

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA



**“Identificación de proteínas que interactúan con la glicoproteína
variante de superficie de *Trypanosoma evansi*”**

Trabajo Especial de Grado
presentado ante la Ilustre
Universidad Central de Venezuela,
por la **Br. Jennifer Sánchez** para
optar al título de Licenciado en
Química

Caracas, octubre del 2013

Yo profesora María Rodríguez, investigadora de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela y el profesor José Bubis, Investigador del Laboratorio de Química de Proteínas del Departamento de Biología Celular de la Universidad Simón Bolívar.

Certificamos que, el presente Trabajo Especial de Grado titulado:

“Identificación de proteínas que interactúan con la glicoproteína variante de superficie de *Trypanosoma evansi*”

Que presenta la Br. Jennifer Sánchez, para aspirar al título de Licenciado en Química, ha sido realizado en el departamento Laboratorio de Química de Proteínas del Departamento de Biología Celular de la Universidad Simón Bolívar bajo nuestra dirección, durante los años 2012 y 2013 y con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, octubre 2013

Prof. José Bubis
(Tutor)

Prof. María Rodríguez
(Tutor)

Los abajo firmantes designados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado:

“Identificación de proteínas que interactúan con la glicoproteína variante de superficie de *Trypanosoma evansi*”

Presentado por la Br. Jennifer Sánchez, C.I 17.759.137, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudio para optar por el título de Licenciado en Química.

Prof. José Bubis
(Tutor)

Prof. María Rodríguez
(Tutora)

Prof. Ivette **Piña**
(Jurado)

Prof. Alírica Suárez
(Jurado)

RESUMEN

El *Trypanosoma evansi* es un parásito protozoario causante de la tripanosomiasis equina. Este posee la característica de evadir la respuesta inmune del hospedador mamífero gracias a la presencia aleatoria de diferentes isoformas de glicoproteínas variantes que se encuentran en su superficie, y que se conocen como VSG por sus siglas en inglés, “variant surface glycoprotein”. Estudios previos han demostrado que la VSG también está involucrada en procesos de señalización celular mediados por calcio. En consecuencia, en este trabajo se planteó aislar y caracterizar las proteínas del parásito que interaccionan con la VSG. Inicialmente, se purificaron a homogeneidad la forma soluble y la forma de membrana de la VSG presente en el aislado TEVA1 de *T. evansi*, mediante cromatografías de intercambio iónico. Posteriormente, se elaboraron soportes de columnas de cromatografía de afinidad, compuestos por resinas de sefarosa acopladas covalentemente a ambas formas purificadas de la VSG. Con el fin de purificar las proteínas adsorbidas a las resinas de sefarosa acopladas a dicha VSG, parásitos *T. evansi* fueron expandidos en ratas, purificados y homogenizados, y sus fracciones solubles y particuladas fueron cromatografiadas a través de las mencionadas resinas de afinidad. Las fracciones eluidas de estas columnas fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilo sulfato de sodio (SDS-PAGE), y como resultado de este análisis, se observaron bandas polipeptídicas con masas moleculares aparentes de 100KDa, 90KDa, 80KDa, 75KDa, 64KDa, 55KDa, 50KDa, y 43KDa, entre otras. De manera interesante, al utilizar ensayos de Western blot en estas mismas fracciones y revelar con anticuerpos anti-VSG y anticuerpos anti-idiotípicos, los cuales teóricamente poseen regiones similares a la VSG, se reconocieron bandas cuyos tamaños coincidieron aproximadamente con algunos de los obtenidos mediante el análisis de SDS-PAGE. Estos resultados demuestran que las bandas polipeptídicas encontradas deben corresponder a las proteínas del parásito que son capaces de interaccionar directamente con la VSG del *T. evansi*.

Adicionalmente, estos resultados sugieren que dichas bandas podrían estar implicadas en los procesos de señalización mediados por Ca^{2+} , en los que la VSG participa.

AGRADECIMIENTOS

- A mi madre Lesbia Feliz, por ser una luchadora que no se detiene ante las dificultades, siempre está dispuesta a desarrollar el potencial de sus hijos con las herramientas que adquirido a través de los años. Sin duda alguna estas líneas son pocas para describir la tremenda admiración que siento por mi madre y el orgullo que siento por ser parte de su familia.
- A mi padre y mis hermanos, Robín, Abraham y Robín Sánchez, quienes forman una parte fundamental para desarrollar mi carácter y habilidades, los amo y quiero que sean personas exitosas y productivas para esta sociedad.
- A mi hermana Karina Sánchez, quien será una de las personas que traerá muchísima alegría y satisfacción a nuestra familia, y aunque ella no lo sabe muchas de las proyectos que me planteo son para darle un ejemplo y una motivación a ella, te quiero.
- A mi tutor, el profesor José Bubis por aceptarme como estudiante, tenerme mucha paciencia y alentarme a concluir uno de los ciclos importantes de mi vida. Gracias por brindarme amistad y consejos que siempre serán muy bien recibidos.
- A mis amigos Leonardo Escalona, Sheerly Rodríguez, Osmin Francia, Jesus Pérez, Cristina Rodríguez, quienes me acompañaron, apoyaron, me hicieron reír y llorar, en fin muchísimas gracias.
- A mi prima Dulce Algarín y a mi novio Christian Brito, quienes en este último año me han alentado a hacer cosas que sin duda alguna jamás imaginaria que podía hacer, el lema de este par es “quien no se mete en problemas, no aparece”.
- Muchísimas gracias a todo el equipo que forman parte del Departamento de Biología Celular escuela de Biología de la Universidad Simón Bolívar, y a mis profesores, amigos y compañeros escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela. Da gusto trabajar con personas atentas, dispuestas a ayudar y que transmiten mucha energía positiva.

INDICE

ÌNDICE DE FIGURAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
INTRODUCCION	1
REVISION BIBLIOGRAFICA	3
• Morfología y Taxonomía del <i>T. evansi</i>	5
• Transmisión y Ciclo de vida del <i>T. evansi</i>	7
• Variación Antígena del <i>T. evansi</i>	8
• Glicoproteína Variante de superficie.	8
• Anticuerpo antidiotipo.....	13
ANTECEDENTES	17
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS ESPECIFICOS	21
METODOLOGIA EXPERIMENTAL	21
• Materiales y Equipo.....	21
✓ Reactivos empleados en la metodología experimental.....	22
✓ Equipos empleados en la metodología experimental.....	24
✓ Soluciones utilizadas en la metodología experimental.....	25
✓ Electroforesis en gel en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDSPAGE).....	27
✓ Análisis de inmunotinción.....	29
• Expansión y Purificación de <i>T. evansi</i>	31
• Purificación de la VSGs y VSGm.	32
• Determinación de la VSGs y VSGm.	33
• Acoplamiento de la VSGs o VSGm a resinas para formar el soporte VSG—resina.	34
• Caracterización de las fracciones de proteína adheridas a la cromatografía de afinidad.	36

RESULTADOS EXPERIMENTALES	38
• Expansión y Purificación de <i>T. evansi</i>	38
• Purificación de la VSGs y VSGm.....	38
• Determinación de proteína.....	44
• Acoplamiento de la VSG a las resinas cromatografica para forma los soportes S1, S2 y S3.....	45
• Caracterización de proteínas purificadas por a la cromatografía de afinidad.	49
DISCUSION	54
CONCUSIONES	59
BIBLIOGRAFIA	61

ÌNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1:	<i>Trypanosoma evansi</i> en sangre.	5
FIGURA 2:	Estructura celular del <i>Trypanosoma evansi</i>	6
FIGURA 3:	Representación de la variación antigénica como parasitemia en función del tiempo.....	8
FIGURA 4:	Disposición estructural de la VSG en la membrana.....	10
FIGURA 5:	Estructura del anclaje de la VSG a la membrana plasmática.....	11
FIGURA 6:	Glicofomas presentes en la VSG de <i>T. brucei</i>	12
FIGURA 7:	Teoría “Red Idiotípica” descrita por Jerne.....	14
FIGURA 8:	Representación grafica de la obtención y uso de la VSG, los α -VSG y α -Ids.....	15
FIGURA 9:	Variación de la concentración de Ca^{2+} intracelular en <i>T. evansi</i> tratados con α -VSG en diferentes condiciones.	16
FIGURA 10:	Electroforesis 2D de las proteínas purificadas con los Acs anti-Ids acoplados a una resina de sefarosa.....	18
FIGURA 11:	Representación grafica del sistema de SDS-PAGE.....	27
FIGURA 12:	Representación fotográfica de un sistema de electrotransferencia.....	28
FIGURA 13:	Monitoreo, purificación e identificación de VSGs.....	39
FIGURA 14:	Monitoreo, purificación e identificación de VSGm.....	41
FIGURA 15:	Comparación e identificación de masa molecular de la VSGs y VSGm ...	42
FIGURA 16:	Curva de calibración empleada para la cuantificación de las proteínas VSGs y VSGm a través del método de Bradford.....	44
FIGURA 17:	Ensayos de inmunotinción para garantizar la formación del soporte S1..	46
FIGURA 18:	Ensayos de inmunotinción para garantizar la formación de los Soporte S2 y S3.....	47
FIGURA 19:	Proteínas de <i>T. evansi</i> que interaccionan con la VSGs y VSGm de los soportes S2 y S3.....	49

FIGURA 20: Ensayos de inmunotinción de las proteínas purificadas de la FS y FNS del
T. evansi**52**

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno.
CM-C	Carboximetil Celulosa
DEAE- C	Dietilaminoetil celulosa.
DEAE- S	DEAE-Sephacell
DMSO	Dimetil Sulfoxido.
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético.
EGTA	Ácido Etilenglicoltetraacético.
HEPES	Ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico.
kDa	Kilo Daltons.
p-CMBS	ácido <i>p</i> - cloromercuribenceno sulfónico .
PBS	Amortiguador salino de fosfato.
PBSG	Amortiguador salino de Fosfato glucosado.
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoruro.
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de Dodecil Sulfato de Sodio.
TBST	Amortiguador de Tris Salino + Tween 20
TEVA1	Aislado <i>T. evansi</i> venezolano.
TLCK	N- α -p-tosil-L-lisina clorometilcetona.
VSG	Glicoproteína Variante de superficie.
VSG _s	Glicoproteína variante de superficie soluble.
VSG _m	Glicoproteína variante de superficie de membrana.
α -VSG	Anticuerpo anti-VSG.
α -Ids	Anticuerpos antidiotipos.
PKC	Proteína quinasa C

INTRODUCCION

El *Trypanosoma evansi* es un parásito protozooario causante de una tripanosomiasis animal que afecta principalmente al ganado equino y sus síntomas clínicos suelen ser anemia, pérdida de peso, disminución de la capacidad reproductiva y en algunos casos puede llegar a producir la muerte. En Venezuela esta enfermedad es conocida como derrengadera. El parásito *T. evansi* se presenta como un elemento monomórfico, cuya reproducción se lleva a cabo por fisión longitudinal y su transmisión es mecánica a través de las picaduras de moscas tales como *Tabanus*, *Stomoxys* y *Haematobia irritans*.

Este parásito posee un mecanismo de variación de su cubierta antigénica que constituye una de las herramientas más complejas que ha desarrollado un organismo patógeno para evadir el sistema inmune del hospedador. La superficie del parásito está compuesta por una proteína denominada glicoproteína variante de superficie (VSG), la cual cambia cada vez que el sistema inmune del hospedador responde ante la presencia del tripanosoma. Este fenómeno se conoce como variación antigénica y es lo que dificulta el control y/o prevención de la tripanosomiasis por métodos inmunológicos tales como vacunas.

