la infección transmitida por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T.cruzi*); parásito tripanosomátido que exhibe un alto grado de polimorfismo genético (Pedroso *et al.*, 2007; Tibayrenc *et al.*, 1993 y Macedo *et al.*, 1998). Al igual que otros miembros de la familia Trypanosomatidae, *T.cruzi* es un organismo digenético, por lo que su ciclo de vida se alterna entre dos diferentes hospederos: uno invertebrado que actúa como vector y una serie de vertebrados, principalmente silvestres, y de mamíferos domésticos, entre los cuales se incluye al hombre (Souza, 2002 *et al.* y Pérez *et al.*, 2009). El parásito se presenta en cuatro formas o estadios: epimastigotes, forma no infectiva que prolifera en el intestino del insecto vector; tripomastigotes metacíclicos, formas infecciosas que se transmiten a los mamíferos a través de las heces los insectos vectores; amastigotes, que se multiplican intracelularmente por fisión binaria; y tripomastigotes del torrente sanguíneo, que se liberan en la sangre y los ganglios linfáticos y pueden llegar a invadir cualquier célula en el cuerpo (Paba *et al.*, 2004).

La pobreza rural, las viviendas deficientes, la tala y quema de árboles, y la intromisión del hombre en el ciclo natural del parásito, han favorecido

la propagación de la enfermedad del Chagas en América Latina (Rodríguez *et al.*, 2004).

Las manifestaciones clínicas de la EC dependen de la etapa de infección y se presentan en dos fases: una fase aguda, generalmente asintomática, con parasitemia evidente que puede durar semanas, una fase crónica asintomática indeterminada, que puede persistir indefinidamente, y después de varios años o décadas, aproximadamente, entre el 10 y 40% de los individuos asintomáticos manifiestan una enfermedad crónica que se caracteriza por la ausencia o baja presencia de parásitos en la circulación o tejidos y lesiones en diversos órganos, principalmente el corazón y/o el sistema digestivo. Estas presentaciones de la enfermedad se denominan respectivamente, la forma digestiva y cardíaca (CC) de la enfermedad de Chagas (Cassio *et al.*, 2006).

La enfermedad de Chagas tiene un resultado clínico variable que va desde infecciones asintomáticas hasta la enfermedad crónica grave con afectación cardiovascular o gastrointestinal, o incluso graves episodios agudos (Macedo *et al.*, 1998). La base de esta variabilidad está relacionada en parte con la complejidad de la población de parásitos que muestran diferencias en sus características biológicas. Por lo tanto, se constituye en un desafío importante correlacionar la variabilidad genética del parásito con la patogénesis (Buscaglia y Di Noia, 2003), con el objeto de conocer si las diferencias que se observan en la presentación de los cuadros clínicos se deben a las diferencias biológicas entre las cepas de *T. cruzi* o a las diferencias genéticas entre las poblaciones humanas susceptibles (Guzmán *et al.*, 1999).

T. cruzi, es un *Trypanosomatidae* perteneciente al Orden *Kinetoplastida*. Es diploide y su modo de reproducción es predominantemente clonal (Tibayrenc, 1986). Constituye una población heterogénea que consta de diferentes poblaciones, las cuales circulan entre el hombre, los vectores, los animales domésticos y los reservorios silvestres. Estas poblaciones muestran comportamientos diferentes en términos de parasitemia, virulencia, patogenicidad, interacción con las células y sensibilidad a los fármacos (Baptista *et al.*, 2006 y Buscaglia y Di Noia, 2003). La base de esta variabilidad se atribuye en parte a la complejidad de la población de parásitos que consiste en múltiples clones que muestran diferencias en sus características biológicas con una gran heterogeneidad tanto genotípica como fenotípica (Macedo *et al.*, 2002; Dvorak *et al.*, 1984 y Tibayrec *et al.*, 1993).

Por análisis bioquímicos de isoenzimas se han clasificado las poblaciones del parásito en tres grupos denominados zimodemas (Z1-Z3) (Ready 1980). Sin embargo, por estudios moleculares utilizando diferentes marcadores, *T. cruzi*, se clasificó, inicialmente, en dos grandes grupos llamados *T. cruzi I* y *T. cruzi II*; con cinco subgrupos identificados dentro del grupo *T. cruzi II* (*Ila*, *Ilb*, *Ilc*, *Ild* y *Ile*) (Brisse, 2000), actualmente, las cepas de *T. cruzi* se clasifican en seis (*T. cruzi I-VI*) (Zingales, 2009).

En Colombia *T. cruzi I* es el grupo predominante (Mejía *et al.*, 2009; Salazar *et al.* 2006 y Saravia *et al.*, 1987). Además, presenta una mayor variabilidad genética que la reportada en otros países del cono sur (Salazar *et al.* 2006, Montilla *et al.* 2002, Rodríguez *et al.* 2002, Cuervo *et al.* 2002, Rodríguez *et al.* 2002, Ruiz *et al.* 2000, Jaramillo *et*

al. 1999, Triana et al. 1999 y Holguín et al. 1987), y se ha encontrado asociado, tanto con ciclo doméstico como con el ciclo selvático, y con la forma crónica de la enfermedad (Cardiopatía Chagásica) (Cuervo 2002). En el departamento de Santander hay una prevalencia en humanos de 80% de *T. cruzi I*, con 20% de Z3 *T. cruzi IIa* (Devia 1999).

Se han realizado numerosos análisis inmunológicos, bioquímicos y funcionales de proteínas relevantes en la interacción hospedero-parásito en la patogénesis de la enfermedad de Chagas (López et al. 2010, Valck et al. 2010, Nogueira et al. 2010, Jacobs et al. 2009, Murata et al. 2008, Villalta et al. 2009, Alves y Colli, 2008, Oliveira et al. 2007 y Bell 2006). Algunos de estos estudios se han dirigido a establecer una correlación entre la cepa infectante y las formas clínicas de la enfermedad (Babtista et al., 2006). La mayoría de ellos involucran cepas pertenecientes al grupo *T. cruzi II*, y la metodología utilizada sólo ha permitido la evaluación de un número limitado de genes predeterminantes, lo que ha restringido la obtención de resultados concluyentes debido a que la regulación génica en tripanosomátidos es principalmente post-transcripcional. Sin embargo, existen tecnologías actuales como la proteómica (Alves et al. 2010), las cuales permiten el análisis completo de las proteínas expresadas, y podrían permitir el desarrollo de mejores aproximaciones al estudio y entendimiento de la enfermedad de Chagas.

Por estas razones, se utilizaron, en este estudio, herramientas como electroforesis de proteínas en dos dimensiones (2D) buscando separar, con una alta resolución proteínas extraídas de los parásitos; para realizar un análisis comparativo de la expresión de las proteínas de epimastigotes de dos clones de *T. cruzi I*, obtenidos de un individuo con CC (clon LQcl1) y uno asintomático (clon MFcl1), con el fin de

identificar, por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS), proteínas cuya expresión se encontrara aumentada en los epimastigotes del clon LQcl1, las cuales pudieran estar implicadas con la presentación de la CC y permitieran establecer una relación entre las proteínas expresadas diferencialmente y el desarrollo clínico de la enfermedad.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas, descrita por primera vez en 1909 por Carlos Chagas, es causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, que se transmite a los humanos por insectos triatomíneos. Ésta se originó hace millones de años como una infección enzoótica de los animales salvajes, la cual comenzó a ser transmitida a los humanos cuando éstos invadieron ecotopos silvestres. Aunque la evidencia de la infección humana se ha encontrado en momias de 9.000 años de antigüedad, la enfermedad de Chagas endémica se estableció como una zoonosis (que puede transmitirse de otros animales vertebrados a seres humanos) sólo en los últimos 200-300 años, cuando los triatomíneos se adaptaron al entorno doméstico (Coura JR y Dias JC, 2009). La infección también se puede producir a través de la transfusión de sangre, transmisión congénita, trasplante de órganos, accidentes de laboratorio, lactancia materna y contaminación oral (Gopikrishna Pudukollu, 2007 y Prata A, 2001). La mayoría de los pacientes se infectan durante la infancia. La etapa temprana de la infección generalmente no es grave, pero de vez en cuando conduce a la muerte, especialmente en los niños. Sin embargo, en aproximadamente una tercera parte de los que están infectados, los síntomas crónicos se desarrollan después de 10-20 años. Además, disminuye la esperanza de vida media para aquellos pacientes que desarrollan los síntomas crónicos, (Gopikrishna et al. 2007).

1.1.1. Epidemiología

Se ha ido demostrando que la enfermedad de Chagas está expandida en toda América Latina, con un alto impacto en la morbilidad y la mortalidad de la población (Días, 2002). Se estima que, en este continente, alrededor de 15 a 16 millones de personas están infectadas con *Trypanosoma cruzi*, y de 75 a 90 millones están expuestas a la infección (Coura JR y Dias JC, 2009). La principal estrategia de control se basa en la prevención de la transmisión, especialmente mediante la eliminación de los insectos vectores domésticos y control de la transmisión por transfusión sanguínea. Sin embargo, los programas de control sólo comenzaron a aplicarse después de la década de 1970, cuando se demostró el alto impacto social de la enfermedad de Chagas. Del mismo modo, la detección de los donantes de sangre infectados en América Latina sólo se inició en la década de 1980, tras la aparición del SIDA. (Días, 2002). A su vez, con el aumento de la migración urbana se ha extendido la enfermedad de Chagas a las ciudades. En los países no endémicos, puede ser de transmisión vertical y por transfusión de sangre o trasplante de órganos (Gopikrishna, 2007 y Prata A, 2001).

1.1.2. Manifestaciones clínicas

En los humanos, una característica notable de la enfermedad de Chagas es la variedad de presentaciones clínicas que incluyen una forma indeterminada, cardiomiopatías y alteraciones digestivas. La severidad y síntomas de la enfermedad varían en las diferentes regiones geográficas. Se ha sugerido que dicha variabilidad puede ser el resultado de la heterogeneidad entre los aislados del *T. cruzi* o de la respuesta inmunitaria del huésped (Souto, 1996).

La enfermedad presenta tres períodos que se clasifican como: fase aguda, fase crónica indeterminada o latente y una fase crónica determinada. El período de incubación en la fase aguda es de 4 a 10 días y de menor duración cuando la vía de adquisición es transfusional (Werner et al., 2008).

Período agudo

Generalmente es asintomático, y más frecuente en personas jóvenes. Se evidencia una alta parasitemia, con síntomas y signos transitorios. Este período se extiende por dos a cuatro meses. Alrededor del 1 a 2% de los casos de enfermedad de Chagas se identifican en esta etapa (Werner et al., 2008). La afectación cardíaca está presente en más del 90% de los casos (Parada, 1997 y Gopikrishna et al., 2007). Los hallazgos de laboratorio son inespecíficos. Así por ejemplo, las pruebas serológicas para la infección por *T. cruzi* suelen ser negativas durante los primeros semanas, pero los parásitos circulantes pueden ser detectados por xenodiagnóstico. La recuperación espontánea se produce en un período de unos pocos meses en más de un 95% de los pacientes. La mortalidad en esta etapa suele ser secundaria a miocarditis (Gopikrishna et al, 2007).

Período crónico indeterminado o latente

Representa entre 50 y 70% de todos los pacientes chagásicos. Se caracteriza por la ausencia de síntomas cardíacos y digestivos. Los pacientes tienen muy baja o nula parasitemia. A pesar de que la prueba serológica sigue siendo reactiva, otros exámenes de laboratorio son normales, tales como: electrocardiograma y radiografías. Esta

forma persiste, por lo menos en 30% de los chagásicos, durante toda su vida. El resto puede evolucionar a una forma crónica determinada, en un lapso de 10 a 30 años. En Chile, por ejemplo, el 2% de los pacientes podrían anualmente pasar de la forma crónica indeterminada a cardiopatía crónica. En Brasil, este porcentaje es menor (Bareto *et al*, 1995 y Werner, *et al.*, 2008).

Período crónico determinado

Las formas crónicas determinadas son principalmente la cardiopatía, colonopatía y esofagopatía (Moncayo y Silveira, 2009). El compromiso de otros órganos es infrecuente, tales como estómago, duodeno, vejiga, uréteres, entre otros. Estas formas de presentación pueden ocurrir separadamente o coexistir en un mismo enfermo. En esta etapa existe una parasitemia baja. Se estima que aproximadamente el 30% de los chagásicos tendrían manifestaciones en la etapa crónica, lo que podría aumentar al emplear métodos diagnósticos más sensibles (Bestetti, 1997).

La cardiomiopatía chagásica es la manifestación clínica más frecuente y grave de la enfermedad de Chagas y se asocia con mal pronóstico y altas tasas de mortalidad en comparación con la insuficiencia cardíaca producida por otras causas (Bestetti, 1997). La cardiopatía chagásica crónica (CCC) se presenta en el 10 al 30% de estos pacientes, mientras que en Chile y Brasil son el 30% de los casos. Ésta se caracteriza por su gravedad y representa la principal causa de muerte de estos enfermos. La cardiopatía evoluciona a la insuficiencia cardíaca, siendo las arritmias frecuentes y variadas. En corazones dilatados, se presentan fenómenos trombo-embólicos que pueden ocasionar infartos pulmonares y cerebrales. En un comienzo, la CCC puede ser

asintomática, pero con evidentes alteraciones electrocardiográficas (Werner Apt B, 2008).

1.1.3. Diagnóstico y Tratamiento

Diagnóstico

Métodos parasitológicos:

Métodos directos:

Examen de sangre al fresco: Con esta técnica se pretende visualizar la presencia de parásitos circulantes en la sangre del paciente. La sensibilidad durante el pico de parasitemia, en la fase aguda, es menor al 50%, para un sólo examen y debe ser repetido varias veces para diferentes muestras de sangre de un mismo paciente, para aumentar su sensibilidad (Bueno, 2007).

Extendido coloreado: Con este método se pretende identificar morfológicamente la especie de *Trypanosoma*. Se realiza cuando el examen al fresco resulta positivo (Bueno, 2007).

Gota gruesa: Con este método se pretende concentrar un mayor número de parásitos en un área reducida. Durante la fase aguda la sensibilidad puede alcanzar el 66% y la probabilidad de éxito se incrementa en función de número de veces que se repita.

Métodos de concentración:

Análisis del extendido de la “capa blanca”: Consiste en centrifugar la sangre heparinizada del paciente y observar al microscopio una fracción

leucocitaria enriquecida. Este método aumenta la sensibilidad del examen al fresco en la fase aguda.

Triple centrifugación: Consiste en remover paulatinamente los eritrocitos de la sangre heparinizada, mediante centrifugaciones a baja velocidad. Luego se centrifuga el plasma recolectado a mayor velocidad para buscar los parásitos en el sedimento. La sensibilidad puede alcanzar hasta un 70% en fase aguda (Bueno, 2007).

Métodos parasitológicos indirectos:

Xenodiagnóstico: Consiste en la demostración de *T. cruzi* en el hospedador intermediario, previamente alimentado con sangre del paciente sospechoso. Este método permite amplificar el número de parásitos que se encontraban presentes en la sangre, debido a la fácil multiplicación del parásito dentro del vector. Para realizarlo, se usan ninfas de triatominos no infectados. Con el fin de constatar la presencia del protozoo dentro del vector, se analiza el contenido intestinal de los triatominos alimentados con la sangre del paciente (Jaramillo 2004). El análisis debe realizarse entre 30 y 45 días después de la ingestión. En las mejores condiciones se ha reportado que la sensibilidad del método, durante la fase crónica podría alcanzar el 60% (Bueno 2007).

Hemocultivo: Consiste en colocar muestras de sangre del paciente, en tubos con medio de cultivo. Las muestras son revisadas a los 20, 30 y 45 días, buscando formas epimastigotes (Jaramillo 2004). En la fase aguda, su sensibilidad podría alcanzar el 100%. Durante la fase crónica, presenta niveles de sensibilidad inferiores al xenodiagnóstico, pero permite aislar más fácilmente cepas del parásito.

Inoculación en animales sensibles: Se usa principalmente el ratón o el cobayo, a los cuales se les inocula sangre del paciente tratada con anticoagulantes o con una porción de la “capa blanca”. El período de observación es variable, desde 3-4 semanas. Se buscan los parásitos en sangre de animales por el método del examen al fresco y se colorean en extendidos.

Diagnóstico Parasitológico Molecular: El desarrollo de una prueba de amplificación de ADN, podría llenar los requisitos para tener una prueba de diagnóstico parasitológico. En términos generales, si los primers son específicos y son empleados a la temperatura de reconocimiento adecuada, el producto de amplificación debería ser específico. Como todos los Eucariotes, *T. cruzi* presenta dos genomas distintos, situados en dos compartimientos celulares bien definidos como el núcleo y la mitocondria. El genoma de *T. cruzi* es relativamente superior ($100\text{-}200 \times 10^6$ pares de base (pb)) al de otros parásitos tales como el de *Leishmania* ($45\text{-}65 \times 10^6$ pb), o *T. brucei* (25×10^6 pb). La cantidad de ADN, varía entre diferentes aislados y entre clones de un mismo aislado. La prueba consiste en la amplificación del ADN del Cinetoplasto y del ADN nuclear en una muestra de ADN del paciente.

Métodos serológicos:

Reacción de fijación del complemento: Un anticuerpo específico en presencia de antígenos de *T. cruzi* es capaz de unirse formando la unión antígeno-anticuerpo, la cual es capaz de fijar complemento, por la fracción Fc de la inmunoglobulina. Esta unión “no visible”, es puesta en evidencia por un sistema indirecto a través del empleo de glóbulos rojos

de carnero, sensibilizados con antígenos del parásito. La sensibilidad está alrededor del 87%.

Hemoaglutinación indirecta: Consiste en la adherencia de antígenos específicos sobre la superficie de glóbulos rojos, que luego aglutinarán al producirse la reacción entre el antígeno y el anticuerpo homólogo existente en el suero inactivado del paciente. Esta reacción tiene una sensibilidad comparable a la reacción de fijación del complemento, pero es más sencillo su desarrollo e interpretación y no requiere de equipos especiales para su implementación (Bueno 2007).

Reacción de anticuerpos líticos: Consiste en incubar el suero de paciente con tripomastigotes sanguíneos purificados y vivos. La reacción se revela por la adición de complemento y se determina la lisis de los parásitos por recuento en cámara de Neubauer. La existencia de anticuerpos líticos se ha asociado a un efecto inmunoprotector, al postularse que cuando el paciente está curado, los títulos de este tipo de anticuerpos desaparecen. Esta reacción se hace negativa en ausencia de parásitos (esterilidad parasitaria), de ahí que se proponga como criterio de curación después del tratamiento (Bueno, 2007).

Acoplamiento a los anticuerpos: Dada la necesidad de incrementar la sensibilidad de las técnicas de detección, se desarrollaron una serie de cambios que amplifican las señales obtenidas. Fundamentalmente estos cambios ocurren en el segundo anticuerpo que a su vez reconoce al anticuerpo primario que es el que confiere la especificidad. Entre las más relevantes y en orden creciente de sensibilidad se encuentran: IFI, anticuerpo acoplado con molécula de fluoresceína; ELISA, una enzima acoplada al anticuerpo, o si se requiere de más sensibilidad, anticuerpo

Biotinado y amplificado con avidina, la cual a su vez posee acoplada varias moléculas de la enzima. A continuación se describen algunas de estas técnicas, basadas en detectar anticuerpos de pacientes chagásicos:

Reacción de inmunofluorescencia Indirecta (IFI):

Esta técnica posee más sensibilidad que las pruebas serológicas descritas. La reacción detecta la existencia de anticuerpos dirigidos a *T. cruzi*, frecuentemente formas epimastigotes de cultivo, que son reconocidos por los anticuerpos de las personas infectadas. Un segundo anticuerpo marcado con un fluorocromo que reconoce al anticuerpo específico que ha reconocido al parásito, nos permite detectarlos, cuando son observados en un microscopio para fluorescencia, equipado con luz ultravioleta. El fluorocromo se excita, permitiendo la identificación visual de las reacciones positivas. Los principales problemas que presenta esta técnica son: 1) la posible subjetividad en la interpretación de los resultados. 2) requiere el uso de equipos especializados. 3) requiere un personal entrenado. 4) Los resultados son cualitativos.

Reacciones inmunoenzimáticas: Esta técnica conocida bajo el nombre ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) se basa en la posibilidad de inmovilizar el antígeno a una fase sólida, sobre la cual se permite en una primera etapa la unión del anticuerpo. En una segunda etapa de la reacción, se añade un segundo anticuerpo acoplado a una enzima, permitiéndose la visualización de la reacción cuando se agrega el sustrato correspondiente. La reacción, luego de detenida con los reactivos adecuados, se puede leer por un cambio de color cuya intensidad es proporcional a la cantidad de anticuerpos que han

reconocido el antígeno fijado. Entre las ventajas que ofrece esta técnica se encuentran: la gran capacidad para procesar un número importante de muestras, sus resultados son cuantitativos, evitando la subjetividad a la hora de interpretar los resultados, fácil manejo y un bajo costo. Esta reacción es considerada como la de más alta sensibilidad, parámetro que varía dependiendo de la calidad y características de los antígenos empleados. Por ejemplo, los antígenos completos presentan altos niveles de sensibilidad, pero confieren baja especificidad. Los péptidos o proteínas recombinantes pueden ser muy específicos, pero disminuyen la sensibilidad, pudiendo diagnosticarse falsos negativos. Obviamente, la solución debería ser intermedia, sugiriéndose el empleo de varias proteínas recombinantes (Oelemann 1999, Ferreira 2001, Pereira 1990), pero aun así, se recomienda el empleo de varias pruebas para tener un diagnóstico certero. Aún cuando esta técnica podría alcanzar un 100 % de sensibilidad, la prueba con anticuerpos de pacientes Chagásicos presenta serios problemas de reactividad cruzada con otras enfermedades, tal como explicamos en los antecedentes.

Tratamiento

Los tratamientos actualmente utilizados son nifurtimox y benznidazol que muestran excesivos efectos secundarios. El tratamiento en la fase crónica está en debate debido a que es dudosa la eficacia del postratamiento (Aguilar *et al*, 2008), además, teniendo en cuenta que en la actualidad no existen vacunas la identificación de nuevos blancos terapéuticos y/o de diagnóstico, es uno de los principales desafíos en el control de la EC (Juri *et al*, 2009).

1.2. *Trypanosoma cruzi*

El *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), protozooario hemoflagelado perteneciente a la familia de los Tripanosomatideos, incluidos en el orden de los Kinetoplastidos, es el agente causal de la enfermedad de Chagas. La diferencia en cuanto a la severidad de la enfermedad en el hospedero humano y en otros mamíferos, se ha atribuido al pleomorfismo natural que presenta *T.cruzi*, el cual se demuestra al estudiar sus aspectos biológicos, bioquímicos y moleculares. Así, se han encontrado grandes diferencias en el comportamiento de las cepas tanto "*in vitro*" como "*in vivo*", y se han descrito posibles implicaciones del vector en la modulación de la virulencia de las cepas (Guzmán, 1999).

El *T. cruzi* comprende un conjunto de poblaciones de cepas que circulan entre vectores, hombre y reservorios, tanto domésticos como selváticos. Aunque se ha descrito como un taxón, *T. cruzi* presenta una gran heterogeneidad tanto genotípica como fenotípica (Dvorak, 1984, Tibayrec, 1993). Por análisis bioquímicos de isoenzimas se clasificaron las poblaciones del parásito en tres grupos denominados zimodemas (Z1-Z3) (Miles 1978, Ready 1980). Los estudios moleculares utilizando diferentes marcadores, inicialmente las clasificaron en dos grupos principales 1 y 2 (Souto 1993, 1996), denominados *T.cruzi I* y *T.cruzi II*; este último a su vez dividido en cinco grupos: *T. cruzi IIa*, *IIb*, *IIc*, *IId* y *IIf* (Momen, 1999). En la actualidad, por consenso, el comité de expertos reconoció que las cepas de *T. cruzi* deben ser clasificadas en seis; *T. cruzi I-VI* (Zingales, 2009).

Se han realizado aislamientos del parásito de diversos hospederos, demostrándose una gran variación intraespecífica en cuanto a

diferencias morfológicas de las formas sanguíneas, virulencia, habilidad para inducir lesiones, susceptibilidad para agentes quimioterapéuticos, constitución antigénica y capacidad de infección para células hospederas (Brener, 1985). El comportamiento del parásito puede estar influenciado por el mismo hospedero o las condiciones del medio ambiente. Se han identificado por varios métodos la marcada heterogeneidad a niveles bioquímico y molecular de las diferentes cepas del parásito, así como la variabilidad en su comportamiento biológico para correlacionar con los hallazgos clínicos y epidemiológicos (Guzmán, 1999).

Diferentes cepas del parásito presentan grandes variaciones relacionadas con, su distribución geográfica, virulencia y tropismo tisular. Se ha reportado la existencia de cepas de *T. cruzi* con tropismo a diferentes órganos, lo que se ha relacionado con características fisiológicas de las formas sanguíneas de diversas cepas (Brener, 1985 y Guzmán, 1999).

