



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS

ESCUELA DE BIOANÁLISIS



**EVALUACION DE LA INMUNOGENICIDAD DE PROTEINAS ANCLADAS  
MEDIANTE GLICOSIL-FOSFATIDIL-INOSITOL (GPI) A LA MEMBRANA DE  
*Trypanosoma cruzi* EN UN MODELO EXPERIMENTAL**

Trabajo especial de grado presentado para optar al título de Licenciado en Bioanálisis de  
la Universidad de Los Andes

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

**AUTOR**

Wilmer G. Peña P.

**TUTOR**

Gladys E. Crisante R.

Mérida, noviembre 2019

## DEDICATORIA

Todo el esfuerzo y resultado final de este trabajo va dedicado a mi madre **Vilmar del Carmen Peña Peña**, la mujer más importante de mi vida, que ha sido Padre y Madre desde el primer momento en que nací, quien ha luchado sin descanso cada día de esta vida para educarme y fórmame como una persona de bien y a quien le debo todo lo que soy y he alcanzado hasta este momento. Espero que la vida me alcance para poder devolverte todos los sacrificios que has hecho por mí. Te amo Mamá.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## AGRADECIMIENTOS

**A Dios todo poderoso**, quien me ha dado la fuerza y la voluntad para alcanzar cada logro de mi vida.

**A mi mamá, mi abuela y mi tía**, grandes mujeres que siempre han estado apoyándome sin importar las circunstancias.

**A la ilustre Universidad de los Andes**, por ser ese templo de conocimiento y hacer posible mi formación académica.

**A la Facultad de Farmacia y Bioanálisis y sus profesores**, por todo el conocimiento impartido en sus salones de clase, de los cuales he logrado formarme como profesional y un adulto de bien.

**Al Profesor Néstor Añez**, por recibirme en su laboratorio y darme la oportunidad de alcanzar este logro, por sus consejos, enseñanzas y más que todo por su paciencia durante la realización de este trabajo.

**A la Dra. Gladys Crisante y la Dra. Agustina Rojas**, por todo el apoyo brindado todo este tiempo, por los conocimientos brindados, por las lecciones profesionales y de vida brindadas, sin su ayuda y dedicación nada de esto hubiera sido posible.

## INDICE GENERAL

<b>INTRODUCCION</b>	1
<b>CAPITULO I EL PROBLEMA</b>	4
Planteamiento del problema	4
Formulación del problema de investigación	5
Justificación de la investigación	5
Objetivos de la investigación	5
Objetivo general	5
Objetivos específicos	5
Alcances y limitaciones	6
Hipótesis	7
<b>CAPITULO II MARCO TEORICO</b>	8
Trabajos previos	8
Antecedentes históricos	10
Antecedentes teóricos	12
Enfermedad de Chagas	12
Fases de la enfermedad	12
<i>Trypanosoma cruzi</i>	14
Formas evolutivas	14
Epimastigote	14
Amastigote	15
Tripomastigote	15
Ciclo de vida	15

Mecanismo de transmisión	16
<i>Trypanosoma cruzi</i> y la respuesta inmune	17
Moléculas de superficie involucradas en la interacción <i>T. cruzi</i> - célula hospedadora.	19
<b>CAPITULO III MARCO METODOLOGICO</b>	23
Tipo de investigación	23
Diseño de investigación	23
Población y muestra	23
Sistema de variables	23
Instrumento de recolección de datos	24
Procedimientos o metodología de la investigación	25
<b>CAPITULO IV RESULTADOS</b>	29
Separación electroforética SDS-PAGE	29
Cuantificación por método de espectrofotometría	30
Inmunización del modelo experimental	32
Determinación de la Inmunogenicidad aplicando TAD	32
<b>CAPITULO V DISCUSION</b>	35
<b>CONCLUSION</b>	36
<b>RECOMENDACIONES</b>	36
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	37

## INDICE DE TABLAS

1. Esquema de trabajo método de Lowry, utilizando diferentes concentraciones de albumina para la realización de la curva patrón	30
2. Absorbancias obtenidas por espectrofotometría del estándar de albumina	31
3. Resultados obtenidos de TAD de la placa sin $\beta$ -mercaptoetanol	32
4. Resultados obtenidos de TAD de la placa con $\beta$ -mercaptoetanol	33

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## INDICE DE FIGURAS Y GRAFICOS

- Fig. 1.** Electroforesis en gel SDS-PAGE del fraccionamiento de proteínas ancladas mediante GPI a la membrana de *Trypanosoma cruzi*, Columna 1 muestra de proteínas sin DTT. Columna 2 muestra trata con DTT 30
- Fig. 2.** Western blot de las proteínas ancladas mediante GPI de *Trypanosoma cruzi* utilizando los anticuerpos obtenidos del suero del modelo vertebrado, demostrando la positividad de la prueba 34
- Grafico 1.** Curva patrón de albumina utilizado para obtener la concentración desconocida de las proteínas ancladas por GPI de *T. cruzi* 31
- Grafico 2.** Representación gráfica de los resultados obtenidos de TAD de la muestra sin  $\beta$ -mercaptoetanol 33
- Grafico 3.** Representación gráfica de los resultados obtenidos de TAD de la muestra con  $\beta$ -mercaptoetanol 34



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS



**EVALUACION DE LA INMUNOGENICIDAD DE PROTEINAS ANCLADAS  
MEDIANTE GLICOSIL-FOSFATIDIL-INOSITOL (GPI) A LA MEMBRANA DE**

***Trypanosoma cruzi* EN UN MODELO EXPERIMENTAL**

Trabajo de grado

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

**Autor**

Wilmer G. Peña P.

**Tutor**

Dra. Gladys E. Crisante R.

**Resumen**

El empleo de ensayos inmunológicos en modelos vertebrados es realizado con el fin de constatar el desarrollo de la respuesta inmune contra el inmunígeno utilizado y la consecuente producción de anticuerpos específicos, de tal modo que el objetivo de esta investigación consistió en evaluar las propiedades inmunológicas de las proteínas ancladas mediante GPI a la membrana de *Trypanosoma cruzi* en un modelo experimental vertebrado. El tipo de investigación fue un estudio explicativo de diseño experimental. Metodológicamente, se realizó la técnica de fraccionamiento

y purificación utilizando el detergente no iónico Tritón X-114, arrojando un rendimiento de alrededor del 7% a partir de proteínas totales del parásito, posteriormente se procedió a la realización de una separación electroforética SDS-PAGE para constatar el estado de viabilidad de las proteínas, continuamente se procedió a la determinación de la concentración de las proteínas ancladas mediante GPI aplicando el método de Lowry obteniendo una concentración de 1,77 $\mu$ g/ $\mu$ l, posteriormente se aplicó el esquema de inmunización planteado que consistió en 3 dosis de las proteínas purificadas en combinación con el adyuvante incompleto de Freund y la recolección de un total de 5 muestras de suero sanguíneo representativas de cada etapa de inmunización. Los sueros resultantes se les aplicó las técnicas inmunológicas de TAD y Western blot, demostrando así la positividad del ensayo, llegando a la conclusión que las proteínas ancladas mediante GPI de la membrana de *Trypanosoma cruzi* son inmunogénicas, capaces de activar el sistema inmune humoral generando así la producción de anticuerpos que fueron detectados desde la primera semana de inmunización.

**Palabras claves:** *Trypanosoma cruzi*, Proteínas ancladas a GPI, Inmunogenicidad, Sistema inmune, Anticuerpos, TAD, Western blot.

## INTRODUCCIÓN

*Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas, es un protozooario hemoflagelado que cumple su ciclo de vida entre hospedadores vertebrados mamíferos y hospedadores invertebrados, insectos hematófagos de la subfamilia Triatominae (Brenner, 1973). Esta dolencia es endémica en 21 países de Latinoamérica y considerada un problema de salud pública en toda la región (WHO, 2016). *T. cruzi* pasa por un proceso de diferenciación y evolución, detectándose la forma epimastigote en el tubo digestivo del hospedador invertebrado, la forma amastigote dentro de las células del hospedador vertebrado, las formas tripomastigote sanguícola en el torrente sanguíneo del hospedador vertebrado y los tripomastigotes metacíclicos en la ampolla rectal del insecto transmisor.

La infección inicia cuando un triatomino sano se alimenta sobre un hospedador infectado, ingiriendo junto con la sangre formas circulantes del parásito, el cual sufre proceso de transformación y multiplicación a través del tracto digestivo hasta producir las formas infectivas, las cuales posteriormente el insecto deposita junto con sus heces sobre la piel o mucosa de un hospedador donde el insecto se alimentará. Una vez penetrada la célula hospedadora, el parásito puede invadir células fagocíticas y no fagocíticas donde sufre un proceso de diferenciación y transformación a su forma amastigote intracelular para luego multiplicarse y salir a circulación en forma de tripomastigote sanguícola, invadiendo otras células para seguir multiplicándose (Stuart y col., 2008).

Una vez alcanzado el cuerpo del vertebrado, el sistema inmune del hospedador en presencia del parásito pone en marcha toda una maquinaria defensiva humoral y celular destinada a defenderse de la infección, atacando al agente patógeno utilizando diferentes

estrategias tales como procesos inflamatorios locales, producción de linfocitos citotóxicos, producción de anticuerpos, entre otros (Miyahira y col., 2003). En la primera etapa de la infección se activan los macrófagos, células NK y células dendríticas que pertenecen al sistema inmune innato, activándose posteriormente el sistema inmune adaptativo cuya principal característica es la producción de anticuerpos específicos anti *T. cruzi*.

Los procesos de infección y la sobrevivencia de *T. cruzi* dentro del hospedador vertebrado están relacionadas con proteínas que median la interacción parásito-hospedador. La mayoría de estas moléculas se encuentran ancladas a la membrana mediante glicosil-fosfatidilinositol (GPI) y cumplen funciones de reconocimiento, invasión de células nucleadas y evasión de la respuesta inmune. Se ha comprobado que las proteínas ancladas mediante GPI son altamente inmunogénicas con una inducción de altos niveles de IgM y de IgG en sueros de modelos vertebrados (Crisante, 2014).