Experimentos realizados por Mendoza et al,^[1] demostraron cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular de parásitos *T. evansi* incubados con anticuerpos dirigidos contra su VSG. Esto conllevó a preguntarse si existen interacciones entre la VSG y alguna otra proteína presente en el parásito. De ser así, estas interacciones pudieran ser las responsables de iniciar alguna ruta de señalización que cause el aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular observada en estos parásitos. A través del uso de la cromatografía por afinidad, con soportes compuestos por resinas enlazadas covalentemente a las formas soluble y de membrana de la VSG del *T. evansi*, se espera aislar las proteínas que interaccionan con la VSG del aislado TEVA

1 del *T. evansi* y de esa manera dar repuesta a los planteamientos antes mencionados.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Los tripanosomatidios son organismos flagelados que causan la enfermedad denominada tripanosomiasis. Según su clasificación taxonómica se ubican dentro del Orden *Trypanosomatina*, Familia *Trypanosomatidae*, la cual incluye los géneros *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Endotrypanum*, *Herpetomonas*, *Leishmania*, *Leptomonas*, *Phytomonas* y *Trypanosoma*. De éstos, resulta interesante resaltar dos géneros causantes de afecciones en humanos y animales los cuales se consiguen en las regiones tropicales y subtropicales, el género *Leishmania*, el cual incluye los agentes etiológicos de la Leishmaniasis, y el género *Trypanosoma*, el cual incluye los parásitos *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma vivax* y *Trypanosoma equiperdum*, entre otros; los cuales son los agentes causantes de enfermedades tales como el mal de Chagas, la derrengadera o surra, la enfermedad del sueño y la nagana, la tripanosomiasis bovina, y la dourina, respectivamente.

Con base al comportamiento de los parásitos en sus vectores, el género *Trypanosoma* ha sido dividido en dos grupos. El primero, llamado *Stercoraria*, incluye a los tripanosomas que se desarrollan en el tubo digestivo del vector, avanzando hacia la porción intestinal con liberación de las formas infectivas a través de las heces, *T. cruzi* pertenece a este grupo. El segundo grupo, llamado *Salivaria*, incluye tripanosomas que se desarrollan inicialmente en el tubo digestivo y que posteriormente atraviesan el epitelio digestivo y atacan las glándulas salivares donde podemos encontrar las formas infectantes que son inoculadas cuando el vector pica al hospedador mamífero. Dentro del grupo *Salivaria* hay parásitos como el *T. brucei* que se pueden diferenciar y dividir dentro del insecto vector y otros como el *T. evansi* que son simplemente transmitidos mecánicamente, sin diferenciarse ni dividirse dentro del vector.

El *T. evansi* es uno de los agentes etiológicos de la tripanosomiasis animal en África del norte, Sureste de Asia, Centro y Sudamérica, afectando principalmente a caballos así como a otros mamíferos tales como camellos, perros, elefantes, bovinos y búfalos.^[2;3] Este parásito es el mayor responsable de las pérdidas de ganado equino en los llanos de Venezuela por ser el causante de la enfermedad conocida como derrengadera. Anemia, debilidad generalizada y fiebre son los síntomas principales de los animales que padecen esta enfermedad, aunque en algunas ocasiones los hospedadores pueden portar el *T. evansi* sin mostrar síntomas clínicos.^[4] Si la enfermedad no es tratada a tiempo, puede causar la muerte del animal.

Se cree que el *T. evansi* fue introducido al continente americano a finales del siglo XVII a través de los caballos traídos por los conquistadores españoles.^[2] En 1856 el Dr. Anacleto Llamozas describió una enfermedad que atacó a un gran número de equinos en las cercanías de los ríos Guárico y Apure de Venezuela, la cual se atribuyó al “miasma” según el criterio de la época. Sin embargo, por los síntomas reportados en esos animales y tiempo de vida luego de la infección, los científicos venezolanos posteriormente aseguraron que esa epidemia pudo ser causada por el hematozoario *T. evansi*^[5]

En 1898, el Dr. Ignacio Ortega realizó algunas observaciones una vez estudiadas muestras de sangre de equinos que presentaban un mal similar al descrito por Llamozas. Ortega notó la presencia de parásitos con movimientos activos, dándole el nombre de “*Hematozoarios del paludismo del caballo*”.^[5] Años más tarde, Rafael Rangel diagnosticó por primera vez en la región El Rastro, cerca de Calabozo, Estado Guárico, Venezuela, un grave brote de tripanosomiasis equina que a su parecer causaba una enfermedad semejante a la descrita en la India por el oficial Griffith Evans, quien dio a conocer mundialmente el parásito en 1881. Actualmente, el *T. evansi* también se encuentra distribuido en los llanos centrales, en los estados Zulia,

Lara, Yaracuy, Carabobo y Anzoátegui.^[6;7] En la figura 1 se muestra la imagen del *T. evansi* en la sangre de un animal infectado.

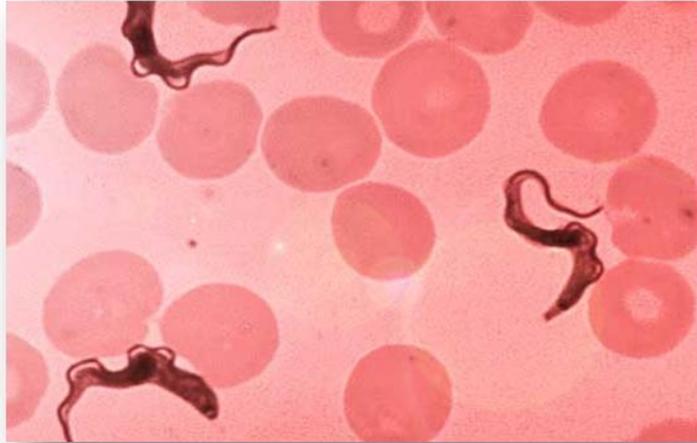


Figura 1: *T. evansi* en sangre.^[8]

Morfología y Taxonomía del *T. evansi*

El *T. evansi* se presenta como un elemento monomórfico en forma de hoja alargada y cola puntiaguda con dimensiones de 15-30 μ m de largo y 3-5 μ m de ancho, posee un extremo posterior cónico, un núcleo central, una membrana ondulante bien desarrollada y el kinetoplasto terminal o sub-terminal posterior al núcleo. Este flagelado se multiplica por fisión longitudinal en el hospedador vertebrado.^[9] Su cuerpo está cubierto por una envoltura gruesa y resistente conocida como periplasto que preserva la forma del parásito. Esta envoltura está conformada por tres capas y en su exterior posee una densa capa de *glicoproteínas variantes de superficie* (VSG por sus siglas en inglés “variant surface glycoprotein”) que contribuyen a evadir la respuesta inmune del hospedador.^[2] La figura 2 muestra la estructura celular del *T. evansi*.

La ubicación taxonómica de éste parásito es la siguiente:^[10]

Dominio *Eukaria*

Reino *Protozoa*

Phylum *Euglenozoa*

Clase *Kinetoplastida*

Orden *Trypanosomatina*

Familia *Trypanosomatidae*

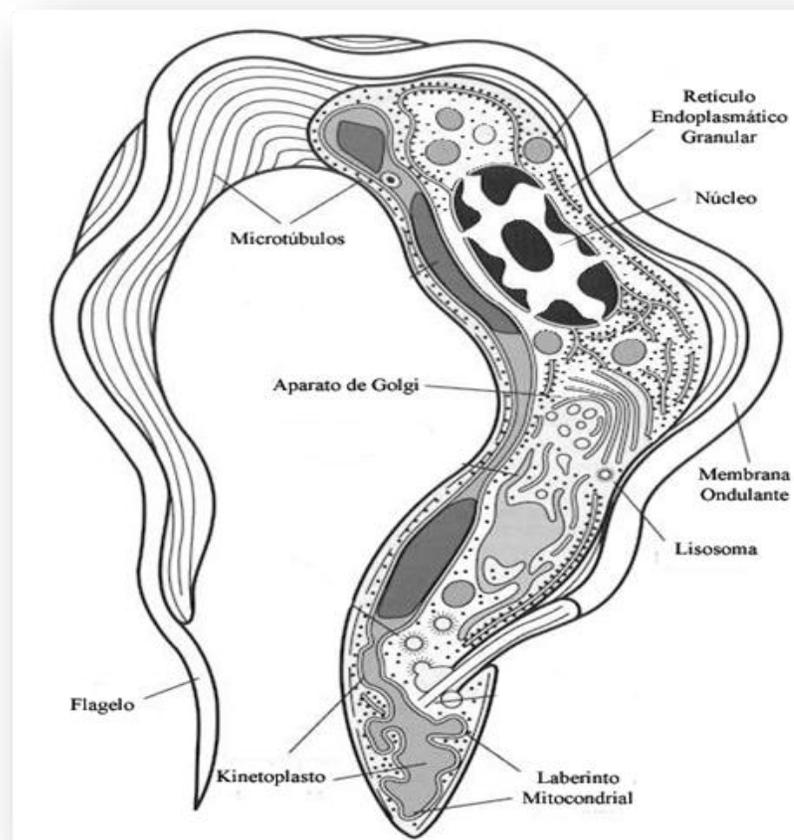


Figura 2: Estructura celular del *T. evansi*.^[11]

Transmisión y ciclo de vida del *T. evansi*

El *T. evansi* se transmite de forma mecánica por medio de insectos hematófagos tales como la mosca del caballo (*Tabanus*), la mosca brava de los establos (*Stomoxys*), la mosca de la paleta (*Haematobia irritans*) y en menor proporción por murciélagos vampiros, los cuales también pueden actuar como reservorios. Las primeras dos especies de insectos son los principales vectores de transmisión de *T. evansi* en Venezuela.^[3;12]

Uno de los factores que afecta la eficiencia en la transmisión del parásito es el tiempo que transcurre entre las alimentaciones subsecuentes del vector, ya que para el *T. evansi* se señala que la infectividad es alta inmediatamente después de la toma de sangre por parte del insecto, pero disminuye o se pierde después de las 8 horas. Esto se debe a que estos tripanosomas están restringidos a vivir por corto tiempo en el aparato bucal del insecto vector.^[4;13] La transmisión es limitada en el caso de la mosca de la paleta debido a que este insecto permanece todo el tiempo sobre un mismo animal, ocurriendo todo lo contrario con la mosca del caballo, la cual es una especie succionadora muy agresiva y vigorosa que tras ataques continuos causa reacciones defensivas por parte del hospedador que impiden finalizar la alimentación de la mosca la cual opta por culminar en otro animal. Esta forma de alimentación interrumpida aumenta la probabilidad de transmisión de un hospedador infectado a uno sano.^[4;13;14]

En comparación a otros organismos flagelados digenéticos, los cuales cuentan con ciclos de vida complejos que hacen que ellos sufran procesos de diferenciación que les permiten adaptarse a los ambientes que encuentran en sus hospedadores, el *T. evansi* no sufre diferenciación durante su ciclo de vida, mostrando una única forma tripomastigote.

Variación Antigénica del *T. evansi*

La variación antigénica es un proceso en el que un agente patógeno altera su superficie proteica, con el fin de evadir la respuesta inmune del hospedador. En el caso de los tripanosomas que pertenecen al grupo *Salivaria* o *Salivarianos*, este proceso se lleva a cabo al expresar alternadamente diferentes VSG. Durante el curso de una infección en un hospedador, una determinada población de tripanosomas, sufre la acción de la respuesta inmune. Sin embargo estos parásitos son capaces de informar lo que está ocurriendo a otra población de parásitos mediante un proceso de señalización no del todo elucidado. En consecuencia, los parásitos inician la expresión de otra VSG. Esto conlleva a que la parasitemia en el hospedador oscile entre niveles altos y bajos a través del tiempo.^[15;16] Una representación gráfica de cómo varía la parasitemia en un hospedador infectado con *T. evansi* es mostrado a continuación en la figura 3.