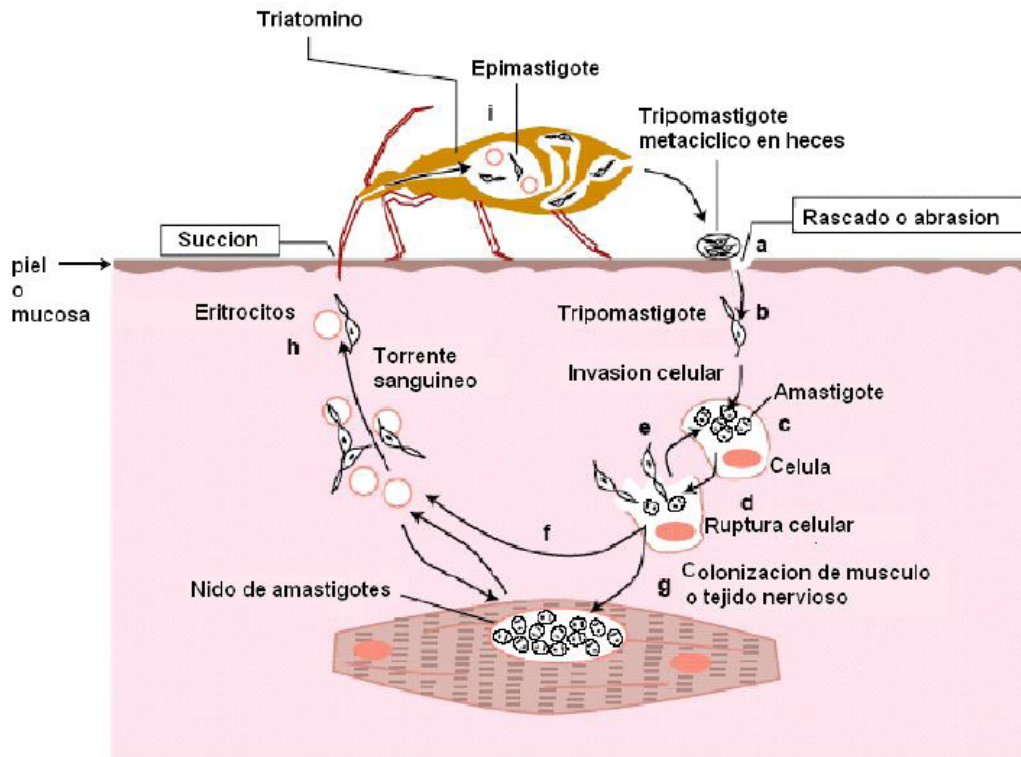


Figura 1.1. Ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi*. a) tripomastigotes metacíclicos en las heces del insecto, b) ingresan al hospedero durante el rascado o por medio de mucosas, c) diferenciación en amastigotes, d y e) ruptura celular y liberación de amastigotes y tripomastigotes, f) migración de tripomastigotes sanguíneos al torrente sanguíneo, g) invasión de nuevas células por amastigotes, h) tripomastigote sanguíneo en la circulación (Souza, 2002).

Obtenido de: http://digeset.ucoi.mx/tesis_posgrado/Pdf/Mario_Vladimir_Ramirez_Archila.pdf. Fecha de acceso 26 de mayo de 2010.

En la **Figura 1** se observa el ciclo de vida de *T. cruzi*. Durante su ciclo evolutivo, adopta aspectos morfológicos diferentes, siendo la presencia o ausencia de flagelo libre, y la posición con respecto al núcleo, lo que le da su característica morfológica. Se presenta en tres formas diferentes según el medio en que se halle:

- *Tripomastigote*: es la forma infectante, no proliferativa.
- *Epimastigote*: es la forma multiplicativa que se encuentra en el tubo digestivo del agente vector y en cultivos.
- *Amastigote*: es la forma multiplicativa intracelular en los mamíferos.

El parásito tiene dos tipos de hospederos: Uno intermediario, que son generalmente insectos de la familia *Triatominae*, tales como *Triatoma dimidiata* y *Triatoma infestans*, y otro definitivo que puede ser cualquier mamífero, incluyendo el hombre.

En cuanto al *ciclo evolutivo*, el insecto vector, a través de la picadura, ingiere los tripomastigotes de la sangre del mamífero infectado. Estos se transforman en epimastigotes y se multiplican por fisión binaria en el intestino medio del insecto. Los epimastigotes finalmente se diferencian a tripomastigotes metacíclicos infectantes en la parte distal de la ampolla rectal y son eliminados en las heces. Los insectos depositan sus heces infestadas sobre la piel del hospedero mientras se alimentan. La picadura produce prurito y a través del rascado se erosiona la piel permitiendo que los parásitos ingresen al organismo. Los tripomastigotes ingresan a las células del hospedero, allí se transforman en amastigotes para multiplicarse y formar el pseudoquiste. Luego se diferencian en epimastigotes y tripomastigotes, se rompe el pseudoquiste

y se produce la parasitemia. Estos tripomastigotes pueden infectar a otras células o ser ingeridos por el insecto vector (Ruiz y Nadal, 1997).

1.3. Interacción hospedero-parásito

La sobrevivencia de *T.cruzi* depende en gran parte de las proteínas y glicoconjugados que median la interacción parásito-hospedero. Los parásitos protozoos afectan la red inmunológica del hospedero, generando un desequilibrio a su favor, por lo que es necesario conocer y estudiar éstos mecanismos para atacar a los parásitos patógenos. En las interacciones parásito – hospedero, el parásito no destruye a su hospedero, porque eso sería destruirse a sí mismo como especie. Los mecanismos de acción se han ido conociendo gracias a las múltiples investigaciones en diferentes campos y hoy en día se tiene bastante información acerca del parásito y del papel del hospedero (Zingales,1987; Palau, 2000; Cruz, 2000) . Sin embargo, quedan todavía campos por explorar.

Para que una infección se establezca en un hospedero, es necesario que existan las condiciones adecuadas y que el parásito logre superar los mecanismos extra e intracelulares del hospedero. Primero, el parásito debe evadir la acción de los componentes del suero; una vez que tiene éxito, debe llevar a cabo el reconocimiento celular, unirse a la célula diana y lograr entrar en ella. Cuando lo consigue, debe eludir la acción celular, multiplicarse y transformarse para continuar su ciclo invadiendo otras células. Si un patógeno intracelular se establece en un hospedero susceptible, puede “engañar” a los mecanismos de defensa del hospedero antes, durante y después de entrar en la célula. Los factores del parásito como determinantes de la virulencia que

permiten la evasión de las defensas del hospedero, representan una forma de adaptación biológica para sobrevivir en el medio inmunológicamente hostil del hospedero.

En cuanto la infección con *Trypanosoma cruzi*, se sabe que este parásito puede entrar a distintos tipos de células mediante el reconocimiento ligando - receptores. Se conocen moléculas tipo lectina y receptores de la familia de las integrinas. El *Trypanosoma cruzi* es capaz de adquirir el ácido siálico de los mamíferos debido a la presencia de trans-sialidasas (TS) en su superficie celular. El ácido siálico se incorpora en las mucinas, que son moléculas proteicas unidas a la membrana del parásito (Reyes, 1994). La sobrevivencia de *T. cruzi* depende en gran parte de las proteínas y glicoconjugados que median la interacción parásito-hospedero. La mayoría de estas moléculas son ancladas a la membrana por el glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) (Palau, 2000).

1.4. Proteómica

La proteómica es un área de las ciencias biológicas que ha permitido ampliar la visión de la genómica desde una perspectiva de biología de sistemas. Mientras que el ADN es el archivo de información de la célula, las proteínas son el resultado de la expresión genómica y transcriptómica, y en última instancia, son las que determinan los procesos biológicos. La proteómica se define como el análisis completo de las proteínas de una célula, tejido u organismo en un punto dado en el tiempo y condición ambiental (Wilkins, et al, 1995 y MacDonald 2004). El análisis proteómico involucra tanto las alteraciones cualitativas de las proteínas como los cambios cuantitativos en los niveles de

expresión de proteínas que se producen en respuesta a un determinado conjunto de condiciones ambientales. Es posible que un genoma único de lugar a un número infinito de proteomas. Se ha demostrado que la información tanto de la expresión de ARNm y proteínas es necesaria para comprender una red de genes (Hatzimanikatis 1999). La expresión génica de los eucariotas se controla tanto de forma transcripcional como post-transcripcional, y diferentes estudios con los eucariotas superiores indican que el control post-transcripcional desempeña un papel crítico en la regulación de la expresión génica (Tomoyoshi, 1995). La importancia de la proteómica se basa en la capacidad de análisis para el estudio post-transcripcional y las modificaciones post-traduccionales de las proteínas (Dutt, 2000).

El campo de la proteómica abarca una serie de diferentes áreas de estudio. Las principales áreas de este ámbito son la proteómica funcional y de expresión diferencial. La proteómica funcional es un término usado para describir las interacciones de proteínas, caracterizar su actividad e identificar la presencia de modificaciones post-traduccionales, mientras que la proteómica de expresión, es la medición de los niveles de expresión de proteínas entre las células o bajo diferentes condiciones ambientales (MacDonald 2004).

Los pasos clave en la proteómica son la separación de mezclas complejas de proteínas, seguida de la identificación de éstas. El éxito de cualquier estudio de proteómica está directamente vinculado con la adecuada ejecución de la técnica de una manera coherente y reproducible.

1.4.1. Importancia de la proteómica en el descubrimiento de nuevas dianas para medicamentos y vacunas

El descubrimiento de medicamentos puede ser definido como un proceso de investigación que identifica y desarrolla una molécula que produce como resultado un efecto deseado en un organismo vivo. A pesar de que la célula humana está hecha de un gran número de genes, proteínas y metabolitos, la mayoría de las veces un fármaco está diseñado para actuar sobre una proteína. Aunque aparentemente puede parecer directo el proceso de encontrar una proteína que causa un efecto adverso y luego usar una molécula para bloquear los efectos, hay retos, tanto técnicos como fisiológicos, que hacen que el descubrimiento de fármacos sea un enorme desafío. El primer reto es encontrar la proteína objetivo. Una vez que un modelo adecuado se ha encontrado, el siguiente paso es identificar la proteína responsable de las condiciones adversas que se estudian. Este paso es donde los avances tecnológicos, que permiten los estudios de proteínas contenidas en células, tejidos y organismos, han cambiado los trabajos relacionados con el descubrimiento y diseño de fármacos (Veenstra, 2006).

Las proteínas se estudian para determinar si juegan un papel en el fenotipo de células particulares. Las tecnologías actuales permiten descubrimientos cuyos objetivos son identificar la mayor cantidad de información sobre tantas proteínas como sea posible para establecer si éstas están contribuyendo al fenotipo observado. La capacidad de reunir más información sobre las proteínas implicadas parece simplificar el problema, y permitir la caracterización de un gran número de dianas para nuevos medicamentos (Veenstra, 2006).

En todo caso, existe una limitación importante en el estudio de las proteínas de baja abundancia, debido a la falta de estrategias análogas a la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa para ácidos nucleicos (Dutt, 2000). El abordaje proteómico es una herramienta invaluable para el estudio de los patrones globales de la expresión génica. La aplicación de estos métodos en tripanosomátidos es particularmente importante, debido a que estos organismos no utilizan la iniciación de la transcripción como una etapa de regulación para controlar la expresión génica (Parodi et al, 2004) y uno de los mayores beneficios de la 2D-PAGE es la capacidad de resolver las proteínas que han sido objeto de modificaciones post-traduccionales (MacDonald, 2004).

1.4.2. Electroforesis de proteínas en dos dimensiones (2D)

Aunque el término "proteómica" fue formalizado en 1996, la herramienta experimental principal de supervisar en todo el genoma la expresión de proteínas, la electroforesis en dos dimensiones (2DE), ha estado disponible desde 1975. Ésta separa las proteínas primero por la carga utilizando un enfoque isoeléctrico y luego por tamaño utilizando electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Dutt, 2000). Es un método que tiene la capacidad de separar mezclas complejas que contienen miles de proteínas, además de resolver aquellas que comparten propiedades físico-químicas similares (Dunn, 1979). Es la herramienta de separación más utilizada en proteómica ya que es un técnica robusta y reproducible (Garfin, 2003).

Como se mencionó anteriormente, la 2DE es una técnica de separación ortogonal en la que las proteínas son separadas por dos principios

fisicoquímicos, primero dependiendo de su punto isoeléctrico (pI) (isoelectroenfoque (IEF)), y posteriormente por su masa molecular, haciendo uso de electroforesis en presencia del detergente dodecil sulfato sódico (SDS). Ambos procedimientos se llevan a cabo en geles de poliacrilamida. Una característica sobresaliente de éste método es que tanto el IEF como la SDSPAGE son técnicas de alta resolución (Garfin, 2003 y MacDonald, 2004).

Isoelectroenfoque

En el IEF, las proteínas se separan en un gradiente de pH que emplea anfóteros (compuestos sintéticos anfóteros) que por el pasaje de corriente eléctrica generan un gradiente de pH continuo y estable donde es posible separar proteínas con una diferencia de puntos isoeléctricos de 10^{-3} unidades de pH. Este gradiente continuo e inalterable durante el paso de la corriente eléctrica, inmoviliza a las proteínas en su valor de carga nula, generando un espectro-isoeléctrico en el interior del gel (Gaffin, 2003; Castagnino, 2008).

Electroforesis en geles de poliacrilamida

El principio básico de la electroforesis consiste en la migración de moléculas a través de un gel u otro tipo de matriz de naturaleza porosa, en el cual, por acción de un campo eléctrico, son separadas de acuerdo con su tamaño o peso molecular. A continuación, las moléculas son teñidas con diferentes colorantes facilitando así su visualización y posterior análisis e interpretación (Yábar, 2003).

La electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida puede llevarse a cabo en condiciones nativas (ND-PAGE) o desnaturalizantes (SDS-

PAGE). Las diferencias dependen de los componentes de los geles y el tratamiento de las muestras. En la SDS-PAGE, se incluyen agentes desnaturizantes: reductores, detergentes y agentes caotrópicos, mientras que en ND-PAGE, las proteínas mantienen su estructura tridimensional (3D) y las diferentes cadenas polipeptídicas pueden permanecer unidas, separándose no sólo en función de su carga eléctrica, sino también según su tamaño y forma. Por el contrario, cuando las proteínas se solubilizan en presencia del detergente aniónico SDS, éste se une a las proteínas, rompiendo interacciones hidrofóbicas y desnaturizándolas. Las proteínas desnaturizadas de la muestra adoptan una estructura en forma de bastoncillo con una serie de moléculas de SDS cargadas negativamente a lo largo de la cadena polipeptídica. Además, se une cada molécula de SDS por cada dos residuos de aminoácidos. La carga nativa original de la molécula está completamente enmascarada por la carga negativa del SDS. Los complejos SDS-proteínas presentan un valor carga/masa constante, y por lo tanto, se separan de acuerdo a su tamaño cuando migran desde el cátodo al ánodo a una velocidad relacionada con su peso molecular. Además del SDS, se emplean otros agentes desnaturizantes como son un agente reductor, generalmente el 2-mercaptoetanol, que reduce los puentes disulfuro (Cys-S-S-Cys) a grupos tioles (Cys-SH), y agentes caotrópicos como la urea, que rompen puentes de hidrógeno, lo cual permite la disociación de las proteínas en sus subunidades. A diferencia de la electroforesis en condiciones nativas, en la SDS-PAGE se separan las proteínas únicamente en función de su tamaño molecular (Maldonado, 2003).

1.4.3. Espectrometría de masas para la caracterización de proteínas en proteómica

La identificación de péptidos y proteínas en mezclas complejas se lleva a cabo actualmente mediante una serie de procedimientos que pueden utilizar una instrumentación muy variada, pero describen dos estrategias básicas: el denominado mapeo de masas peptídicas mediante espectrometría de masas y la secuenciación de péptidos mediante espectrometría de masas en tándem. En el primer caso, es necesario utilizar bases de datos de secuencias de genes o proteínas, mientras que en el segundo no.

La espectrometría de masas (mass spectrometry, MS, por sus siglas en inglés) se introdujo en el ámbito del análisis de biomoléculas al final de la década de los años 70 del siglo pasado con la aparición de diversas técnicas de ionización suave, tales como: la desorción por campo eléctrico (FD), la desorción por plasma (PD) y la ionización por bombardeo con átomos rápidos (FAB). Estas técnicas permitían la ionización de moléculas termolábiles de gran tamaño, como los péptidos y las proteínas, sin producir la degradación característica de las denominadas técnicas de ionización dura. En especial el FAB, desarrollado a partir de las técnicas de espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS), constituyó la herramienta básica para el análisis y secuenciación de péptidos durante más de una década. Posteriormente, en el inicio de los años 90, otros dos métodos de ionización suave, el electrospray (ESI) y la desorción de iones por láser asistida por matriz (MALDI) se constituyeron en los pilares básicos de la espectrometría de masas en la proteómica contemporánea.

El desarrollo de analizadores de masas (**Figura 1.2**) de creciente resolución y velocidad de análisis ha sido primordial en este proceso. A su vez, en los últimos años el incremento continuo de las prestaciones de los analizadores de iones ha ido marcando y ampliando los límites con los que se aborda el estudio de proteomas por espectrometría de masas.



Figura 1.2. Analizadores de masa.

De los cuatro grandes grupos en que pueden dividirse los analizadores de masas, vgr. Analizadores de sectores (eléctricos, E y/o magnéticos, B), de cuadrupolo (Q), de tiempo de vuelo (TOF) y de confinamiento de iones (loc Traps, Orbitraps, y analizadores de resonancia ciclotrónica de iones, ICR), sólo los primeros no tienen una utilización amplia de proteómica. Las ventajas únicas que ofrecían en el pasado los sistemas de sectores en cuanto a su resolución y a su capacidad para llevar a cabo colisiones de alta energía para la secuenciación de péptidos, puede ser proporcionada ahora por sistemas relativamente menos complejos, voluminosos y costosos como los analizadores de tiempo de vuelo provistos de reflectrón (reTOF) o el *Orbitrap*. Por otro

lado, los sistemas actuales de ICR mediante transformada de Fourier (FT-ICR), superan ampliamente las características de los mejores sistemas de sector, por lo que en definitiva estos últimos han dejado de ocupar un espacio visible en el área de las aplicaciones en proteómica.

Analizadores de masa

Los cuadrupolos son un caso particular de sistemas multipolares que, están presentes en casi todos los tipos de espectrómetro de masa modernos como filtros y guías de banda ancha de iones. Un cuadrupolo consiste en cuatro barras paralelas de sección hiperbólica en la cara interna, a las que se aplica un potencial combinado de corriente continua y de radiofrecuencia que crean en su interior un campo denominado cuadrupolar. Los iones generados en la fuente deben atravesar longitudinalmente el recinto limitado por estas barras para incidir en el detector. Estos iones que entran en el analizador a una energía de unos pocos electronvoltios, son sometidos al efecto del campo cuadrupolar que los hace oscilar y los desvía en función de su valor m/z (masa por unidad de carga) de forma que para una combinación de potenciales sólo los iones en un estrecho rango de valores m/z llega a incidir en el detector. Los analizadores de cuadrupolo actúan como filtros de iones y los espectros de masas en estos sistemas se obtienen mediante un barrido del potencial aplicado a las barras. En consecuencia, en cada instante sólo una pequeña fracción del total de iones es monitorizada, mientras que el resto se desecha. Este modo de funcionamiento repercute negativamente en el límite de detección de estos instrumentos, especialmente cuando se requiere la obtención de espectros completos en rangos de masa

amplios. Cuando a un cuadrupolo se aplica únicamente el potencial de radiofrecuencia, este sistema actúa como un filtro de banda ancha mucho más eficiente que los formados por lentes electrostáticas en analizadores de baja energía. Este modo de trabajo, conocido como *RF-only*, es el que utilizan las cámaras de colisión en los instrumentos de triple cuadrupolo y en otros espectrómetros en tándem que emplean colisiones de baja energía. Además, en los sistemas de triple cuadrupolo, cuando se realizan barridos convencionales (MS) uno de los dos analizadores debe trabajar también en modo *RF-only*.

Analizador TOF (time of flight)

El analizador TOF se basa en el hecho de que los iones acelerados por un campo eléctrico adquieren distintas velocidades según el valor de su relación m/z , y por tanto, tardan distintos tiempos en recorrer una distancia determinada. Considerando constantes la carga y la energía cinética de los iones formados en la fuente, la medida del tiempo de vuelo permite determinar de forma muy precisa la masa de cada uno de estos iones. A diferencia de los sistemas de cuadrupolo o de sectores, que como se indicó anteriormente, filtran en cada instante grupos de iones dentro de un pequeño rango de valores m/z desechando el resto de la población de iones. De esta forma, el analizador TOF separa y detecta en una escala de tiempo (tiempo de vuelo) el paquete completo de iones procedente de la fuente. El sistema trabaja por este motivo en régimen discontinuo, por lo que es un detector indicado para técnicas de ionización de carácter pulsante como el MALDI. El acoplamiento del TOF a fuentes de iones de producción continua como el ESI, se lleva a

cabo mediante sistemas de confinamiento de iones intermedios que mediante campos eléctricos, acumulan e inyectan, perpendicularmente a la trayectoria inicial, paquetes de iones en el analizador en ciclos con frecuencia del orden del KHz. El TOF es un analizador relativamente simple, con un ciclo de barrido rápido y con un rango de masas en teoría ilimitado. Debe indicarse que este instrumento fue el primero en utilizarse en sistemas acoplados para cromatografía de gases-MS (GC/MS) y el primero también utilizado para el estudio de biomoléculas mediante su acoplamiento a la ionización por desorción por plasma (PD).

Trampas de iones

Este tipo de analizadores permite el confinamiento de iones dentro de una cámara de pequeño tamaño utilizando campos eléctricos (*Paul trap* o *ión trap*, *Orbitrap*) o magnéticos (analizador de resonancia electrónica de iones mediante transformada de Fourier, FT-ICR). Este tipo de analizadores permiten almacenar, seleccionar y analizar los iones formados en la misma trampa o fuentes de ionización externas. Los iones pueden mantenerse en el interior de la trampa durante tiempos prolongados, con objeto de favorecer la observación de descomposiciones metaestables o de fragmentos producidos por colisión con moléculas de gas. Los iones fragmentos generados en estos procesos pueden ser a su vez seleccionados y fragmentados de nuevo en la misma trampa de forma que el sistema equivale a un sistema de espectrometría de masas en tándem múltiple.

El denominado *ion trap* o trampa de iones cuadrupolar (QIT) fue inicialmente descrito por el premio Nobel de física (1989) Wolfgang

Paul. Los principales avances en el desarrollo de este analizador fueron llevados a cabo por Finnigan MAT que en 1983 comercializó este analizador en sistemas para GC/MS. En un QIT, el espacio donde atrapan los iones queda definido por las superficies hiperbólicas de tres electrodos. Generalmente las tapas laterales están conectadas a tierra o tienen aplicado un campo de corriente continua mientras el electrodo anular se le aplica un voltaje de radiofrecuencia que genera un campo de tipo cuadrupolar en el interior del analizador. Los iones que se introducen en la trampa quedan sometidos a este campo de radiofrecuencia que los mantiene oscilando en una órbita compleja formada por una componente axial y otra radial. Para generar el espectro de masas, los iones pueden extraerse de la trampa en función de su relación m/z utilizando diferentes procedimientos. El primer método utilizado en sistemas comerciales fue el modo de desestabilización selectiva de masas (*mass-selective instability*) que hace un barrido de la corriente de radiofrecuencia aplicada al electrodo anular. El aumento de la amplitud de esta corriente aumenta la energía de las oscilaciones de los iones y desestabiliza sus trayectorias produciendo la expulsión axial de la trampa de iones con valores de m/z creciente. Posteriormente, el procedimiento se mejoró mediante el modo de eyección resonante, donde se aplica un voltaje de radiofrecuencia adicional a las placas laterales para la desestabilización y expulsión de los iones.

Un rasgo adicional de la trampa es que ésta permite aislar iones individuales que luego pueden, mediante la aplicación de un voltaje de radiofrecuencia a las tapas laterales, excitarse para fragmentación por CID con moléculas de Helio introducidas en la trampa. Para el aislamiento, primero se eliminan los iones de valores de m/z inferiores

al del ión de interés, aumentando la amplitud de la radiofrecuencia aplicada al electrodo anular tal como se indicó anteriormente, para seguidamente aplicar a éste un voltaje negativo que produce la eliminación en el eje radial de los iones de m/z superior. Este proceso de aislamiento/activación puede realizarse repetidamente, y si bien en la práctica del análisis proteómico, raramente se requieren más de 3 de estas etapas, ya que las trampas iónicas comerciales son capaces de realizar MS^n con $n=15$.

El primer instrumento basado en el QIT dirigido al análisis de biomoléculas (ESQUIRE) podía utilizar diversos métodos de ionización como el ESI, el MALDI o el FAB. En 1995, Finnigan MAT introdujo su propio LCQ, sistema especialmente diseñado para ionización por ESI e ionización química a presión atmosférica (APCI). Para entonces, el QIT mostraba las ventajas únicas que aportaban los sistemas de confinamiento de iones, entre ellas, su capacidad de acumulación de iones y de realizar análisis en tándem múltiple. La aparición de las fuentes de micro en 1995 hizo de estos sistemas uno de los analizadores más populares para el análisis de biomoléculas en las últimas dos décadas (Abián, 2008).

Identificación de proteínas mediante mapeo peptídico

Mediante la estrategia denominada mapeo peptídico o huella de masas peptídicas, una proteína aislada es convertida en péptidos de tamaño medio mediante la acción de enzimas específicas, típicamente tripsina. El conjunto de péptidos derivados de una proteína es una característica propia de ésta y puede utilizarse para su caracterización. De esta forma, la determinación de la masa de los péptidos de digestión de una

proteína permite hacer comparaciones con las masas teóricas del conjunto de péptidos esperados para las secuencias almacenadas en bases de datos, y sugerir, aquellas que se ajustan más a los datos experimentales.