En el proceso de inmunización de modelos vertebrados se utilizan moléculas capaces de inducir una respuesta inmune específica, característica que es esencial para la producción de anticuerpos. Como criterios de evaluación de un suero inmunológico, se utiliza tanto el aspecto cuantitativo (título) como el cualitativo (afinidad y especificidad), siendo este último el más importante (Lomonte, 2007). La utilización de ensayos experimentales de este tipo permite la comprensión del proceso de desarrollo de anticuerpos en modelos vertebrados que pudiera ayudar a entender características similares encontradas en pacientes con enfermedad de Chagas (Lomonte, 2007).

El presente trabajo tiene como objetivo principal utilizar proteínas ancladas por GPI a la membrana plasmática de *T. cruzi* como un inmunógeno en un modelo vertebrado de

experimentación. Durante este proceso, siguiendo un esquema de inmunización, se pretende observar el efecto de sucesivas dosis del antígeno sobre el incremento de los niveles de anticuerpos específicos anti GPI-T. *cruzi*, los cuales serán demostrados utilizando pruebas serológicas convencionales como la Técnica de Aglutinación Directa (TAD) y Western blot, normalmente empleadas en el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

# CAPÍTULO I

## EL PROBLEMA

### Planteamiento del problema

La enfermedad de Chagas, según estimaciones hechas por la Organización Mundial de la Salud, se registra en Latinoamérica en un tenor de 16 a 18 millones de personas infectadas y 120 millones bajo riesgos de infección, lo cual resulta en un problema regional de salud pública (WHO, 2016).

La respuesta inmune asociada con la infección por *T. cruzi* es compleja y no completamente comprendida. Evidencias experimentales han demostrado que se requiere de la presencia de anticuerpos específicos de los subtipos IgM e IgG para conferir protección al hospedador, por lo que las técnicas de inmunización son consideradas entre las más efectivas para la generación de altos títulos de anticuerpos neutralizantes que se unan al agente etiológico y prevengan la infección chagásica (Lomonte, 2007).

Uno de los pasos esenciales en los métodos de inmunización es la identificación de los antígenos que sean capaces de desencadenar la producción de anticuerpos (Lomonte, 2007). Investigaciones realizadas, han utilizado diferentes fragmentos de proteínas del parásito dando como resultado diferentes niveles de protección contra *T. cruzi* (Crisante y col., 2015).

Considerando los estudios previos, en el presente trabajo se planteó la siguiente interrogante: ¿Qué títulos de anticuerpos policlonales específicos serán producidos por las proteínas ancladas mediante GPI al ser inoculadas en un hospedador vertebrado utilizando un esquema de inmunización de 3 inoculaciones con diferentes concentraciones de proteína y diferentes lapsos de tiempos de inoculaciones?

## **Justificación de la investigación**

Con la necesidad de generar conocimientos sobre los procesos inmunológicos desencadenados por las fracciones proteicas de *T. cruzi*, fue realizado este trabajo para evaluar la inmunogenicidad de las proteínas ancladas por GPI a la membrana de *T. cruzi* las cuales fueron mezcladas en proporciones iguales con un adyuvante, utilizando un esquema de inmunización que consiste en tres inoculaciones con diferentes concentraciones de las proteínas en diferentes lapsos de tiempo llevados a cabo en el modelo experimental vertebrado. La detección se realizó cuantificando los títulos de anticuerpos específicos anti GPI- *T. cruzi* producidos al final de cada inoculación y al culminar el experimento.

## **Objetivos de la investigación**

### **Objetivo general**

Evaluar la inmunogenicidad de proteínas ancladas por GPI a la membrana de *Trypanosoma cruzi* en un modelo vertebrado de experimentación empleando un esquema de 3 inmunizaciones y determinar el incremento de títulos de anticuerpos específicos anti GPI de *T. cruzi* generados durante cada proceso de inoculación. El desarrollo de la investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigaciones Parasitológicas “J.F. Torrealba”, Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.

### **Objetivos específicos**

1. Fraccionar y purificar por solubilidad proteínas ancladas por GPI a la membrana de epimastigotes de *T. cruzi* utilizando el detergente no iónico Tritón X-114.

2. Separar electroforéticamente las proteínas ancladas por GPI de la membrana de *T. cruzi* en geles SDS PAGE.
3. Cuantificar las proteínas purificadas por espectrofotometría utilizando el método de Lowry.
4. Inmunizar el modelo vertebrado (*Oryctolagus cuniculus*) con proteínas ancladas mediante GPI a la membrana de *Trypanosoma cruzi* complementado con adyuvante incompleto de Freund.
5. Evaluar la inmunogenicidad de las proteínas ancladas por GPI en la membrana de *Trypanosoma cruzi* en el suero del modelo animal inmunizado aplicando las técnicas de aglutinación directa (TAD) y Western blot.

### **Alcances y limitaciones de la investigación**

En la investigación realizada se evaluó la capacidad inmunogénica que poseen las proteínas ancladas por GPI a la membrana de *Trypanosoma cruzi* para el desarrollo de la respuesta inmune en el modelo de experimentación vertebrado y el aumento progresivo de los títulos de anticuerpos producidos por el estímulo del inmunógeno tras realizar varias inoculaciones en diferentes lapsos de tiempo.

Las limitaciones presentadas durante el desarrollo de la investigación fueron: la accesibilidad a un animal de experimentación de sexo, edad y peso adecuado y la poca disponibilidad de reactivos para emplear un mayor número de técnicas serológicas para la detección de los anticuerpos específicos anti GPI-*T. cruzi*.

### ***Hipótesis***

Las proteínas ancladas por GPI a la membrana de *T. cruzi* estimulan el sistema inmune del hospedador vertebrado, induciendo la producción de anticuerpos policlonales específicos anti-GPI-*T. cruzi*, los cuales se incrementarán con sucesivos refuerzos del antígeno.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### Antecedentes

Nasser y col. (1997), estudiando la respuesta inmune humoral y celular inducida por las proteínas recombinantes SAPA (antígeno de superficie de etapa aguda), demostraron su presencia en el modelo *T. cruzi* ancladas a su membrana por glicosil-fosfatidil-inositol. Este resultado llevado a cabo en ratones de experimentación mediante la aplicación de un esquema de 2 inmunizaciones semanales de 50 $\mu$ gr de la proteína complementado con adyuvante de Freund. Transcurrido una semana de la primera inoculación con la proteína, detectaron en las muestras de sueros la presencia de inmunoglobulinas específicas anti-SAPA y pasado el tiempo de la segunda inoculación lograron determinar que la concentración de inmunoglobulinas hallada era 30 veces mayor que la detectada durante la primera inmunización, demostrando así la alta inmunogenicidad que poseen estas proteínas y la eficacia que posee el esquema de inmunización con respecto a los niveles de anticuerpos producidos.

Por otra parte, Añez-Rojas y col. (2006), utilizando el método de partición Tritón X-114 lograron aislar y purificar proteínas GPI de *Trypanosoma cruzi* y *T. rangeli*, las cuales usaron para inmunizar conejos aplicando un protocolo de 3 inoculaciones, una cada 15 días con una concentración de 100 $\mu$ gr en la primera, 50 $\mu$ gr y 50 $\mu$ gr en la segunda y tercera. En el suero obtenido del modelo experimental lograron registrar la presencia de anticuerpos generados por el estímulo utilizando la técnica de Western blot. En este caso los autores obtuvieron diferentes patrones proteicos en las dos especies de parásitos, observando bandas un alto peso molecular correspondientes a proteínas de *T. rangeli* y bandas de bajo peso molecular correspondientes a *T.*

*cruzi*, lo cual demostró diferencias entre las proteínas GPI encontradas en ambas especies. Este resultado generó la propuesta del uso de estas proteínas como marcadores bioquímicos y como una herramienta de diagnóstico diferencial para ser usada en áreas endémicas de enfermedad de Chagas en la cual ambos parásitos *T. cruzi* y *T. rangeli* coexisten. Posteriormente, Rojas y col. (2008), realizaron el fraccionamiento, purificación y la evaluación antigénica e inmunogénica de *L. (V.) braziliensis* y la compararon con diferentes especies de *Leishmania* incluyendo *L. (L.) donovani*, *L. (L.) mexicana* y *L. (L.) amazonensis*. Similar a lo propuesto en nuestro trabajo, los autores inmunizaron un conejo experimental con extractos de proteínas ancladas mediante GPI a la membrana de *Leishmania braziliensis*, siguiendo un protocolo de inmunización de tres inoculaciones, una cada quince días. El suero de conejo fue recolectado 15 días después de realizada la última inmunización, posteriormente se utilizaron tres técnicas serológicas convencionales (*IFI*, *TAD* y *ELISA*), obteniendo altos títulos de anticuerpos Anti-GPI de *L. braziliensis*, indicando una buena respuesta del sistema inmune del animal al inmunógeno utilizado. La evaluación de la antigenicidad se llevó a cabo utilizando Western blot, el cual reveló la presencia de 2 bandas proteicas de GPI de peso molecular 50kDa y 28kDa y resultaron ser altamente reconocidas por el suero anti GPI de *L. braziliensis* proveniente de animales inmunizados experimentalmente, a su vez se observó que estos péptidos no fueron detectados cuando se enfrentaron fracciones proteicas de las otras especies de *Leishmania* con el mismo antisuero, lo que sugirió el uso de estos péptidos específicos como marcadores bioquímicos para la identificación y diferenciación de Leishmaniasis causada por *L. (V.) braziliensis*. Más recientemente, Crisante y col. (2015), utilizando la técnica de fraccionamiento y purificación empleada ya en investigaciones anteriores de Añez-Rojas y col. (2006), demostraron reproducibilidad y obteniendo un rendimiento de 7%. Como anteriormente expuesto, las

proteínas ancladas mediante GPI a *T. cruzi* también fueron inoculadas en conejos siguiendo un esquema de 3 inoculaciones y a los sueros obtenidos se le aplicaron dos técnicas serológicas (TAD y ELISA), dando como resultado altos títulos de anticuerpos específicos anti GPI de *T. cruzi*. Finalmente, para poder demostrar su validez como un antígeno específico para el serodiagnóstico de la enfermedad de Chagas, utilizaron un total de 174 sueros de pacientes chagásicos previamente diagnosticados por métodos clínicos, serológicos y parasitológicos, el experimento final dio como resultado un 100% de sensibilidad y especificidad concluyendo así que la metodología empleada puede ser utilizada como una técnica alternativa para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

### **Antecedentes históricos**

Los primeros estudios de la tripanosomiasis americana comienzan a principios del siglo XX. En el año 1909, el investigador brasileño Carlos Chagas hizo el hallazgo de un nuevo parásito que llamo *Trypanosoma cruzi* en honor a Oswaldo Cruz y describió la enfermedad que causaba llamada en su honor como Enfermedad Chagas. En un solo trabajo, este eminente científico brasilero, realizó la descripción del agente causal *Trypanosoma cruzi*, reconoció los transmisores en los insectos Reduviidae de la subfamilia Triatominae y describió las principales manifestaciones clínicas de la enfermedad en el ser humano.