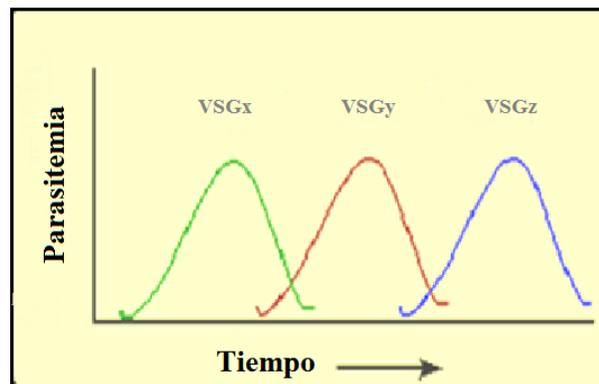


Figura 3: Representación de la parasitemia en función del tiempo.

Glicoproteínas variantes de superficie

Las glicoproteínas son proteínas unidas covalentemente a oligosacáridos, las cuales se encuentran normalmente empacadas en las membranas plasmáticas

celulares, y juegan un papel importante en las interacciones proteína-proteína y en procesos de señalización entre células. Las glicoproteínas se clasifican en dos grupos según la posición del sacárido, las N-glicoproteínas, aquellas en las que el sacárido se encuentra enlazado al nitrógeno del grupo amida presente en la cadena lateral del aminoácido asparragina, y las O-glicoproteínas, en las cuales el sacárido se encuentra enlazado al oxígeno del grupo hidroxilo de aminoácidos como serina, treonina e hidroxiprolina.

La información disponible acerca de la estructura y función de las VSG, ha sido obtenida principalmente de investigaciones realizadas sobre la especie *T. brucei*. Esta información puede ser extrapolada a otros tripanosomas del grupo Salivariano, dada la estrecha relación entre las especies clasificadas dentro de este grupo. La VSG forma una cubierta densamente empaquetada, visible por microscopia electrónica como una capa compacta de 12–15nm de espesor. Esta proteína se localiza sobre la membrana citoplasmática del tripanosoma como una monocapa de aproximadamente 10^7 moléculas. Estructuralmente, la VSG está constituida por dímeros, cuyos monómeros poseen una masa molecular aproximada de 55-65 KDa. Esta proteína actúa como una barrera física ante el sistema inmune del hospedador ya que cubre las proteínas invariantes del parásito.^[10;17;18] Cada tripanosoma contiene aproximadamente 1000 genes que codifican para VSG antigénicamente diferentes. Sin embargo, en una célula dada y en un tiempo dado, solamente uno de estos genes localizado en un sitio de expresión activo es transcrito y traducido, por lo que la siguiente generación de tripanosomas en el interior del hospedador puede poseer una VSG diferente a la de sus antecesores.^[19;20]

La VSG es una proteína de aproximadamente 500 aminoácidos. Su dominio N-terminal posee 20 aminoácidos que conforman un péptido señal, seguidos de una cadena polipeptídica de aproximadamente 350 aminoácidos que constituyen la región variante o variable, este dominio se ve representado en la Figura 4 con un par de

óvalos verticales en color azul, identificados como Dominio N-terminal. El dominio C-terminal de la glicoproteína está constituido por un polipéptido de 100 aminoácidos que conforman una región conservada y de homología en muchas VSG, además de otro péptido de aproximadamente 20 aminoácidos representado con el color rojo en la Figura 4, que conforman una cola hidrofóbica por donde la proteína se ancla a la membrana celular mediante un grupo Glicosilfosfatidilinositol (GPI).^[20-21]

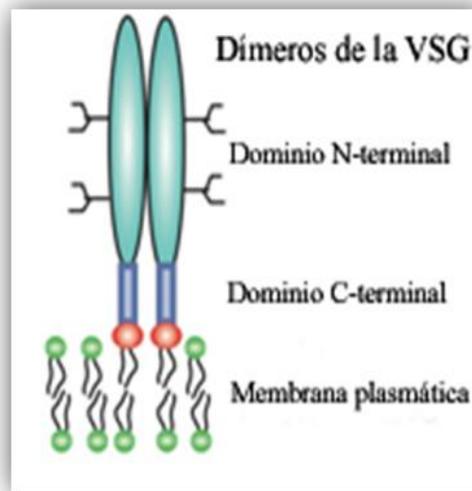


Figura 4: Disposición estructural de la VSG en la membrana.^[22]

La figura 4 ilustra la disposición de la VSG en la membrana celular según los hallazgos de Vervoort et al.,^[23] en los cuales se realizaron estudios con electroforesis en geles de poliacrilamida, en presencia de dodecil sulfato de sodio como agente desnaturizante y electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas. En condiciones desnaturizantes, se contempló una banda de masa molecular aproximada de 60 kDa, mientras que para las condiciones nativas, se obtuvo una banda de aproximadamente 115 kDa, lo que indica la formación de homodímeros.

El anclaje GPI varía su composición de acuerdo a la especie del tripanosomatidio. Para el *T. evansi* no se encuentra disponible esta información, por lo

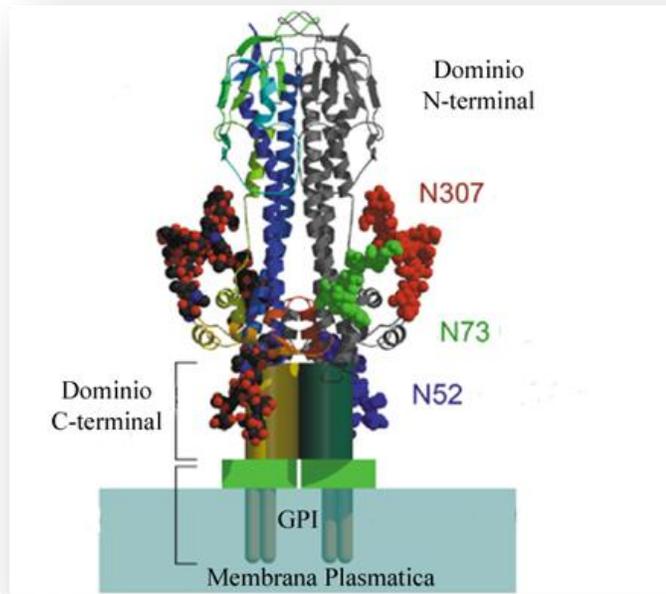


Figura 6: Glicofomas presentes en la VSG de *T. brucei*.^[20]

Composición de las glicofomas presentes en la VSG de *T. brucei*.

El número entre paréntesis indica el número de sacáridos de cada tipo

N52: Man(8) GlcNAc(2), **N73:** Gal(1) GlcNAc(2) Man(3) GlcNAc(2), **N307:** Gal(2) GlcNAc(2) Man(3) GlcNAc(2)

Un aspecto de gran importancia al cual se debe hacer referencia, es la característica que tienen las VSG de solubilizarse cuando se produce la lisis de los tripanosomas. La conversión de la VSG a su forma soluble involucra el rompimiento del enlace fosfodiéster del anclaje GPI y la liberación de 1,2 dimiristoil sn-glicerol del glicolípido de la molécula, la enzima involucrada en esta reacción tiene la especificidad de una fosfolipasa C (PLC) y se conoce como GPI-PLC^[24-25] Dicha lisis ocasiona la exposición de un epítipo común conformado por carbohidratos conocido como determinante de reactividad cruzada (CRD por el inglés “cross-reacting determinant”) el cual ha sido localizado en la molécula glicano del GPI y representa el sitio de reactividad cruzada entre las diferentes variantes de VSG^[25] Algunos investigadores, han denominado la forma enlazada a membrana de esta glicoproteína como VSGm y a

su forma soluble como VSGs. En el presente estudio se adoptará esta terminología para diferenciar ambas formas de la VSG.

Anticuerpos anti-idiotípicos

Debido a que en el presente trabajo de investigación se hace uso de los anticuerpos anti-idiotípicos (α -Ids) para la detección de las proteínas purificadas por cromatografía de afinidad, se presenta en detalle el fundamento de estos anticuerpos (Ac). Los anticuerpos son glicoproteínas producidas en respuesta a un antígeno (Ag), están compuestas por cuatro cadenas polipeptídicas, dos de ellas identificadas como cadenas livianas o ligeras, de masa molecular aproximada de 25 KDa, y dos cadenas pesadas de masa molecular de alrededor de 50 KDa. Cada cadena ligera está unida covalentemente a una cadena pesada por puentes disulfuro, enlaces de hidrógeno y otras interacciones de tipo no covalente.^[38]

Los anticuerpos poseen regiones variables que funcionan como un sitio de unión al Ag y representan grupos de determinantes antigénicos denominados determinantes idiotípicos, estos son capaces de inducir una respuesta inmune por parte de un hospedador. En algunos casos, un idiotopo constituye el sitio de unión al Ag, y en otros casos puede comprender secuencias de la región variable fuera del sitio de unión al Ag. Cada molécula de anticuerpo presenta múltiples idiotopos y la suma de los idiotopos individuales es llamada el idiotipo del anticuerpo^[38] Es posible producir anticuerpos contra los determinantes idiotípicos, los cuales son denominados anticuerpos anti-idiotípicos (α -Ids), con la finalidad de utilizarlos como herramientas para el estudio de interacciones entre proteínas.

La teoría descrita por Jerne^[39] conocida como “red idiotípica”, señala que durante la respuesta inmunológica a un antígeno (Ag), se producen anticuerpos específicos (Ab₁), los cuales poseen diversos determinantes idiotípicos, que son capaces de inducir la formación de anticuerpos anti-Ide (Ab₂). Estos anticuerpos anti-Ide reconocen diversos determinantes antigénicos de la molécula de Ab₁, entre los cuales se encuentra el fragmento de unión al Ag de la molécula de Ab₁. Por lo tanto, es probable que los anticuerpos Ab₂ compartan motivos estructurales con el Ag. A su vez, los anticuerpos Ab₂ pueden generar Acs anti-anti-idiotípicos (Ab₃) perpetuando una cascada de producción de anticuerpos cuyo resultado será una cadena de anticuerpos que pueden modular el sistema inmune, estimulándolo o suprimiéndolo.^[40]

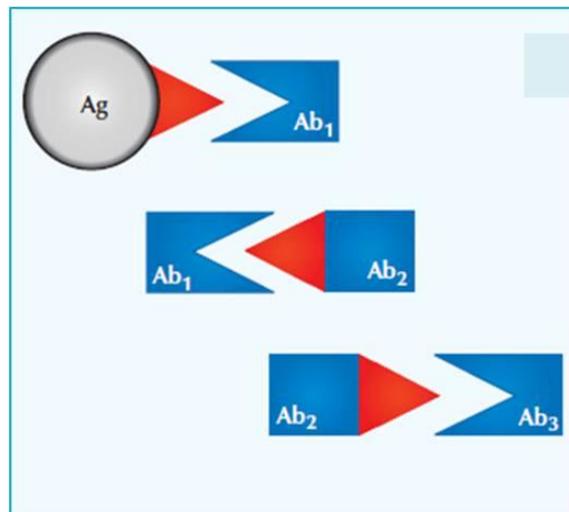


Figura 7: Teoría de la “Red Idiotípica” descrita por Jerne. La inmunización con un Ag conduce a la producción de Acs anti-Ag denominados Ab₁. La estructura única de Ab₁, en el sitio de unión al Ag (región variable) es reconocida por el sistema inmune para generar Acs anti-Id, designados Ab₂, los cuales son Acs anti-anti-Ag, que presentan características estructurales similares al Ag original (semejanza molecular). Ab₃ son inducidos por la presencia de Ab₂ y tiene capacidades de unión similares a las de Ab₁.^[40]

Una representación gráfica de la producción, uso y correlación de la VSG, los anticuerpos y las proteínas presentes en el parásito *T. evansi* se observa en la figura 8. Al infectar animales con VSG (color azul) se activa el sistema inmune y se crean anticuerpos α -VSG, estos últimos poseen idiotipos que constituyen el sitio de unión con el Ag, es decir con la VSG. Cuando el α -VSG (color morado) es inyectado en otro animal, los determinantes idiotípicos que forman parte del α -VSG, inducen la formación de anticuerpos α -Ids (color rojo), estos comparten motivos estructurales con la VSG de partida, según la teoría de la “Red Idiotípica” y es lo que permitiría la identificación de las proteínas del *T. evansi* que interaccionan con la VSG.