1.4.4. Proteómica y *Trypanosoma cruzi*

Se han llevado a cabo diversos análisis inmunológicos, bioquímicos y funcionales de las proteínas relevantes en la interacción hospedero-parásito y en la patogénesis de la enfermedad. Sin embargo, la mayoría de ellos involucran cepas pertenecientes al grupo *T. cruzi II* y *T. cruzi I* de referencia, como las cepas Tulahuen y Dm28c (Hartl 2002, Ortega 1991, Frasch 2001, Almeida 2001, Acosta 2001, Hartl 2002, Mancipar 2003, Marañón 2001, Thomas 2001 y Anez 2005). Se ha realizado también un estudio de genómica comparativa utilizando seis cepas humanas, tres de pacientes asintomáticos y tres de pacientes cardíacos, entre ellas la cepa CL Brener, Silvio X10 (*T. cruzi I*) y cepas de *T. cruzi II*; con el fin de tratar de establecer diferencias que relacionaran el grupo de *Trypanosoma cruzi* con la forma de presentación de la patología (Baptista, 2006). Utilizando la proteómica comparativa, se han publicado algunos trabajos con *Trypanosoma cruzi*. En el primero se analizó la expresión proteica de epimastigotes de la cepa Dm28c, donde se argumenta que la etapa donde se tienen epimastigotes, es decir, la forma no infectiva, sería un buen modelo para estudios de proteómica, Esto se debe a su facilidad para ajustarse y responder a diferentes condiciones de cultivos *in vitro*, y la posibilidad de obtener una alta cantidad de células necesarias para electroforesis bidimensional. En los otros, se evaluaron las diferencias en la

expresión de proteínas entre las diferentes fases del ciclo de vida del parásito (Parodi-Talice 2004, Paba 2004, Agüero 2006, Atwood 2005).

Tecnologías actuales como la proteómica, que permite el análisis completo de las proteínas expresadas, dan paso a estudios menos ambiguos y ejecutables en menor tiempo. Además, el hecho de que la expresión de genes en *T. cruzi* y otros tripanosomátidos se regule en primer término a nivel post-transcripcional, y que éstas modificaciones desempeñan un papel importante en la modulación de las funciones de la proteína en este parásito, hacen que el análisis proteómico sea especialmente atractivo para observar los cambios en la expresión de proteínas del parásito (Lacerda, 2009). Por estas razones, y teniendo en cuenta que no existen reportes de análisis comparativos de proteínas que relacionen las diferentes formas de presentación de la patología con los linajes de *T. cruzi*, en este trabajo se propuso una aproximación metodológica que permitiera determinar diferencias en la expresión de proteínas entre dos aislados de *T. cruzi I*, con el objeto de poder establecer una relación de éstas con el tropismo por el tejido, y en consecuencia, con el desarrollo clínico de la enfermedad.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material Biológico: Se utilizaron dos aislados obtenidos de pacientes chilenos; caracterizados genéticamente como *T. cruzi I* por isoenzimas y con el marcador mini-exón. La cepa LQ se aisló de un paciente con cardiomiopatía chagásica y la cepa MF de un paciente asintomático. Estas cepas fueron donadas por el Doctor Aldo Solari Illescas del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Chile, y se han mantenido en el laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de la Universidad Industrial de Santander, por repiques cada 4 días en un medio de cultivo LIT (Liver Infusion Triptose) líquido, suplementado con suero bovino fetal al 10% p/v y a una temperatura de 28°C.

2.2. Clonación: Los parásitos de los dos aislados fueron clonados para asegurar que se estaba trabajando con una población homogénea de células (Brisse 2001). Los clones para cada una de las cepas fueron obtenidos a partir de epimastigotes cultivados en medio semisólido AGAR-LIT-BHI-sangre; para esto se mezclaron 50 ml de agar estéril de pH 7,2, 100 ml de medio LIT con suero bovino fetal al 10%p/v, 100 ml de infusión de hígado y corazón (BHI) estéril, y 6,25 ml de sangre desfibrinada. A continuación, se sirvieron 25 ml de esta mezcla en cajas de Petri de 95 mm de diámetro y, después de comprobar la esterilidad del medio, se sembraron 100 parásitos por caja. Posteriormente, se sellaron las cajas con papel parafinado y cubrieron con papel estéril, y finalmente, se incubaron aproximadamente durante 30 días a 28°C hasta observar el crecimiento de colonias. Se aislaron y cultivaron cuatro clones para la cepa LQ y dos para la cepa MF en

medio LIT suplementado con suero bovino fetal al 10%p/v (Camargo, 1964).

2.3. Cultivo y crecimiento de los clones: Los clones de los parásitos (epimastigotes) se cultivaron a 28° C en medio LIT (Liver Infusión Tryptose) suplementado con suero bovino fetal al 10% (Camargo, 1964). Los cultivos se iniciaron con una concentración 1×10^6 parásitos/mL. Después de 4 días, se hizo una dilución al doble, y finalmente, 4 días más tarde, se obtuvieron los parásitos por centrifugación a 8000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. A continuación, se realizaron tres lavados con Buffer fosfato salino (PBS), utilizando las mismas condiciones de centrifugación. A partir de los pellets, se obtuvieron los extractos de proteínas totales mediante la lisis de los parásitos.

2.4. Extracción de las proteínas por lisis celular: Se ensayaron diferentes métodos para la extracción de proteínas, con el fin obtener una concentración suficiente para utilizar en la electroforesis bidimensional (2D), tal como se describe a continuación:

2.4.1. Choque térmico: Los parásitos fueron hervidos 5 minutos con SDS 0.2% p/v y enfriados en hielo durante un minuto. A continuación, se incubaron las muestras en un buffer que contenía: Urea 7M, tiourea 2M, PMSF 100µM, EDTA 5mM, y triton x-100 al 2% v/v.

2.4.2. Lisis Química I: Los extractos totales de las proteínas fueron obtenidos por lisis de los parásitos en un buffer que contenía: Tris hidroximetil aminometano (Tris base) 40 mM, urea 7 M, tiourea 2M, fenilmetano sulfonil fluoruro (PMSF) 1 mM y Tritón x-100 al 2%v/v. Después de incubación a temperatura ambiente con agitación

apreciable, los parásitos lisados fueron centrifugados por 30 min a 13000 gravedades. Posteriormente, se conservó el sobrenadante que tenía las proteínas en disolución.

Los dos ensayos anteriores se realizaron a diferentes tiempos de incubación, en los respectivos buffer de lisis, que fueron 30 y 60 minutos respectivamente, cada ensayo se efectuó también sin la presencia de Tritón x-100. Con base en los resultados se optó por probar un último método de extracción.

2.4.2. Lisis química II: Los extractos de las proteínas totales fueron obtenidos por lisis de los parásitos en un buffer que contenía la siguiente composición: Tris Base 40 mM, urea 7 M, tiourea 2M, 3-(cloroamido propil)-dimetilamonio-1 propanosulfato (CHAPS) al 4% y PMSF 1mM. Después de incubar la solución resultante a temperatura ambiente con agitación apreciable, los parásitos lisados fueron centrifugados por 30 minutos a 13000 g y el sobrenadante fue llevado a -70°C o usado inmediatamente para llevar a cabo el Isoelectroenfoco (Parodi, 2004).

2.5. Cuantificación de proteínas solubles totales: La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (Bradford 1976). El reactivo de Bradford se preparó mezclando 50ml de etanol al 95% (v/v), 100 mg azul de Coomassie G250 y 100ml de ácido *orto*-fosfórico al 85% (v/v).95%. Se realizó la curva de calibración, con una solución de albúmina de bovino (BSA) de concentración 1mg/ml, a partir de la cual se prepararon disoluciones de proteína de 0,1 a 0,8 mg/ml. Como diluyente se utilizó una solución 1:10 de buffer de lisis en agua

destilada. Para la cuantificación, se mezcló 1 ml de reactivo de Bradford y 20 μ L de cada muestra patrón, respectivamente. Las mezclas se dejaron reposar durante dos minutos y se leyó la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro marca Termo Electrón Corporation, modelo Genesis 10UV. Conocida la curva de calibración, se determinaron las muestras problema (diluciones 1:10) que correspondían a los extractos de proteínas de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* I de los aislados LQ y MF. (Ver anexo1)

2.6. Electroforesis de Proteínas en una dimensión (1D)

Como un paso previo a la comparación entre las proteínas de los clones provenientes de las cepas LQcl1 y MFcl1, se realizó electroforesis de proteínas en una dimensión (1D) en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% y en condiciones denaturantes. Para ello, se utilizó una cámara de electroforesis marca BIORAD, modelo Mini-Protean Tetra cell. Para realizar la electroforesis, se ensamblaron los vidrios de acuerdo a las especificaciones de manufactura, y se prepararon 5 ml de gel de corrida (2 mL de Acrilamida/bisacrilamida al 30% p/v, 1,3 mL de tris pH 8,8, 50 μ L de SDS al 10% v/v, 25 μ L de persulfato de amonio al 10% p/v y 2,5 μ L de TEMED).

El gel se vertió entre los vidrios y se cubrió con una capa de isopropanol, con el propósito de hacer más efectiva la polimerización. Una vez polimerizado el gel de corrido, se lavó con abundante agua desionizada para retirar el isopropanol y las porciones acrilamida sin polimerizar. Posteriormente, se secó con papel de filtro y se llenó con 3 ml de gel de poliacrilamida al 4 %p/v (staging gel), (0,45 mL de

acrilamida/bisacrilamida al 30% p/v; 0,75 mL de tris-HCl pH 6,8; 30 μ L de SDS al 10 %; 60 μ L persulfato de amonio y 10 μ L de TEMED). Se introdujo el peine en la solución y se dejó polimerizar. Terminada la polimerización se sacó el peine, se limpiaron los pozos, se introdujo el montaje en la cámara de electroforesis y se cubrió con buffer de corrido (Tris base al 0,20% p/v, glicina 1,44% p/v, SDS al 0,10% v/v).

Las muestras para análisis electroforético, se mezclaron 10 μ L de extracto de proteínas del parásito, de concentración 1 μ g/ μ L, con 10 μ L de buffer de carga (tris-HCl pH 8,8 al 25%, glicerol al 20%, SDS al 40%, mercaptoetanol al 10% y azul de bromofenol al 5%). La mezcla se calentó durante 5 minutos en baño maría. A continuación, se sembraron en los pozos con 5 μ L de cada muestra, y un pozo con marcador de peso molecular marca FERMENTAS, que contenía proteínas entre 10 y 200 KDa de masa molecular. Las proteínas se separaron en los geles a un voltaje de 100 V durante 1.5 h. Posteriormente, se desmontaron los geles de las placas de vidrio y tiñeron durante 20 minutos con azul de Coomassie R-250, preparado al 0,25% p/v en solución de metanol al 50 % v/v y ácido acético al 10% v/v disueltas en agua destilada. Para observar las bandas de proteínas, se destiñó el gel sumergiéndolo durante 20 minutos en solución decolorante concentrada compuesta por metanol al 50 %v/v y ácido acético al 10%v/v disueltas en agua destilada. Seguidamente, se destiñó durante 3 días en solución decolorante diluido (metanol al 5 %v/v y ácido acético al 10%v/v). Posteriormente, se escaneó el gel con las proteínas teñidas en un densitómetro UMAX, PowerLook 2100XL. La comparación de los perfiles proteicos de los dos aislados se realizó haciendo uso del programa PhotoCaptMw., determinando las diferencias entre los perfiles proteicos y el peso molecular de las proteínas de cada aislado.

2.7. Electroforesis de proteínas en dos dimensiones (2D): Los extractos solubles de las proteínas totales se separaron mediante electroforesis bidimensional (2D-SDS-PAGE), tal como se describe a continuación:

Se llevaron a cabo ensayos iniciales para la estandarización de la técnica de electroforesis 2D con parásitos de *T.cruzi*. Para ello, se realizaron ensayos con epimastigotes del clon 338 de *T.cruzi* correspondiente a un aislado de paciente de Santander con cardiomiopatía chagásica y clasificado como linaje Tc I. En este caso se utilizó un gradiente de pH de 3 a 10. En este procedimiento, se variaron tiempos de rehidratación y condiciones de isoelectroenfoco hasta lograr mapas proteómicos con una alta resolución. Las condiciones para electroforesis en dos dimensiones elegidas se describen a continuación:

Los sobrenadantes de las proteínas solubles (180 µg de proteína de cada aislado), se mezclaron con un buffer de rehidratación, compuesto por: urea 8 M, CHAPS al 2%p/v, Biolite al 2%v/v y trazas de azul de bromofenol, hasta completar 125 µL de solución. Las mezclas se agitaron y se centrifugaron durante un minuto a 1500 g. Para la primera dimensión, se utilizaron tiras de pH en gradiente inmovilizado (7 cm, pH de 3-10, Bio-Rad). La rehidratación de los 125 µL de cada muestra se llevó a cabo en forma pasiva durante 12 horas. Seguidamente, las proteínas fueron isoelectroenfocadas a 20 °C mediante el siguiente protocolo: Paso 1 (20 min a 250 V, lineal), paso 2 (2 h a 4 000 V) y paso 3 (4 000 V hasta 10 000 V/h). Una vez finalizado el IEF, se equilibraron las tiras en un buffer compuesto por Tris de pH 8,8, 1,5 M, urea 6 M, glicerol al 30%v/v, SDS al 2%p/v y dititreitól (DTT) al 2%v/v, y en un segundo buffer compuesto por Tris 1,5 M de pH 8,8, urea 6 M,

glicerol al 30%v/v, SDS al 2%p/v y yodoacetamida al 2 %v/v durante 15 min, en cada caso. La mayoría de los puntos (spots) de proteína se centró en la región ácida del gel, por lo que se realizaron nuevas corridas usando tiras de un rango de pH más estrecho (pH rango 5-8).

La separación de las proteínas en función de su masa molecular (segunda dimensión), se realizó colocando las tiras equilibradas del IEF sobre geles de poliacrilamida al 12%p/v en presencia de SDS (PAGE-SDS) preparados según el protocolo descrito para el gel de corrido en una dimensión. Esta electroforesis se llevó a cabo a un voltaje de 150 V durante 50 minutos. La tinción de los geles se llevó a cabo con azul de Coomasie R-250 al 0,25 %p/v siguiendo el mismo protocolo utilizado para la tinción del gel en una dimensión, descrita anteriormente.

Usando el procedimiento descrito, se prepararon tres geles de una misma muestra de proteínas para verificar la reproducibilidad de la técnica. Los geles escaneados fueron analizados según el protocolo que se describe en el análisis bioinformático de imágenes. Además, se probó la técnica publicada por Wang, (2003) para disminuir la probabilidad de errores experimentales en la segunda dimensión (2D) y en la tinción de los geles. Esta consiste en cortar las tiras después de alcanzar el equilibrio, y colocar las tiras con el mismo rango de pH en un mismo gel para la separación por tamaño molecular.

Luego de probar las diferentes técnicas, se decidió utilizar las tiras completas y realizar los experimentos por triplicado con el fin de disminuir la presencia de errores experimentales y así tener un punto de comparación.

2.8. Análisis bioinformático de los “spots” de los geles de electroforesis 2D.

Para el análisis comparativo de los geles teñidos, éstos se digitalizaron en el escáner (UMAX, PowerLook 2100XL) a una resolución de 150 dpi (píxeles por pulgada). Posteriormente, los “spots” proteicos de las imágenes se analizaron cuantitativamente con el programa PDQuest 2-D software V 8.1 (Bio-Rad). Se compararon los “spots” de 3 geles distintos por cada uno de los grupos analizados (proteínas del clon LQ versus proteínas del clon MF). Para compensar los posibles errores introducidos durante la carga proteica y en el desarrollo de la tinción de los geles, las intensidades de los spots se normalizaron expresando la intensidad de cada mancha respecto a la intensidad total de todas las manchas presentes en el gel. Los valores medios y los coeficientes de variación de los puntos diferenciados (en expresión o presencia/ausencia) se calcularon con el mismo programa.

En este análisis, se identificaron los “spots” cuya cuantificación cambió significativamente en ambos sentidos (aumento o disminución). Se identificaron las proteínas cuyo contenido en el clon LQ era superior 10 veces al contenido del clon MF. Cuando un punto no se encontraba presente en un gel, una estimación de la mancha del mínimo detectable fue utilizada para el análisis.

2.9. Espectrometría de Masas MALDI-TOF: Los “spots” de interés se recortaron de forma manual y se digirieron “*in-situ*” con tripsina empleando un protocolo basado en el trabajo descrito por Shevchenko *et al* (1996). El sobrenadante de la digestión (que contiene los péptidos) se acidificó con TFA (0.1% concentración final), y se secó en

una centrífuga al vacío (Speedvac), para luego resuspenderlo en 5 ml de TA (TFA 0.1%v/v en Acetonitrilo 33% v/v). Una pequeña alícuota (0.5 ml), se depositó en una placa “Anchor-chip” (Bruker) empleando DHB (ácido 2,5-di-hidroxi Benzoico) como matriz a una concentración de 5 g/l mediante el método de evaporación rápida. La placa se introdujo en un espectrómetro de masas de tipo MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight) Modelo Autoflex de Bruker equipado con reflector. Los espectros de masas obtenidos se utilizaron como “huella peptídica” para la identificación de proteínas en las bases de datos utilizando motores de búsqueda (por ej. Mascot) accesibles en la red.

2.10. Espectrometría de masas con trampa iónica (Sistema LC/MS/MS)

El digerido utilizado para el análisis de masas se volvió a secar y se resuspendió en ácido acético al 0.5% v/v para su posterior análisis por cromatografía líquida en fase reversa-espectrometría de masas (LC/RP-MS) en un espectrómetro de masas de tipo electrospray acoplado a trampa iónica (ESI-IT) modelo Deca-XP (Thermo-Finnigan, San José, California, USA) empleando una columna de 180 mm de diámetro interno a un flujo de 1,5 ml/m en modo micro-spray con una interface “metal needle-kit” (Thermo-Finnigan). El método empleado (“Exclusión Dinámica”) fragmenta potencialmente todos los péptidos resueltos contenidos en la mezcla inicial. Los espectros de fragmentación obtenidos (MS/MS) se analizaron mediante el motor de búsqueda Phenyx y se confirmaron con motor Sequest las secuencias parciales obtenidas se utilizaron para encontrar homologías empleando el programa FASTA.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Extracción y cuantificación de proteínas de epimastigotes de *T.cruzi*

Inicialmente, se realizaron ensayos preliminares con epimastigotes del clon 338, correspondiente a un aislado de paciente de Santander con cardiomiopatía chagásica y clasificado como linaje *T.cruzi I*.

En primer lugar se llevó a cabo la estandarización de la técnica de extracción de proteínas de los epimastigotes de *T.cruzi*. En la **tabla 3.1** se muestran los resultados de las dos técnicas de lisis celular para la obtención de proteínas solubles totales de *T.cruzi*. En ella se muestra que los mejores resultados fueron obtenidos a mayor tiempo de incubación y en presencia de tritón- x 100.

Tabla 3.1. Efecto del tipo de lisis celular sobre la extracción de proteínas de epimastigotes del aislado 338.

No. de muestra	Método de extracción	Tiempo de incubación (min)	Presencia de Tritón- x100	Concentración de proteínas totales (mg/mL)
A	Buffer de lisis	60	NO	1.41
B	Buffer de lisis	60	SI	2.20
C	Buffer de Lisis	30	NO	1.36
D	Buffer de Lisis	30	SI	2.09
E	Choque térmico	30	NO	0.36
F	Choque térmico	30	SI	0.23
G	Buffer de lisis	60	NO	1.41
H	Choque térmico	60	SI	0.99

Nota: Las concentraciones de proteínas se estimaron por el método de Bradford, después de la lisis de los parásitos en un buffer (Tris base 40 mM, urea 7 M, tiourea 2M, PMSF 1 mM) y la lisis por choque térmico. Los dos ensayos se realizaron a diferentes tiempos de incubación. Además, cada uno se realizó en ausencia o presencia del detergente Tritón x-100 en el buffer respectivo. Los ensayos se hicieron por triplicado y las desviaciones estándar fueron menores al 3%.

Posteriormente, los sobrenadantes de cada ensayo fueron utilizados para electroforesis en una dimensión (1D). En la **Figura 3.1** se puede ver que se aprecian muy levemente las bandas de proteínas correspondientes a los extractos proteicos obtenidos por choque térmico. Es por ello que se optó por utilizar lisis química de los parásitos para la obtención de proteínas totales solubles del parásito. Sin embargo, se observó una baja resolución de las bandas de proteínas en los carriles correspondientes a las muestras tratadas con el buffer de lisis, por lo que, tal como se describe en los métodos, se optó por experimentar con un nuevo buffer de lisis que contenía: Tris base 40 mM, urea 7 M, tiourea 2M, PMSF 1 mM y CHAPS 4% p/v. Las concentraciones de proteínas totales se determinaron por el método de Bradford. En el **anexo 1** se muestra una curva de calibración realizada con albúmina y en la **tabla 3.2** la concentración de las proteínas de los parásitos lisados.

Tabla 3.2. Concentración de proteínas totales obtenidas mediante lisis química de los epimastigotes de los clones LQ, MF y 338

Tipo de <i>T.cruzi</i>	Proteínas (mg/mL)
Epimastigotes del clon LQ	8,12
Epimastigotes del clon MF	8,90
Epimastigotes del clon 338	8,10

Nota: .Los parásitos fueron lisados utilizando el buffer de lisis compuesto por: Tris base 40 mM, urea 7 M, tiourea 2M, PMSF 1 mM. CHAPS 4% p/v. Los ensayos se hicieron por triplicado y las desviaciones estándar fueron menores al 3%.

Las concentraciones de proteínas totales mostradas en la **tabla 3.2** fueron considerablemente más altas que las obtenidas por los métodos de extracción que se resumen en la **tabla 3.1**, por lo que se consideró que éste método es más adecuado para los experimentos de electroforesis en dos dimensiones (2D) debido a las altas concentraciones de proteínas que se necesitan en el desarrollo de esta técnica. Los extractos proteicos cuantificados fueron utilizados para electroforesis en una dimensión (1D) (**Ver Figura 3.2**), y posteriormente para los primeros ensayos de electroforesis bidimensional (2D). (Parodi, 2004).

3.2. Electroforesis unidimensional de proteínas de epimastigotes de los aislados de *T.cruzi*

En la **figura 3.1** se muestra la imagen correspondiente al gel de electroforesis SDS-PAGE (1D) de los extractos de proteínas obtenidos por los métodos que se describen en la **tabla 3.1**. En los dos últimos carriles se observa que las muestras tratadas con el método de choque térmico no fueron detectadas bandas de proteínas por tinción con azul de Coomasie, mientras que en los cuatro primeros carriles se pueden apreciar algunas bandas, aunque con muy poca resolución. Por esta razón, se probó nuevo método de extracción de proteínas de epimastigotes de *T.cruzi*.

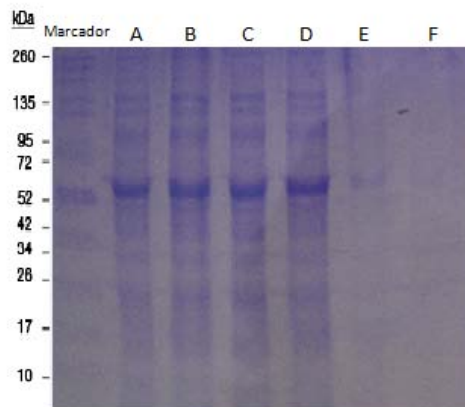


Figura 3.1 Gel de SDS-PAGE al 12% de los extractos proteicos de epimastigotes del aislado 338 de *T.cruzi* lisados por los métodos descritos en la tabla 3.1.

Los carriles corresponden a lo siguiente: (A) Proteínas extraídas con buffer de lisis, 60 min de incubación. (B) Proteínas extraídas con buffer de lisis, 60 min de incubación y presencia de Tritón X-100. (C) Proteínas extraídas con buffer de lisis, 30 min de incubación. (D) Proteínas extraídas con buffer de lisis, 60 min de incubación y presencia de Tritón X-100. (E y F) Proteínas extraídas por el método de choque térmico.

A partir de las concentraciones de los extractos proteicos indicados en la **tabla 3.2**, se seleccionó la lisis química como método de extracción de proteínas la lisis química utilizando el buffer compuesto por: Tris base 40 mM, urea 7 M, tiourea 2M, PMSF 1 mM y CHAPS 4%p/v. A continuación, se prepararon geles SDS-PAGE en una dimensión (1D) para una diferenciación preliminar entre la composición de las proteínas de los epimastigotes de las cepas de *T.cruzi* LQ . MF y 338 (Figura3.2).