En Venezuela, Enrique Tejera en el año 1919, fue el primero en registrar la presencia de insectos triatomino albergando infección por *Trypanosoma cruzi* relacionando el hallazgo con la para entonces recién descubierta enfermedad de Chagas en Brasil. Sin embargo, no fue sino hasta los años 30 cuando se tomó consciencia de la magnitud del problema con el tesonero trabajo de

José Francisco Torrealba (1940), este investigador logró constatar la alta incidencia de la infección chagásica aguda en individuos del llano venezolano empleando la técnica de xenodiagnóstico descrita previamente por Brumpt (1912). Posteriormente, Pifano (1974), realizó una amplia campaña de seguimiento de la infección que involucró a más de 10.300 personas provenientes de ocho estados del país, detectando un 43,9% de seropositividad a *T. cruzi* destacando un 20,4% en niños de edades comprendidas entre 0 a 10 años y un 4% de positivos al examen de xenodiagnóstico indicando transmisión activa.

Añez y col. (1999) en un trabajo durante los años 1988 al 1996 en el cual realizaron estudios clínicos, parasitológicos y serológicos en 152 pacientes pertenecientes al occidente de Venezuela donde la enfermedad de Chagas es endémica, demostraron 91 (59.9%) positivos de los cuales 59 se encontraban en la fase aguda de la enfermedad con signos y síntomas variados, destacándose entre estos 15% de pacientes asintomáticos, demostrando así un problema endémico en áreas del oeste del país que eran consideradas bajo control por la campaña llevada a cabo en 1960.

Añez y colaboradores en el año 1999, realizaron evaluación de 28 pacientes con caso crónico de la infección, examinando muestras de biopsias del tejido miocárdico, determinando que el uso de drogas para tratar la enfermedad reduce la parasitaria encontrada en el paciente, pero no la elimina totalmente. En ese trabajo se estudiaron pacientes crónicos tratados y no tratado con Benznidazol durante la fase aguda, y se demostró la presencia de parásitos en el tejido cardíaco ya que el tratamiento empleado solo elimina las formas circulantes y no las tisulares, La importancia de este Trabajo fue que se demostró por primera vez en pacientes vivos altos porcentajes de persistencia parasitaria de *T. cruzi* en la fibra cardíaca en pacientes chagásicos crónicos del occidente de Venezuela. Asimismo Añez y col.(2007), presentaron un

estudio llevado a cabo en el periodo de Enero 2006 a Marzo 2007 donde fueron detectados un total de 9 casos agudos de la enfermedad de Chagas en pacientes procedentes del occidente del país, de zonas consideradas anteriormente como endémicas para la enfermedad, llegando a la conclusión que ha habido un resurgimiento de la enfermedad en Venezuela por transmisión activa evidenciada por el hallazgo de estos nuevos casos en áreas endémicas y a su vez demuestra un descuido de la aplicación de los programas de control de vectores triatomíneos de *Trypanosoma cruzi* aumentando así la transmisión vectorial.

### **Antecedentes teóricos (bases teóricas)**

#### ***Enfermedad de Chagas***

La enfermedad de Chagas también conocida como tripanosomiasis americana, es una enfermedad parasitaria tropical potencialmente mortal causada por *Trypanosoma cruzi* transmitida al humano por vía contaminativa a través de las deyecciones de vectores infectados pertenecientes a la sub familia Triatominae a través de las heces u orina. Una vez que llega a la célula hospedadora sufre ciclos consecutivos de transformaciones y multiplicaciones para luego invadir otras células ocasionando la destrucción del tejido y la subsiguiente disfunción del órgano correspondiente (Stuart y col., 2008).

#### ***Fases de la enfermedad***

La enfermedad de Chagas presenta dos fases, la primera etapa de la infección de *T. cruzi* al hospedador se denomina etapa aguda caracterizada por la presencia del parásito en sangre, microscópicamente detectable y un perfil serológico con elevados niveles de IgM y bajos títulos

de IgG. Esta etapa puede ser asintomática o presentar cuadros clínicos variables que incluyen fiebre recurrente, cefalea, mialgia, edema, anorexia, linfo-adenopatía, hepatoesplenomegalia leve y miocarditis en grado variable (Añez, 1999, Bern, 2011, Torreao, 2015). En algunos casos se puede presentar la formación de un nódulo cutáneo local en el sitio de inoculación llamado Chagoma, o cuando el sitio de inoculación es la membrana mucosa conjuntival, el paciente desarrolla un edema peri orbital unilateral o bilateral, conjuntivitis y linfadenitis preauricular, manifestaciones características conocida como signo de Romaña.

Algunos casos agudos se resuelven en un periodo de dos a tres meses, producto del control de la replicación del parásito por acción de la respuesta inmune (Rassi y Marin-Neto, 2010). El individuo se mantiene asintomático durante años constituyendo un reservorio importante de la parasitosis. Superada la fase aguda el individuo pasa a una fase crónica, puede ser sintomática o asintomática, aparece en el 20% o 30% de los casos, la enfermedad afecta al sistema digestivo, al sistema nervioso y al tejido muscular. Las infecciones crónicas dan como resultado daño en el músculo cardíaco (miocardiopatía) y algunas veces se puede presentar pérdida de peso y la consecuente desnutrición del paciente (Acquatella, 2007, de Oliveira, 1998). Después de pasar varios años con la infección, un 27% desarrolla daños cardíacos, un 6% tendrán daños digestivos y un 3% presentan trastornos del sistema periférico (Pinazo, 2010). En la fase crónica las pruebas parasitológicas son frecuentemente negativas, mientras que el diagnóstico serológico arroja positividad revelando elevados niveles de IgG y bajos niveles de IgM (Añez y col., 1999, 2001).

### ***Trypanosoma cruzi***

*Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas, es un parásito protozoario unicelular flagelado digenético cuyo ciclo de vida se desarrolla de forma alternada entre el hospedador invertebrado y un amplio rango de hospedadores vertebrados domésticos y salvajes entre los que se incluye el hombre.

Taxonómicamente *Trypanosoma cruzi* se clasifica de la siguiente forma:

***Reino:*** Protista

***Subreino:*** Protozoo

***Phylum:*** Euglenozoa

***Clase:*** Kinetoplastida

***Familia:*** Trypanosomatidae

***Género:*** *Trypanosoma*

***Subgénero:*** *Schizotrypanum*

***Especie:*** *Trypanosoma cruzi*

### ***Formas evolutivas***

*Trypanosoma cruzi*, adopta diferentes formas en su evolución con características propias que refleja su adaptación a los distintos ambientes. Entre sus formas de desarrollo se describen las siguientes: ***Epimastigote*** Formas alargadas de aproximadamente 20µm el flagelo se origina

próximo al núcleo y en posición yuctanuclear, emergiendo por un costado del cuerpo del parásito, el kinetoplasto se encuentra localizado en la parte media del organismo delante del núcleo, este estadio se desarrolla en el vector y en medios de cultivo, constituye una de las formas proliferativas del parásito.

***Amastigote:*** Formas esféricas u ovaladas de aproximadamente 2 $\mu$ m de diámetro, poseen un núcleo, kinetoplasto y flagelo rudimentario. Este representa la forma de multiplicación del parásito en el hospedador mamífero localizado en el interior de las células hospedadoras.

***Tripomastigote:*** Formas alargadas de aproximadamente 20 $\mu$ m con el kinetoplasto situado posterior al núcleo; el flagelo sale en su proximidad y emerge por un costado del cuerpo del parásito el cual se libera del extremo anterior creando una imagen de una membrana ondulante de importante extensión. Se encuentra presente en la circulación del mamífero como tripomastigotes sanguícola y en la ampolla rectal del insecto vector como tripomastigotes metacíclico, constituyen la forma infectiva.

### ***Ciclo de vida***

El ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* es uno de los más complejos entre los miembros pertenecientes al clase Kinetoplastida, describiéndose hasta cuatro formas básicas propias de este parásito conocidas como epimastigote, tripomastigote metacíclico, tripomastigote sanguícola y amastigote.

El ciclo se inicia cuando el triatomino infectado succiona sangre del mamífero y libera con sus heces Tripomastigotes metacíclicos cerca del sitio de picadura, los tripomastigotes

penetran en el hospedador a través de la mucosa. Dentro del hospedador, los tripomastigotes metacíclicos invaden las células nucleadas cercanas al sitio de inoculación donde se diferencian a amastigotes intracelulares. Los amastigotes se multiplican por fisión binaria y cuando ocupan el citoplasma celular, se diferencian nuevamente en tripomastigotes que son liberados al espacio intracelular, a la linfa y a la circulación sanguínea como tripomastigotes sanguícolas, invaden nuevas células para completar un nuevo ciclo intracelular, *Trypanosoma cruzi* infecta células de una gran variedad de tejidos incluyendo, células de músculos lisos, tejido adiposo y sistema nervioso central (Stuart y col., 2008).

Los tripomastigotes sanguícolas ingeridos por el insecto vector se transforman en Epimastigotes que se multiplican por fisión binaria uniéndose a las paredes del intesto. En la zona terminal del intestino o en la ampolla rectal los epimastigotes se diferencian a tripomastigotes metacíclicos, los cuales se liberan por las heces continuando así el ciclo biológico del parasito (Stuart y col., 2008).

### ***Mecanismo de transmisión***

*T. cruzi*, es transmitido en las heces de los triatominos vectores, insectos hematófagos que pertenecen a la subfamilia Triatominae, el insecto en la naturaleza suele habitar palmeras entre cuyas especies más conocidas destacan *Attalea humboldtiana* (palma de agua), *Copernitia tectorum* (palma llanera), *Acrocomia aculeata* o *Acrocomia sclerocarpa* (palma corozo), *Coccus nucifera* (palma de coco) y *Mauritia minor* (palma moriche), pero suele incursionar zonas domésticas en busca de animales y personas para alimentarse, son de hábitos nocturnos y se infectan con *T. cruzi* después de picar a un animal o persona que tiene parásitos en sangre, al

frotar las picaduras se introduce de forma accidentalada las heces en la herida, en los ojos o en la boca, así el parásito entra al torrente sanguíneo replicándose principalmente en tejidos musculares. Esta vía de transmisión posee una gran importancia a nivel epidemiológico, otra forma de transmisión es por vía oral, la cual ocurre cuando los animales se alimentan con insectos infectados y en humanos cuando se ingieren alimentos contaminados con heces u orina de triatomíneos. *T. cruzi*, puede también ser transmitido a humanos por medio de transfusiones de sangre o trasplantes de órganos donantes infectados, esta vía de contagio es importante en zonas no endémicas por la gran cantidad de personas infectadas clínicamente sanos o asintomáticos (Angheben, 2015).