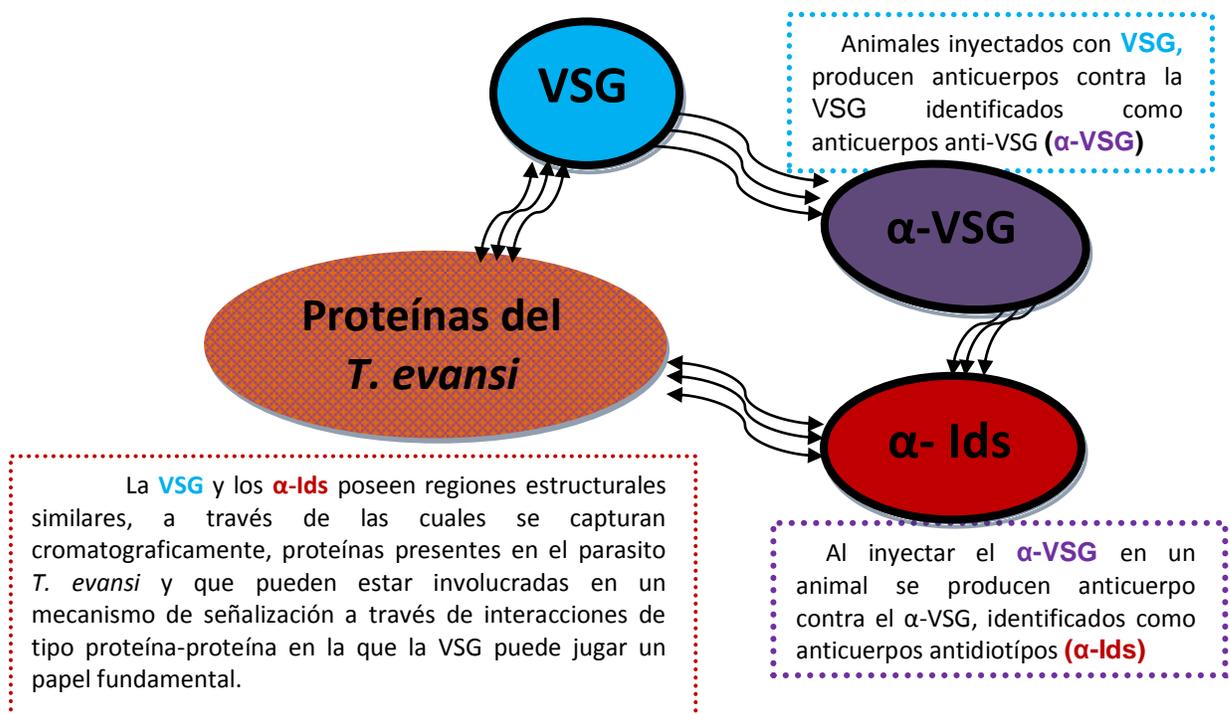


Figura 8: Representación gráfica de la obtención y uso de la VSG, los α -VSG y α -Ids.

Para efectos del presente trabajo de investigación, identificaremos como anticuerpos α -Ids de conejos, los anticuerpos obtenidos de la infección de conejos con el α -VSG proveniente de un ratón así como los anticuerpos α -Ids obtenidos de un conejo infectado con el α -VSG proveniente de otro conejo, por su parte, llamaremos α -

Ids de ratón, los anticuerpos obtenidos de un ratón inyectado con α -VSG proveniente de un conejo o en sus efectos los α -Ids provenientes de un ratón previamente infectado con α -VSG proveniente de otro ratón.

ANTECEDENTES

Experimentos realizados por Mendoza et al.,^[1] que consistieron en incubar *T. evansi* con anticuerpos específicos anti-VSG (α -VSG) producidos en líquido ascítico de ratones en presencia de Ca^{2+} extracelular, dieron como resultado un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular del parásito, efecto que no se observó al repetir el experimento empleando los mismos anticuerpos α -VSG previamente incubado con VSG purificada. Al lavar estos parásitos y nuevamente incubarlos con α -VSG, la concentración de Ca^{2+} intracelular varió en proporción similar a lo observado en el primer experimento descrito. En la figura 9 se muestra una representación gráfica de los resultados obtenidos en estos experimentos.

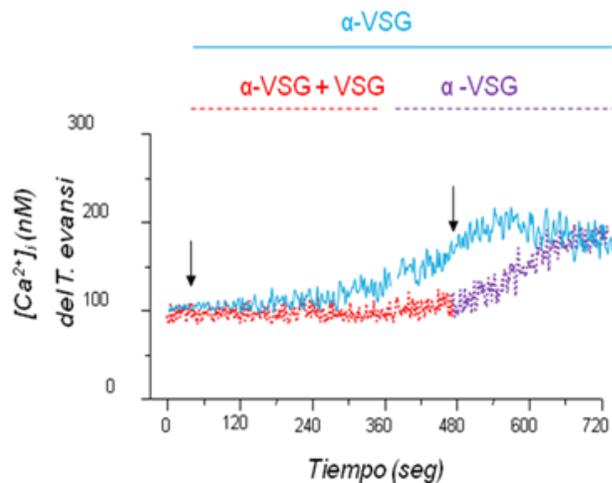


Figura 9: Variación de la concentración de Ca^{2+} intracelular en *T. evansi* tratados con α -VSG en diferentes condiciones. La línea azul oscilante muestra el aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular en parásitos *T. evansi* incubados con α -VSG puro. La línea roja inferior representa la variación de Ca^{2+} intracelular en parásitos *T. evansi* tratados con α -VSG previamente incubado con VSG, en este caso no hubo variación de Ca^{2+} en los parásitos. Al lavar esta misma tanda de parásitos con solución amortiguadora y nuevamente ponerlos en contacto con α -VSG esta vez puro, se produjo un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular de los parásitos, este último paso fue representado con la línea oscilante de color morado.

Por otra parte, cuando los parásitos fueron incubados con anticuerpos no relacionados (anti-subunidad y de la transducina bovina) no se observó ningún efecto sobre los parámetros evaluados. Probablemente, la asociación de los anticuerpos específicos contra las VSG presentes en la superficie del parásito promovió una señal de Ca^{2+} involucrada en la respuesta de *T. evansi* contra el sistema inmune del hospedador. Por consiguiente, la VSG a través de procesos de interacción proteína-proteína, puede estar relacionada con mecanismos de señalización desencadenados durante la interacción parásito-hospedador que involucran la participación de calcio, el cual es un importante segundo mensajero que transmite información dentro de la célula y coordina procesos celulares.^[1;26]

Durante el trabajo de investigación de Carrasquel^[27] se generaron anticuerpos específicos contra la VSGs y la VSGm del aislado TEVA 1 de *T. evansi*. Estos anticuerpos fueron purificados cromatográficamente y empleados para preparar los anticuerpos α -Ids de conejo y α -Ids de ratón utilizados para formar los soportes cromatográficos con los que se purificaron las proteínas que interaccionaron con la VSG y cuyas masas moleculares fueron de 100, 80, 76, 72, 64, 62, 61, 60, 55 y 51 KDa. A continuación en el panel A y B de la figura 10, se observan los geles de electroforesis bidimensional realizados a las muestras obtenidas durante dichas purificaciones cromatográficas y que dieron a conocer la masas moleculares de las bandas polipeptídicas señaladas como L₂₇, L₂₅, L₂₀, L₂₁, L₂₃, L₂₄, L₁₉, L₂₆, L₂₂ y L₂₈, correspondientes a las masas moleculares nombradas anteriormente en el mismo orden.

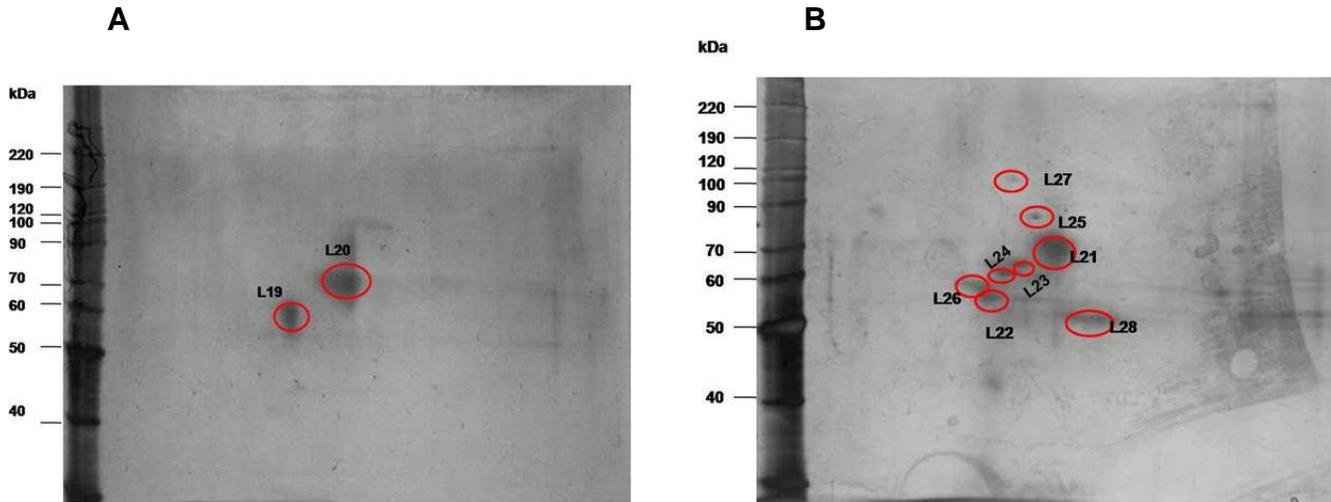


Figura 10: Electroforesis 2D de las proteínas purificadas con los Acs anti-Ids acoplados a una resina de sefarosa. Electroforesis bidimensional y tinción con plata de las proteínas purificadas con los Acs α -Ids preparados en conejo (A) y con los Acs α -Ids preparados en ratón (B).

Los análisis de espectrometría de masa, realizados a las proteínas purificadas por la Dra Carrasquel, demostraron que algunas de estas proteínas presentaban homología con las reportadas en la base de datos de otros tripanosomas tales como el *T. brucei*, *T. cruzi*, *T. vivax* y *T. congolense*. Tal es el caso de la proteína de choque térmico Hsp70 identificada como la banda L₂₅, las proteínas ESAG6 y ESAG7 (genes de expresión de sitios asociados 6 y 7), las cuales constituyen el receptor de transferrina, a partir de la banda L₂₂, una bomba de protones V-ATPasa a partir de la banda L₂₁, una proteína homologa a la glicosilfosfatidil inositol (GPI)-transamidasa a partir de la banda identificada como L₂₁, entre otras.

Posiblemente las interacciones desencadenadas entre la VSG y las proteínas presentes en el parásito, generan esa variación de Ca^{2+} intracelular en el parásito como respuesta a un posible mecanismo de señalización que se activa una vez detectada la respuesta inmune del hospedador. A fin de continuar los estudios que den pie a dilucidar los mecanismos de señalización en los que posiblemente está

involucrada la VSG, en este trabajo de investigación se pretende aislar las proteínas que interaccionan con la VSG por cromatografía de afinidad empleando resinas a las cuales se les acopló directamente la VSG de forma covalente. Debido a que aún no se tiene información acerca de la región de la VSG involucrada en estas interacciones, resulta interesante realizar experimentos en presencia de la VSGs (proteína que carece del GPI) y en presencia de la VSGm (proteína que posee el GPI en su estructura) para conocer si el GPI es necesario para que sucedan estas interacciones con la VSG.