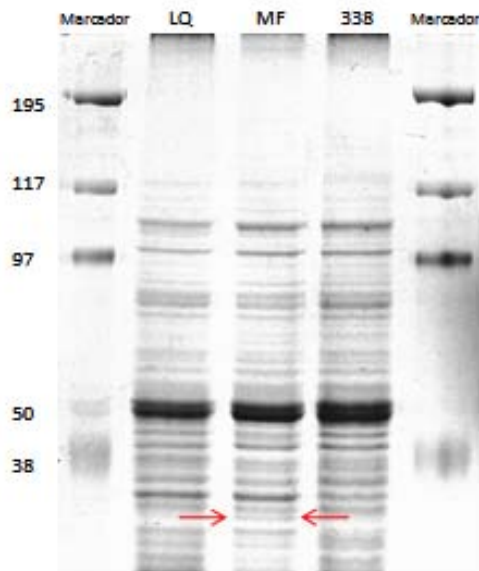


Figura 3.2 Gel de electroforesis SDS-PAGE-1D al 12% de los clones LQ, MF y 338 lisados utilizando el buffer de lisis. Nota: El buffer de lisis estaba compuesto por: Tris base 40 mM, urea 7 M, tiourea 2M, PMSF 1 mM y CHAPS 4%p/v.

En la **figura 3.2** se observa que los perfiles electroforéticos en 1D de las proteínas extraídas de los clones son muy similares, y que presentan diferencias mínimas en proteínas de bajo peso molecular (menores que 38 kDa) que podrían resultar interesantes para ser analizadas. Sin embargo, este resultado evidenció la necesidad de usar una electroforesis de proteínas bidimensional (2D) para encontrar perfiles de expresión diferencial de proteínas entre los aislados LQ y MF. Con estos experimentos, se pudo confirmar que es adecuado el método de extracción de proteínas, utilizando el buffer de lisis (compuesto por Tris base 40 mM, urea 7 M, tiourea 2M, PMSF 1 mM y CHAPS 4%p/v), debido a la alta concentración de proteínas (**tabla 3.2**) y resolución de bandas de proteínas observada en la **figura 3.2**.

Después de este sondeo, se procedió a la optimización de la electroforesis 2D.

3.3. Electroforesis bidimensional de proteínas de epimastigotes de *T.cruzi* I

3.3.1. Estandarización de la técnica

De la misma forma que en la estandarización de los métodos de extracción de proteínas, se realizaron inicialmente ensayos preliminares con el extracto proteico de epimastigotes del clon 338. Estos ensayos se llevaron a cabo como una forma de estandarizar la técnica de análisis bidimensional. En este caso, se usó un gradiente de pH de 3 a 10. Los resultados de la separación de proteínas se muestran en la **figura 3.3**. A partir de este resultado, se concluyó que era necesario aumentar el tiempo de focalización, por lo que se prosiguió a aumentar la de voltios/h totales. Además, se pudo apreciar que la cantidad de muestra rehidratada se podía incrementar para poder detectar un mayor número de proteínas. Después de varios ensayos se logró la obtención de un gel con buena resolución (**figura 3.4**).

Para evaluar la reproducibilidad de la técnica, se corrieron dos geles que incluían las mismas muestras proteicas. En esta ocasión se aumentó en 2 horas el tiempo de focalización. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie y posteriormente se escanearon. Las imágenes obtenidas fueron digitalizadas y procesadas en el software de análisis PDQUEST. Los resultados se muestran en las **figura 3.4** donde, aunque se observan algunas diferencias entre los geles en la **tabla 3.3**,

se muestran los altos porcentajes de similitud entre las muestras analizadas.

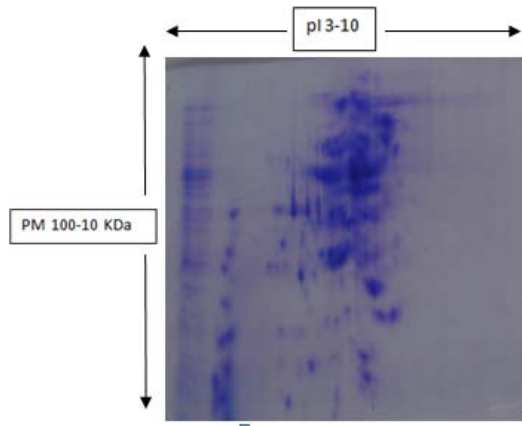


Figura 3.3. Gel de electroforesis SDS-PAGE-2D al 12% de las proteínas de epimastigotes de *T.cruzi* del clon 338 usando tiras con gradiente de pH 3-10.

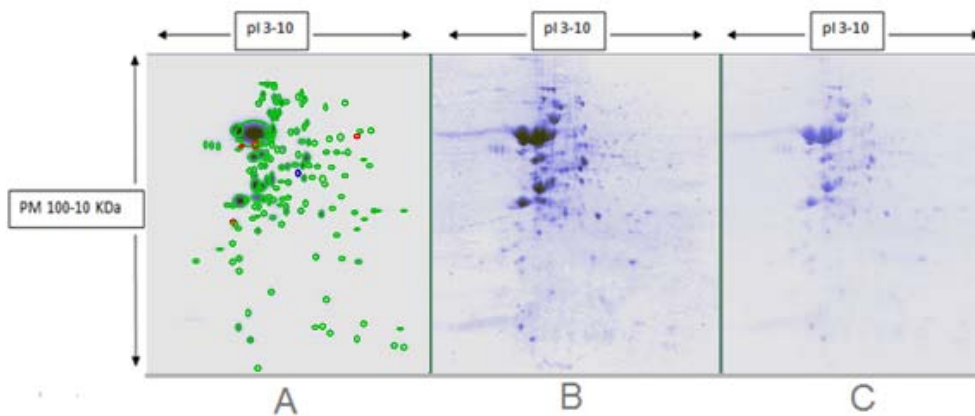


Figura 3.4 Análisis de los spots de las imágenes de los geles SDS-PAGE-2D de las proteínas de epimastigotes del clon 338 de *T.cruzi*. (A) Gel máster producido por el programa PD-QUEST (verde; proteínas expresadas simultáneamente en los dos geles, rojo proteínas expresadas particularmente en el gel B y azul; proteínas expresadas particularmente en el gel C) y Réplicas de los geles 2D, SDS-PAGE, de las proteínas de epimastigotes del clon 338 (B y C); usando tiras con gradiente de pH 3-10.

Tabla 3.3. Reporte del análisis de las réplicas correspondientes a las proteínas de epimastigotes del clon 338

Gel Name	Replicate Group	Spots	Matched	Match Rate 1	Match Rate 2	Corr Coeff
*epimastigotes del aislado 338 I v1	not assigned	159	157	98%	99%	1.000
epimastigotes del aislado 338 II v1	not assigned	155	150	99%	94%	0.876

A su vez, se realizaron ensayos usando gradientes de pH de 3 a 10 para comparar el clon MFcl1, correspondiente a la cepa chilena de paciente asintomático, y el clon LQcl1, la cepa chilena del paciente con cardiomiopatía (CC). Al igual que los anteriores, estos geles se tiñeron con azul de Coomassie (Ver **figura 3.5**).

Para identificar las proteínas que se expresaron de forma diferente entre ambos aislados, se utilizó el programa PD-Quest (BIO-RAD) para llevar a cabo la superposición de los imágenes de los geles de ambos aislados de *T.cruzi I*, lo que permitió identificar las señales de spots que difieren en intensidad, las que son comunes a los dos aislados y las que están ausentes en uno de los dos aislados. La **figura 3.6** muestra los resultados de estos análisis. Se hallaron 301 “spots” en el gel del clon LQcl1, mientras que 305 para clon MFcl1. Los “spots” compartidos en ambas muestras fueron 282. 17 spots mostraron mayor intensidad y 15 fueron exclusivos del clon LQcl1, mientras que, en el gel del clon MFcl1 se identificaron 13 spots más intensos y 19 exclusivos (Ver **figura 3.6**).

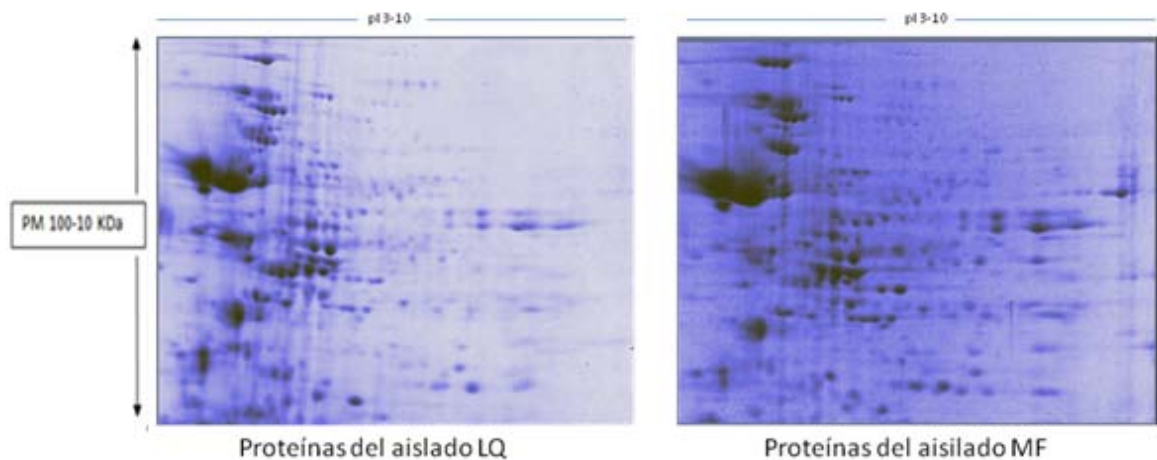


Figura 3.5. Geles de electroforesis SDS-PAGE-2D al 12% de las proteínas de los clones provenientes de los aislados LQ (CC) y MF (Asintomático).

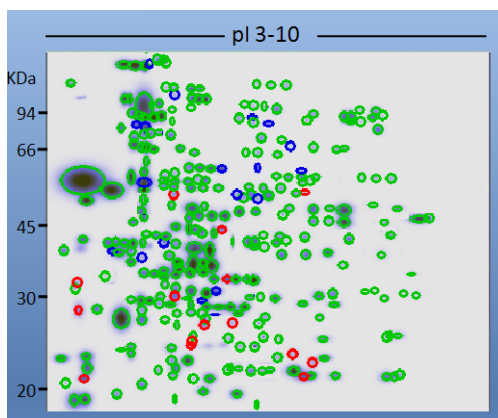


Figura 3.6. Análisis comparativo de imágenes de los mapas proteómicos de los clones LQc1 y MFc1. En la figura se expresa el gel “Master” generado por el programa PD-QUEST (Verde; proteínas expresadas simultáneamente en los dos geles, rojo proteínas expresadas particularmente por el clon LQc1 y azul; proteínas expresadas particularmente por clon MFc1)

Posteriormente, se llevaron a cabo los análisis de las digestiones trípticas de 10 puntos de proteínas expresados de forma diferencial (Ver

figura 3.7), para poder llevar a cabo la identificación de las proteínas por espectrometría de masas MALDI-TOF y posterior búsqueda en el motor de búsqueda MASCOT. Los puntos identificados inequívocamente fueron: un receptor de la proteína quinasa C y tres isoformas de la proteína HSP 60 (Ver **anexo 2**) expresadas en mayor medida en el aislado de paciente con CC. Además de ser identificadas en éste ensayo preliminar, éstas mismas proteínas también fueron identificadas por LC-MS/MS (trampa iónica) en otros geles de los mismos aislados, después de conseguir una mejor resolución de las proteínas separadas por electroforesis bidimensional (2D) (Ver **figura 3.12 y tabla 3.6**).

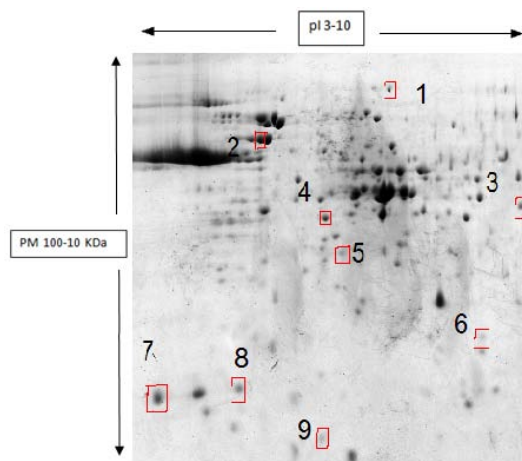


Figura 3.7 Imagen del gel de electroforesis SDS-PAGE-2D al 12 % indicando las proteínas del clon LQc1 analizadas por espectrometría de masas MALDI-TOF.

Como se observa en las figuras anteriores, la mayor cantidad de proteínas se concentra en un rango de pH menor a 8. Por lo tanto, se utilizó un gradiente de pH de 5-8 para lograr una mayor separación y resolución de las proteínas, y un análisis más detallado de su nivel de

expresión. Además, se probó la técnica publicada por Wang (2003) que consiste en cortar las tiras después de la fase de equilibrio y colocar las fracciones con el mismo rango de pH en un mismo gel para la separación por tamaño molecular. En las **figuras 3.8 y 3.9** se muestran las imágenes de los geles obtenidos con las proteínas de epimastigotes del clon 338. En ella se observa que la variación de muestras individuales es reducida, y por tanto la comparación de cada una de las mitades es más fácil de visualizar en relación con la técnica anterior. Estos geles se tiñeron con azul de Coomasie y para identificar las proteínas que se expresaron diferencialmente se utilizó el programa PD-Quest (BIO-RAD), que permite detectar las señales que difieren en intensidad, las que son comunes para ambos aislados y las que no se expresan en el otro aislado (**figuras 3.4 y 3.6**).

El análisis se realizó comparando dos mitades de cada uno de los geles del clon 338, y se observó una alta reproducibilidad (100% de los spots) en la primera mitad del gel y de 95% en la segunda, tal como se puede observar en las **figuras 3.8 y 3.10** y en los resultados de las **tablas 3.4 y 3.5** generadas por el programa.

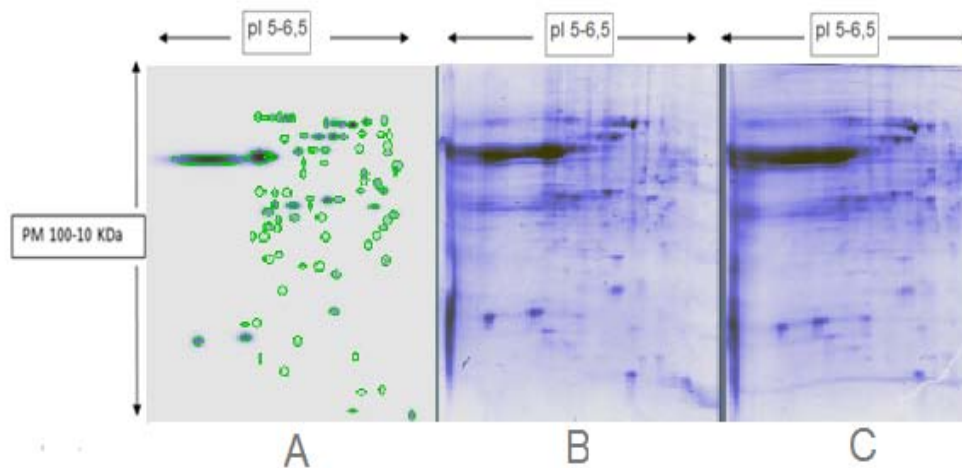


Figura 3.8 Análisis de imágenes de los geles SDS-PAGE-2D de las proteínas del clon 338. (A): Gel Máster generado por el programa PD-QUEST (verde; proteínas expresadas simultáneamente en los dos en los primeros fragmentos geles) **(B y C):** Réplicas de primeros fragmentos de los geles de las proteínas del clon 338. En estos geles se usaron tiras IEF con gradiente de pH 4-8 cortadas por la mitad.

Tabla 3.4 Reporte del análisis del los primeros fragmentos del gel (Tira cortada pH 5-8) correspondiente a las proteínas de epimastigotes del clon 338.

Gel Name	Replicate Group	Spots	Matched	Match Rate 1	Match Rate 2	Corr Coeff
*epimastigotes 338 tira cortada 5-8 1 160409 v2	not assigned	83	83	100%	100%	1.000
epimastigotes 338 tira cortada 5-8 1 160409 v3	not assigned	83	83	100%	100%	0.740

Los resultados de la segunda mitad de los dos geles se observan en las figuras 3.9 y 3.10, y en la **tabla 3.5**.

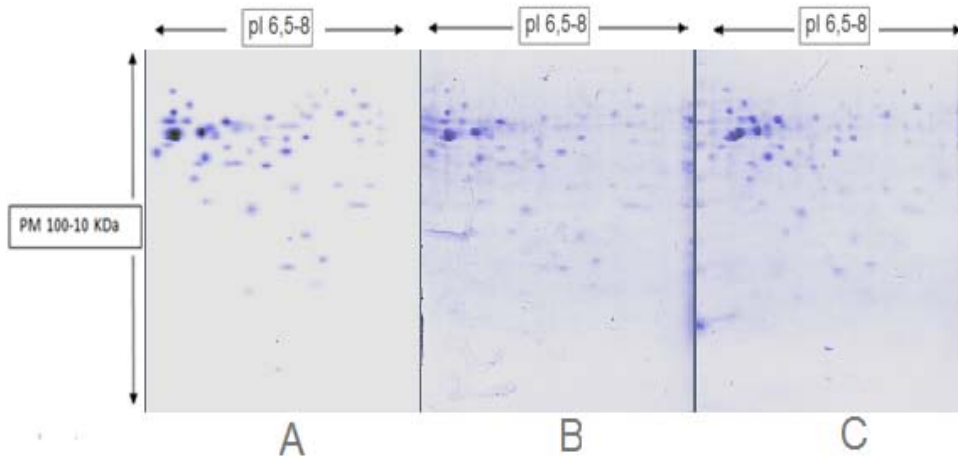


Figura 3.9. Análisis de imágenes de los geles SDS-PAGE-2D de las proteínas del clon 338. (A): Gel Máster generado por el programa PD-QUEST. (B y C): Réplicas de segundos fragmentos de los geles de las proteínas del clon 338. En este caso se usó tiras de IEF con gradiente de pH 5-8 cortadas por la mitad.

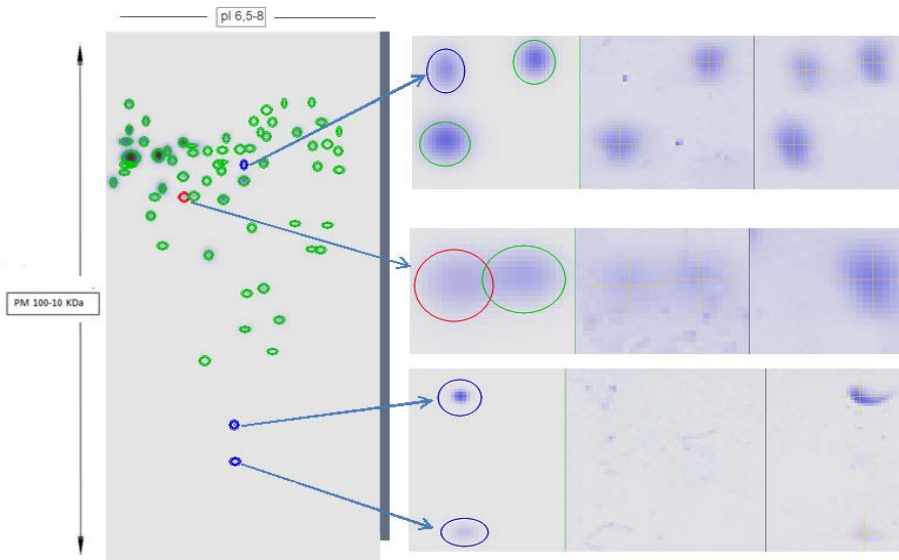


Figura 3.10. Imagen del Gel “Master” generado por el programa PD-QUEST de los mapas proteicos del clon 338 correspondiente al análisis de los segundos fragmentos de las tiras. Nomenclatura: Verde; proteínas expresadas simultáneamente en los dos geles. Rojo: proteínas expresadas particularmente del segundo fragmento de la primer tira, y Azul: proteínas expresadas particularmente segundo fragmento de la tira.

Tabla 3.5. Reporte del análisis del los segundos fragmentos del gel correspondiente a las proteínas de epimastigotes del clon 338.

Gel Name	Replicate Group	Spots	Matched	Match Rate 1	Match Rate 2	Corr Coeff
Epimastigotes del clon 338 segundo fragmento de la tira cortada pH5-8 (muestra I).	not assigned	62	62	100%	95%	1.000
Epimastigotes del clon 338 segundo fragmento de la tira cortada pH5-8 (muestra II).	not assigned	64	64	100%	98%	0.893

En la **figura 3.10** se muestra una amplificación los “spots” expresados diferencialmente para los segundos fragmentos de las tiras rehidratadas con el extracto proteico del clon 338. No obstante, se observan diferencias mínimas entre los dos geles (Ver **tabla 3.5**), las cuales no son sustanciales y podrían considerarse como despreciables.

El mismo procedimiento se realizó para los clones LQ y MF usando tiras de gradiente de pH 3-10 (ver **figura 3.11**) y 5-8. Sin embargo, en varios casos se observó que al cortar las tiras se deterioraba la resolución de las muestras en los bordes correspondientes al corte, perdiendo algunas proteínas. Además, se tuvo en cuenta que posteriormente estos mismos geles serían comparados con otros correspondientes a otras cepas y estadios del ciclo de vida de *T.cruzi*. Por esta razón, se separaron las proteínas de los clones a LQcl1 y MFcl1 por electroforesis bidimensional usando tiras de gradiente de pH 5-8, tal como se describió en el procedimiento. Los tratamientos se realizaron por triplicado y las muestras fueron comparadas usando el software de análisis PD-Quest.

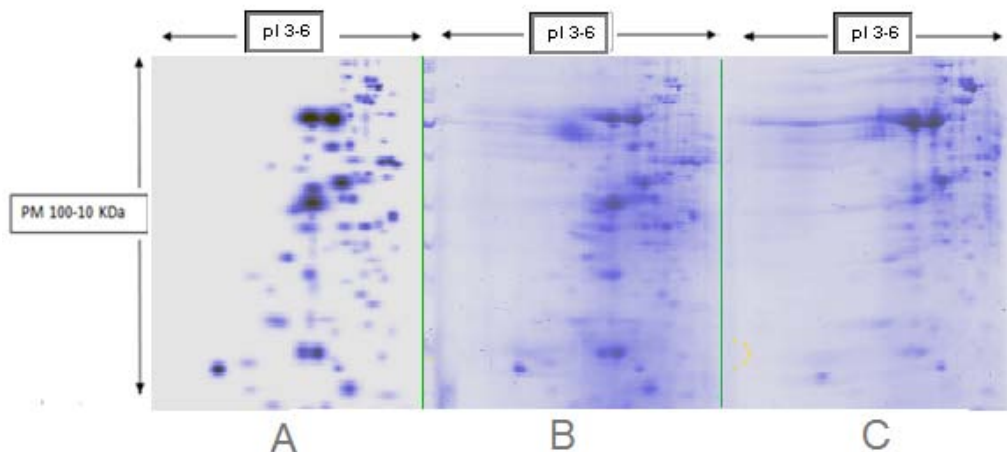


Figura 3.11. Imágenes de los primeros fragmentos de los geles de electroforesis SDS-PAGE-2D al 12% de los clones de *T.cruzi I.* (A) Gel máster generado por el programa PD-QUEST, (B) LQc1, y (C) MFc1. En ambos casos se usaron tiras con gradiente de pH 5-8.

3.3.2. Análisis proteómico comparativo

Las réplicas de los geles comparados se muestran en la **figura 3.12**. Para la selección de los puntos a identificar se tuvieron en cuenta aquellos cuya cuantificación cambió significativamente en ambos sentidos (aumento o disminución), y aquellos que se expresaron en un grupo pero no en el otro, y viceversa, pero teniendo en cuenta los parámetros ya descritos.

El estudio proteómico de ambas cepas permitió la identificación de proteínas expresadas diferencialmente, gracias a la obtención de mapas proteómicos altamente resueltos y reproducibles; lo que facilitó el manejo y transporte de los geles, permitiendo así el análisis de un mayor número de muestras. Los resultados mostraron que 10 proteínas

fueron sobre-expresadas en el clon del paciente asintomático (MFcl1) (Ver **figura 3.13**), mientras que 8 presentaron mayores niveles de expresión en el clon obtenido del paciente con CC (LQcl1), (Ver **figura 3.14**).

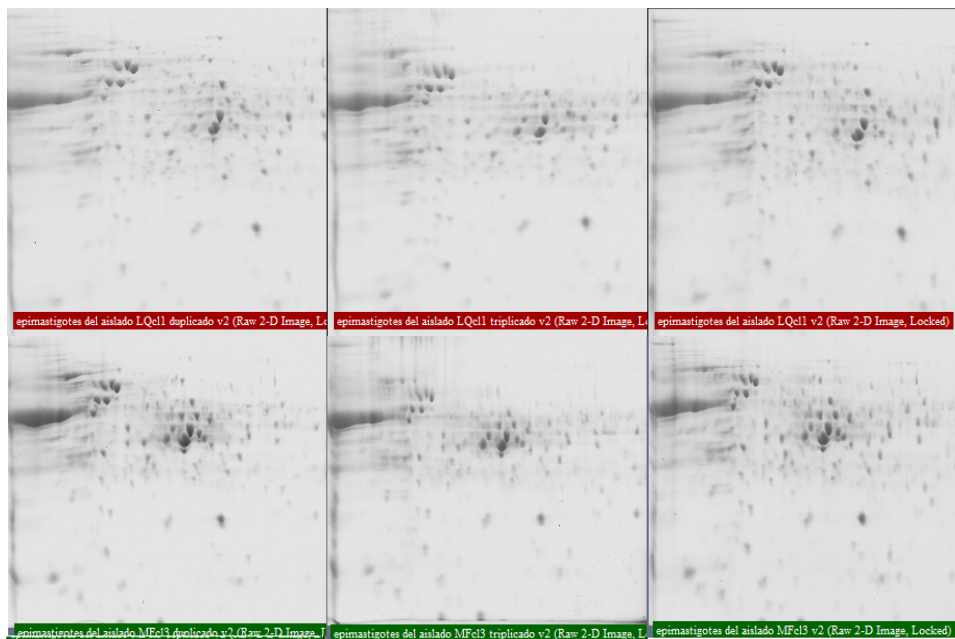


Figura 3.12. Análisis proteómico comparativo entre las réplicas de los clones de *T. cruzi* I. Rojo. Parte superior: Cepa LQcl1; Verde. Parte inferior: Cepa MFcl1.