### ***Trypanosoma cruzi* y la respuesta inmune**

El sistema inmune humano es capaz de reconocer patógenos, eliminarlos o neutralizarlos. Sin embargo, la respuesta contra la infección por *T. cruzi* es inadecuada y solo provee una defensa parcial contra el mismo. Tanto la respuesta innata como la adaptativa-celular son cruciales para el reconocimiento y control de patógenos intracelulares como *T. cruzi*. El hecho de que este patógeno establezca una infección crónica sugiere que también ha desarrollado potentes mecanismos de evasión del sistema inmune o su modulación.

El mecanismo por medio del cual el sistema inmune reconoce y responde a nivel celular no ha sido completamente descifrado. Este organismo es genéticamente complejo y a lo largo de su ciclo de vida presenta cambios constantes en el perfil antigénico, lo que parece ser de importancia para evadir o modular el sistema inmune (Tarleton, 2001, Cardoso, 2016).

Durante la etapa aguda la activación de las células Natural Killer y macrófagos con la liberación de óxido nítrico y enzimas lisosomales, son la primera acción para eliminar el parásito. Sin embargo, muchos logran sobrevivir dentro de las células fagocíticas y replicarse evadiendo la respuesta inmune (Taniwaki, 2011). Luego la infección evoluciona a una patología crónica, donde el principal mecanismo de defensa contra *T. cruzi* está mediado por células T y anticuerpos específicos (Marini, 2011). Tanto los linfocitos CD4 como CD8 son necesarios para el control de la infección con una principal acción protectora de LTh1 (Tarleton, 2000). Las citoquinas liberadas por los linfocitos T helper incrementan la actividad microbicida de los macrófagos, y los linfocitos citotóxicos destruyen las células infectadas por parásitos que son inaccesibles a los anticuerpos (Basso y Marini, 2014). *T. cruzi*, es capaz de infectar un amplio rango de tipos celulares entre ellas, las de origen hematopoyético o con función de célula presentadora profesional. Luego de 12 a 18 horas de la invasión celular, *T. cruzi* escapa de la vacuola parasitófora y reside en el citoplasma de la célula hospedadora bajo la forma de amastigote replicativo. Estudios previos han demostrado que dentro de citoplasma se produce la liberación de proteínas por parte del parásito que son presentadas en la superficie celular asociadas a CMH clase I para el reconocimiento de las células T CD8 (Rodríguez, 2007). Los subproductos de la degradación de *T. cruzi* en los fagolisosomas son llevados a la superficie celular para ser presentados a linfocitos T CD4 en el contexto de las moléculas de CMH clase II. De esta manera son activados los linfocitos responsables de la respuesta inmune efectora (Hoft, 2007).

La resistencia a la infección por *T. cruzi* ha sido asociada a la producción de citoquinas pro inflamatorias, IL-12 e IFN- $\gamma$  (Rodríguez, 2012). Estas citoquinas activan la producción de óxido nítrico por parte de macrófagos responsables de la eliminación del parásito.

Por otro lado, una de las capacidades que posee el parásito es la regulación negativa de IL-12 con la sobreexpresión de IL-10 y TGF- $\beta$  (Sacks y Sher, 2002). *T. cruzi* en la etapa aguda de infección disminuye la capacidad de las células dendríticas de estimular linfocitos T, disminuyendo así la expresión de CMH clase II. Esta actividad sería dependiente de la cepa, pudiendo estar este fenómeno relacionado con la virulencia de la misma (Soto, 2003).

Diferentes estudios han demostrado la importancia de los anticuerpos para la supervivencia y la eliminación de los parásitos (Krettli, 1999). Brener (1986) propuso que los anticuerpos tripanocida generados durante la infección activa son el principal mecanismo efector para controlar la infección por *T. cruzi* en humanos, y Galvao (1993) observó que los anticuerpos contra *T. cruzi* tienen la habilidad de inducir la lisis de los parásitos *in vitro*. A pesar de la importancia de estos anticuerpos específicos, también se ha demostrado la existencia de anticuerpos con reducida actividad contra el parásito (Grag y Tarleton, 2002, Bermejo, 2011). Se ha probado que *T. cruzi* induce *in vivo* activación policlonal linfocitaria que compromete todas las poblaciones linfoides periféricas, distraendo la respuesta específica. En resumen, diversos estudios sugieren que una respuesta efectiva contra *T. cruzi* requiere la presencia de citoquinas Th1, anticuerpos líticos, así como la actividad conjunta de macrófagos, linfocitos T colaboradores y citotóxicos (Reina-San-Martin, 2000).

### **Moléculas de superficie involucradas en la interacción *T. cruzi* - célula hospedadora**

*T. cruzi*, presenta un repertorio de diferentes moléculas que expresan a nivel de superficie celular destinadas a la invasión de las células mamíferas (Alves y Colli, 2007). Entre estas destacan las siguientes: **Mucinas**, las cuales son unas de las principales glicoproteínas presentes

en la superficie de *T. cruzi* (Acosta-Serrano y col., 2001, Buscaglia y col., 2006, Barrias y col., 2013). Dichas moléculas generan una matriz densa de oligosacáridos que las hace muy adecuadas para la protección del parásito. Las mucinas se encuentran involucradas en la interacción hospedador-parásito y poseen principalmente dos funciones: proteger al parásito de los mecanismos de defensa tanto del triatomino como del hospedador mamífero y asegurar un punto de anclaje y posterior invasión de células en tejidos específicos (Freitas-Junior y col., 1998). Al respecto, se ha establecido que estas glicoproteínas forman una cubierta alrededor del parásito que lo protegen del ataque de proteasas y glicosidasas presentes en el tracto digestivo del vector triatomino (De Pablos y Osuna, 2012). A su vez, en el interior del hospedador mamífero, las mucinas parasitarias se relacionan principalmente con los procesos de adhesión e inmunomodulación (Buscaglia y col., 2006).

Se ha establecido que estas glicoproteínas son las principales receptoras de ácido siálico, el cual es transferido desde glicoconjugados del hospedador mamífero por trans-sialidasas específicas del parásito. Una vez las mucinas son modificadas por las trans-sialidasas, participan tanto en la unión e invasión a las células como en la sobrevivencia dentro del hospedero mamífero (Campo y col., 2006). Durante el proceso de invasión a la célula hospedadora, las mucinas presentes en la superficie del tripomastigote metacíclico son liberadas hacia la vesícula parasitófora (Schenkman y col., 1993).

**Trans-sialidasas,** Son las glicoproteínas más abundantes relacionadas con el proceso de invasión celular en *T. cruzi* (Mattos y col., 2014) y presentan la característica de estar ancladas a glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) (Alves y Colli, 2007, Mattos y col., 2014). Dentro de este grupo se encuentran las proteínas gp82, gp80, gp 35/50 y gp85 (Barrias y col, 2013). Estas proteínas juegan un rol importante en la transferencia de ácido siálico desde proteínas del hospedador

hacia las mucinas parasitarias, pues se ha establecido que *T. cruzi* no posee la capacidad de sintetizar ácido siálico (Osorio y col., 2012).

**Superfamilia Gp85/Trans-sialidasa**, esta glicoproteína se expresa en la membrana de tripomastigote, pero no está presente en la forma epimastigote (Tonelli y col., 2010, Osorio y col., 2012). Participa de los procesos de adhesión a la célula hospedera e invasión debido a la interacción con múltiples ligandos como laminina, fibronectina, colágeno, citoqueratina (CK) y algunas otras moléculas de superficie y proteínas extracelulares (Tonelli y col., 2010). Se caracteriza por anclarse a glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) (Alves y Colli, 2007).

**Gp82**, Es una de las principales adhesinas presentes en la membrana de la forma tripomastigote del parásito, se une a la membrana celular de células epiteliales a través del anclaje glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), lo que favorece los procesos de adhesión e invasión a las células hospederas (Neira y col., 2003, Yoshida y Cortez, 2008, Osorio y col., 2012). Gp82 es una molécula capaz de inducir un incremento transiente de las concentraciones intracelulares de Ca<sup>+</sup>, tanto en la célula hospedadora como en el parásito, mediante la activación de proteínas tirosina quinasa (PTK) y fosfolipasa C (PLC). El aumento de calcio citosólico promueve dos eventos que facilitan la invasión de tripomastigotes metacíclicos: la disrupción del citoesqueleto de actina dependiente de calcio y el reclutamiento de lisosomas para la formación de la vesícula parasitófora y posterior invasión celular (Málaga y Yoshida, 2001, Yoshida y Cortez, 2008, Maeda y col., 2012, Bayer-Santos y col., 2013).

**Gp90**, Glicoproteína de la familia de la trans-sialidasas que participa en los procesos de invasión celular, es específica de la superficie de tripomastigote metacíclico, la unión a la membrana plasmática del parásito ocurre a través del anclaje GPI (Yoshida y col., 1990, Málaga

y Yoshida, 2001, Maeda y col., 2012). Funciona como un regulador negativo de la invasión parasitaria.

**Gp35/50**, Encontrada en la superficie de tripomastigotes metacíclicos y en epimastigotes, con estructura similar a las mucinas (Yoshida, 2009). Estas moléculas se unen a receptores de células hospederas generando activación de la vía de señalización de  $Ca^{+}$  pero la respuesta producida es menor a la observada por Gp82. Gp35/50 genera la activación de la adenilato ciclasa, con la consecuente liberación de  $Ca^{+}$  que proviene probablemente de los acidocalcisomas. Son proteínas altamente glicosiladas, similares a mucinas, que poseen zonas ricas en residuos de ácido sialico y galactosa (Yoshida y Cortez, 2008).