OBJETIVO GENERAL

Identificar las proteínas que interactúan con la glicoproteína variante de superficie del *Trypanosoma evansi*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Expandir el aislado TEVA 1 de *Trypanosoma evansi* en ratas de experimentación.
- 2.- Purificar a homogeneidad la VSG del aislado TEVA 1 de *Trypanosoma evansi* por métodos cromatográficos tanto en su forma soluble (VSGs) como su forma membranal (VSGm).
- 3.-Acoplar ambas formas purificadas de la VSG a resinas para ser utilizada como soportes de cromatografía de afinidad en la adsorción de proteínas que interactúan con la VSG.
- 4.- Purificar las proteínas adsorbidas a la resina de afinidad e identificar los pesos moleculares aparentes mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, bajo condiciones desnaturalizantes.

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

MATERIALES Y EQUIPOS:

Reactivos empleados en la metodología experimental:

Reactivo	Casa comercial
Marcador Estándar de Masa molecular de Proteínas	Invitrogen
Marcador Estándar de Masa molecular pre-teñido	Invitrogen
Acrilamida	Bio-Rad
Anti-Mouse IgG	Bio-Rad
N,N' metilenbisacrilamida	Bio-Rad
Immunoaffinity Supports Affi-gel 10	Bio-Rad
Azul de nitrotetrazolio (NBT)	Bio-Rad
5-bromo, 4.cloro, 3-indolilfosfato (BCIP)	Bio-Rad
Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA)	Sigma
Dietilaminoetil Celulosa (DEAE)	Sigma
Tris	Sigma
Clorhidrato de Benzamidina	Sigma
Iodoacetamida	Sigma
[trans-epoxysuccinil-L-leucilamido-(4-guanidino)butano] (E-64)	Sigma
Dietilaminoetil-Sephacell (DEAE-Sephacell)	Sigma
Carboximetil-Celulosa (CMC)	Sigma
Benzamidina	Sigma
N- α -p-tosil-L-lisina clorometilcetona(TLCK)	sigma

Reactivo	Casa comercial
n-octil- β -glucopiranosido	Sigma
Tetrametiletilendiamina (TEMED)	USB Organics
Azul de Coomassie R-250	USB Organics
Rojo de Ponceau-S	USB Organics
Tween-20	USB-Organics
Glicina	USB Organics
Fenilmetilsulfonil Fluoruro (PMSF)	USB Organics
Dextrosa	Fisher Scientific
Resina de Sepharosa activada con CNBr	GE Healthcare
Ácido (4-(2-hidroxietil)-1- Piperazinaetanosulfónico (HEPES)	Research organic
Membranas de Nitrocelulosa de 0,45 μ m	Advantec

Equipos empleados en la metodología experimental:

Equipo	Marca	Modelo
Colector de Fracciones	Waters	III
Fuente de Poder para Electroforesis	C.B.S. Scientific	
Cámara de Electroforesis	Owl Scientific	
Cámara de Electrotransferencia semiseca	Owl Scientific	
Disruptor Ultrasónico	Fisher Scientific	FS-60
Ultracentrífuga Refrigerada	DuPont	Sorvall RT6000B
Espectrofotómetro UV	Beckman	DU-640
Espectrofotómetro UV con celda de flujo	Pharmacia	II
Congelador de -80°C	Sin	
Centrífuga Refrigerada	Eppendorf	5810R
Lector de Placas de 96 pocillos	Biotek	

Soluciones utilizadas en la metodología experimental.

Soluciones	Componentes
PBS	74 mM NaCl, 95mM Na ₂ HPO ₄ , 5 mM NaH ₂ PO ₄ .
PBSG	Es la dilución de PBS en agua con una proporción 1:3 suplementado la solución final con 1% de glucosa.
Solución A	5mM HEPES pH 7.2, 1 mM de benzamidina, 1 mM de PMSF, 5 mM EDTA, 1 mM iodoacetamida.
Solución B	50 mM HEPES pH 7, 1 mM iodoacetamida, 5 mM EDTA.
Solución C	PBS, 2mM TLCK, 1Mm PMSF, 1mM benzamidina, 1mM iodoacetamida, 5 mM EDTA, 10 mM p-CMBS.
Solución D	10 mM ácido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinaetanosulfónico (HEPES-NaOH, pH 6.9), 1 mM TLCK, 1 mM PMSF, 2% n-octil-β-glucopiranosido.
Solución E	50 mM HEPES pH 7, 1 mM iodoacetamida, 5 mM p-CMBS, 0.2% n-octil-β-glucopiranosido, 5 mM EDTA.
Solución F	25 mM Tris, 6 % p/v glicerol, 6% p/v SDS, 6% v/v 2-mercaptoetanol y 0.01% azul de bromofenol.
Solución G	0.5 mg/mL de azul de nitrotetrazolio (NBT) (0.5 mg/mL) y 0.25 mg/mL de 5-bromo, 4.cloro, 3-indolilfosfato (BCIP) disueltos en solución AP.
Solución colorante	0,25% azul de Coomasie R-250, 25% isopropanol, 10% ácido acético glacial.
Solución decolorante	25% isopropanol, 10% ácido acético glacial.
Solución H	67mg de Tris-base por cada 20mL de glicina.
Solución de Corrida	25 mM Tris pH 8.3, 192 mM glicina y 0,1% SDS.
Solución de Transferencia	25 mM Tris-HCl (pH 8.3), 192 mM glicina y 20% metanol

Soluciones	Componentes
Solución colorante Rojo de Ponceau S	0,2 % p/v de rojo ponceau S, 30 % p/v ácido 5-sulfosalicilico, 30 % p/v ácido tricloroacético.
Solución TBST	50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 % Tween 20.
Solución AP	100 mM Tris pH 9.5, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl ₂ .
Solución HEPES	50mM HEPES
Solución Glicina-HCl	100mM glicina, 1M HCl pH 2,8.
Acrilamida Mix	29% acrilamida, 0.8% N,N-metilenbisacrilamida.

Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)

La técnica de electroforesis se basa en aprovechar la capacidad que poseen las proteínas de migrar según su masa molecular a través de geles de poliacrilamida, luego de haber sido sometidas a la acción del detergente aniónico dodecil sulfato de sodio (SDS), el cual es un agente desnaturizante que le imparte una alta densidad de carga negativa a todas las proteínas por igual. Al someter a una mezcla de proteínas desplegadas y cargadas negativamente a una diferencia de potencial en un gel, se logran separar y distinguir unas de otras debido a que, aquellas que posean mayor masa molecular, migran a una menor distancia en la corrida electroforética, en comparación a aquellas que posean una menor masa molecular, ya que se dificulta su paso por los poros del gel. Para conocer la masa molecular de una proteína incógnita se debe realizar un simple cálculo que involucra relacionar las distancias recorridas por las bandas de las proteínas marcadores de masa molecular conocida, y la distancia que recorrió la banda polipeptídica de interés. La electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) se utilizó para evaluar la pureza de las proteínas purificadas e identificar la masa molecular aparente de las proteínas desconocidas. A continuación se presenta una descripción generalizada de cómo se llevaron a cabo los análisis de SDS-PAGE en este trabajo de investigación, según la metodología detallada por Laemmli.^[30]

El porcentaje de poliacrilamida para los geles preparados dependió del tamaño de las proteínas a separar. La estructura física de los geles está compuesta por dos capas principales, la primera capa llamada gel de corrida el cual permite separar las proteínas según su tamaño y la segunda el gel de apilamiento, que se emplea para formar los bolsillos donde se inyecta la muestra a estudiar.

La muestra de proteínas fue mezclada con una solución F compuesta por 25 mM Tris, 6% p/v glicerol, 6% p/v SDS, 6% v/v 2-mercaptoetanol y 0.01% azul de bromofenol. Esta mezcla se llevaba a cabo en una proporción 3:1 muestra de proteína-solución F, para lograr reducir los puentes disulfuros por acción del 2-mercaptoetanol contenido en la solución amortiguadora y el desplegamiento de la proteína por la acción del SDS. Luego de agitar y someter a ebullición la muestra durante 5 minutos para asegurar la reducción de los puentes disulfuros, se dejaba reposar y se sembraba en el gel de electroforesis, el cual debía estar previamente en una cámara, rodeado por solución de corrida compuesta por 25 mM Tris pH 8.3, 192 mM glicina y 0,1% SDS, tal y como se muestra en la figura 11.

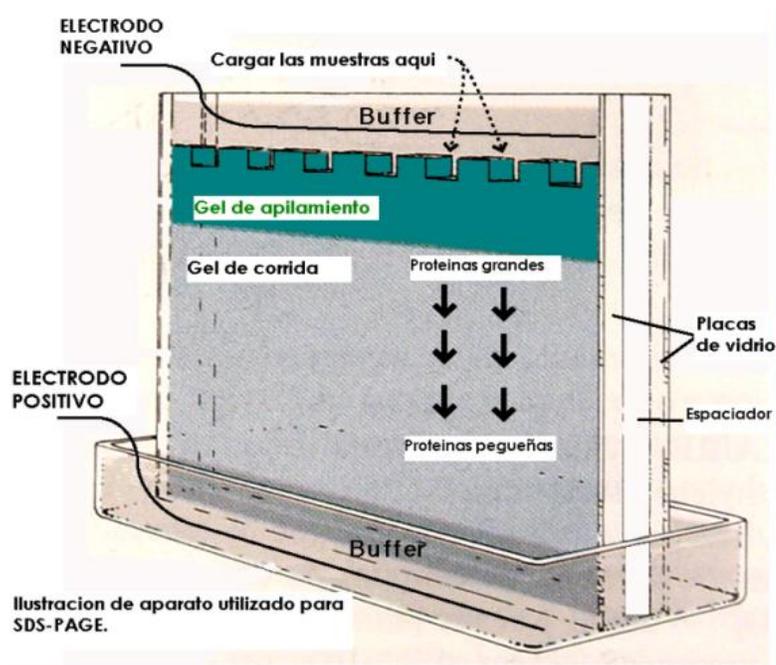


Figura11: Representación gráfica del sistema de SDS-PAGE.

La corrida electroforética se llevaba a cabo aplicando una corriente de 20mA mediante una fuente de poder, y se detenía cuando el frente de corrida llegaba al final del gel, luego se extraía el gel, el cual contenía las proteínas separadas, ya sea para colorearlo usando azul de Comassie o tinción de plata, o electrotransferirlo a una membrana de nitrocelulosa.

Análisis de inmunotinción o Western blot

El Western blot o inmunotinción, es una técnica analítica usada para detectar proteínas específicas en un muestra determinada.^[32] Luego de que las proteínas eran separadas por SDS-PAGE, el gel de electroforesis conteniendo las proteínas era equilibrado bajo agitación durante 10 min con una solución de transferencia compuesta por una mezcla de 25 mM Tris-HCl (pH 8.3), 192 mM glicina y 20% metanol. Paralelamente, se humedecían cuatro láminas de papel de filtro con la misma solución de transferencia, al igual que la membrana de nitrocelulosa con poros de 0,45 μ m. Todo debía estar previamente recortado a la medida del gel. En una cámara de transferencia se colocaban dos láminas de papel de filtro, encima de estas el gel de poliacrilamida que contiene las proteínas, seguido de la membrana de nitrocelulosa y finalmente el resto de las láminas de papel de filtro. La cámara de transferencia se cerraba y se aplicaban 400mA de corriente durante 75 min a fin de transferir las proteínas a la membrana de nitrocelulosa. En la figura 12 se muestra una fotografía de la cámara de transferencia empleada.