3.4. Identificación de las proteínas expresadas diferencialmente por espectrometría de masas

Las ocho proteínas cuya expresión fue mayor en las réplicas de los geles correspondientes al clon LQcl1 fueron analizadas por espectrometría de Masas MALDI-TOF, y se estima que podrían estar

relacionadas con la presentación clínica de la cardiomiopatía chagásica, Sin embargo, para ninguno de los puntos (spots) se obtuvieron espectros de masas que permitieran identificar proteínas en las bases de datos de forma inequívoca. Esto podría tratarse del tipo de muestras que por razones desconocidas no ionizaron bien. Sin embargo, el análisis LC-MS/MS dio como resultado la identificación exitosa de todas las proteínas. En la **tabla 3.6** y los **anexos 4 a 11** se muestran los resultados con el motor Phenyx (el motor Sequest aporta los mismos resultados).

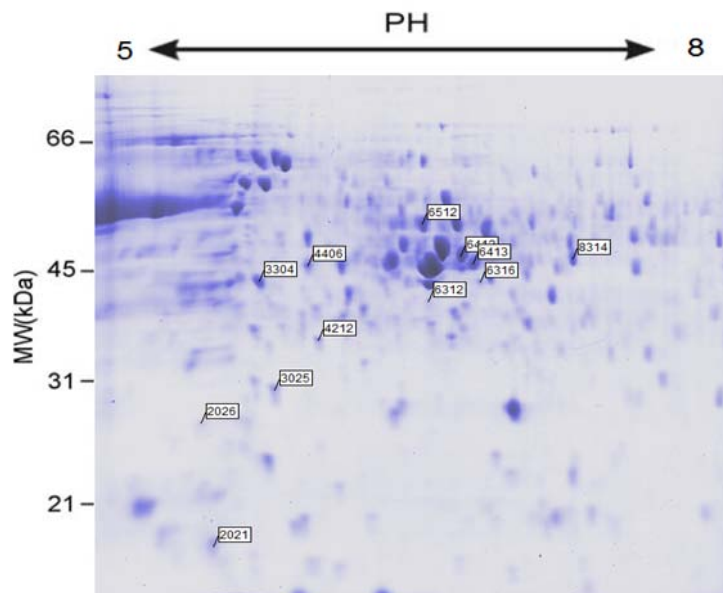


Figura 3.13. Imagen de gel de electroforesis bidimensional del clon MFc111 (asintomático) indicando las proteínas con niveles de expresión aumentados con respecto al clon LQc11 (CC).

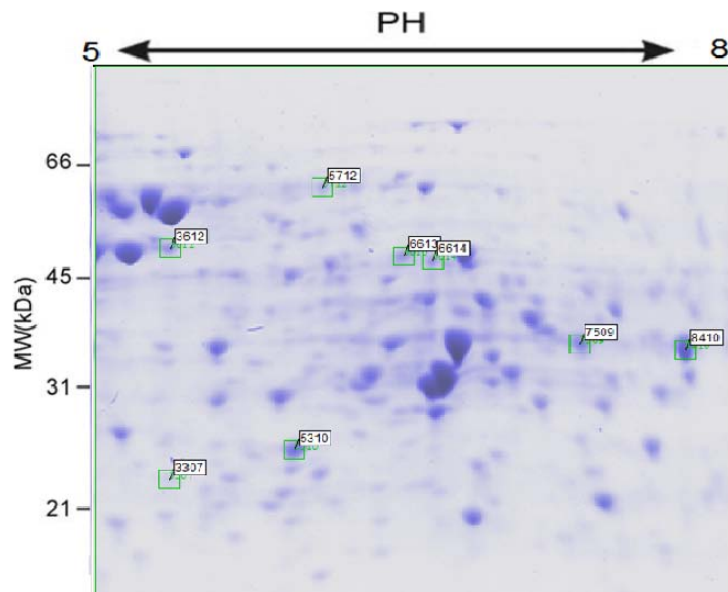


Figura 3.14. Imagen de gel de electroforesis bidimensional del clon LQc1 (CC) señalando las proteínas identificadas con niveles de expresión aumentados con respecto al clon MFc1 (Asintomático)

Tabla 3.6. Proteínas identificadas con el motor de búsqueda Phenyx

“Spot”	Proteína identificada	No. de acceso
3307	Enolasa	gi/71665461
3612	HSP60 mitocondrial	gi/71665068
5712	Proteína de choque térmico mitocondrial	gi/205278870
5310	Proteína quinasa C	gi/71661424
6313	Metilcarboxipeptidasa	gi/47076074
6414	Metilcarboxipeptidasa	gi/47076074
7509	Cistation beta sintasa	gi/71668089
8410	Cistation beta sintasa	gi/71668089

3.4.1. Correlación de las proteínas identificadas con el desarrollo clínico de la enfermedad de Chagas

Enolasa:

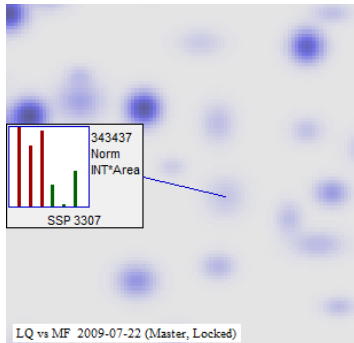


Figura 3.15. Histograma de la expresión diferencial de la enolasa mostrado en el gel "Master", (En verde Las replicas que corresponden al clon MFcl1 y en rojo las del clon LQcl1)

Las enolasas se han caracterizado en una amplia variedad de organismos, y se ha encontrado que sus secuencias están muy conservadas entre las diferentes especies encontradas. La enolasa (hidrolasa 2-fosfo-D-glicerato) es una enzima responsable de catalizar el paso de la deshidratación del 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato en la vía glucolítica. Específicamente, la expresión de

enolasa se ha relacionado con las etapas de transformación del *Toxoplasma gondii* (*T.gondii*), protozoo causante de la toxoplasmosis. Se ha sugerido que el aumento de la expresión de ésta proteína en *T.gondii* puede estar relacionada con su dependencia de la glucólisis anaeróbica durante el enquistamiento del parásito. La división activa e invasiva, Taquizoíto (forma activa de replicación), también, se ha relacionado con presencia de la enolasa.

La enolasa no sólo se asocia con la vía catabólica de un parásito (Kibe, 2005 y Bolten, 2008). Otros estudios han expuesto otros papeles de la proteína en distintos protozoos. La enolasa es una enzima glicolítica y gluconeogénica que también se encuentra en la superficie de algunas células eucariotas y procariotas, donde actúa como proteína de unión del plasminógeno (glicoproteína sintetizada por el hígado, presente en el plasma sanguíneo). La *Leishmania mexicana*, uno de los agentes causantes de la leishmaniasis, se une al

plasminógeno, y la enolasa ha sido encontrada en la cara externa de la membrana plasmática de este parásito. Se ha demostrado que la enolasa recombinante purificada tiene actividad de unión del plasminógeno en la superficie del parásito y que la proteína puede actuar como uno de los receptores de éste (Vanegas, 2007).

Al realizar los análisis comparativos entre los clones, la enolasa se expresa con mayor intensidad en el clon obtenido del paciente con CC (**Figura 3.15**), lo que fortalece la hipótesis de que la sobreexpresión de la enolasa en *T. cruzi*, al igual que en otros protozoos, podría estar relacionada con la capacidad de infección del parásito e incrementar la posibilidad de que se presente la forma clínica de la EC. En este sentido, se ha propuesto que la expresión diferencial de la enolasa en los parásitos protozoarios, probablemente sirve como una estrategia para que éstos puedan adaptarse a diferentes condiciones ambientales. Es por esta razón, se sugiere que debido a que esta enzima actúa como receptor del plasminógeno (Kibe, 2005 y Gupta, 2007), y se expresa en mayor medida en el aislado del paciente con CC, tal como indica Bolten, 2008, podría ser un blanco terapéutico contra el parásito.

Proteínas de choque térmico mitocondrial

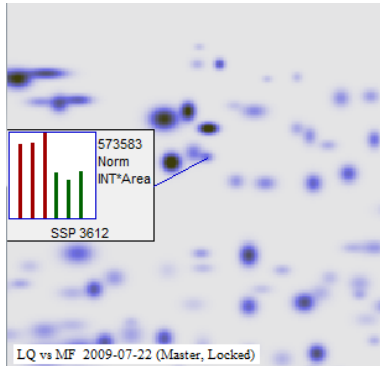


Figura 3.16. Histograma de la expresión diferencial de la HSP60, mitocondrial mostrado en el gel "Master", (En verde Las replicas que corresponden al clon MFcl1 y en rojo las del clon LQcl1)

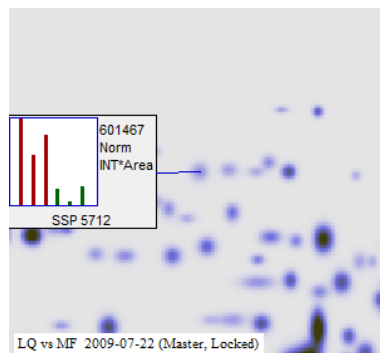


Figura 3.17. Histograma de la expresión diferencial de la proteína de choque térmico mitocondrial mostrado en el gel "Master", (En verde Las replicas que corresponden al clon MFcl1 y en rojo las del clon LQcl1)

Las proteínas de choque térmico se han descrito como unas de las más abundantes en *T. cruzi II* (Parodi, 2004).

La transmisión de *T. cruzi* del vector al hospedero vertebrado está asociada con la exposición de los parásitos a un cambio repentino en la temperatura, que aumenta de 22-28 ° C en los insectos, y hasta 37 ° C en mamíferos superiores. La respuesta al choque térmico constituye un mecanismo homeostático que se caracteriza por un aumento en la síntesis de un grupo de proteínas conocidas como proteínas de choque térmico (HSP), que tradicionalmente se han clasificado sobre la base de su masa molecular (Pérez, 2009). Estas proteínas son de considerable

interés para el estudio de los parásitos por varias razones. En primer lugar, el ciclo de vida de la mayoría de los parásitos implica la transferencia de las células parasitarias de un insecto a un mamífero hospedero, sometiendo así al organismo a cambios bruscos de temperaturas con respecto a la temperatura ambiente. Es por ello que se considera que las proteínas HSP participan en el proceso de diferenciación del parásito y en la adaptación del parásito a sus hospederos. Una de las principales características de la respuesta de las células frente al choque térmico es el papel protector que desempeñan las HSPs, ya que las protegen de los efectos tóxicos del

calor y otras formas de estrés; de modo que el grado de síntesis de HSPs, se correlaciona con el grado de tolerancia a condiciones extremas de temperatura en una gran variedad de organismos. Existen dos mecanismos generales por los cuales las HSPs son capaces de proteger a la célula frente a la presencia de proteínas de ser desnaturalizadas por temperatura. Uno es la degradación de proteínas mutadas, ya que ayudan en los mecanismos de proteólisis mediante la interacción con moléculas de degradación; el segundo consiste en prevenir la agregación de proteínas mal plegadas con el fin de promover su correcto plegamiento. En este último caso, las HSPs desempeñan un papel primordial actuando como chaperonas moleculares (Tibbetts, 2007; Folgueira, 2006; Fernandes, 2005). La HSP60 facilita el proceso de plegamiento real, creando un entorno aislado para las moléculas individuales plegables y también puede promover el despliegue y el repliegue de las sustancias intermedias mal conformadas (Fink, 1999). Además, se ha demostrado que las HSPs juegan un papel en la respuesta inmune del hospedero (Giambiagi, 1996 y Radwanska, 2000). Las HSP influyen en la actividad de algunas de las células del sistema inmune por su interacción con receptores de la inmunidad innata y sus vías de señalización, modulando la expresión de estas células (Bringaud, 1995). La HSP 60 exhiben propiedades inmunoreguladoras, especialmente por inducir una respuesta pro-inflamatoria, la cual en la CC está relacionada con el daño tisular. Los resultados obtenidos en este estudio estarían confirmando el papel de estas proteínas en el desarrollo de la CC al encontrarse aumentada su expresión en el paciente con CC vs el individuo asintomático.

Proteína Quinasa activada

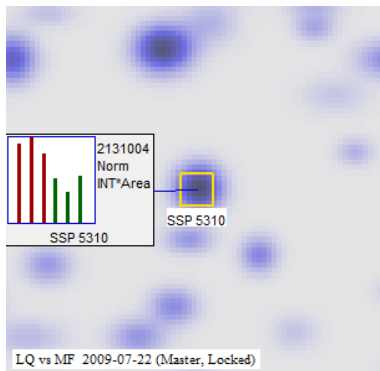


Figura 3.18. Histograma de la expresión diferencial de la proteína quinasa activada mostrado en el gel "Master". (En verde Las replicas que corresponden al clon MFc11 y en rojo las del clon LQc11)

La proteína quinasa A y la proteína quinasa C (PKC) fosforilan residuos de treonina o serina, modificando la actividad enzimática de manera específica en cada tipo celular ejerciendo así efectos sobre el metabolismo.

La fosforilación de proteínas juega un papel clave en la transducción de señales en los sistemas de eucariotas.

El diacilglicerol activa un ion Ca^{2+} y un fosfolípido dependiente de la PKC, que están asociados con muchos procesos celulares en células de mamífero.

Aunque se sabe poco sobre los mecanismos moleculares implicados en el control de la homeostasis del *T.cruzi*, se ha demostrado que PKC juega un papel importante en la regulación del crecimiento del parásito a través de la modulación del proceso de translocación del *mio*-inositol a través de la membrana celular del parásito (Barbosa, 2009). El *mio*-inositol es un factor de crecimiento para las células de mamíferos, así como para los patógenos protozoarios como el *T.cruzi*. La mayoría de las moléculas de la superficie celular en este organismo dependen de *mio*-inositol, que es un precursor biosintético de fosfoinosítidos y fosfatidil-inositol glicosilados (Lamas, 2000).

En las células renales de mamíferos se demostró que la Na^+ -ATPasa insensible a oubaína se activa por fosforilación de PKC, lo cual podría constituir un importante mecanismo de regulación de la homeostasis de iones en el parásito protista. Análogos de éter-lípidos como miltefosina

(1-O-hexadecilfosfocolina), utilizado como fármacos contra el cáncer, han demostrado una excelente actividad *in vitro* e *in vivo* contra las formas extracelulares e intracelulares de tripanosomátidos como *Leishmania* sp. y *T. cruzi* (Saraiva, 2002). En un trabajo reciente, cuyo objetivo fue evaluar la susceptibilidad *in vitro* a miltefosina, nifurtimox y benznidazole de cepas de *T. cruzi* aisladas de humanos y vectores en Santander, Colombia, se encontró que todos los parásitos fueron más susceptibles a la miltefosina que a los medicamentos de referencia (Luna, 2009).

A pesar de que no se conoce el mecanismo de acción de la miltefosina, se ha demostrado que inhibe el crecimiento de *T. cruzi* a través de la inhibición de la Na⁺-ATPasa y las actividades de la PKC (Saraiva, 2009). Adicionalmente, con los resultados expuestos en la **figura 3.18** que muestra que la PKC se encuentra mayormente expresada en los epimastigotes del clon LQ, se abren nuevos enfoques de investigación que podrían permitir elucidar el rol de la PKC en el crecimiento del parásito y en la generación de la patología. En este estudio, se logró determinar un aumento de la expresión de PKC en el clon obtenido del paciente con CC con respecto al del paciente asintomático.

En otros estudios, se encontró que isoenzimas de PKC, regulan un número de respuestas cardíacas, incluidas las que están asociadas con la insuficiencia cardíaca (IC). En hipertensión inducida por IC, es perjudicial la activación de la PKC. Numerosos estudios *in vitro* han señalado el papel de isoenzimas PKC en el daño celular por citoquinas pro-inflamatorias en enfermedades cardíacas o células cardíacas (Selvaraj, 2009). Estos estudios son coherentes con los resultados obtenidos (Ver **figura 3.18**) y permitirían proponer a la PKC parasitaria como un objetivo terapéutico para el tratamiento de *T.cruzi*.

Metalocarboxipeptidasas

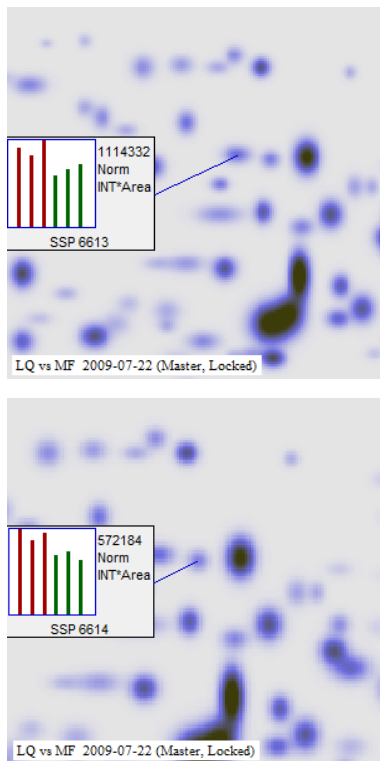


Figura 3.19. Histogramas de la expresión diferencial de las metalocarboxipeptidasas mostradas en el gel "Master", (En verde las replicas que corresponden al clon MFc11 y en rojo las del clon LQc11)

Se han identificado y estudiado bioquímicamente dos metalocarboxipeptidasas (MCP) del clon CL Brener, de *T. cruzi*, TcMCP-1 y TcMCP-2. (Niemirowicz, 2007). Estas peptidasas son enzimas citosólicas que difieren en su patrón de expresión: mientras TcMCP-1 está presente en todas las etapas de la vida de *T. cruzi*, TcMCP-2 se limita principalmente a las etapas que se producen en el hospedero invertebrado. A pesar de la alta identidad en sus secuencias (64%), las TcMCPs tienen notables diferencias bioquímicas. TcMCP-1 rompe y libera residuos básicos presentes en el C-terminal, mientras que

TcMCP-2 hidroliza residuos aromáticos y alifáticos. Además, los genes ortólogos correspondientes a proteínas TcMCPs, hasta ahora no caracterizados, se han encontrado en los genomas de otros protozoos relacionados como *Trypanosoma brucei* y *Leishmania sp.* Hasta ahora, los miembros de esta familia están ausentes de los genomas eucariotas, con la notable excepción de los de tripanosomátidos (Niemirowicz, 2008). Este hecho hace que estas enzimas sean un blanco atractivo potencial para el desarrollo de medicamentos contra este tipo de microorganismos.

Las MCPs se encuentran también en bacterias patógenas humanas tales como: *Bacillus anthracis*, *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis*, *Vibrio cholerae*, *Legionella pneumophila* y varios *Serratia*, *Rickettsia* y especies de *Yersinia* (Niemirowicz, 2008).

Ensayos de inmunofluorescencia indirecta sugieren que ambas proteínas (TcMCP-1 y TcMCP-2) se localizan en el citosol del parásito (Niemirowicz, 2008). El estudio de las peptidasas en parásitos protozoarios de forma general, y en tripanosomátidos en particular, se ha realizado a niveles molecular y celular. En los parásitos, las proteasas desempeñan funciones centrales, tales como la invasión y la salida desde la célula hospedera, el catabolismo de las proteínas del hospedero, la progresión del ciclo celular, cito-adherencia y la evasión del sistema inmunitario del hospedero (Klemba, 2002).

En este marco, está siendo explorada la posibilidad de desarrollar inhibidores selectivos de proteasas de parásitos patógenos en nuevas estrategias de quimioterapia (Klemba, 2002). Estos son los primeros miembros de esta familia que se caracteriza en un organismo

eucariota. Los resultados de la **figura 3.19** se añaden al conocimiento de las TcMCPs del parásito, ya que en el proteoma del clon LQcl1 (ver **figura 3.19**) se observa un aumento de la expresión de dos MCPs con respecto al del MFcl1, lo que sugiere una vez más la participación de éstas proteínas en la capacidad del *T.cruzi* para evadir los mecanismos de defensa de los diferentes hospederos. De modo que estas proteínas ofrecen un nuevo objetivo para el desarrollo de una quimioterapia racional contra de la enfermedad Chagas y otras enfermedades causadas por tripanosomátidos (Niemirowicz, 2008).

Cistationa beta-sintasa

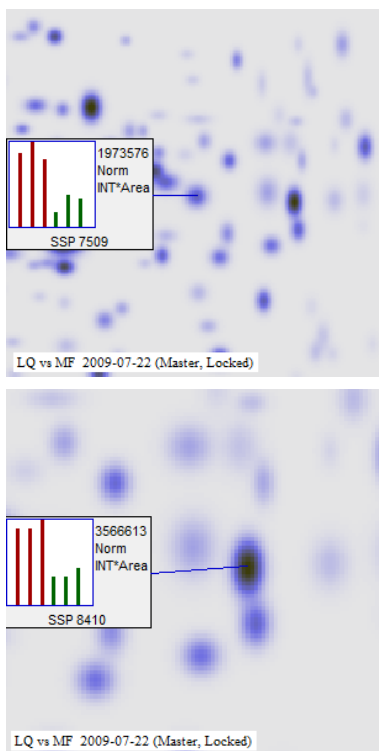


Figura 3.20. Histogramas de la expresión diferencial de las cistationina beta-sintasas mostrado en el gel "Master". (En verde Las replicas que corresponden al clon MFcl1 y en rojo las del clon LQcl1)

La cistationina beta-sintasa (CBS) es una enzima clave de la vía de tran-sulfuración del parásito *Trypanosoma cruzi*. El azufre que contienen los aminoácidos desempeña un papel importante en una variedad de funciones celulares, tales como; la síntesis de proteínas y la síntesis de glutatión.

La CBS de *T.cruzi*, a diferencia de la CBS de mamíferos, carece del carboxilo terminal regulador, no contiene hemo, y no es activada por la S-adenosil-metionina. La enzima forma un homo-tetrámero, y posee además de la actividad CBS, actividades serina sulfidrilasa y cisteína sintetasa (CS) (una enzima que cataliza el último paso en

la biosíntesis de cisteína) *in vitro*. La expresión de la TcCBS en *Saccharomyces cerevisiae* y *Escherichia coli* demostró que la CBS y CS tienen actividades funcionales *in vivo*. Estudios enzimáticos en extractos de *T. cruzi* indican que hay una enzima adicional CS. A su vez, estudios de control de la etapa específica de la expresión de CBS y CS demostraron que *T. cruzi* es un protista único, ya que posee tanto actividad transulfuración como vías de asimilación de azufre (Nozaki, 2001).

Varios compuestos que contienen azufre, especialmente cisteína, metionina, y S-adenosil-metionina, son esenciales para el crecimiento y actividades de todas las células; la metionina inicia la síntesis de proteínas, la cisteína juega un papel fundamental en la estructura, estabilidad y función catalítica de muchas proteínas y participa en la síntesis del glutatión antioxidante, y la S-adenosil-metionina desempeña un papel crucial en la transferencia del grupo metilo y en la biosíntesis de poliaminas (Griffith, 1987).

El aumento de la expresión de la TcCBS en el clon LQ (Ver **figura 3.20**) sugiere que es una enzima implicada en la síntesis de proteínas comprometidas con la invasión del *T. cruzi* a la célula hospedera, mientras que se ve altamente disminuida en el proteoma del clon del paciente asintomático, lo que en consecuencia, estaría indicando que es una de las proteínas involucradas en el proceso de la generación de la patología sintomática.

4. CONCLUSIONES

La electroforesis de geles bi-dimensionales (2D) de proteínas, utilizada en este estudio, así como el análisis computacional de las imágenes de los geles 2D, permitió obtener una alta resolución y reproducibilidad en la caracterización de las proteínas de epimastigotes de *T.cruzi* tipo I cultivados *in vitro*. Además, resultó ser un método útil de análisis de proteomas de organismos con concentraciones de proteína baja,

El análisis LC-MS/MS permitió la identificación selectiva con alto grado de confianza de todas las proteínas seleccionadas que se expresaron de forma diferencial. Por esta razón, se sugiere como un método adecuado y compatible para la caracterización de proteínas de interés por electroforesis de proteínas bi-dimensional (2D).

El estudio comparativo de los proteomas de los epimastigotes de los dos clones, LQcl1 y MFcl1, permitió la caracterización e identificación de proteínas claves implicadas en la virulencia y probable infectividad del parásito, así como de posibles dianas moleculares para la acción de fármacos destinados al control del *T. cruzi* I y la enfermedad de Chagas.