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## CAPÍTULO III

### MARCO METODOLÓGICO

**Tipo de investigación:** La investigación se desarrollará a un nivel explicativo, el cual se encarga de buscar el porqué de los hechos mediante el establecimiento de relaciones causa – efecto. (Arias, 2016).

**Diseño de investigación:** El diseño es experimental, ya que se someterá al objeto de estudio a determinadas condiciones, estímulos o tratamiento (variable independiente) para observar los efectos o reacciones que se producen (variable dependiente) (Arias, 2016).

**Población y muestra:** La población del trabajo de investigación consiste en sangre tomada de un conejo de edad adulta al tiempo 0 antes de la inoculación, a los 15 días, a los 30 días y a los 45 días después de la inoculación y la muestra está constituida por el suero sanguíneo.

#### **Sistema de variables**

**Variable:** Proteínas de membrana

**Tipo de variable:** Independiente

**Definición conceptual:** Moléculas formadas por aminoácidos que están unidos por enlaces peptídicos. *T. cruzi* expresa una gran variedad de proteínas de superficie que cumplen diferentes roles durante su proceso de invasión al hospedador y la evasión de la respuesta inmune. En este estudio fueron utilizadas las proteínas ancladas por GPI a la membrana de *T. cruzi*.

**Definición operacional:** Obtenidas a través de un proceso de masificación, aislamiento, purificación. Se cuantificó utilizando el método de Lowry.

**Dimensión:** Relación 1:1 de proteína con adyuvante incompleto de Freund.

**Variable:** Respuesta Inmune del hospedero

**Tipo de variable:** Dependiente

**Definición conceptual:** La respuesta inmune suele definirse como la reacción del sistema inmunitario del hospedador a un antígeno o una proteína extraña. El estudio permitió la detección de la respuesta inmune dada por la producción de anticuerpos específicos anti Proteínas ancladas por GPI a la superficie de *T. cruzi*.

**Definición operacional:** Los anticuerpos fueron detectados aplicando como método serológico la prueba de aglutinación directa (TAD) y Western blot.

**Dimensión:** La positividad de la prueba es demostrada con títulos de anticuerpos a partir de 1:64 hasta 1:4096.

#### ***Instrumento de recolección de datos***

Para la recolección de los datos de investigación se utilizó la técnica de observación experimental. Los datos cualitativos y cuantitativos obtenidos de la aplicación de la técnica serológica TAD serán registrados y documentados en la base de datos del Laboratorio de Investigación “J.F Torrealba” de la Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes, Mérida.

## ***Procedimientos o Metodología de la investigación***

### ***Cultivo in vitro y masificación de aislados de Trypanosoma cruzi:***

Formas epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* fueron crecidas en medio difásico NNN a 25°C hasta la fase exponencial. Se realizaron grandes volúmenes de cultivos parasitológicos hasta obtener la cantidad necesaria para la masificación y fraccionamiento proteico. Posterior a su crecimiento, las células fueron colectadas por centrifugación y conservadas a -20°C hasta su uso.

### ***Fraccionamiento y purificación de proteínas utilizando detergente Tritón X-114:***

Las proteínas de *T. cruzi* fueron separadas de acuerdo a su solubilidad usando el método de partición con el detergente Tritón X-114 descrito por KO & Thompson (1995). Se obtuvieron tres fracciones diferenciadas en: moléculas hidrofílicas presentes en la fase acuosa (F1), proteínas integrales de membrana (F2) y moléculas unidas a la membrana con anclaje tipo glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) presentes en la fase detergente (F3). Para obtener las distintas fracciones proteicas, los parásitos fueron concentrados mediante centrifugación y resuspendidos en buffer de lisis (150 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl; 2% Tritón X-114 pH 7,4) en presencia de inhibidores de proteasas. La preparación fue incubada con agitación en baño de hielo durante una hora, posteriormente la suspensión centrifugada a 3.500 rpm a 0°C durante 10 minutos en una centrifuga Eppendorf 5804R rotor A-4-44. El pellet resultante con el debris celular se descartó, el sobrenadante se almacenó a -20°C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo indicado el sobrenadante fue lentamente descongelado manteniéndose a temperatura ambiente de 22°C y luego incubado en baño térmico a 34°C durante 20 minutos hasta obtener la primera partición que luego fue centrifugado por 5 min a 3.000 rpm permitiendo la obtención de la fase acuosa en el sobrenadante que contiene las proteínas hidrofílicas y la fase detergente se resuspendió suavemente en dos volúmenes de buffer B (Tris-HCl 100 mM; NaCl 150 mM; 0.06% Tritón X-114 pH 7.4) y colocado en un recipiente con hielo durante 10 minutos, luego se incubo por 20 minutos a 34°C y así poder obtener una segunda partición que se centrifugó durante 5 minutos a 3.000 rpm, se descartó el sobrenadante que contenía proteínas hidrofílicas. La fase detergente resultante se resuspendió nuevamente en buffer y centrifugó durante 45 minutos a 5.000 rpm obteniéndose el pellet con las proteínas hidrofóbicas integrales de membrana. El sobrenadante

resultante se sometió a una tercera partición a 34°C durante 20 minutos y se volvió a centrifugar durante 2 minutos a 3.000 rpm, en la fase detergente resultante se obtuvo las proteínas ancladas mediante GPI.

Ya obtenidas las proteínas ancladas mediante GPI, estas fueron alicuotadas en volúmenes de 500 µl en tubos eppendorf, para luego ser precipitadas agregándosele volúmenes de acetona a -20°C durante 2 horas. Una vez precipitadas, las proteínas fueron centrifugadas nuevamente 10 min a 3.000 rpm descartándose el sobrenadante y procediéndose a secar el pellet conteniendo las proteínas GPI. Todas las fracciones del proceso de purificación fueron resuspendidas en buffer de muestra (Tris base 62 mM; 2% SDS; 10% Glicerol; 0,05% pH 6.8).

### ***Separación electroforética SDS-PAGE de las proteínas GPI de T. cruzi***

Las proteínas fueron separadas electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 12% con SDS como detergente aniónico, la migración de las proteínas de acuerdo a su peso molecular fue realizada en mini geles de 0,75 mm. En cada pozo de gel fueron colocados 20 µg de muestra de proteína realizándose la electroforesis a una diferencia de potencial constante de 100V durante 2 horas en una cámara de Mini Protean II (Bio-Rad). El gel posteriormente fue coloreado con una solución de azul de Coomassie con agitación suave durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo de coloración, el gel fue colocado en solución decolorante (Metanol 40% y ácido acético 10%) con agitación suave para eliminar el exceso de coloración hasta observar los patrones proteicos de las proteínas obtenidas durante el proceso de purificación.

### ***Cuantificación de las proteínas GPI de T. cruzi***

Proceso realizado aplicando el método de Lowry (1951), proceso colorimétrico de valoración cuantitativa de proteínas, en el cual a la disolución de proteínas se le añade un reactivo que forma un complejo coloreado con ellas, siendo la intensidad de color de la disolución resultante proporcional a la concentración de proteínas, según la ley de Lambert-Beer.

Este método consta de dos etapas:

1) Los iones  $\text{Cu}^{2+}$ , en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -proteína tienen un color azul claro. Además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos fenólicos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción. El  $\text{Cu}^{2+}$  se mantiene en solución alcalina en forma de su complejo con tartrato. 2) La reducción, también en medio básico, del reactivo de Folin-Ciocalteu, por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina, presentes en la mayoría de las proteínas, actuando el cobre como catalizador. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso. En este caso, fue utilizado un patrón de albumina de concentraciones conocidas para la realización de una curva patrón. La muestra de proteínas ancladas por GPI fue diluida en buffer de muestra hasta completar un volumen de  $10\mu\text{l}$  con una concentración desconocida, la cual posteriormente fue determinada con el uso de la curva patrón.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

### ***Inmunización del modelo vertebrado experimental con proteínas ancladas mediante GPI y obtención del suero sanguíneo***

Siguiendo el esquema de inmunización planteado, fueron realizadas 3 inoculaciones en total con una concentración variada y en lapsos de 15 días de diferencia, la primera de  $100\mu\text{gr}$ , la segunda de  $50\mu\text{gr}$  y la tercera de  $80\mu\text{gr}$ . En el día 0 se tomó una muestra de sangre periférica de la oreja del animal antes de la inoculación y posteriormente se inoculó el pool de proteínas purificadas suspendidas en 0.5 ml de buffer (62mM Tris-Base; 2% SDS; 10% Glicerol pH 6.8) en una mezcla 1:1 con adyuvante incompleto de Freund para un volumen final de 1 ml en tres sitios distintos del dorso del animal. Al transcurrir 15 días, se procedió nuevamente a tomar una muestra de sangre del conejo e inocularlo con la mezcla de proteínas y adyuvante en 3 zonas distintas de la primera inoculación, en el día 30 se tomó una última muestra de la oreja del animal y se inoculó por vía subcutánea en el dorso del animal. En el día 45 se tomó una muestra de sangre por cardio puntura.

## **Evaluación de la inmunogenicidad aplicando técnicas serológicas**

A todas las muestras de sueros obtenidos les fueron realizadas técnicas serológicas para determinar el título de anticuerpos anti- GPI-*Trypanosoma cruzi*. Las pruebas empleadas durante el desarrollo de esta investigación fueron el test de aglutinación directa (TAD) y Western blot según protocolos seguidos en el laboratorio (Añez y col., 2001).

Para la técnica de Western blot, se realizó una corrida electroforética de una muestra de 20µg de la proteína anclada mediante GPI de *T. cruzi* en presencia del agente reductor DTT, transcurrido el tiempo de la electroforesis, fue realizada un electro transferencia, a un voltaje constante de 100V durante 1 hora, a una membrana de inmobilon P. Para la inmunodetección se utilizó como anticuerpo primario las muestras de suero del modelo vertebrado inmunizado diluido 1:100 y como anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugada con peroxidasa diluido 1:10.000. Finalmente, la membrana fue expuesta a temperatura ambiente a una solución reveladora compuesta por 4-cloro-naftol hasta generar un precipitado coloreado producto de la reacción de óxido-reducción, al final del revelado, la membrana fue lavada con abundante agua destilada para detener la reacción.