Figura 12: Representación fotográfica del sistema de electrotransferencia empleando una cámara semiseca.

Una vez transcurrido el tiempo, se extraía la membrana de nitrocelulosa y se teñía con solución colorante Rojo de Ponceau S para observar las bandas de las proteínas trasferidas, se lavaba con varios volúmenes de solución TBST para eliminar

el colorante y se incubaba durante 2 horas con 100mL de leche descremada al 5% disuelta en solución TBST para bloquear los sitios activos de la membrana. Seguidamente se lavaba en 3 ocasiones la membrana con solución TBST para retirar la leche descremada y se incubaba con el anticuerpo primario de interés durante no menos de 1 hora. Nuevamente se hacían los lavados con solución TBST y se incubaban con un anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina. Finalmente se revelaban las bandas presentes en la membrana, haciendo uso de la solución G la cual contenía los substratos precipitables NBT y BCIP en 100 mM Tris (pH 9.5), 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂. Una vez que se observaban las bandas polipeptídicas de interés en la membrana, se agregaba agua para detener la reacción, se decantaba el líquido y se dejaba secar la membrana a temperatura ambiente.

Las bandas que se observaban al final del ensayo serán aquellas proteínas reconocidas por los anticuerpos utilizados. Al igual que en una SDS-PAGE, para conocer la masa molecular de la proteína incógnita, se determinaba la distancia recorrida por dicha proteína y su masa molecular se calculaba a partir de un gráfico del logaritmo de las masas moleculares de las proteínas estándares empleadas como marcadores versus su distancia recorrida en el gel de poliácridamida.

Expansión y Purificación de *T. evansi*.

Los parásitos fueron expandidos a través de la infección de ratas albinas adultas (Sprague Dawley) con 6×10^5 parásitos del aislado venezolano TEVA 1. La composición del criopreservado empleado como material de partida para la infección era de 1:1 PBS: sangre de ratas con parásitos viables en 10% de DMSO. Una vez que se realizaba la infección de las ratas por vía intraperitoneal, estas eran monitoreadas diariamente mediante un examen directo al microscopio de la sangre extraída de la cola del animal. Cuando la parasitemia de las ratas alcanzaba alrededor de 100 parásitos por campo, se extraía la sangre a través de punción cardiaca, empleando 0.5M EDTA como anticoagulante.

Debido a que el *T. evansi* no posee carga superficial negativa a un rango de pH 7-9, las purificaciones de los tripanosomas se llevó a cabo mediante cromatografía de intercambio aniónico, usando una columna de DEAE-Celulosa como fase estacionaria, según la metodología descrita por Lanham y Godfrey.^[28] La sangre obtenida era centrifugada a 1475 g durante 10 minutos, luego de este paso eran descartados los glóbulos rojos y el plasma del animal infectado, y se utilizaba únicamente la capa blanca, la cual contenía los glóbulos blancos y los tripanosomas. Esta capa era resuspendida en PBSG a pH 8 y cargada a una columna de intercambio aniónico previamente equilibrada con 10 volúmenes de PBS y 3 volúmenes de PBSG, ambas soluciones a pH 8. De esta forma se eliminaban los glóbulos blancos y los restos de glóbulos rojos, ya que estos permanecían adheridos a la resina. Los tripanosomas eran eluidos a 4°C con PBSG en la fracción no adherida a la columna. Una vez culminado el procedimiento, se realizaba el conteo de parásitos empleando una cámara de Neubauer, y finalmente eran centrifugados a 1475 g durante 10 minutos a 4 °C y almacenados a -80 °C hasta su uso posterior.

Purificación de la VSGs y VSGm.

Para la obtención de la forma pura de la VSGs, se siguió el procedimiento descrito por Uzcanga et al.,^[29] el cual consistió en homogeneizar 10^9 tripanosomas en 4ml de una solución A compuesta por 5mM HEPES pH 7.2, 1 mM de benzamidina, 1 mM de PMSF, 5 mM EDTA, 1 mM iodoacetamida. Empleando un disruptor de ultrasonido, las suspensiones de parásitos fueron sometidas a 3 pulsos de 7 W a 4°C, con una duración de 30 segundos y con descansos de 30 segundos entre los pulsos. Los extractos fueron centrifugados a 15000 g durante 30 minutos a 4°C, para obtener los sobrenadantes y los sedimentos del *T. evansi*. Los sobrenadantes representaban la fracción soluble clarificada de *T. evansi*, la cual contenía la VSGs. Estas muestras fueron cargadas a un sistema de columnas de intercambio aniónico DEAE-Sephacell (DEAE-S) (30 ml) y catiónico Carboximetil-Celulosa (CM-C) (10 ml) conectadas en serie y previamente equilibradas con una solución B compuesta por 50 mM HEPES pH 7, 1 mM iodoacetamida, 5 mM EDTA.. Bajo estas condiciones se logró eluir la VSGs en las fracciones no adheridas a las columnas. Este procedimiento se monitoreó espectrofotométricamente a 280 nm empleando un espectrofotómetro UV con celda de flujo. Una vez purificada la proteína, era almacenada a -20 °C hasta su uso.

La metodología empleada para la purificación de la VSGm es una combinación de los protocolos descritos por Schell et al.,^[30] y Stijlemans et al.,^[31] con algunas modificaciones. Inicialmente se partió de una porción fresca de parásitos, es decir, parásitos no congelados, a fin de evitar la hidrólisis del grupo GPI de la VGS. Los parásitos fueron incubados durante 30 minutos a 4°C en 10mL solución C, compuesta por PBS, 2 mM TLCK, 1 mM PMSF, 1 mM Benzamidina, 1 mM Iodoacetamida, 5 mM EDTA, 10 mM p-CMBS, este último es un inhibidor de la GPI-PLC, enzima responsable de romper el anclaje GPI de la VSG. Luego de una centrifugación a 100000g durante 30 minutos a 4°C, el sedimento obtenido fue resuspendido en 10 mL de solución D, la cual contiene 10 mM ácido 4-(2-hidroxietil)-1-

piperazinaetanosulfónico (HEPES-NaOH, pH 6.9), 1 mM TLCK, 1 mM PMSF, 2% n-octil- β -glucopiranosido, y centrifugado a 100000 g durante 60 minutos a 4°C. La fracción sobrenadante contenía la VSGm, por lo que era cargada a un sistema de columnas de intercambio aniónico DEAE-S (30 ml) y catiónico CM-C (10 ml) conectadas en serie previamente equilibrada con solución E, la cual contiene el inhibidor de la GPI-PLC y detergente (50 mM HEPES pH 7, 1 mM iodoacetamida, 10 mM p-CMBS, 0.2% n-octil- β -glucopiranosido, 5 mM EDTA). Bajo estas condiciones se logró eluir la VSGm en la fracción no adherida a las columnas, la proteína purificada era almacenada a -20 °C hasta su uso. La pureza de las proteínas purificadas fue comprobada a través de SDS-PAGE al 12% de poliacrilamida de acuerdo a Laemmli.^[30]

Para la identificación de las proteínas obtenidas durante el proceso de purificación de las VSGs y VSGm, se realizaron análisis de inmunotinción empleando como anticuerpos primarios los anticuerpos policlonales anti-VSG (α -VSG), purificados por Carrasquel^[27] durante el desarrollo de su tesis doctoral. Una vez revelada las proteínas presentes en la membrana de nitrocelulosa, se debían observar las bandas características de cada proteína, es decir, 64 y 62 kDa en el caso de la VSGs y VSGm respectivamente.

Determinación de proteína.

La determinación de las cantidades de proteínas purificadas se llevó a cabo mediante el método de análisis de Bradford^[34], en el que se utilizó albúmina de suero bovino como proteína estándar para realizar la curva de calibración. Una vez realizadas las lecturas de absorbancia de la VSGs y la VSGm, a una longitud de onda de 595 nm se llevaba a cabo la determinación de la concentración de ambas proteínas a través de la interpolación de los valores dentro de la curva de calibración.

Acoplamiento de la VSGs o VSGm a la resina cromatográfica para formar el soporte VSG—resina.

Para la formación del soporte VSG—resina, utilizado para la purificación de las proteínas que interaccionan con la VSG, se seleccionó una resina de agarosa conocida como Affi-Gel 10 y una resina de sefarosa activada con CNBr. Ambas eran ideales para trabajar en amplios rangos de pH y acoplar ligandos que posean aminas primarias en su estructura. La razón por la cual se seleccionaron dos resinas para realizar los acoplamientos, fue para comparar y garantizar el uso de la resina más eficiente y que acople la mayor cantidad de la VSG bajo las condiciones de trabajo.

Para dar inicio a la formación de los soportes VSGs—agarosa (S1) y VSGs—sefarosa (S2), se tomaron 6 ml de la resina de agarosa y 1 g de la resina de sefarosa por separado y se lavaron en 5 ocasiones con 10 mL de H₂O, luego se lavaron con 10 mL de HEPES 50 mM pH 7 para equilibrarlas. Cuatro mililitros de resina de agarosa y de sefarosa equilibradas, fueron incubados con 24.77 mg y 23,64 mg de VSGs respectivamente, durante 24 h, a 4°C, bajo agitación constante. Una vez transcurrido el tiempo, se centrifugaron en tubos de 50 mL para extraer los sobrenadante y cuantificarlos a través del método de Bradford,^[34] estos correspondían a la VSGs no adherida a las resinas.

Una vez cumplido el procedimiento para formar los soportes S1 y S2, se realizaron ensayos de inmunotinción por separado, para avalar la efectividad del acoplamiento en cada caso y determinar cuál soporte se debía utilizar en los experimentos posteriores. Los ensayos consistían en incubar 200 µL de HEPES 50 mM con 100 µL de S1 y 100µL de S2 por separado, durante 1h a temperatura ambiente bajo agitación continua, esto con el fin de retirar la VSGs no adherida a la resina. Cincuenta µL de S1 y 50 µL de S2 fueron incubados con 100 µL de α-VSG durante 1 h a temperatura ambiente, los 50 µL restante de cada soporte fueron

resuspendidos en 100 μ L de HEPES 50 mM durante 1 h a temperatura ambiente, con el fin de ser usados como controles negativos en los mismos ensayos, debido a que no se pusieron en contacto con α -VSG.

Tras varios lavados con HEPES 50 mM, para extraer y desechar el α -VSG que no interaccionó con S1 y S2, se les agregó 100 μ L de solución F compuesta por 25 mM Tris, 6% p/v glicerol, 6% p/v SDS, 6% v/v 2-mercaptoetanol y 0.01% azul de bromofenol, para desprender por acción del SDS y el 2-mercaptoetanol, el anticuerpo α -VSG que se unió específicamente a la VSGs presente en la resina. El sobrenadante fue analizado por inmunotinción en dos ocasiones, haciendo uso de anticuerpos anti-inmunoglobulina de conejo (α -IgG de conejo) como anticuerpo primario en el primer análisis, y α -VSG como anticuerpo primario en el segundo. Los controles, en los que la resina no fue incubada con α -VSG también fueron tratados con solución F.

Debido a que parte de la VSGs acoplada a la resina de agarosa se desprendía, esta resina fue descartada para formar los soportes de cromatografía de afinidad. Finalmente se llevó a cabo el procedimiento para formar un tercer soporte compuesto por la VSGm y la resina de sefarosa el cual llamaremos S3, bajo condiciones similares con las que se formo el soporte S2. En el caso de S3, la solución amortiguadora HEPES 50 mM pH 7, adicionalmente contenía 10 mM del inhibidor de la GPI-fosfolipasa C, p-CMBS y 0.2% del detergente n-octil- β -glucopiranosido. El soporte S3 también fue sometido a análisis de inmunotinción haciendo uso de los anticuerpos α -VSG como anticuerpos primarios.