Los resultados reportados en este estudio estarían confirmando el papel de proteínas como la HSP60 y la quinasa C activada en el desarrollo de la cardiopatía chagásica al encontrarse aumentada su expresión en el paciente con cardiopatía chagásica en comparación con el individuo asintomático.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la utilidad de las técnicas proteómicas usadas en los estudios comparativos entre diferentes

cepas de *Trypanosoma cruzi* y otros tripanosomátidos, posibilitando la identificación de nuevas dianas terapéuticas involucradas en la producción de la patología.

5. RECOMENDACIONES

A partir de los resultados obtenidos en este estudio se proponen las siguientes recomendaciones:

Identificar las proteínas cuyo mayor nivel de expresión se presentó en los epimastigotes del paciente asintomático respecto a los del paciente con cardiomiopatía chagásica, con el fin de encontrar y describir posibles proteínas que actúen promoviendo el proceso de infección.

Realizar un análisis proteómico comparativo de los dos clones, LQcl1 y MFcl1, utilizando proteínas de los estadios que se encuentran en el hospedero vertebrado; tripomastigotes y amastigotes, e incluyendo nuevas cepas de parásitos obtenidos de pacientes con las mismas características que las utilizadas. Estos estudios son esenciales para evaluar y/o validar las hipótesis planteadas en este estudio.

Evaluar el uso de otras técnicas de tinción más sensibles tales como “SYPRO Ruby” con el objeto de continuar minimizando la cantidad necesaria de proteínas, para hacer éste tipo de estudios, y así, reducir el tiempo empleado en la recolección de los parásitos y la cantidad de materiales y reactivos que se invierten en dicho proceso.

Realizar análisis entre los proteomas de los parásitos, pero usando particularmente proteínas de membrana, y utilizar técnicas que permitan una, aún, mayor resolución de los geles, tales como geles con gradiente y/o tiras de gradientes más estrechos según la ubicación de los puntos de interés.

Se sugiere que los resultados obtenidos, identificación de proteínas que parecen jugar un papel relevante en el proceso de la infección del *Trypanosoma cruzi*, se complementen con análisis computacionales

destinados a comprender el mecanismo de invasión del parásito y a proponer nuevos tratamientos para la enfermedad de Chagas.

6. ESTRATEGIAS DE PUBLICACIÓN

Los resultados preliminares del trabajo se publicaron en dos eventos:

Joint Congress SEProt-LAHUPO. Proteomics and Human Proteome-from bench to bedside, 2009, Pamplona (España), febrero de 2009. “Differential protein profiles of *trypanosoma cruzi* strains isolated from asymptomatic and symptomatic patients with chagas disease” **(Ver Anexo 12)**.

XIV Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical Y X Simposio PECET, Medellín, octubre de 2009 “Expresión diferencial de proteínas de *Trypanosoma cruzi* obtenidas de un paciente con cardiomiopatía chagásica y un individuo asintomático: Una aproximación desde la proteómica”. Con memorias en la **Revista Biomédica**. ISSN: 0120-41vol. 29 p. 180, **2009 (Ver Anexo 13)**.

Con el fin de dar a conocer los resultados y de promover nuevos trabajos de investigación relacionados, éste trabajo será publicado en la Revista Biomédica y en Journal of Proteomics. Ambos artículos se encuentran en preparación.

7. BIBLIOGRAFÍA

Aguilar-Shea, A.L.; Coletto-Lovera D.N.; López-García, E.; Bernardo-Fernández, T.; Semergen. **2008**, 34 (9), 465-466.

Alves L.R., Avila A.R., Correa A., Holetz F.B., Mansur F.C., Manque P.A., de Menezes J.P., Buck G.A., Krieger M.A. y Goldenberg S.; *Gene*. **2010**; 452(2):72-8.

Alves M.J. y Colli W.; *Subcell. Biochem.* **2008**; 47:58-69.

Ayub, M.; Atwood, J.; Nuccio, A.; Tarleton, R.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, 382, 30–34.

Baptista C.S.; Vêncio R.Z.; Abdala S.; Carranza J.C.; Westenberger S.J.; Silva M.N.; Pereira C.A.; Galvão L.M.; Gontijo E.D.; Chiari E., Sturm N.R. y Zingales; *B.Mol. Biochem. Parasitol.* **2006**; 150(2):236-48.

Baptista CS, Vêncio RZ, Abdala S, Carranza JC, Westenberger SJ, Silva MN, Pereira CA, Galvão LM, Gontijo ED, Chiari E, Sturm NR, Zingales B; *Mol Biochem Parasitol.* **2006**, 150(2):236-248.

Barretto, AC.; *Sao Paulo Med J.* **1995**, 113, 797–801.

Bell A., Monaghan P. y Page A.P.; *Int J Parasitol.* **2006**; 36(3):261-76.

Bestetti, R.B.; Muccillo, G.; *Int. J. Cardiol.* **1997**, 60, 187–93.

Bolten, K.E.; Marsh, A.E.; Reed, S.M.; Dubey, J.P.; Toribio, R.E.; Saville, W.J.A.; *Experimental Parasitology.* **2008**, 120, 108–112.

Brener, Z.; *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **1985**, 18 (suppl):1-8, 43-44.

Bringaud, F.; Peyruchaud, S.; Baltz, D.; Giroud, C.; Simpson, L.; Baltz, T.; *Mol. Biochem. Parasitol.* **1995**, 74, 19- 123

Brisse S., Barnabe C., Tibayrenc M.; *Int J Parasitol.* **2000**; 30:35-44.

Bueno Yeny. Tesis. Universidad Industrial de Santander. **2007**.

Buscaglia, C.; Di Noia, J.; Heidelberg, M.; *Microbes and Infection.* **2003**, 5 (5), 419-427.

- Camargo, E.P.; Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. **1964**, 12, 93-100.
- Cassio S., Baptista, Ricardo Z.N. Vêncio, Abdala Sarah, Carranza Julio César, Scott J. Westenberger, Marcelo N. Silva, *et al.* Mol. Biochem. Parasitol. **2006**; 150 (2): 236-248.
- Castagnino, J.; Acta Bioquím. Clín. Latinoam. **2008**; 42 (2), 179-82.
- Coura, J.R.; Días, J.C.; Mem. Inst. Oswaldo Cruz. **2009**, 104 (4), 31-40.
- Cruz Cubas, A. Anales de la Facultad de Medicina. **2000**, 61 (1), 65 – 77.
- Cuervo P., Cupolillo E., Segura I., Saravia N., Fernandes O.; Mem. Inst. Oswaldo Cruz. **2002**; 97(6):877-80.
- Devia F. Tesis de grado Magister en Microbiología. Universidad de los Andes. **1999**.
- Días, J.C.; Silveira, A.C.; Schofield, C.J.; Mem. Onst. Oswaldo Cruz. **2002**, 97 (5), 603-612.
- Dutt M.J. y Lee K.H..Curr Opin Biotechnol. **2000**; 11(2):176-9.
- Einicker-Lamas M.; Almeida AC.; Todorov AG.; de Castro SL.; Caruso-Neves C.; Oliveira MM.; Eur. J. Biochem. **2000**, 267 (9), 2533-2537.
- Fernandesa, M.; Silvaa, R.; Rfsslea, S.; Bischa, P.; Rondinellia, E.; Urmenyia T.; Gene. **2005**, 349, 135–142.
- Fink, A. L.; Physiol. Rev. **1999**, 79, 425-449.
- Folgueira Fernández, C. Los genes HSP70 de Leishmania: importancia de la regulación traduccional y relevancia biológica del gen HSP70-II. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, octubre de **2006**.
- Garfin, D.; Trends. Analyt. Chem. **2003**, 22 (5), 263-272.
- Giambiagi-Demarval, M.; Souto-Padrón, T.; Rondinelli, E.; Parasitology. **1996**, 83, 335–345.

Punukollu G., Gowda R.M., Khan I.A., Navarro V.S. y Vasavada B.C.; *Int J Cardiol.* **2007**; 115(3):279-83.

Griffith, O. W.; *Methods Enzymol.* **1987**, 143, 366–376.

Gupta, S.K.; Sisodia, B.S.; Sinha, S.; Hajela, K.; Naik, S.; Shasany, A.K.; Dube, A.; *Proteomics.* **2007**, 7, 816–823.

Gutiérrez R., Angulo V.M., Tarazona Z., Britto C., Fernandes O. *Parasitology.* **2004**; 129:439-44.

Guzmán-Marín, E.; Zavala-Castro, J.; Acosta-Viana, J.; Rosado-Barrera, M.; *Rev. Biomed.* **1999**, 10,177-184.

Hatzimanikatis, V.; Lee, K.; *Metab. Eng.* **1999**, 1, 275-281.

Heitmann , I.; Jercic, M.; Jofré , L.; Muñoz , P.; Noemí , I.; San Martín , A. V.; Sapunar , J.; Torres, M.; Zulantay, I.; *Parasitología, Rev. Chil. Infect.* **2008**; 25 (3), 194-199.

Holguín A.F., Saravia N.G., D'Alessandro A.; *J. Trop. Med.* **1987**; 36(1):53-8.

Jacobs T., Erdmann H., Fleischer B. J, *Cell. Biol.*; **2010**; 89(1):113-6.

Jaramillo A.M., Arboleda-Sánchez S., Rodríguez I.B., Cura C., Salazar A., Del Mazo J., Triana-Chávez O., Schijman A.G. *Parasitol Res.* **2009**;104(2):399-410.

Jaramillo N., Moreno J., Triana O., Arcos-Burgos M., Muñoz S., Solari A.; *J. Trop. Med.* **1999**; 61(6):986-93.

Kibe, M.K.; Coppin, A.; Dendouga, N.; Oria, G.; Meurice, E.; Mortuaire, M.; Madec, E.; Tomavo, S.; *Nucleic Acids Research.* **2005**, 33, 1722–1736.

Klemba, M.; Goldberg, D. E.; *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, 71, 275–305.
Laboratorio de Estudios sobre Tripanosomiasis, Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 70228, C.P. 04510 México DF, Mexico.

Lacerda, C.; Chapeaurouge, A.; Kalume, D.; Lima, L.; Perales, J.; Fernandes, O.; Arch. Microbiol. **2009**, 191,177–184.

López N.C., Valck C., Ramírez G., Rodríguez M., Ribeiro C., Orellana J., Maldonado I., Albiní A., Anacona D., Lemus D., Aguilar L., Schwaeble W., Ferreira A.; Trop. Dis. **2010**; 4(7):e730.

Luna, K.; Hernández, I.; Rueda, C.; Zorro, M.; Croft, S.; Escobar P.; Biomédica. **2009**, 29 (3), 448-455.

MacDonald, J.A.; Borman, M.A.; International Congress Series. **2004**, 1275, 14–21.

Macedo A.M. y Pena S.D. Parasitol Today. **1998**; 14(3):119-24.

Michael, J.; Lee, K.; Current Opinion in Biotechnology. **2000**, 11, 176–179.

Moncayo A. Mem Inst Oswaldo Cruz. **2003**; 98:577-91.

Moncayo, A; Silveira, A.C.; Mem. Inst. Oswaldo Cruz. **2009**, 104 (4), 17-30.

Montilla M.M., Guhl F., Jaramillo C., Nicholls S., Barnabe C., Bosseno M.F., Breniere S.F. J. Trop. Med. **2002**; 66(4):394-400.

Murata E., Hashimoto M., Aoki T.; Microbiol. Immunol. **2008**; 52(11):539-43.

Niemirowicz, G.; Parussini, F.; Agüero, F.; Cazzulo, J.J.; Biochem. J. **2007**. 401, 399–410.

Nogueira de Melo A.C., de Souza E.P., Elias C.G., Santos A.L., Branquinho M.H., *et al.*; Exp. Parasitol. **2010**;125(3):256-63.

Nozaki T. y Cross G.A.; Mol. Biochem. Parasitol. **1995**, 75, 55-67.

Nozaki, T.; Shigeta, Y.; Saito-Nakano, Y.; Imada, M.; Kruger, W.; J. Bio. Chem. **2001**, 276 (9), 6516–6523.

Oliveira F.O., Alves C.R., Calvet C.M., Toma L., Bouças R.I., Nader H.B., Castro Côrtes L.M., Krieger M.A., Meirelles M., Souza Pereira MC.; Microb. Pathog. **2008**; 44(4):329-38.

Paba, J., Santana, J. M., Teixeira, A. R., Fontes, W. *et al.* **2004**; 4: 1052–1059.

Palaniyandi, S.; Sun, L.; Batista Ferreira, J.; Mochly-Rosen, D.; Cardiovascular Res. **2009**, 209-239.

Palau , M.; MVZ - CORDOBA, **2000**; 5 (1), 33-37.

Parada, H.; Carrasco, H.A.; Anez, N.; Fuenmayor, C.; Inglessis, I.; Int J. Cardiol. **1997**, 60, 49–54.

Parodi-Talicea , A.; Durán , R.; Arrambide, N.; Prieto, V.; Dolores Piñeyro M.; Pritsch, O.; Cayota, A.; Cerveñansky, C.; Robello, C.; J.Parasitol. **2004**, 34, 881–886.

Pedroso A., Cupolillo E., Zingales B.; Exp. Parasitol. **2007**; 116(1):71-6.
Pérez-Morales , D.; Ostoa-Saloma , P.; Espinoza , B. Exp. Parasitol.; **2009**, 123, 182–189.

Pérez-Morales, D.; Ostoa-Saloma, P.; Espinoza B.; Exp. Parasitol. **2009**, 123, 182–189.

Prata, A.; Lancet Infect. Dis. **2001**, 1, 92–100.

Punukollu G.; Gowda, R.; Khan , I.; Navarro, V.; Vasavada, B.; Int. J. Cardiol. **2007**, 115 (3), 279-83.

Radwanska, M.; Magez, S.; Dumont, N.; Pays, A.; Nolan, D.; Pays, E.; Parasite Immunol. **2000**, 22, 639–650.

Ready P.D. y Miles M.A.; J.Trop. Med. **1980**; 74(2):238-42.

Rodríguez P., Escalante M., Díez H., Cuervo C., Montilla M., Rubén Santiago N., Zarante I., Puerta C.; Biomedica. **2002**;22(3):263-71.

Ruiz-Garcia M., Montilla M., Nicholls S.O., Angarita L., Alvarez D.; Heredity. **2000**; 85 (4): 318-327.

Salazar A., Schijman A.G. y Triana-Chávez O.; Acta. Trop. **2006**; 100(1-2):110-8.

Saraiva, V.; Wengert, M.; Gomes-Quintana, E.; Heise, N.; Caruso-Neves, C.; Archives of Biochem. Biophysics. **2009**, 481, 65–71.

Saraiva, V.B.; Gibaldi, D.; Previato, J.O.; Mendonça-Previato, L.; Bozza, M.T.; Freire- De-Lima, C.G.; Heise, Antimicrob. N.; Agents Chemother. **2002**, 46, 3472–3477.

Saravia N.G., Holguin A.F., Cibulskis R.E., D’Alessandro A.; J. Trop. Med. **1987**; 36:59-69.

Souto RP.; Fernandes O.; Macedo AM.; Campbell DA.; Zingales B.; Mol. Biochem. Parasitol. **1996**, 83, 141-152.

Tibayrenc M., Neubauer k., Barnabo C., *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. **1993**, 90: 1335-1339.

Tibbetts, R.; Jensen, J.; Olson, C.; Wang, F.; Engman, D.; Mol. Biochem. Parasitol. **1998**, 91, 319–326.

Triana O., Jaramillo N., Moreno J.; Biol. Res. **1999**; 32(1):1-10.

Valck C., Ramírez G., López N., Ribeiro C.H., Maldonado I., Sánchez G., Ferreira V.P., Schwaeble W., Ferreira A.; Mol. Immunol. **2010**; 47(7-8):1516-21.

Vanegas, G.; Quiñones, W.; Carrasco-López, C.; Concepción, J.L.; Albericio, F.; Avilán, L.; Parasitology Research. **2007**, 101, 1511–1516.

Veenstra, T; Drug Discovery Today: Technologies. **2006**, 3 (4), 433-440.

Vertommen, D.; Roy, J.; Szikora, J.; Rider, M.; Michels, P.; Opperdoes, F.; Molecular & Biochemical Parasitology. **2008**, 158, 189–201.

Villalta F., Scharfstein J., Ashton A.W., Tyler K.M., Guan F., Mukherjee S., Lima M.F., Alvarez S., Weiss L.M., Huang H., Machado F.S. y Tanowitz H.B.; Parasitol. Res. **2009**; 104(6):1251-60.

Wilkins, M.R.; Sanchez, J-C.; Gooley, A.A.; Appel, R.D.; Humphery-Smith, I.; Hochstrasser , D.F.; Williams, K.L.; Biotechnol. Genet. Eng. Rev. **1995**, 13, 19– 50.

World Health Organization. Tropical disease research, progress 2003-2004: 17th Programme Report of the UNICEF/UNDP/World Bank/WHO.

Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases.
Report No. 17. Geneva: WHO; **2005**.

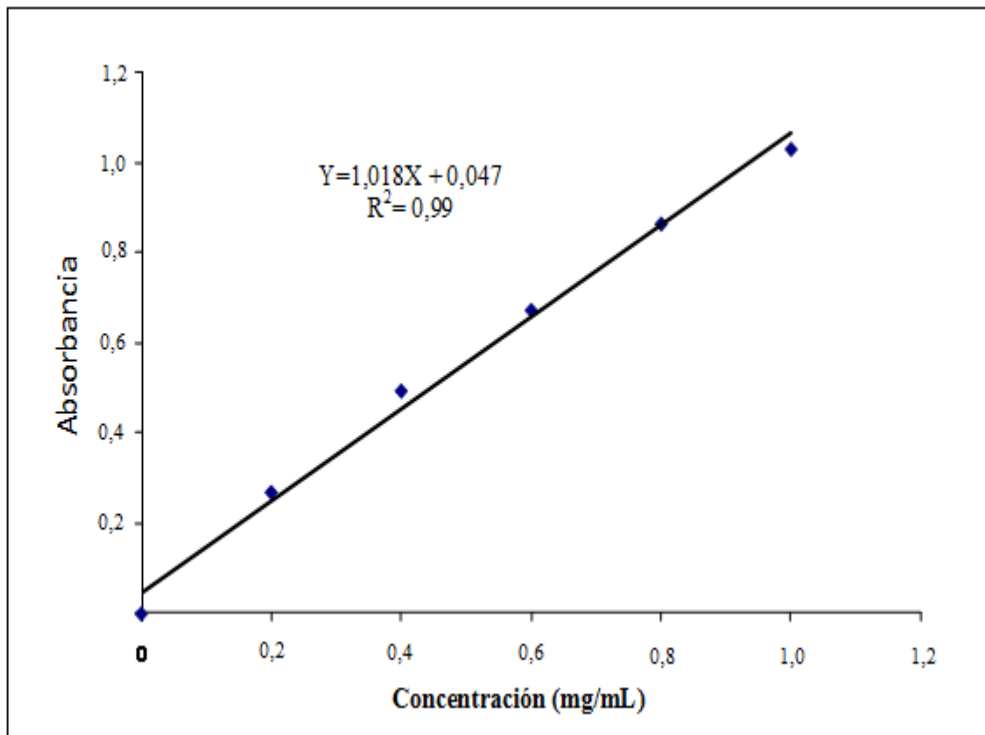
Yábar Varas, Carlos Augusto; MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE ELECTROFORESIS PARA PROTEÍNAS Y ADN. Serie de Normas Técnicas N° 38 Lima. **2003**, 5.

Zingales B., Andrade SG., Briones M.R.S., Campbell D.A., Chiari E., Fernandes O., Guhl F., Lages-Silva E., Macedo A.M., Machado C.R., Miles M.A., Romanha A.J., Sturm N.R., Tibayrenc M. y Schijman A.G.; *Mem Inst Oswaldo Cruz*. **2009**, 104(7): 1051-1054.

Zingales B., Carniol C., De Lederkremer, R.M. y Colliw, W.; *Mol. Biochem. Parasitol.* **1987**, 26, 135-144.

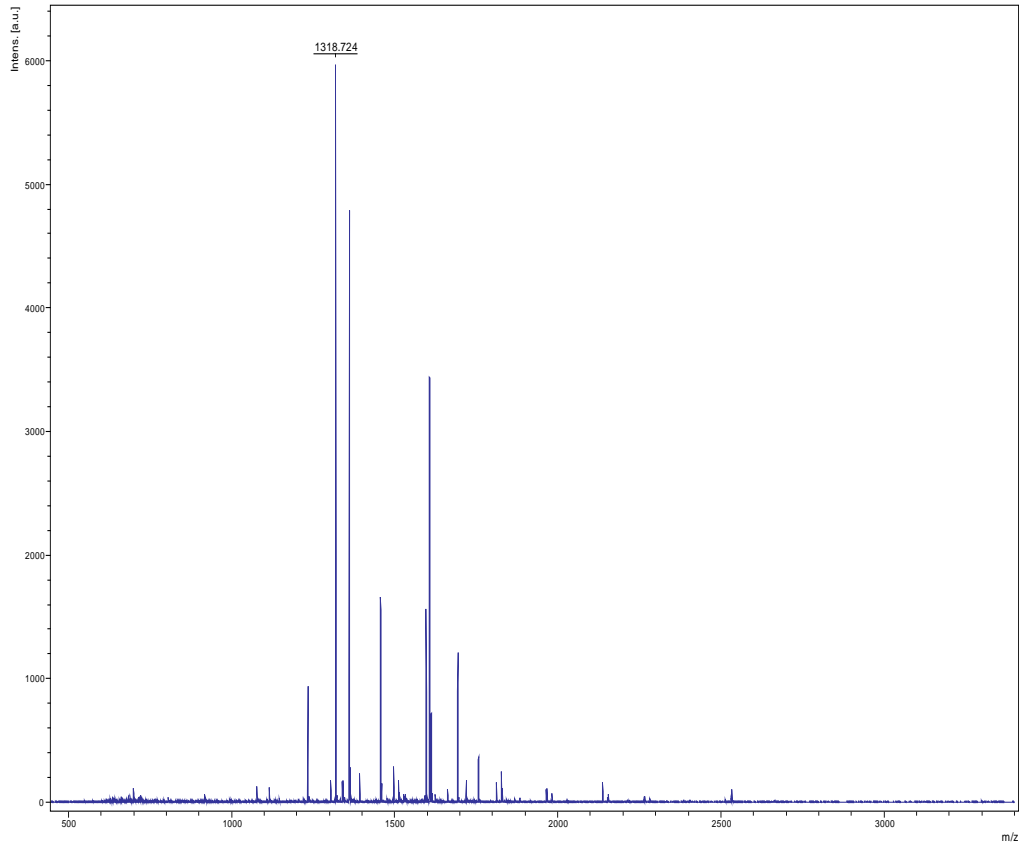
Anexo 1

Curva de calibración para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford. Las proteínas se cuantificaron a 595 nm.