## CAPITULO IV

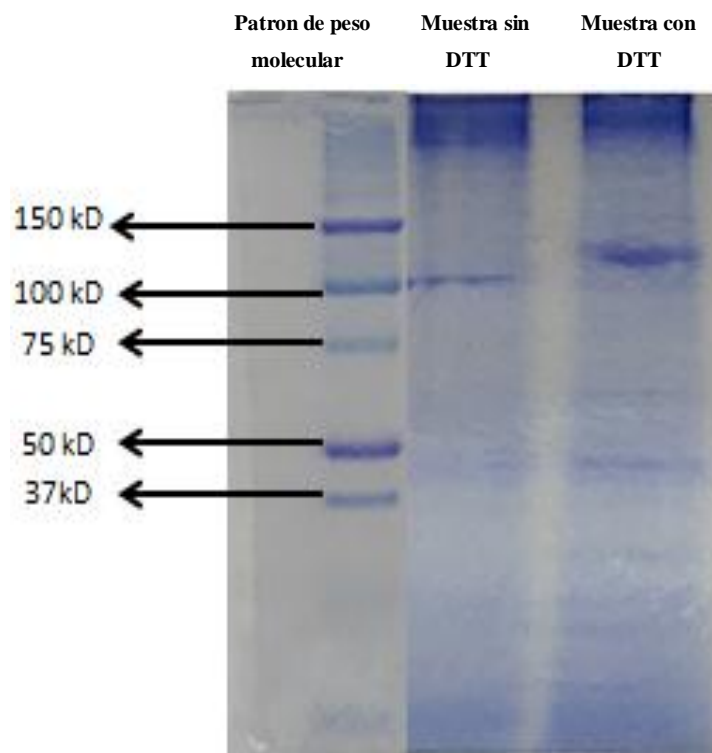
### RESULTADOS

#### **Fraccionamiento y purificación de proteínas de *Trypanosoma cruzi***

El proceso de fraccionamiento y purificación de epimastigotes de *T. cruzi*, utilizando el método de partición con el detergente no iónico Tritón X-114, permitió la obtención de las diferentes fracciones proteicas separadas de acuerdo a su solubilidad, la obtención final de las proteínas ancladas mediante GPI demostró un rendimiento del 7% de la concentración total de proteínas.

#### **Separación electroforética SDS-PAGE**

Se realizó la corrida electroforética a dos muestras de las proteínas GPI-*T. cruzi*, a una se le agregó un agente reductor Ditioneitol (DTT), cuya función es la de romper los puentes disulfuros en las proteínas permitiendo así su fraccionamiento, por lo que se observan varias proteínas de menor peso molecular. Transcurrido el tiempo de migración, el gel fue coloreado con el método de azul de Coomassie, observándose así un gran número de bandas proteicas, en la muestra tratada con agente reductor DTT se observaron un gran número de bandas proteicas, resaltando una gran cantidad de peso molecular menor a 37 kDa y en la muestra no tratada con DTT se observaron bandas que rondan entre los 200 kDa y 37 kDa.



**Figura 1.** Electroforesis en gel SDS-PAGE del fraccionamiento de proteínas ancladas mediante GPI a la membrana de *Trypanosoma cruzi*. Columna 1 muestra de proteínas sin DTT. Columna 2 muestra trata con DTT.

### Cuantificación por espectrofotometría utilizando el método de Lowry

Siguiendo el método de Lowry, se utilizó el siguiente esquema de trabajo

N° de muestras	Patrón albumina	Solución de reacción	Folin	Agua destilada
1	10 µl	3 ml	300 µl	590 µl
2	20 µl	3 ml	300 µl	580 µl
3	30 µl	3 ml	300 µl	570 µl
4	40 µl	3 ml	300 µl	560 µl
5	50 µl	3 ml	300 µl	550 µl
6	60 µl	3 ml	300 µl	540 µl

**Tabla 1.** Esquema de trabajo método de Lowry, utilizando diferentes concentraciones de albumina para la realización de la curva patrón.

Con los datos obtenidos, fue realizada una curva de calibración patrón de albumina para así poder determinar la concentración de la proteína GPI obtenida de *T. cruzi*, dando como resultado una concentración de 1.77  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

Concentración	Absorbancia
0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	0
10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	0,013
20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	0,039
30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	0,06
40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	0,085
50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	0,098
60 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	0,127

Tabla 2. Absorbancias obtenidas por espectrofotometría del estándar de albumina

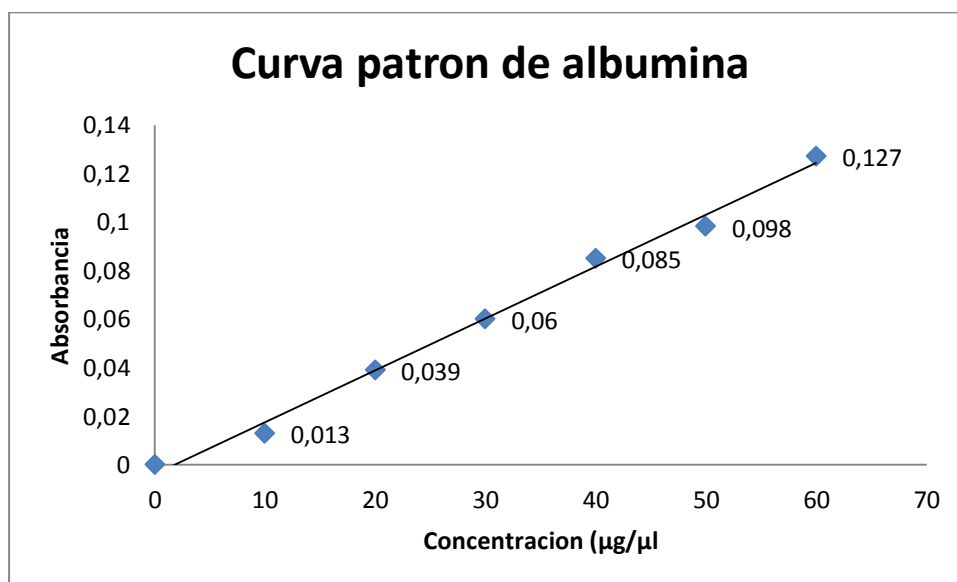


Grafico 1. Curva patrón de albumina utilizado para obtener la concentración desconocida de las proteínas ancladas por GPI de *T. cruzi*

## Immunización del modelo vertebrado y obtención del suero sanguíneo

Durante el desarrollo del esquema de inoculación, se fue formando al paso de los días pápulas en el dorso del animal en las zonas de inoculación que poco a poco fueron evolucionando a granulomas, a pesar de esto no se observó algún otro efecto secundario o adverso notable en el animal experimental. Según lo planteado en el experimento se lograron obtener 5 muestras sanguíneas representativas de cada etapa de toma de muestra del animal. Las muestras fueron centrifugadas durante 10 minutos a 3.000 rpm en una centrifuga así logrando la separación del suero de los demás componentes sanguíneos. Estos sueros fueron congelados a -20°C para ser utilizados posteriormente en la etapa de valoración inmunogénica.

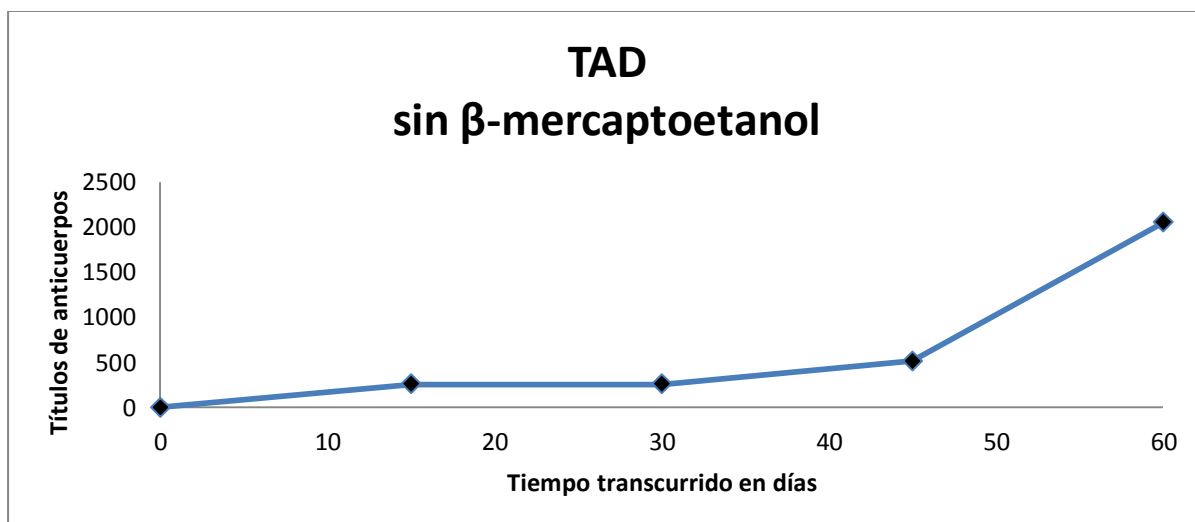
### Determinación inmunogénica utilizando TAD y Western blot

Los 5 sueros obtenidos fueron etiquetados según el tiempo en que fueron tomados del animal. El suero control obtenido antes de la inmunización el cual no contenía anticuerpos específicos, el suero 1 tomado a los 15 días de la primera inoculación, momentos antes de la segunda inoculación, el suero 2 tomado a los 30 días y antes de la tercera inoculación, el suero 3 tomado a los 45 días y posterior a la tercera inoculación y por último el suero 4 recolectado por cardio-puntura, transcurridos 60 días desde el inicio del experimento. Se le realizó análisis de inmunodiagnóstico a las muestras. En el caso de la técnica TAD, se utilizaron dos placas:

La primera placa sin  $\beta$ -mercaptoetanol, se observaron los siguientes resultados:

Tiempo	Descripción de la muestra	Título de anticuerpos
0 días	<ul style="list-style-type: none"><li>• Toma de suero de animal sano (Control negativo)</li><li>• Primera inmunización (100<math>\mu</math>g/<math>\mu</math>l)</li></ul>	0
15 días	<ul style="list-style-type: none"><li>• Toma de muestra de sangre de la primera inmunización</li><li>• Segunda inmunización (50<math>\mu</math>g/<math>\mu</math>l)</li></ul>	1:256
30 días	<ul style="list-style-type: none"><li>• Toma de muestra de sangre de la segunda inmunización</li><li>• Tercera inmunización (80<math>\mu</math>g/<math>\mu</math>l)</li></ul>	1:256
45 días	<ul style="list-style-type: none"><li>• Toma de muestra de sangre de la tercera inmunización</li></ul>	1:512
60 días	<ul style="list-style-type: none"><li>• Toma de muestra por cardio-puntura</li></ul>	1:2048