Caracterización de las proteína adheridas a la cromatografía de afinidad empleando el soporte formado entre la VSG y la resina de sefarosa activada con CNBr.

Para dar inicio a la caracterización de las proteínas presentes en el *T. evansi* que interaccionan con la VSG, se homogenizaron 10^9 tripanosomas en 4 ml de solución A, con el uso de un disruptor de ultrasonido, seguidamente se centrifugó el extracto a 100000 g, para obtener el sobrenadante y el sedimento, los cuales representaron la fracción soluble (FS) y la fracción no soluble o particulada (FNS) del *T. evansi*.

La FS se hizo pasar directamente por un sistema de columnas de cromatografía de afinidad, la primera compuesta por el soporte S2 y la segunda por el soporte S3. Seguidamente, las columnas fueron lavadas con solución HEPES para eluir las proteínas que no fueron adheridas a S2 y S3, para evitar la hidrólisis de la VSGm acoplada al soporte S3 la solución HEPES contenía 10 mM del inhibidor de PLC-GPI (p-CMBS). Las proteínas que interaccionaron con los soportes se eluyeron utilizando 1 mL de solución Glicina-HCl pH 2. Las fracciones colectadas fueron neutralizadas con solución H, y a través de análisis SDS-PAGE se lograron determinar las masas moleculares aparentes de las proteínas aisladas a partir de la FS de *T. evansi*.

En el caso de la FNS, por ser el sedimento obtenido de la centrifugación del extracto de *T. evansi*, no se podía pasar directamente por el sistema de columnas de cromatografía, por tal razón, las proteínas contenidas en esta fracción fueron solubilizadas resuspendiendo la FNS en 15 mL de detergente 2% n-octil- β -glucopiranosido en solución HEPES. Luego de 12h de agitación continua a 4 °C la muestra fue centrifugada y el extracto soluble, el cual contenía las proteínas solubilizadas de la FNS, se hizo pasar por el sistema de columnas cuyos soportes eran S2 y S3 respectivamente. Para eluir las proteínas que no interaccionaron con los

soportes S2 y S3, se utilizó la solución HEPES. Durante el uso del soporte S3, la solución HEPES contenía 10 mM de p-CMBS para evitar la hidrólisis de la VSGm acoplada a la resina de sefarosa. Las proteínas adheridas a ambos soportes se eluyeron empleando 1 mL de solución Glicina-HCl pH 2 y se neutralizaron con solución H.

Se realizaron tres análisis de inmunotinción haciendo uso de tres anticuerpos primarios diferentes, que fueron los α -VSG, los α -Ids de conejo y los α -Ids de ratón respectivamente, con fin de determinar que bandas eran reconocidas por alguno de los anticuerpos utilizados, y comprar las bandas polipeptídicas con las obtenidos durante la investigación realizada por Carrasquel.^[27]

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Expansión y Purificación de *T. evansi*.

Para este trabajo de investigación se realizaron seis tandas de purificación de parásitos *T. evansi*. Cada una contaba con cuatro ratas adultas albinas las cuales fueron infectadas con aproximadamente 1×10^6 parásitos *T. evansi* del aislado venezolano TEVA 1. Una vez extraída la sangre de las ratas a través de una punción cardíaca, el fluido se sometía a múltiples centrifugaciones para eliminar los glóbulos rojos, la fase que contenía los parásitos era cargada en un sistema de cromatografía de intercambio aniónico obteniéndose un promedio de 1×10^{11} parásitos por cada tanda de purificación.

Purificación de las VSGs y VSGm.

Partiendo de 1×10^9 parásitos homogeneizados por acción de un disruptor de ultrasonido y haciendo uso de un sistema de cromatografía de intercambio iónico en el que las proteínas ácidas interaccionaban con el soporte DEAE-C y las proteínas básicas se quedaban adheridas al soporte CM-C por interacciones iónicas, se logró la purificación de la VSGs. La purificación de la VSGs fue monitoreada empleando un espectrofotómetro UV a una longitud de onda de 280 nm. En el panel A de la figura 13 se observa el perfil cromatográfico derivado de una de las purificaciones de la VSGs. Para obtener este perfil, se tomaron las medidas de absorbancia a cada dos fracciones durante la separación, y a través del pico cromatográfico que se observa en este perfil se pudo determinar que la mayor concentración de VSGs obtenida se encontraba en las fracciones 12, 13 y 14, lo cual se corrobora con los resultados de SDS-PAGE e inmunotinción que se muestran en el panel B y C de la figura 13, respectivamente.

En el gel de poliacrilamida al 12%, se observan las bandas de las proteínas contenidas en las fracciones 12,13 y 14 correspondientes a la purificación de VSGs, al comparar la distancia de migración de dichas bandas con las correspondientes al marcador de masa molecular que se encuentra en el carril 1 del mismo gel, se establece que la masa molecular aparente de la proteína purificada es de ~64kDa, lo cual concuerda con la masa molecular de la VSGs, reportada en los trabajos de Mendoza^[1] y Carrasquel.^[27] Así mismo a través del análisis de inmunotinción realizado a la proteína de 64kDa purificada en esta ocasión (figura 13C), se corroboró que se trataba de la VSGs, ya que se dio el reconocimiento de esta proteína por parte del anticuerpo α -VSG.

Para mostrar un aproximado del número de proteínas presentes en los extractos del parásito *T. evansi* y garantizar que el α -VSG solo reconocía a la VSGs se realizó la corrida electroforética de una muestra de homogenato de *T. evansi*, así como su correspondiente inmunotinción. Los resultados de estos análisis se pueden apreciar en el espacio identificado como "FS" en el gel de poliacrilamida y en "FS" de la membrana de nitrocelulosa de los paneles B y C de la figura 13, respectivamente. En el gel de electroforesis resalta la banda de 64 kDa entre el resto de las bandas polipéptidicas presentes en el mismo carril 10, mientras que en el análisis de inmunotinción es evidente el reconocimiento exclusivo de esa misma banda de 64 kDa, por parte del anticuerpo primario α -VSG en el homogenato.

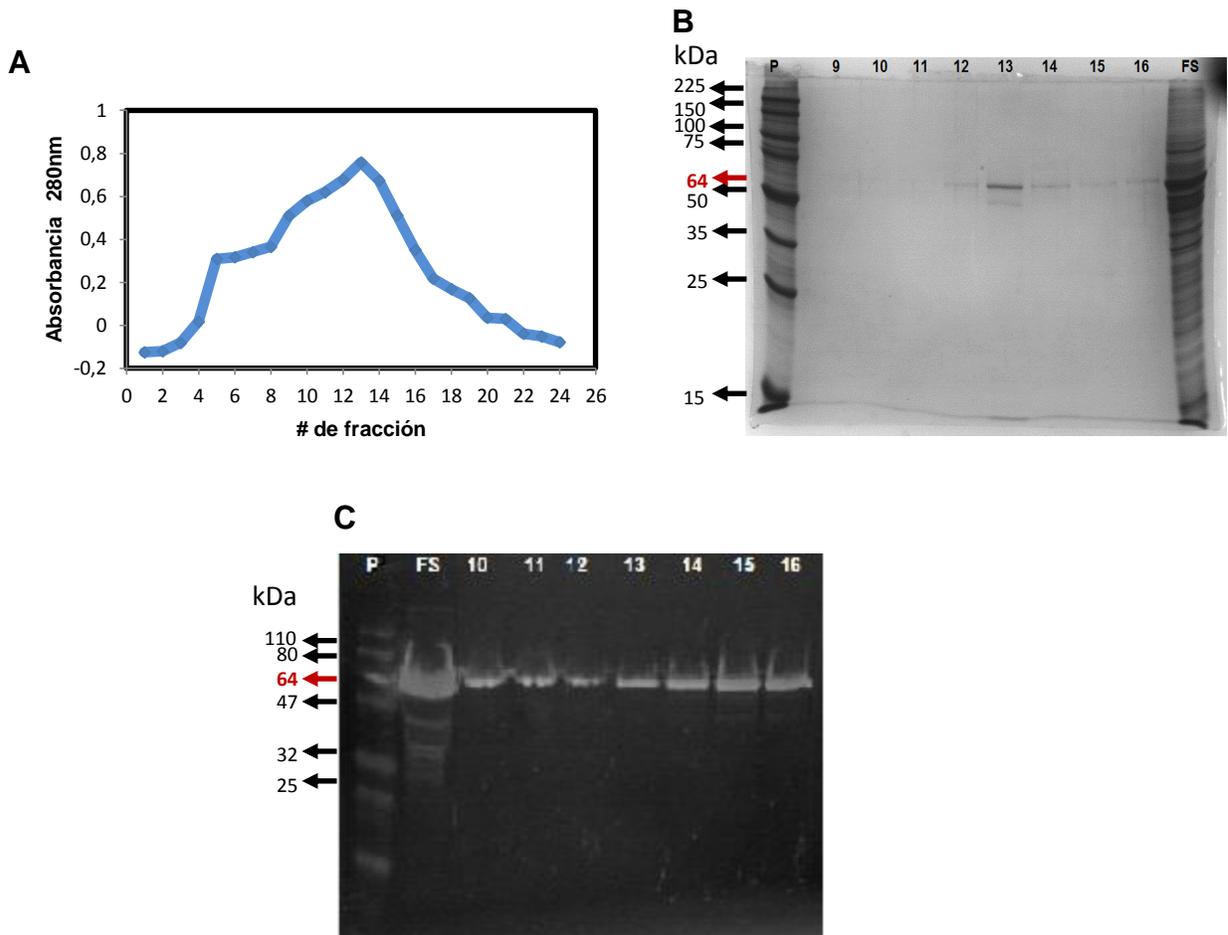


Figura 13: Monitoreo, purificación e identificación de VSGs; Panel A: Perfil cromatográfico de VSGs obtenido a través de vez de un espectrofotómetro UV a 280nm; **Panel B:** Gel de electroforesis de fracciones de VSGs purificada por cromatografía de intercambio iónico. En la parte superior del gel se colocaron los números de las fracciones de VSGs que se sembraron es esos espacios para realizar la corrida electroforética, el extremo izquierdo y derecho del gel contenían el marcador de masas molecular de proteínas y la fracción soluble clarificada de *T. evansi* respectivamente. La banda de 64KDa correspondiente a la VSGs contenida en las muestras de las fracciones 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16, se indica con una flecha de color rojo; **Panel C:** Membrana de nitrocelulosa resultante de los análisis de inmunotinción realizados a la proteína de VSGs purificada por cromatografía de intercambio iónico, en la parte superior de la membrana se enumeran las fracciones de VSGs que fueron utilizadas como muestra para llevar a cabo el análisis, en el primer carril se coloco el marcador de masas moleculares mientras que el segundo carril contenía la fracción soluble clarificada de *T. evansi*. La flecha roja indica la posición y masa molecular de la banda polipeptídica más relevantes, en este caso la banda de 64KDa correspondientes a la VSGs.

En el caso de la purificación de la VSGm se tomó en cuenta que no se puede partir de parásitos previamente congelados debido a que al congelar y descongelar el parásito se produce la ruptura de la membrana plasmática y la liberación de la enzima GPI-PLC, la cual promueve el rompimiento del anclaje GPI. Por tal razón, una vez purificada una tanda de parásitos, se procedió directamente a la purificación de la VSGm bajo un sistema similar a la purificación de la VSGs, tomando en cuenta que las soluciones utilizadas para homogeneizar los parásitos, y tratar los extractos del mismo, contenían un inhibidor de la GPI-PLC, el p-CMBS.