Anexo 2

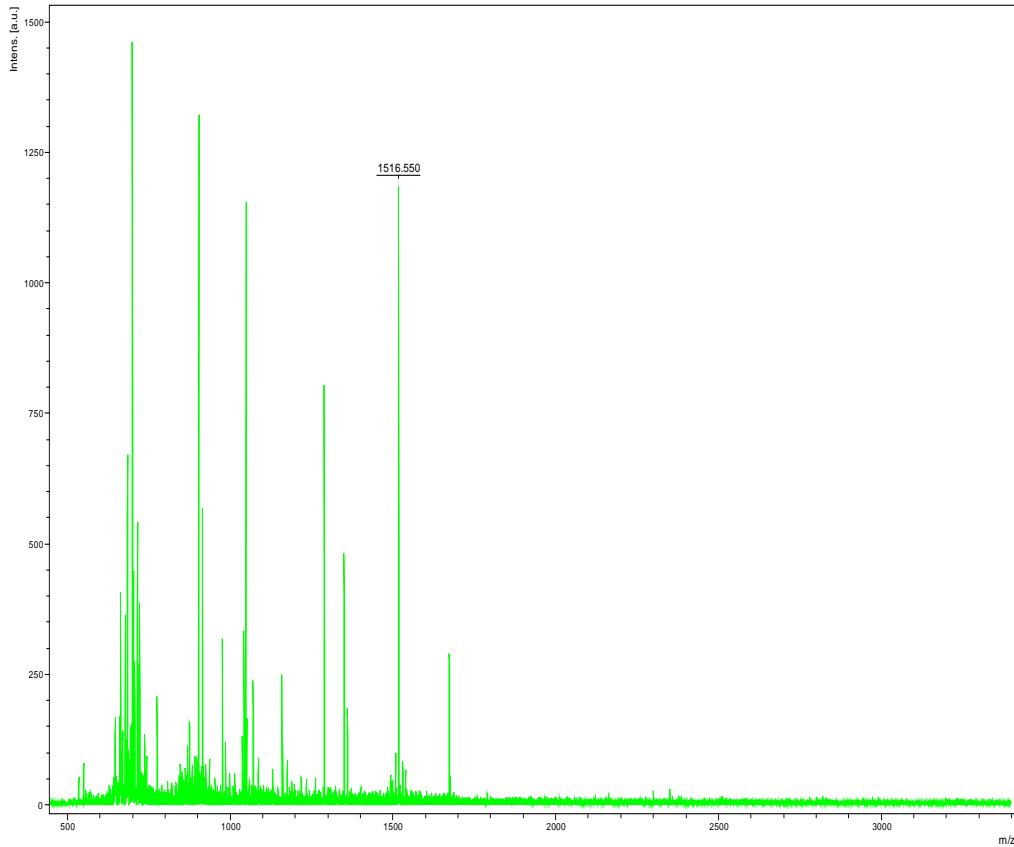
Identificación de la proteína de la Muestra 2 (ver figura 3.7)
 utilizando MASCOT como motor de búsqueda.
<http://www.matrixscience.com/>



Accession	Mass	Score	Description
1. gi 71665068	59129	180	chaperonin HSP60, mitochondrial precursor [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]
2. gi 3623476	59374	168	RecName: Full Chaperonin HSP60, mitochondrial; Short Protein Sp60; AltName: Full-groEL
3. gi 71665064	59351	131	chaperonin HSP60, mitochondrial precursor [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]
4. gi 295363	59349	130	heat shock protein 60
5. gi 71659487	30630	95	chaperonin HSP60 mitochondrial precursor [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]
6. gi 218895994	33660	74	DnaD domain protein [Bacillus cereus G9842]
7. gi 162450008	42029	67	hypothetical protein scel738 [Sorangium cellulosum 'So ce 56']
8. gi 225089309	33153	66	transcriptional regulator, AraC family [gamma proteobacterium NOR5-3]
9. gi 196044174	33549	66	DnaD domain protein [Bacillus cereus O3BB108]
10. gi 210902141	33374	66	DnaD domain protein [Bacillus cereus AH820]
11. gi 148270364	19818	63	metal dependent phosphohydrolase [Thermotoga petrophila RKU-1]

Anexo 3

Identificación de la proteína de la Muestra 4 (ver figura 2.7)
utilizando MASCOT como motor de búsqueda.
<http://www.matrixscience.com/>



Accession	Mass	Score	Description
1. gi 71661424	35009	99	activated protein kinase C receptor [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]
2. gi 1162454014	26728	65	hypothetical protein sca5718 [Sorangium cellulosum 150 ca 561]
3. gi 194385828	19952	63	unnamed protein product [Homo sapiens]
4. gi 157352040	27993	61	unnamed protein product [Vitis vinifera]
5. gi 168009864	39073	60	predicted protein [Physcomitrella patens subsp. patens]
6. gi 83657442	11281	60	Gp15/400 polyprotein [Wuchereria bancrofti]
7. gi 58803251	76704	59	fatty acyl-CoA synthetase 3 [Babesia bovis]
8. gi 194365605	42630	59	response regulator receiver modulated metal dependent phosphohydrolase
9. gi 225141673	42544	59	response regulator CheB [Stenotrophomonas sp. SKA14]
10. gi 15893590	23172	58	guanylate kinase [Clostridium acetobutylicum ATCC 824]
11. gi 145521178	14266	57	hypothetical protein [Paramecium tetraurelia strain d4-2]

Anexo 4

Análisis por LC-MS/MS del spot marcado como 3307 en el gel de electroforesis bidimensional correspondiente a los extractos proteicos del clon LQcl1 (ver figura 314) y búsqueda en bases de datos (UniProt-euglenozoa) utilizando el motor de búsqueda Sequest o (NCBI-nr/all taxa) utilizando el motor de búsqueda Phenyx (tabla de excel con los resultados obtenidos).

Phenyx: Main Page | 12571-Proteins Overview

Proteins Overview (Job 12571)

Parameters: Compounds Overview | Open (Refresh) Job in ProteinCenter

#	AC	ID	Score	#Peptides	% Cov	Description
1	gi 71665461	ref XP_019700.1	63.24	11/11	21	enolase [Trypanosoma cruzi str...
2	gi 1857239	gb AAB48403.1	45.9	10/10	25	29 kDa proteasome subunit TCPR...
3	gi 71399535	ref XP_002811.1	33.27	5/5	13	sterol 24-c-methyltransferase ...
4	gi 71401714	ref XP_003810.1	24.98	5/5	14	coatomer epsilon subunit [Tryp...
5	gi 71444731	val YD_014400.1	19.0	1/1	9	invariant mannose-binding lectin

ref|XP_019700.1 (gi|71665461) in NCBI nr, ProteinCenter (Protein Details)
 enolase [Trypanosoma cruzi strain CL Brener];gi|70895013|gb|EAM97849.1| enolase, putative [Trypanosoma cruzi]

Subset
 gi|5566209 in NCBI nr (Protein Details)
 gi|5566210 in NCBI nr (Protein Details)
 gi|7146974 in NCBI nr (Protein Details)
 gi|160877726 in NCBI nr (Protein Details)

Auto	User	Sequence	Search	z	m/z	δ m/z	z-Score	p-Value	Pos.	#MC	Modif.	Source	Compound
+	+	K/AQVGGDLTVTVNSR/I	blast	2	787.58	-0.167	13.12	1.293E-35	313-327	0	normal	081009_Roc...ge.txt.946	
+	+	K/INQIGTITEAEASK/F	blast	2	794.426	0.0070	13.04	3.799E-35	344-358	0	normal	081009_Roc...e.txt.1288	
+	+	K/AQVGGDLTVTVNSR/I	blast	2	787.674	-0.261	11.74	4.518E-28	313-327	0	normal	081009_Roc...ge.txt.950	
+	+	R/IEELGAAHAF	blast	2	549.029	-0.243	10.6	3.344E-24	413-422	0	normal	081009_Roc...ge.txt.673	
+	+	K/INQIGTITEAEASK/F	blast	2	794.638	-0.205	10.31	3.691E-21	344-358	0	normal	081009_Roc...e.txt.1280	
+	+	R/IEELGAAHAF	blast	2	549.102	-0.317	8.42	3.512E-15	413-422	0	normal	081009_Roc...ge.txt.681	
+	+	K/HAGNALPQEFMDAPV/A	blast	2	943.72	-0.235	7.88	2.964E-13	156-172	0	normal	081009_Roc...e.txt.1369	
+	+	R/LPVPKFNIVNGSK/H	blast	2	708.46	-0.581	7.12	1.026E-10	143-155	0	normal	081009_Roc...e.txt.1246	
+	+	K/AGSFNEALR/M	blast	2	483.096	-0.35	5.78	4.155E-5	173-181	0	normal	081009_Roc...ge.txt.836	
+	+	K/HAGNALPQEFMDAPV/A	blast	2	944.273	-0.788	5.72	9.153E-7	156-172	0	normal	081009_Roc...e.txt.1379	
+	+	R/NQAEVYHSLK/S	blast	2	575.824	-0.042	5.7	6.357E-5	182-191	0	normal	081009_Roc...ge.txt.738	

Anexo 5

Análisis por LC-MS/MS del spot marcado como 3612 en el gel de electroforesis bidimensional correspondiente a los extractos proteicos del clon LQc11 (ver figura 314) y búsqueda en bases de datos (UniProt-euglenozoa) utilizando el motor de búsqueda Sequest o (NCBI-nr/all taxa) utilizando el motor de búsqueda Phenyx (tabla de excel con los resultados obtenidos).

Phenyx Main Page | 12588-Proteins Overview

Proteins Overview (Job 12588)

Parameters | Compounds Overview | Open (Refresh) Job in ProteinCenter

#	AC	ID	Score	#Peptides	% Cov	Description
1	gi 71665068	ref XP_019508.1	312.14	61/64	67	chaperonin HSP60, mitochondria...
2	gi 205278870	gb AC102310.1	26.37	4/4	6	mitochondrial heat shock [Tryp...
3	gi 71396081	ref XP_002382.1	17.89	3/3	9	hypothetical protein [Trypanos...
4	gi 91981193	gb ABE68664.1	12.95	2/2	7	alpha tubulin [Parabodo caudat...
5	gi 71406674	ref XP_005895.1	10.15	1/4	7	chaperonin HSP60/CHP60 [Trypan...

Subset
 gi|2022479 in NCBItr (Protein Details)
 gi|395263 in NCBItr (Protein Details)
 gi|71665064 in NCBItr (Protein Details)
 gi|71659487 in NCBItr (Protein Details)
 gi|71665068 in NCBItr (Protein Details)

Auto	User	Sequence	Search	z	m/z	d m/z	z-Score	p-Value	Pos.	MHC	ModC	Source	Compound
+	+	K/TAMNQQSIASFAGAR/L	blast	2	764.586	-0.217	12.58	3.532E-24	293-306	0	Oxidation_MiOxidation_Mi	normal	081009_Roc...e.tst.972
+	+	K/AQKAELEAPLVSAK/K	blast	2	860.303	-0.333	12.41	2.686E-22	217-232	1		normal	081009_Roc...e.tst.1161
+	+	K/ALDELLGDSELTADQR/T	blast	2	831.564	-0.143	11.9	1.367E-20	435-450	0		normal	081009_Roc...e.tst.1017
+	+	R/ELATGTWPIQMK/R	blast	2	669.093	-0.277	11.79	6.374E-20	113-124	0	iCys_CAM Oxidation_Mi	normal	081009_Roc...e.tst.660
+	+	K/TAMNQQSIASFAGAR/L	blast	2	756.52	-0.149	11.75	7.556E-20	293-306	0	Oxidation_Mi	normal	081009_Roc...e.tst.1117
+	+	R/YVNMFEAGIIDPAR/V	blast	2	798.338	0.06	11.74	9.854E-20	499-512	0		normal	081009_Roc...e.tst.1214
+	+	R/LPANTLVNAGV/E	blast	2	617.618	-0.248	11.65	2.849E-20	462-473	0		normal	081009_Roc...e.tst.796
+	+	R/VNIIQYIGAPV/I	blast	2	660.046	-0.192	11.39	6.696E-20	44-95	0		normal	081009_Roc...e.tst.750
+	+	R/YVNMFEAGIIDPAR/V	blast	2	806.558	-0.162	11.19	5.671E-20	499-512	0	Oxidation_Mi	normal	081009_Roc...e.tst.1031
+	+	K/VGGSEVEVEK/K	blast	2	602.501	-0.205	11.16	1.708E-20	391-402	0		normal	081009_Roc...e.tst.542
+	+	R/AVGVLLQVAEQSR/K	blast	2	728.985	-0.075	11.14	9.416E-20	130-143	0		normal	081009_Roc...e.tst.1041
+	+	R/GVTSPIVYTDK/A	blast	2	680.814	0.029	11.06	2.148E-20	205-216	0		normal	081009_Roc...e.tst.1023
+	+	K/TAMNQQSIASFAGAR/L	blast	2	764.645	-0.276	10.78	6.582E-20	293-306	0	Oxidation_MiOxidation_Mi	normal	081009_Roc...e.tst.980
+	+	R/YVNMFEAGIIDPAR/V	blast	2	806.605	-0.209	10.62	2.962E-20	499-512	0	Oxidation_Mi	normal	081009_Roc...e.tst.1037
+	+	R/YVNMFEAGIIDPAR/V	blast	2	798.419	-0.021	10.52	8.501E-20	499-512	0		normal	081009_Roc...e.tst.1220
+	+	R/ELATGTWPIQMK/R	blast	2	747.148	-0.282	10.28	1.049E-20	113-125	1	iCys_CAM Oxidation_Mi	normal	081009_Roc...e.tst.654
+	+	K/AELEDAPLVSAK/K	blast	2	696.628	-0.253	10.08	9.235E-20	220-232	0		normal	081009_Roc...e.tst.1206
+	+	K/VKDGVTITQDQV/T	blast	2	659.463	-0.109	10.02	1.529E-20	176-188	1		normal	081009_Roc...e.tst.548
+	+	R/SARVDEADVRSQGLLR/A	blast	2	804.313	-0.745	9.95	2.833E-21	415-431	0		normal	081009_Roc...e.tst.1103

Terminado

Anexo 6

Análisis por LC-MS/MS del spot marcado como 5310 en el gel de electroforesis bidimensional correspondiente a los extractos proteicos del clon LQc11 (ver figura 314) y búsqueda en bases de datos (UniProt-euglenozoa) utilizando el motor de búsqueda Sequest o (NCBI-nr/all taxa) utilizando el motor de búsqueda Phenyx (tabla de excel con los resultados obtenidos)

The screenshot displays the Phenyx Proteins Overview interface for Job 12589. It features a 'Parameters' section, a 'Compounds Overview' table, and a detailed view of a protein entry.

Compounds Overview Table:

#	AC	ID	Score	#Peptides	% Cov	Description
1	gi 71661424	ref XP_017733.1	143.08	32/36	61	activated protein kinase C rec...
2	gi 71411717	ref XP_008096.1	64.57	9/10	35	proteasome alpha 3 subunit [Tr...
3	gi 71657431	ref XP_017231.1	39.22	8/8	20	hypothetical protein [Trypanos...
4	gi 71415980	ref XP_010037.1	37.49	4/4	16	hypothetical protein [Trypanos...
5	gi 3059572	gb AAC72049.1	36.22	10/11	17	activated protein kinase C rec...

Protein Details (ref|XP_017733.1 (gi|71661424) in NCBI nr, ProteinCenter (Protein Details)):

activated protein kinase C receptor [Trypanosoma cruzi strain CL Brenner]; gi|71661426|ref|XP_017734.1| activated protein kinase C receptor [Trypanosoma cruzi strain CL Brenner]; gi|70882943|gb|EAY95882.1| activated protein kinase C receptor, putative [Trypanosoma cruzi]; gi|70882944|gb|EAY95883.1| activated protein kinase C receptor, putative [Trypanosoma cruzi]

Subunit
gi|74025270 in NCBI nr (Protein Details)
gi|151347322 in NCBI nr (Protein Details)

Main Search Results Table:

Aut	User	Sequence	Search	z	m/z	d m/z	i-Score	p-Value	Pos.	*MC	Mod	Source	Compound
+	+	R/DNTLIAGSINMOR/N	blast	2	747.086	-0.24	13.35	6.951E-37	37-49	0		normal	001009_Roc...e.tst.1147
+	+	R/GAHTDWWSEVR/F	blast	2	644.56	-0.262	12.03	1.598E-29	149-159	0	Cys_CAM:	normal	001009_Roc...ge.tst.840
+	+	R/DNTLIAGSINMOR/N	blast	2	755.571	-0.720	11.49	7.659E-27	37-49	0	Oxidation_M:	normal	001009_Roc...e.tst.1011
+	+	R/VWVWKGEEHLGR/S	blast	2	835.15	-0.215	11.18	2.758E-25	135-148	1	Cys_CAM:	normal	001009_Roc...ge.tst.969
+	+	K/GHTYITTSVVSQDGLSEASSDQGVAR/L	blast	3	965.948	-0.49	10.93	3.619E-24	194-221	1	Cys_CAM:	normal	001009_Roc...ge.tst.942
+	+	R/YWMAATEV/G	blast	2	588.405	-0.159	10.93	5.238E-24	250-258	0	Oxidation_Mi:Cys_CAM:	normal	001009_Roc...ge.tst.694
+	+	R/VWVWKGEEHLGR/S	blast	2	835.658	-0.722	10.53	3.415E-22	135-148	1	Cys_CAM:	normal	001009_Roc...ge.tst.977
+	+	R/NSEEEYQFPER/R	blast	2	758.837	-0.033	10.48	5.428E-22	50-61	0	Cys_CAM:	normal	001009_Roc...ge.tst.826
+	+	R/GAHTDWWSEVR/F	blast	2	644.414	-0.115	10.27	5.20E-21	149-159	0	Cys_CAM:	normal	001009_Roc...ge.tst.850
+	+	K/TPENSIASWASDQNTLYSIVTDWVR/V	blast	2	1469.678	-0.523	10.27	1.414E-21	285-310	0	Cys_CAM:Oxidation_M:	normal	001009_Roc...e.tst.1193
+	+	K/DVDELAFEAQQV/S	blast	2	720.499	-0.108	9.81	5.314E-19	269-281	0		normal	001009_Roc...e.tst.1013
+	+	R/YWMAATEV/G	blast	2	580.353	-0.104	9.65	3.16E-18	250-258	0	Cys_CAM:	normal	001009_Roc...ge.tst.885
+	+	R/YWMAATEV/G	blast	2	588.335	-0.088	9.63	3.763E-18	250-258	0	Oxidation_Mi:Cys_CAM:	normal	001009_Roc...ge.tst.699
+	+	R/NSEEEYQFPER/R	blast	2	759.09	-0.286	9.59	5.186E-18	50-61	0	Cys_CAM:	normal	001009_Roc...ge.tst.818
+	+	R/DNTLIAGSINMOR/N	blast	2	755.175	-0.332	9.15	2.898E-16	37-49	0	Oxidation_M:	normal	001009_Roc...e.tst.1142
+	+	K/DVLSVTFSPDR/R/Q	blast	2	675.226	0.113	9.05	8.107E-16	111-122	0		normal	001009_Roc...e.tst.1048
+	+	K/SEELHLGR/S	blast	2	522.047	-0.288	8.25	1.154E-12	140-148	0	Cys_CAM:	normal	001009_Roc...ge.tst.677
+	+	R/GVPTALAEKQITTEYIV/A	blast	2	976.249	-0.245	8.23	9.137E-13	14-30	0	Cys_CAM:	normal	001009_Roc...e.tst.1354

Terminado

Anexo 7

Análisis por LC-MS/MS del spot marcado como 5712 en el gel de electroforesis bidimensional correspondiente a los extractos proteicos del clon LQc11 (ver figura 314) y búsqueda en bases de datos (UniProt-euglenozoa) utilizando el motor de búsqueda Sequest o (NCBI-nr/all taxa) utilizando el motor de búsqueda Phenyx (tabla de excel con los resultados obtenidos)

Phenyx: Main Page | 12593-Proteins Overview

Proteins Overview (Job 12593)

Parameters | Compounds Overview | Open (Refresh) Job in ProteinCenter

ID	Accession	Score	#Peptides	% Cys	Description
1	gi 205278870	67.84	10/10	15	mitochondrial heat shock [Tryp...
2	gi 162117	43.74	6/6	12	heat shock protein HSP70
3	gi 123603	20.95	3/3	5	HSP70_TRYCR RedName: Full+Heat...
4	gi 59824406	9.82	2/2	3	heat shock protein 70-B cytos...
5	gi 162179	8.04	1/1	3	major parafagellar rod prote...
6	gi 7141423	6.92	1/1	5	hypothetical protein [Trypanos...
7	gi 71424392	6.14	1/1	1	hypothetical protein [Trypanos...
8	gi 146103798	6.11	1/1	1	mitogen activated kinase-like ...
9	gi 157866096	6.02	1/1	2	hypothetical protein [Leishman...
10	gi 71656979	6.02	1/1	2	hypothetical protein [Trypanos...
11	gi 71661424	6.01	1/1	4	activated protein kinase C rec...

Subst: gi|205278870 in NCBI (Protein Details)
mitochondrial heat shock [Trypanosoma ouzi]

Auto	User	Sequence	Search	z	m/z	d m/z	z-Score	p-Value	Pos.	MC	ModE	Source	Compound
+	+	R/VVNEPTAALAYGLDV/T	blast	2	816.354	0.082	10.85	1.08E-23	193-208	0	normal	081009_Roc...ge.tst.817	
+	+	K/DAGTLAGLWVR/V	blast	2	600.365	-0.024	9.82	5.46E-19	181-192	0	normal	081009_Roc...ge.tst.783	
+	+	K/VLENTGFR/T	blast	2	533.042	-0.27	8.78	1.13E-14	51-99	0	normal	081009_Roc...ge.tst.541	
+	+	K/MKETAENLQR/K	blast	2	656.254	0.048	8.76	1.07E-14	148-158	1	Oxidation_M	081009_Roc...ge.tst.620	
+	+	R/VVNEPTAALAYGLDV/T	blast	2	816.731	-0.296	8.69	1.897E-14	193-208	0	normal	081009_Roc...ge.tst.811	
+	+	K/VVGAKEKWR/T	blast	2	655.577	-0.254	8.18	1.702E-12	575-585	1	normal	081009_Roc...ge.tst.380	
+	+	K/DAGTLAGLWVR/V	blast	2	600.52	-0.179	7.44	6.0E-10	181-192	0	normal	081009_Roc...ge.tst.779	
+	+	K/STGIDLSNR/M	blast	2	546.256	0.024	7.29	1.919E-9	267-276	0	normal	081009_Roc...ge.tst.510	
+	+	R/TTPSVAFKQGEV/L	blast	2	696.797	-0.417	7.13	5.453E-9	60-72	1	normal	081009_Roc...ge.tst.551	
+	+	K/SQTFSTADNQTVGK/V	blast	2	898.661	-0.216	7.04	9.005E-9	443-459	0	normal	081009_Roc...ge.tst.569	

Terminado

Anexo 8

Análisis por LC-MS/MS del spot marcado como 7509 en el gel de electroforesis bidimensional correspondiente a los extractos proteicos del clon LQc11 (ver figura 314) y búsqueda en bases de datos (UniProt-euglenozoa) utilizando el motor de búsqueda Sequest o (NCBI-nr/all taxa) utilizando el motor de búsqueda Phenyx (tabla de excel con los resultados obtenidos)

Phenyx Main Page | 12602-Proteins Overview

Proteins Overview (Job 12602)

Parameters | Compounds Overview | Open (Refresh) Job in ProteinCenter

#	AC	ID	Score	#Identifiers	% Cys	Description
1	gi 71668089	ref XP_020988.1	202.09	59/59	47	cystathionine beta-synthase [T...
2	gi 71409124	ref XP_006925.1	201.58	58/58	50	cystathionine beta-synthase [T...
3	gi 1168606	sp P33447.2	115.84	23/23	47	ATTY_TRYCR RedKame: Full=Tyros...
4	gi 71656085	ref XP_016595.1	48.57	8/8	19	isovaleryl-coa dehydrogenase [...]
5	gi 71663174	ref XP_018583.1	36.45	6/6	12	succinyl-CoA ligase [GDP-formi...
6	gi 9836735	gb AA000298.1	21.56	4/6	9	AF165323_1 tyrosine aminotrans...

Subset:
 gi|71649184 in NCBItr (Protein Details)
 gi|71404304 in NCBItr (Protein Details)
 gi|71409967 in NCBItr (Protein Details)
 gi|13241624 in NCBItr (Protein Details)
 gi|71404306 in NCBItr (Protein Details)
 gi|71411781 in NCBItr (Protein Details)
 nt|11475039 in NCBItr (Protein Details)

Auto	User	Sequence	Search	z	m/z	d m/z	z-Score	p-Value	Pos.	#MC	ModE	Source	Compound
+	+	KVDMAVFTTGTGGTMAGVAR/R	blast	2	929.456	-0.01	13.55	3.723E-38	209-227	0	Oxidation_M	normal	091009_Roc...e.tst.878
+	+	K/AMVESTAQEYDQGGQV/V	blast	2	964.186	-0.268	13.17	5.413E-38	192-208	0	Cys_CAM	normal	091009_Roc...e.tst.727
+	+	K/SADKESFALASEVHR/E	blast	2	824.124	-0.214	11.75	3.827E-30	285-299	1		normal	091009_Roc...e.tst.819
+	+	K/SADKESFALASEVHR/E	blast	2	824.138	-0.227	11.11	6.477E-27	285-299	1		normal	091009_Roc...e.tst.811
+	+	K/KYPMIITHPVK/R	blast	2	627.415	-0.08	11.09	6.629E-27	124-133	1	Oxidation_M Oxidation_M	normal	091009_Roc...e.tst.750
+	+	K/EEFNPGGSDV/D	blast	2	604.521	-0.229	10.8	2.157E-25	71-81	0	iCys_CAM	normal	091009_Roc...e.tst.817
+	+	K/EVTLQALGAEVPR/T	blast	2	699.952	-0.05	10.7	5.215E-25	140-152	0		normal	091009_Roc...e.tst.1222
+	+	KVDMAVFTTGTGGTMAGVAR/R	blast	2	929.544	-0.099	10.68	5.698E-23	209-227	0	Oxidation_M	normal	091009_Roc...e.tst.964
+	+	K/AMVESTAQEYDQGGQV/V	blast	2	964.037	-0.119	10.44	6.528E-24	192-208	0	Cys_CAM	normal	091009_Roc...e.tst.719
+	+	K/EEFNPGGSDV/D	blast	2	740.171	-0.315	10.24	6.288E-23	71-83	1	iCys_CAM	normal	091009_Roc...e.tst.776
+	+	KVDMAVFTTGTGGTMAGVAR/R	blast	2	921.527	-0.079	10.17	1.191E-20	209-227	0		normal	091009_Roc...e.tst.1072
+	+	K/GVLLDQVIRNPNV/A	blast	2	882.74	-0.283	10.09	2.704E-22	177-191	1		normal	091009_Roc...e.tst.933
+	+	K/EEFNPGGSDV/D	blast	2	739.884	-0.027	9.85	2.714E-21	71-83	1	iCys_CAM	normal	091009_Roc...e.tst.785
+	+	KVDMAVFTTGTGGTMAGVAR/R	blast	2	929.554	-0.109	9.83	3.825E-19	209-227	0	Oxidation_M	normal	091009_Roc...e.tst.972
+	+	K/GVLLDQVIRN	blast	2	563.725	0.073	9.74	1.343E-20	177-185	0		normal	091009_Roc...e.tst.989
+	+	K/EVTLQALGAEVPR/T	blast	2	700.103	-0.201	9.67	2.497E-20	140-152	0		normal	091009_Roc...e.tst.1215
+	+	K/KYPMIITHPVK/R	blast	2	619.633	-0.295	9.35	5.319E-19	124-133	1	Oxidation_M	normal	091009_Roc...e.tst.857

Terminado

Anexo 9

Análisis por LC-MS/MS del spot marcado como 8410 en el gel de electroforesis bidimensional correspondiente a los extractos proteicos del clon LQcl1 (ver figura 314) y búsqueda en bases de datos (UniProt-euglenozoa) utilizando el motor de búsqueda Sequest o (NCBI-nr/all taxa) utilizando el motor de búsqueda Phenyx (tabla de excel con los resultados obtenidos)

Phenyx Main Page | 12618-Proteins Overview

Proteins Overview (Job 12618)

Parameters | Compounds Overview | Open (Refresh) Job in ProteinCenter

#	AC	ID	Score	#Peptides	% Cys	Description
1	gi 71668089	ref XP_020988.1	207.29	64/65	48	cystathionine beta-synthase [T...
2	gi 71409124	ref XP_006925.1	205.61	63/64	50	cystathionine beta-synthase [T...
3	gi 71663174	ref XP_018583.1	77.06	11/14	25	succinyl-Coa ligase [GDP-formi...
4	gi 71390764	ref XP_002641.1	69.91	11/12	29	succinyl-Coa ligase [GDP-formi...
5	gi 15783527	pdb 2J1Q	22.7	4/5	9	A Chain A: Crystal Structure O...
6	gi 71419829	ref XP_011288.1	16.72	2/3	9	hypothetical protein [Trypanos...