**Tabla 3.** Resultados obtenidos de TAD de la placa sin  $\beta$ -mercaptoetanol

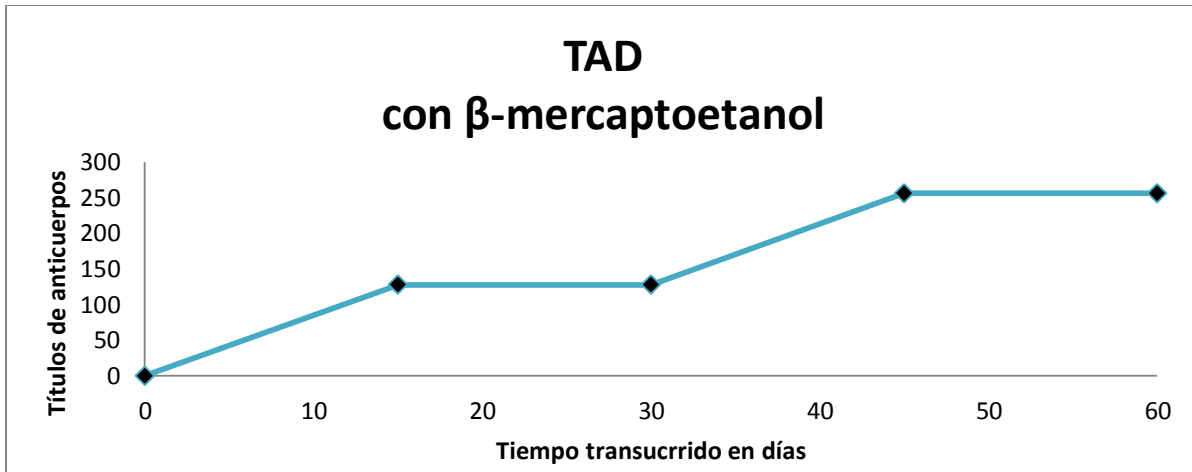


**Grafico 2.** Representación gráfica de los resultados obtenidos de TAD de la muestra sin  $\beta$ -mercaptoetanol

La segunda placa con  $\beta$ -mercaptoetanol, se observaron los siguientes resultados:

TIEMPO	Descripción de la muestra	Títulos de anticuerpos
0 días	<ul style="list-style-type: none"> <li>Toma de suero de animal sano (Control negativo)</li> <li>Primera inmunización (100<math>\mu</math>g/<math>\mu</math>l)</li> </ul>	0
15 días	<ul style="list-style-type: none"> <li>Toma de muestra de sangre de la primera inmunización</li> <li>Segunda inmunización (30<math>\mu</math>g/<math>\mu</math>l)</li> </ul>	1:128
30 días	<ul style="list-style-type: none"> <li>Toma de muestra de sangre de la segunda inmunización</li> <li>Tercera inmunización (80<math>\mu</math>g/<math>\mu</math>l)</li> </ul>	1:128
45 días	<ul style="list-style-type: none"> <li>Toma de muestra de sangre de la tercera inmunización</li> </ul>	1:256
60 días	<ul style="list-style-type: none"> <li>Toma de muestra por cardiopuntura</li> </ul>	1:256

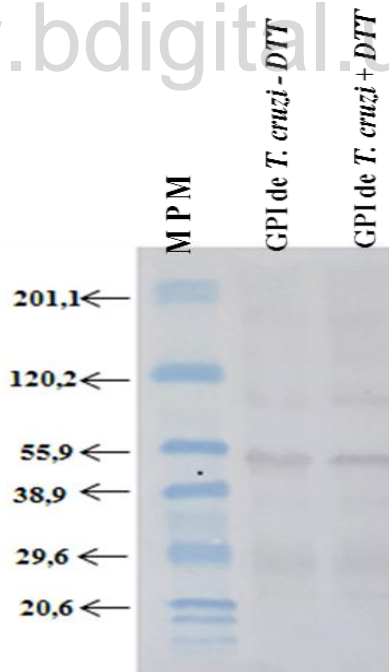
**Tabla 4.** Resultados obtenidos de TAD de la placa con  $\beta$ -mercaptoetanol



**Grafico 3.** Representación grafica de los resultados obtenidos de TAD de la muestra con β-mercaptoetanol

Con respecto al Western blot, tras realizar la metodología planificada, se observó bandas proteicas, correspondientes a las proteínas anclada mediante GPI, de diferentes pesos moleculares desde 201,1 kDa hasta rangos menores de 20,6 kDa, todo esto debido a la presencia de anticuerpos específicos anti-GPI de *T. cruzi*, demostrando así una positividad de la prueba.

www.bdigital.ula.ve



**Figura 2.** Western blot de las proteínas ancladas mediante GPI de *Trypanosoma cruzi* utilizando los anticuerpos obtenidos del suero del modelo vertebrado, demostrando la positividad de la prueba

## CAPITULO V

### DISCUSION

En el presente trabajo fue realizada la evaluación de proteínas ancladas mediante GPI de *T. cruzi*, utilizadas para inmunizar un modelo experimental, que en este caso se realizó en conejo, con la finalidad de detectar, mediante técnicas serológicas tales como: TAD y Western blot, el desarrollo de niveles séricos de anticuerpos anti- GPI de *T. cruzi*.

Primeramente, las proteínas ancladas mediante GPI de *Trypanosoma cruzi* utilizadas para la inmunización, siguiendo la metodología de purificación con detergente no iónico Tritón X-114, demostró ser eficiente y reproducible. Los resultados obtenidos en esta investigación fueron comparables a los registrados en trabajos previos realizados con proteínas ancladas mediante GPI de *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli* y *Leishmania braziliensis* (Añez-Rojas y col., 2005, Rojas y col., 2007, Crisante y col., 2015).

Una de las características resaltantes de esta investigación es la generación de títulos de anticuerpos detectables por técnicas serológicas desde las primeras semanas después de la primera inoculación y el consecuente aumento de la concentración de estos anticuerpos, lo que puede ser explicado por una buena activación de la respuesta inmune por parte de las propiedades inmunogénicas que poseen las proteínas ancladas mediante GPI. Además, se demostró que desde la primera inmunización se pudieron detectar Acs anti- GPI de *T. cruzi*.

Como prueba complementaria, la realización del Western blot reveló un patrón de bandas proteicas de diferentes pesos moleculares que van desde 201,1 kDa hasta rangos menores de 20,6 kDa, lo que indica los anticuerpos presentes en el suero del animal reconocieron y reaccionaron a la presencia de las proteínas ancladas mediante GPI de *T. cruzi* demostrando así una alta

especificidad y sensibilidad de parte de los anticuerpos. Estos hallazgos nos permiten sugerir que las proteínas ancladas mediante GPI de *T. cruzi* pudieran ser utilizadas en el diagnóstico temprano de pacientes con enfermedad de Chagas.

## CONCLUSIONES

El empleo de un esquema de inmunización utilizado en el experimento, que consistió en la inoculación de 3 dosis de la proteína-GPI con una concentración variada en intervalos de tiempos de 15 días, demostró ser eficaz para la generación del estímulo necesario para el desarrollo de la respuesta inmune del animal.

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación confirman la alta capacidad inmunogénica que poseen las proteínas ancladas mediante GPI de *Trypanosoma cruzi* para la estimulación del sistema inmune humoral de un modelo vertebrado de experimentación.

## RECOMENDACIONES

Ya que durante la investigación se dispuso solamente un animal como modelo de experimentación y una técnica serológica para la detección de los títulos de anticuerpos debido a limitante económica presente durante la ejecución del experimento. Se recomienda realizar un estudio más amplio con la disposición de un mayor número de modelos vertebrados experimentales que permita observar el desarrollo de anticuerpos a un nivel poblacional. Además de esto, se recomienda el uso de un mayor número de técnicas serológicas como lo son IFI y ELISA.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Acquatella, H. (2007) Echocardiography in Chagas heart disease. *Circulation* 115:1124-1131.

Acosta-Serrano, A., Almeida, I., Freitas-Junior, L., Yoshida, N. y Schenkman, S. (2001) The mucin-like glycoprotein super-family of *Trypanosoma cruzi*: structure and biological roles. *Mol Biochem Parasitol* 114(2): 143-150.

Alberti, E., Acosta, A., Sarmiento, M., Hidalgo, C., Vidal, T., Fachado, A., Fonte, L., Izquierdo, L., Infante, J., Finaly, C. y Sierra, G. (1998) Specific cellular and humoral immune response in BALB/c mice immunised with an expression genomic library of *Trypanosoma cruzi*. *Vaccine* 16, 608-612.

Alves, M.J. y Colli, W. (2007) *Trypanosoma cruzi*: adhesion to the host cell and intracellular survival. *IUBMB Life* 59(4-5): 274-279.

Angheben, A., Boix, L., Buonfrate, D., Gobbi, F., Bisoffi, Z., Pupella, S., Gandini, G. y Aprili G. (2015) Chagas disease and transfusion medicine: a perspective from non-endemic countries. *Blood Transfus* 13: 540-50.

Añez, N., Carrasco, H., Parada, H., Crisante, G., Rojas, A., Gonzalez, N., Ramirez, J.L., Guevara, P., Rivero, C., Borguez, R., Scorza, J.V. (1999) Acute Chagas disease in western Venezuela: a Clinical sero-parasitologic and epidemiologic study. *Am J Trop Med Hyg* 60: 215-222.

Añez, N., Crisante, G., Parada, H. (2007) Nuevos casos agudos de enfermedad de Chagas en el Occidente de Venezuela. *Salus, Supl. N°1*, 11:87-90.

Añez-Rojas, N., García-Lugo, P., Crisante, G., Rojas, A., Añez, N. (2006) Isolation, purification and characterization of GPI-anchored membrane proteins from *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*. *Act. Trop.* 97: 140-145.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

Barrias, E.S., de Carvalho, T.M y de Souza, W. (2013) *Trypanosoma cruzi*: Entry into Mammalian Host Cells and Parasitophorous Vacuole Formation. *Front Immunol* 1(4): 186.

Bayer-Santos, E., Cunha-E-Silva, N.L., Yoshida, N., Franco da Silveira J. (2013) Expression and cellular trafficking of GP82 and GP90 glycoproteins during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Parasit Vectors* 6: 127.

Bern, C. (2011) Antitrypanosomal Therapy for Chronic Chagas' Disease. *N Engl J. Med* 364 (26): 2527-34.

Buscaglia, C., Campo, V., Di Noia, J., Torrecilhas, A., de Marchi, C., Ferguson, M., Frasch, A., Almeida, I. (2004) The surface coat of the mammal dwelling infective trypomastigote stage of *Trypanosoma cruzi* is formed by highly diverse immunogenic mucins. *J Biol Chem* 279(16): 15860-15869.

Buscaglia, C., Campo, V., Frasch, A., Di Noia, J. (2006) *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nat Rev Microbiol* 4(3): 229-236.

Brener, Z. (1973) Biology of *Trypanosoma Cruzi*. *Annu. Rev. Microbiol.* 27, 347–382.

Campo, V., Buscaglia, C., Di Noia, J., Frasch, A. (2006) Immunocharacterization of the mucin-type proteins from the intracellular stage of *Trypanosoma cruzi*. *Microbes Infect* 8(2): 401-409.

Cardoso, M., Reis-Cunha, J., Bartholomeu, D.C., Cardoso, M.S, Luís, J., Reis-Cunha, J.L. (2016) Evasion of the immune Response by *Trypanosoma cruzi* during Acute infection. *Front. Immunol.* 6: 659.

Crisante, G. (2014) Purificación y caracterización de proteínas ancladas mediante glicosilfosfatidilinositol (GPI) a la membrana de *Trypanosoma cruzi* y su uso en el diagnostico específico de la enfermedad de Chagas. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida Edo. Mérida.

Crisante, G., Garcia, P., Rojas, A., Graterol, D., Contreras, V., Añez, N. (2015) Validation of *Trypanosoma cruzi*-GPI Anchored Membrane Proteins for Specific Sro-Diagnosis of Chagas Disease. American Journal of Microbiology and Biotechnology. 2015; 2 (3): 26-37.

De Pablos, L., Osuna, A. (2012) Multigene families in *Trypanosoma cruzi* and their role in infectivity. Infect Immun 80(7): 2258-2264.

Freitas-Junior, L., Briones, M., Schenkman, S. (1998) Two distinct groups of mucin-like genes are differentially expressed in the developmental stages of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 93(1): 101-114.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

Getz, E.B., Xiao, M., Chakrabarty, T., Cooke, R., Selvin, P.R. (1999) A comparison between the sulfhydryl reductants tris(2-carboxyethyl)phosphine and dithiothreitol for use in protein biochemistry. Anal. Biochem. 273, 73–80.

Hartree, EF. (1972) Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Anal Biochem. 48(2):422-7.

Hoft, D., Eickhoff, C., Giddings, O., Vasconcelos, J., Maurício M. Rodrigues†. (2007) Trans-Sialidase Recombinant Protein Mixed with CpG Motif-Containing Oligodeoxynucleotide

Induces Protective Mucosal and Systemic *Trypanosoma cruzi* Immunity Involving CD8<sub>+</sub> CTL and B Cell-Mediated Cross-Priming. J. Immunol.

Krettli, AU. (1999). Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* chronic infections in humans: usefulness of the complement regulatory protein antigens and lytic antibodies in the control of cure. Mem.Inst. Oswaldo Cruz, 94(Suppl. 1), 301-304.

Lomonte, B. (2007) Manual de Métodos Inmunológicos, 138 pp. Universidad de Costa Rica.  
Acceso libre en: <http://www.icp.ucr.ac.cr/~blomonte/>

Maeda, F., Cortez, C., Yoshida, N. (2012) Cell signaling during *Trypanosoma cruzi* invasion. Front Immunol 3: 361.

Malaga, S., Yoshida, N. (2001) Targeted reduction in expression of *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein gp90 increases parasite infectivity. Infect Immun 69(1): 353-359.

Marini, V., Moretti, E., Bermejo, D., Basso, B. (2011) Vaccination with *Trypanosoma rangeli* modulates the profiles of immunoglobulins and IL-6 at local and systemic levels in the early phase of *Trypanosoma cruzi* experimental infection. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 106 (1): 32-7.

Mattos, E.C., Tonelli, R.R, Colli, W., Alves, M.J. (2014) The Gp85 surface glycoproteins from *Trypanosoma cruzi*. Subcell Biochem 74: 151-180.

Miyahira, Y., Katae, M., Takeda, K., Yagita, H., Okumura, K., Kobayashi, S., Takeuchi, T., Kamiyama, T., Fukuchi, Y., Aoki, T. (2003) Activation of natural killer T-cells by Bgalactosylceramide impairs DNA vaccine-induced protective immunity against *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 71, 1234-1241.

Neira, I., Silva, F.A., Cortez, M., Yoshida, N. (2003) Involvement of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecule gp82 in adhesion to gastric mucin and invasion of epithelial cells. *Infect Immun* 71(1): 557-561.

Osorio, L., Rios, I., Gutierrez, B., Gonzalez, J. (2012) Virulence factors of *Trypanosoma cruzi*: who is who? *Microbes Infect* 14(15): 1390-1340.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

Pinazo, M.J., Cañas, E., Elizalde, JI., García, M., Gascón, J., Gimeno, F., Gomez, J., Guhl, F., Ortiz, V., De E., Posada, J., Puente, S., Rezende, J., Salas, J., Saravia, J., Torrico, F., Torrus, D., Treviño, B. (2010) Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' gastrointestinal disease in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic. *Gastroenterol Hepatol* 33: 191–200.

Rassi, A., Marin-Neto, J.A. (2010) Chagas disease. *Lancet*, 375: 1388–402.

Reina-San-Martín, B., Cosson, A., Minoprio, P. (2000) Lymphocyte polyclonal activation: A pitfall for vaccine design against infectious agents. *Parasitol. Today* 16(2):62-7.

Rodrigues, DBR., Dos Reis, MA., Romano, A., Pereira, SADL., Teixeira, VDPA., Tostes Junior, S., Rodrigues, V. (2012) In situ expression of regulatory cytokines by heart inflammatory cells in chagas' disease patients with heart failure. *Clin. Dev. Immunol.* Vol. 2012, Art. ID 361730.

Rodrigues Jr, V., Salgado Agrelli, G., Cardoso Leon, S., Nascimento Silva Teixeira, D., Tostes Jr, AO., Bertulucci Rocha-Rodrigues, D. (2007) Fas/Fas-L expression, apoptosis and low proliferative response are associated with heart failure in patients with chronic Chagas' disease. *Microbes Infect.* 10(1):29-37.

Rodriguez, M., Riberao, M., Pereira-Chioccola, V., Reina, L., Costa, F. (1999) Predominance of CD4 Th1 and CD8 Tc1 cells revealed by characterization of the cellular immune response generated by immunization with DNA vaccine containing a *Trypanosoma cruzi* gene. *Infect. Immun.* 67, 3855-3863.

Rojas, A., Garcia-Lugo, P., Crisante, G., Añez-Rojas, N., Añez, N. (2008) Isolation, purification, characterization and antigenic evaluation of GPI-anchored membrane proteins from *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Acta tropica* 105 139-144.

Sacks, D., Sher, A. (2002) Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nat. Immunol.* 3: 1041–1047.

Schenkman, S., Ferguson, M., Heise, N., de Almeida, M., Mortara, R., Yoshida, N. (1993) Mucin-like glycoproteins linked to the membrane by glycosylphosphatidylinositol anchor are the major acceptors of sialic acid in a reaction catalyzed by transsialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 59(2): 293–303.

Soto, CDA., Mirkin, GA., Solana, ME., González Cappa, SM. (2003) *Trypanosoma cruzi* Infection Modulates In Vivo Expression of Major Histocompatibility Complex Class II Molecules on Antigen-Presenting Cells and T-Cell Stimulatory Activity of Dendritic Cells in a Strain-Dependent Manner. *Infect. Immun.* 71: 1194–1199.

Stuart, K., Brun, R., Croft, S., Fairlamb, A., Gurtler, R., Mckerrow, J. (2008). Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J Clin Invest* 118, 1301-1310.

Taniwaki, NN., Gonçalves, VM., Romero, JK., Da Silva, CV., Da Silva, S., Mortara, RA. (2011) *Trypanosoma cruzi* strains in the *Calomys callosus*: Parasitemia and reaction of intracellular forms with stage-specific antibodies in the acute and chronic phase of infection and after immunosuppression. *Parasitol. Res.* 109(2):431-40.

Tarleton, RL. (2007) Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Curr. Opin. Immunol.* 19(4):430-4.

Tarleton, RL. (2001) Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int. J. Parasitol.* 31: 550–554.

Tarleton, RL., Grusby, MJ., Zhang, L. (2000) Trypanosoma cruzi Mice to Infection with and Enhanced Resistance in Stat6-Deficient Increased Susceptibility of Stat4-Deficient Increased Susceptibility of Stat4-Deficient and Enhanced Resistance in Stat6-Deficient Mice to Infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol Ref.* 165: 1520–1525.

Tonelli, RR., Giordano, RJ., Barbu, EM., Torrechilas, AC., Kobayashi, GS., Langley, RR., Arap, W., Pasqualini, R., Colli, W., Alves, MJ. (2010) Role of the gp85/trans-sialidases in *Trypanosoma cruzi* tissue tropism: preferential binding of a conserved peptide motif to the vasculature *in vivo*. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 4(11).

Torreão, JA., Ianni, BM., Mady, C., Naia, E., Rassi, CH., Nomura, C., Parga, JR., Avila, LF., Ramires, JAF., Kalil-Filho, R., Rochitte, CE. (2015) Myocardial tissue characterization in Chagas' heart disease by cardiovascular magnetic resonance. *J. Cardiovasc. Magn. Reson.* 18:17:97.

WHO: World Health Organization (Internet). Actualizado en Marzo de 2016; disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es>.

Yoshida, N., Blanco, SA., Aragauth, MF., Russo, M., González, J. (1990) The stage specific 90-kilodalton surface antigen of metacyclic tripomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 39(1): 39-46.

Yoshida, N., (2006) Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *An. Acad. Bras. Cienc.* 78(1): 87-111.

Yoshida, N., Cortez, M. (2008) *Trypanosoma cruzi*: parasite and host cell signaling during the invasion process. *Subcell Biochem* 47: 82-91.

Yoshida, N., (2009). Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 Suppl 1: 101-107.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)