Subset
 ref|XP_020988.1 (gi|71668089) in NCBI nr, ProteinCenter (Protein Details)
 cystathionine beta-synthase [Trypanosoma cruzi strain CL Brener];gi|70886353|gb|EA899137.1| cystathionine beta-synthase [Trypanosoma cruzi]

Auto	User	Sequence	Search	z	m/z	d m/z	z-Score	p-Value	Pos.	#MC	ModE	Source	Compound
+	+	K/AHYEGTAQEIVDQGGV	blast	2	964.235	-0.317	13.54	2.201E-39	192-208	0	Cys_CAM	normal	091009_Roc...pe.tst.749
+	+	K/VDMAVFTTGTGGTMAGV/R	blast	2	921.653	-0.205	13.19	4.58E-36	209-227	0		normal	091009_Roc...e.tst.1081
+	+	K/SADKESFALAEVHR/E	blast	2	823.949	-0.038	13.14	5.013E-37	285-299	1		normal	091009_Roc...pe.tst.846
+	+	K/AHYEGTAQEIVDQGGV	blast	2	964.206	-0.288	12.5	1.793E-33	192-208	0	Cys_CAM	normal	091009_Roc...pe.tst.741
+	+	K/VDMAVFTTGTGGTMAGV/R	blast	2	937.634	-0.191	11.96	2.614E-29	209-227	0	Oxidation_M	normal	091009_Roc...pe.tst.786
+	+	K/SADKESFALAEVHR/E	blast	2	824.181	-0.27	11.65	6.549E-29	285-299	1		normal	091009_Roc...pe.tst.834
+	+	K/VDMAVFTTGTGGTMAGV/R	blast	2	929.609	-0.163	11.38	2.184E-26	209-227	0	Oxidation_M	normal	091009_Roc...pe.tst.906
+	+	K/VDMAVFTTGTGGTMAGV/R	blast	2	921.429	0.019	11.25	1.058E-25	209-227	0		normal	091009_Roc...e.tst.1090
+	+	K/VDMAVFTTGTGGTMAGV/R	blast	2	929.583	-0.138	11.06	8.766E-25	209-227	0	Oxidation_M	normal	091009_Roc...pe.tst.913
+	+	K/EVTLQALGAEV/R/T	blast	2	700.098	-0.197	11.05	6.306E-26	140-152	0		normal	091009_Roc...e.tst.1235
+	+	K/KMSHEVTLQALGAEV/R/T	blast	2	1078.438	-0.357	10.52	1.363E-23	134-152	2	Oxidation_M	normal	091009_Roc...e.tst.1151
+	+	K/KVSMITMVR/K	blast	2	619.332	0.060	10.29	2.208E-22	124-133	1	Oxidation_M	normal	091009_Roc...pe.tst.870
+	+	K/EELRPPGGVDR/I	blast	2	740.046	-0.189	10.13	3.053E-21	71-83	1	Cys_CAM	normal	091009_Roc...pe.tst.793
+	+	K/EVTLQALGAEV/R/T	blast	2	700.178	-0.276	10.1	1.412E-21	140-152	0		normal	091009_Roc...e.tst.1243
+	+	K/SADKESFALAEVHR/E	blast	3	549.897	-0.288	9.7	8.933E-20	285-299	1		normal	091009_Roc...pe.tst.844
+	+	K/EKGVVLLDQYR/N	blast	2	692.665	-0.298	9.46	8.437E-19	175-185	1		normal	091009_Roc...pe.tst.979
+	+	K/KMSHEVTLQALGAEV/R/T	blast	2	1078.417	-0.337	9.26	3.958E-18	134-152	2	Oxidation_M	normal	091009_Roc...e.tst.1143

Terminado

Anexo 10

Análisis por LC-MS/MS del spot marcado como 6614 en el gel de electroforesis bidimensional correspondiente a los extractos proteicos del clon LQc11 (ver figura 314) y búsqueda en bases de datos (UniProt-euglenozoa) utilizando el motor de búsqueda Sequest o (NCBI-nr/all taxa) utilizando el motor de búsqueda Phenyx (tabla de excel con los resultados obtenidos)

Phenyx Main Page | 12600-Proteins Overview

Proteins Overview (Job 12600)

Parameters | Compounds Overview | Open (Refresh) Job in ProteinCenter

#	AC	ID	Score	#Peptides	% Cov	Description
1	gi 71661816	ref XP_017923.1	154.72	28/31	34	hypothetical protein [Trypanos...
2	gi 47076074	emb CA628317.1	122.5	23/26	32	metallocarboxypeptidase [Trypa...
3	gi 71412653	ref XP_808555.1	42.68	5/6	11	UTP-glucose-1-phosphate undyl...
4	gi 71408922	ref XP_808825.1	28.93	4/4	19	elongation factor 1-alpha (EF...
5	gi 71413508	ref XP_808890.1	14.78	2/2	7	hypothetical protein [Trypanos...

emb|CA628317.1 (gi|47076074) in NCBI nr , ProteinCenter (Protein Details)
metallocarboxypeptidase [Trypanosoma out]

Substrat
gi|159443325 in NCBI nr (Protein Details)
gi|159443336 in NCBI nr (Protein Details)
gi|71667929 in NCBI nr (Protein Details)

Auto	User	Sequence	Search	z	m/z	d m/z	r-Score	p-Value	Pos.	#MC	Modif.	Source	Compound
+	+	R/SQAFMEFLAPR/L	blast	2	621.534	-0.231	13.16	4.048E-36	309-319	0	Oxidation_Mi	normal	091009_Roc...e.txt.1122
+	+	K/IWQHSSLLTDLLR/Q	blast	2	878.66	-0.205	11.15	1.63E-25	464-478	0		normal	091009_Roc...e.txt.1084
+	+	K/IWQHSSLLTDLLR/Q	blast	2	878.731	-0.276	11.13	2.413E-25	464-478	0		normal	091009_Roc...e.txt.1078
+	+	R/SQAFMEFLAPR/L	blast	2	621.365	-0.062	10.44	4.748E-22	309-319	0	Oxidation_Mi	normal	091009_Roc...e.txt.1114
+	+	K/SYLGLETLSNDK/E	blast	2	655.598	-0.262	10.23	4.214E-21	390-401	0		normal	091009_Roc...e.txt.1031
+	+	R/ELGEEVDDCIR/K	blast	2	795.414	-0.031	10.19	5.482E-21	437-449	1	Cys_CAM	normal	091009_Roc...e.txt.895
+	+	R/ELGEEVDDCIR/K	blast	2	717.358	-0.026	9.88	1.382E-19	438-449	0	Cys_CAM	normal	091009_Roc...e.txt.899
+	+	R/ELGEEVDDCIR/K	blast	2	717.646	-0.314	9.85	2.043E-19	438-449	0	Cys_CAM	normal	091009_Roc...e.txt.905
+	+	R/IDADELLEPLHVMLR/Y	blast	2	922.706	0.25	9.83	2.053E-19	349-363	0	Cys_CAM	normal	091009_Roc...e.txt.1311
+	+	R/DLMDGRIAEIVPR/V	blast	2	802.988	-0.621	9.42	1.088E-17	369-382	0	Oxidation_Mi	normal	091009_Roc...e.txt.814
+	+	R/IDADELLEPLHVMLR/Y	blast	2	931.053	-0.1	8.39	1.081E-13	349-363	0	Cys_CAM Oxidation_Mi	normal	091009_Roc...e.txt.1167
+	+	K/GFETQVEMAR/S	blast	2	648.354	-0.057	8.2	6.046E-13	280-290	0	Cys_CAM	normal	091009_Roc...e.txt.798
+	+	R/DEIFGNR/S	blast	2	531.816	-0.033	7.76	2.381E-11	169-177	0		normal	091009_Roc...e.txt.1013
+	+	K/IWQHSSLLTDLLR/Q	blast	3	586.198	-0.226	7.3	8.273E-10	464-478	0		normal	091009_Roc...e.txt.1076
+	+	R/IDADELLEPLHVMLR/Y	blast	2	930.595	0.358	7.08	3.161E-9	349-363	0	Cys_CAM Oxidation_Mi	normal	091009_Roc...e.txt.1173
+	+	R/YEIRDLMGRIAEIVPR/V	blast	3	766.115	-0.757	6.95	1.006E-8	364-382	1	Oxidation_Mi	normal	091009_Roc...e.txt.975
+	+	R/GAMAEQLQNHMDITAPK/I	blast	3	689.739	-0.068	6.78	3.171E-8	41-59	0	Oxidation_Mi Oxidation_Mi	normal	091009_Roc...e.txt.832
+	+	R/QATGETLNDEHPR/R	blast	2	758.755	-0.392	6.71	4.951E-8	479-491	0		normal	091009_Roc...e.txt.726

Terminado

Anexo 11

Análisis por LC-MS/MS del spot marcado como 6613 en el gel de electroforesis bidimensional correspondiente a los extractos proteicos del clon LQc11 (ver figura 314) y búsqueda en bases de datos (UniProt-euglenozoa) utilizando el motor de búsqueda Sequest o (NCBI-nr/all taxa) utilizando el motor de búsqueda Phenyx (tabla de excel con los resultados obtenidos)

Phenyx Main Page | 12594-Proteins Overview

Proteins Overview (Job 12594)

Parameters | Compounds Overview | Open (Refresh) Job in ProteinCenter

#	AC	ID	Score	#Peptides	% Cov	Description
1	gi 71661816	ref XP_017923.1	149.29	32/33	30	hypothetical protein [Trypanos...
2	gi 47076074	emb CA020317.1	36.15	4/4	9	metallocarboxypeptidase [Trypa...
3	gi 32295728	gb AA043150.1	14.63	2/2	8	thiol transferase TCS2 [Trypan...
4	gi 157070504	ref XP_001680842.1	7.61	1/2	1	hypothetical protein [Leishman...
5	gi 71413508	ref XP_008890.1	6.82	1/1	3	hypothetical protein [Trypanos...

emb|CA020317.1 (gi|47076074) in NCBI nr, ProteinCenter (Protein Details)
metallocarboxypeptidase [Trypanosoma out]

Subset
gi|198443305 in NCBI nr (Protein Details)
gi|198443306 in NCBI nr (Protein Details)
gi|71661816 in NCBI nr (Protein Details)

Acta	User	Sequence	Search	z	m/z	δ m/z	z-Score	p-Value	Pos.	#MC	Modif.	Source	Compound
+	+	R/SQAFMEFLAPR/L	Alut	2	621.448	-0.145	11.49	9.269E-29	209-319	0Oxidation_M1.....	normal	091009_Roc...e.tst.1164
+	+	R/LLEGVVGGCEPR/K	Alut	2	717.274	0.059	11.21	2.09E-27	438-449	0Cys_CAM.....	normal	091009_Roc...ge.tst.979
+	+	R/LDEIFDNR/S	Alut	2	531.92	-0.137	6.76	9.437E-10	169-177	0	normal	091009_Roc...e.tst.1078
+	+	K/SFETQVEMAR/S	Alut	2	656.317	-0.022	6.69	1.361E-9	280-290	0Cys_CAM.Oxidation_M1.....	normal	091009_Roc...ge.tst.706

Terminado

Anexo 12

Memorias del trabajo presentado en el congreso de proteómica 2009 "Joint Congress SEProt-LAHUPO. Proteomics and Human Proteome-from bench to bedside". Pamplona (España), 2009.



<http://www.cbm.uam.es/seprot>

Sede social:

Instituto de Biomedicina de Valencia, C.S.I.C.
c/Jaime Roig 11, 46010 Valencia.
Tel.: 96 339 1778. Fax: 96 369 0800
C.I.F. G97465629
Nº Registro Nacional de Asociaciones: 584.180

Junta Directiva

Juan José Calvete
Presidente
Instituto de Biomedicina de Valencia
CSIC
jcalvete@ibv.csic.es

Concha Gil
Vicepresidenta
Departamento de Microbiología II
Universidad Autónoma de Madrid
conchagil@farm.ucm.es

Jesús V. Jorrín
Secretario
Universidad de Córdoba
bfljonoj@uco.es

David Andreu
Tesorero
Universidad Pompeu Fabra
Barcelona
david.andreu@upf.edu

Juan Pablo Albar
Vocal
Centro Nacional de Biotecnología
UAM-CSIC, Madrid
jpalbar@cnb.uam.es

Fernando J. Corrales
Vocal
Universidad de Navarra
fjcorrales@unav.es

Ángela Moreno
Vocal
Universidad de Córdoba
gelmoloa@uco.es

Jesús M. Vázquez
Vocal
Centro de Biología Molecular
"Severo Ochoa", UAM-CSIC, Madrid
jvazquez@cbm.uam.es

PROTEÓMICA

*Revista de la Sociedad Española
de Proteómica*

Número 3, febrero 2009

Comité Editorial

Jesús V. Jorrín (Universidad de Córdoba)

Jesús Vázquez (CBMSO, Madrid)

Fernando Corrales (CIMA-Universidad de Navarra)

Ángela Moreno (CSIC-Universidad de Córdoba)

Juan J. Calvete (IBV-CSIC, Valencia)

Ángel García (Universidad Santiago Compostela)

Antonio Martínez Ruiz (Hospital de la Princesa, Madrid)

Correspondencia Editorial

Jesús V. Jorrín Novo
(Dpto de Bioquímica y Biología Molecular,
Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales,
Ed. Severo Ochoa [C6], 14071 Córdoba.
E-mail: bfljonoj@uco.es)

Abstract Book

of the

*Joint Congress of the Spanish Society
and the Latin American Human
Proteome Organization*

**DIFFERENTIALD PROTEIN PROFILES OF *TRYPANOSOMA CRUZI*
STRAINS ISOLATED FROM ASYMPTOMATIC AND SYMPTOMATIC
PATIENTS WITH CHAGAS DISEASE**

**Rocio del Pilar Niño Moyano¹, Clara Isabel González Rugeles²,
Rodrigo Gonzalo Torres Sáeza**

Grupo de Bioquímica e Ingeniería de Proteínas¹, Grupo de Inmunología y Epidemiología² Molecular,
Universidad Industrial de Santander

Trypanosoma cruzi is a protozoan kinetoplastid parasite responsible for Chagas disease. This important disease affects 18 million people in Latin America. Currently, a few hundred thousand of seropositive individuals are estimated to live in the USA, Europe and Asia. Moreover, Chagas disease is characterized by an acute phase followed by a long chronic phase. During this disease, 70% of *T. cruzi*-infected individuals remain asymptomatic, whereas the remaining 30% suffers Chagas cardiomyopathy. Drugs for the treatment of *T. cruzi* infection are inadequate, and vaccines are lacking. On the other hand, prognostic values of these alterations in the variability of symptoms, and geographical differences in the distribution of the chronic forms of Chagas disease, have been attributed to diversity of *T. cruzi* strains. Many investigations have determined that gene expression in *T. cruzi* is mainly regulated at post-transcriptional level. Alternatively, proteome analyses have been used for the generation of protein maps from different parasite forms. One explanation for different phenotypes and pathogenesis induced by *T. cruzi* strains may be attributed to differential expression of some particular proteins. In this work, we have investigated this hypothesis, analyzing proteome profiles of two strains of *T. cruzi*. For this aim, we used 2D-gel electrophoresis, determining protein expression profiles of two *T. cruzi* strains isolated from asymptomatic (strain MF) and symptomatic patients (with cardiac form of Chagas disease (strain LQ)). For protein identifying of differentially expressed proteins between these two strains, we carried out image analysis, using PD-Quest Image Software analysis (Biorad). 273 and 305 spots were displayed respectively in the strains LQ and MF gels. The two strains share the presence of 242 spots; determining differences in protein expression and spot intensity of proteome images.

Anexo 13

Memorias del trabajo presentado en el XIV Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical y X Simposio PECET. Medellín, 2009.

Trabajos libres

Biotecnología 2009;28(Supl.):162-96

TCII mostraron que 6/9 aislamientos pertenecían a cepas del grupo *T. oruzi* I, observándose la banda de amplificación específica de 350 pb, 2/9 al grupo *T. oruzi* II con la amplificación de la banda esperada de 300 pb y 1/9 presentó una mezcla con ambos grupos del parásito. Posteriormente, se analizó el subgrupo al que pertenecían las cepas aisladas del grupo *T. oruzi* II, con las pruebas de PCR que utilizan los iniciadores V1-V2 y D71-D72, con las cuales 2 cepas mostraron ser *T. oruzi* IIIb, con los productos de amplificación específicos de 125 y 165 pb, respectivamente. En el caso de la infección mixta, el subgrupo de la cepa *T. oruzi* II mostró ser IIc/d, ya que se amplificaron los fragmentos de 110 y 165 pb.

Conclusiones. La transmisión transplacentaria de *T. oruzi* en Colombia se presenta por cepas de ambos grupos del parásito, y existe, además, la presencia de infecciones mixtas.

Expresión diferencial de proteínas de *Trypanosoma cruzi* obtenido de paciente con cardiomiopatía chagásica e individuo asintomático: una aproximación desde la proteómica

Rocío Niño¹, Martha Lucía Díaz², Marina Ramírez³, Aldo Solari⁴, Rodrigo Torres¹, Clara Isabel González²

¹ Grupo de Bioquímica e Ingeniería de Proteínas, GRIP, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

² Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular, GIEM, Facultad de Salud, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

³ Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago de Chile, Chile

⁴ Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España

Introducción. La enfermedad de Chagas 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 10% a 30% de los individuos, a la fase crónica con síntomas característicos como cardiomiopatía o megasíndromes digestivos.

Se han reportado variaciones geográficas en la forma de presentación clínica de la enfermedad de Chagas y en la distribución de los linajes de *T. oruzi*. Es así como el linaje *T. oruzi* II se asocia con la enfermedad y la existencia de formas digestivas en países del Cono Sur, mientras que en países como Colombia,

Venezuela y los de Centroamérica, lo es *T. oruzi* I y no se reportan casos de compromiso digestivo. La razón de esta variabilidad geográfica y el por qué diferentes pacientes desarrollan diferentes formas clínicas, aún no se ha explicado.

La respuesta podría estar en la interacción entre el genoma del huésped y el genoma del parásito, dando como resultado una modulación en la expresión génica del mismo. En *T. oruzi* la expresión génica es regulada principalmente a nivel postranscripción; por ello, la proteómica representa una metodología valiosa para detectar diferencias de expresión del parásito en respuesta a diferentes estímulos que podrían estar determinando el curso clínico de la enfermedad. De acuerdo con lo anterior, se propuso determinar la expresión diferencial de proteínas entre parásitos aislados de individuos en la fase asintomática y crónica con cardiomiopatía chagásica.

Materiales y métodos. Parásitos aislados de *T. oruzi* I obtenidos de paciente con cardiomiopatía chagásica y de paciente asintomático. Los parásitos fueron cultivados en medio LIT y clonados en placas de cultivo, para asegurar la homogeneidad de la población. Se confirmó la clasificación del clon utilizado. Los extractos de las proteínas totales se obtuvieron por lisis de los parásitos y se sometieron a electroforesis bidimensional (triplicado). Las imágenes adquiridas con densitómetro se analizaron utilizando el software PDQUEST 2D para establecer la expresión diferencial. Los *spots* de interés fueron procesados y sometidos a espectrometría de masas MALDI-TOF para la identificación de las proteínas.

Resultados. Los *spots* identificados inequívocamente fueron un receptor de la proteína cinasa C y tres isoformas de la proteína HSP60, expresadas en mayor medida en el aislamiento de paciente con cardiomiopatía chagásica. Las proteínas de choque térmico fueron inicialmente identificadas como proteínas inducidas por estrés y caracterizadas por su papel como chaperonas. Sin embargo, también son importantes en el control de la respuesta inmune. Las HSP influyen en la actividad de algunas de las células del sistema inmune por su interacción con receptores de la inmunidad innata y sus vías de señalización, modulando la expresión de estas células. La HSP 60 exhibe propiedades inmunorreguladoras, especialmente por inducir una respuesta proinflamatoria, la cual está relacionada en la cardiomiopatía chagásica con el daño tisular.

Los resultados obtenidos en este estudio estarían confirmando el papel de estas proteínas en el desarrollo de la cardiomiopatía chagásica al encontrarse aumentada

su expresión en el paciente con cardiopatía chagásica en comparación con el individuo asintomático.

Financiado por: Colciencias, proyecto 1102- 343-19320 y Universidad Industrial de Santander.

Mapeo de proteínas asociadas con resistencia a antimonio pentavalente mediante análisis comparativo del proteoma de *Leishmania panamensis*

Ronald G. Peláez, Carlos E. Muskus, Iván Darío Vélez, Marcel Marín

Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, PECET, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Introducción. La leishmaniasis sigue siendo uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial, a pesar de las estrategias de control dirigidas contra el parásito y contra el vector.

No obstante su toxicidad, alto costo, duración y administración parenteral, el tratamiento de la leishmaniasis en cualquiera de sus diferentes formas clínicas se realiza con antimonio pentavalente (SbV), como el antimonio de N-retilglucarsina (Glucantime®) o estibogluconato de sodio (Pentostam®), a las dosis indicadas para cada caso.

Los antimonios pentavalentes han sido la terapia de elección por más de 50 años, aunque desde 1980 se han reportado fallas del tratamiento y cada vez son más los reportes que la mencionan. Existen reportes de falla hasta de 65%, como ocurre en el distrito norte de Bihar en la India. Oliveira Neto *et al.* evidenciaron en 1999 fallas del tratamiento en Brasil con antimonios pentavalentes en pacientes con lesiones recidivantes y diseminación a otras partes del cuerpo, principalmente mucosa nasal, después de un tratamiento completo, lo que sugiere resistencia del parásito al medicamento.

Afortunadamente, el surgimiento de la resistencia a los antimonios ha sido un proceso lento, lo que está de acuerdo con la hipótesis de que algunas cepas pueden adquirir resistencia a los antimonios pentavalentes por medio de varias mutaciones o varios cambios bioquímicos perpetuados durante un largo periodo.

Materiales y métodos. Cultivo de parásitos, inducción de resistencia *in vitro* a Glucantime® (37 mg/ml), evaluación de la resistencia *in vivo* a antimonios pentavalentes de *Leishmania panamensis*

en el modelo hámster, preparaciones solubles y determinación de la concentración de proteínas de *L. panamensis* susceptibles y resistentes a los medicamentos bajo estudio, separación de las proteínas por electroforesis en gel de dos dimensiones, visualización de proteínas y análisis de imágenes, extracción de péptidos y análisis de espectrometría de masas, y PCR en tiempo real (PCR-RT). **Resultados.** Hasta el momento, en la realización del trabajo se ha logrado inducir la resistencia de promastigotes de *Leishmania* a 37 mg/ml de Glucantime®, realizar un mapeo de las proteínas de los parásitos WT y resistentes al medicamento mediante análisis de electroforesis en dos dimensiones. El posterior análisis de los geles bidimensionales se realizó con el *software ImageMaster*, y se encontraron diferencias en la expresión, tanto en las cepas WT como en las cepas resistentes a Glucantime®. Se espera prontamente realizar la secuenciación de dichas proteínas, un análisis de correlación de expresión mediante PCR en tiempo real y un análisis de resistencia *in vivo* en un modelo hámster.

Evidencia de diversidad genética en pacientes palúdicos asintomáticos de los municipios endémicos de Tierralta, Córdoba, y Tumaco, Nariño

Sandra Milena Barrera, Fabio Aníbal Cristiano, Rubén Santiago Nicholls, Ángela Patricia Guerra

Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. En la actualidad, la malaria asintomática se considera habitual en regiones de alta transmisión, como África, y se ha encontrado común en algunas zonas de moderada y alta transmisión en Latinoamérica. La malaria asintomática está asociada con la resistencia a los medicamentos antipalúdicos, la administración discontinua de niveles subterapéuticos de antipalúdicos, la inmunidad adquirida por el huésped después de múltiples exposiciones al parásito y la intensidad de la transmisión existente en un área determinada.

La diversidad genética en *Plasmodium falciparum* se ha estudiado frecuentemente, ya que tiene gran importancia, pues es la que le confiere al parásito la capacidad de evadir la respuesta inmune del huésped y producir variantes resistentes, tanto a medicamentos como a vacunas; se ha estudiado en pacientes sintomáticos y, por lo general, enmarcada en estudios de eficacia a medicamentos antipalúdicos.