Los extractos producidos a partir de una tanda de parásitos fueron centrifugados a 100000 g con la finalidad de obtener la fracción particulada del *T. evansi* en el sedimento. Este último fue resuspendido en una solución E la cual contenía, 50 mM HEPES pH 7, 1 mM iodoacetamida, 5 mM p-CMBS, 0.2% n-octil- β -glucopiranosido, 5 mM EDTA, para solubilizar las proteínas presentes en esta fracción y cargarlas al sistema de cromatografía de intercambio iónico, en el que la VSGm fue eluida en la fracción no adsorbida a las columnas. El resto de las proteínas fueron adheridas a los soportes cromatográficos a través de interacciones aniónicas y catiónicas.

El perfil cromatográfico obtenido por el uso de un espectrofotómetro UV a 280nm durante la purificación de la VSGm se observa en el panel A de la figura 14. Según los picos cromatograficos que se observan en este perfil cromatográfico, las fracciones con mayor concentración de VSGm fueron la 10, 11, 12, 13 y 14, de hecho, este resultado es congruente con lo observado en el gel de electroforesis obtenido del análisis de SDS-PAGE, el cual se encuentra representado en el panel B de la figura 14. En el gel de electroforesis se observa una única banda polipeptídica de 62 KDa señalada con una flecha de color rojo, proveniente de las fracciones 10, 11, 12, 13 y 14 de la VSGm purificada en esta ocasión.

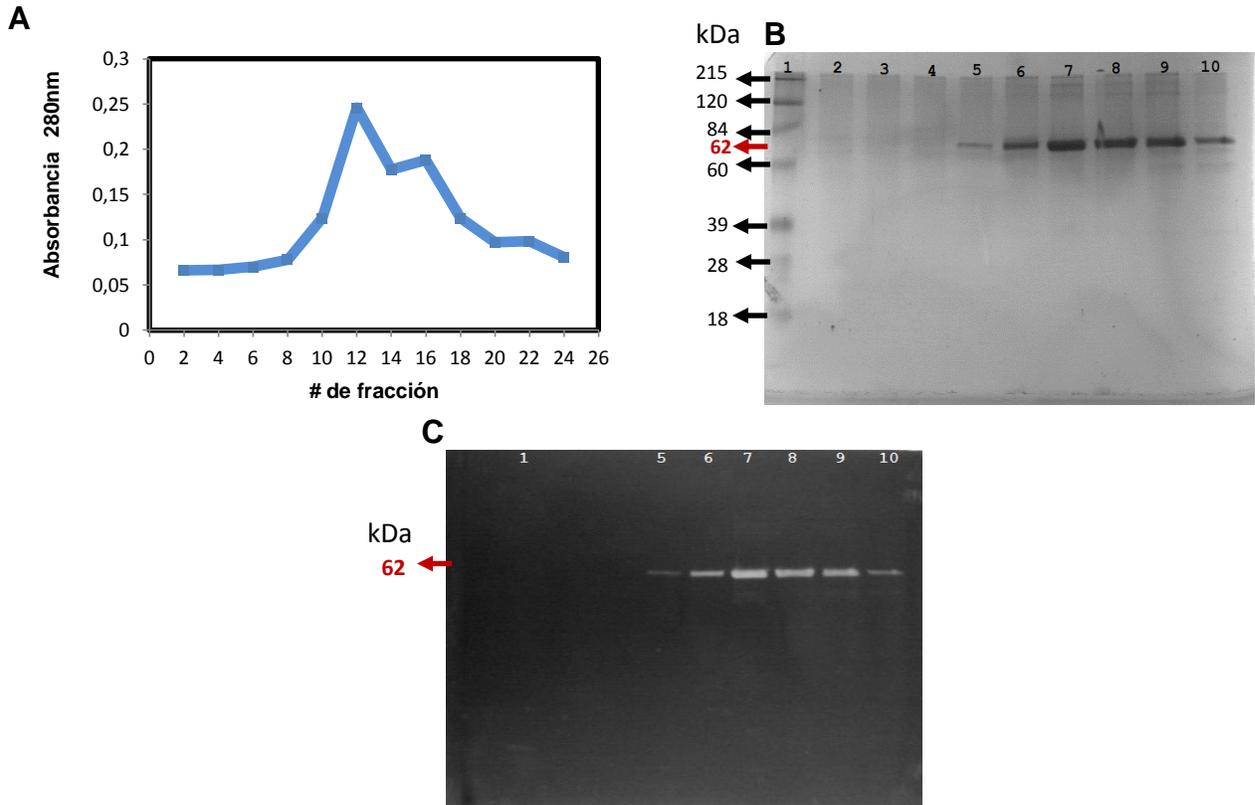


Figura 14: Monitoreo, purificación e identificación de VSGm. Panel A: Perfil cromatográfico de VSGm obtenido a través de vez de un espectrofotómetro UV a 280nm; **Panel B:** Gel de electroforesis de las fracciones de VSGm purificada por cromatografía de intercambio iónico. En la parte superior del gel se colocaron los números de las fracciones de VSGm que se sembraron es esos espacios para realizar la corrida electroforética, el extremo izquierdo del gel contenían el marcador de masas molecular de proteínas identificado como P. La banda de 62KDa correspondiente a la VSGm contenida en las muestras de las fracciones 10, 11, 12, 13, 14 y 15 se indica con una flecha de color rojo; **Panel C:** Membrana de nitrocelulosa resultante de los análisis de inmunotinción realizados a la proteína de VSGm purificada por cromatografía de intercambio iónico, en la parte superior de la membrana se enumeran las fracciones de VSGm que fueron utilizadas como muestra para llevar a cabo el análisis, en el primer carril se colocó el marcador estándar de La flecha roja indica la posición y masa molecular de la banda polipéptidicas más relevantes, en este caso la banda de 62KDa correspondientes a la VSGm identificada por el anticuerpo α -VSG.

El análisis de inmunotinción en el que se utilizó como anticuerpo primario el α -VSG, ratificó que la proteína purificada fue la VSGm al presentar reconocimiento de la banda de 62KDa señalada con una flecha de color rojo, en el panel C de la figura 14. Cabe destacar que el anticuerpo α -VSG no discrimina entre el reconocimiento de la VSGs y la VSGm, este simplemente interacciona con una región en común de ambas VSG lo cual permite el reconocimiento de las bandas polipeptídicas de 64 y 62 KDa en cada caso respectivamente. La diferencia entre ambas proteínas se evidencia en la masa molecular reflejada por cada una, en un gel de electroforesis tal y como se observa en el panel A de la figura 15 correspondiente a los resultados de análisis de SDS-PAGE. La Flecha **verde** resalta la banda polipeptidica de 64KDa correspondiente a la VSGs mientras que con **color rojo** sobresale la banda de 62KDa propia de la VSGm.

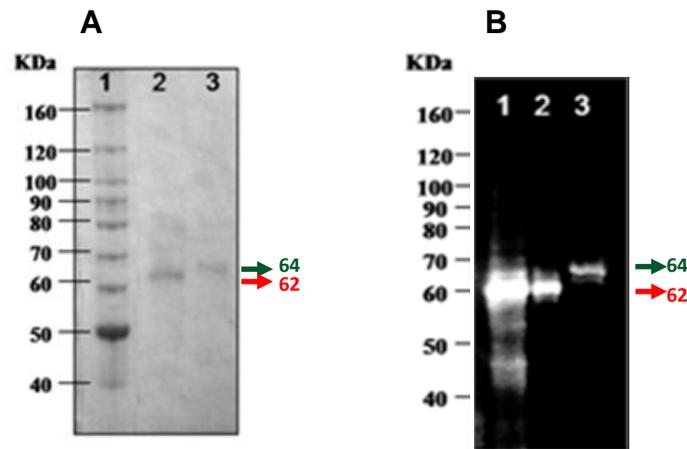


Figura 15: Comparación e identificación de la masa molecular de la VSGs y la VSGm. Panel A: Gel de electroforesis. La diferencia de masa molecular se hace evidente al comparar la flecha en **rojo** y **verde** correspondientes a la VSGm y VSGs respectivamente, con una diferencia de 2KDa entre si. En el primer carril del mismo gel se observa el marcador de masa molecular; **Panel B:** membrana de nitrocelulosa correspondiente al análisis de inmunotinción realizado con las muestras purificadas de VSGs y VSGm. Las bandas de 64 y 62 KDa reconocidas por el α -VSG utilizado como anticuerpo primario en este ensayo corresponden a la VSGs y VSGm respectivamente.

En el caso de la VSGm, era de esperarse que la presencia del grupo GPI proporcionara una mayor masa molecular, lo que se vería reflejado en una disminución de la distancia recorrida por la proteína. Sin embargo, al comparar la masa molecular de la VSGm y la VSGs (62 y 64 kDa respectivamente) en la figura 15, se refleja una diferencia de 2 kDa entre ellas, siendo la VSGs la proteína con la mayor masa molecular aparente, a pesar de no poseer el grupo GPI en su estructura. Este artefacto parece deberse a que la carga aniónica que aporta el GPI en la VSGm produce un reordenamiento estructural en la proteína lo cual la hace más compacta. Esto permite un desplazamiento de una mayor distancia por parte de la VSGm en el gel de poliacrilamida, proporcionándole una menor masa molecular aparente en comparación a la VSGs.

Determinación de proteína.

En la figura 16 se muestra una de las curvas de calibración obtenidas por el método de Bradford, para cuantificar las proteínas purificadas. Se realizaron dos purificaciones de VSGs obteniéndose 24,77 mg en la primera oportunidad y 23,63 mg en la segunda. De la purificación de la VSGm se obtuvo 8,44 mg de proteína. Cabe destacar que las cantidades de parásito que se utilizaron como punto de partida para purificar la VSGs y VSGm fueron las mismas. La razón por la cual se obtiene una menor concentración de VSGm durante la purificación a pesar de partir de cantidades iguales de parásitos, es que un porcentaje de la VSGm se puede solubilizar a pesar de estar en presencia del inhibidor de la enzima responsable de hidrolizar el anclaje GPI y por ello se pierde parcialmente durante la primera decantación de la muestra de los parásitos homogeneizados.

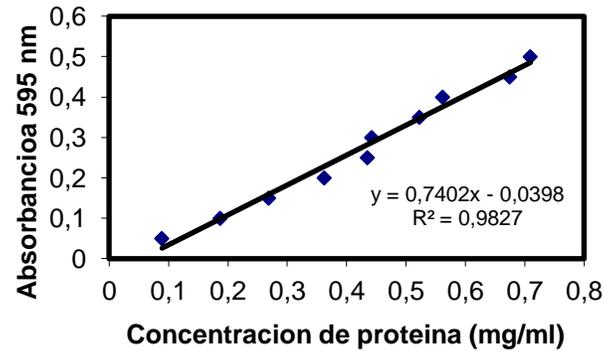


Figura 16: Curva de calibración empleada para la cuantificación de las proteínas VSGs y VSGm a través del método de Bradford

Acoplamiento de la VSG a las resinas cromatografica para forma los soportes S1, S2 y S3

Una vez efectuados los procedimientos descritos en la parte experimental para acoplar la VSGs a las resinas de agarosa y sefarosa para formar los soportes S1 y S2, se cuantificó la cantidad de VSGs restante a través del método de Bradford. Por medio de esta cuantificación se pudo determinar que las cantidades de VSGs acopladas a ambas resinas fueron 6,32 y 1,71 mg respectivamente. Según estos resultados, el soporte S1 compuesto por VSGs y la resina de agarosa, hubiese sido el ideal para llevar a cabo la cromatografía de afinidad en las que se purificarían las proteínas presentes en el *T. evansi* que posiblemente interaccionan con la VSGs, debido a la mayor cantidad de VSGs que se acopló al soporte S1 en comparación al soporte S2. Sin embargo, los análisis de inmunotinción realizados a las muestras obtenidas de los soporte S1 y S2, los cuales fueron incubados con α -VSG, constataron que parte de la VSGs que estaba unida al soporte S1 se desprendía tras cada lavado. Estos resultados se pueden observar en los paneles A y B de la figura 17.

Los anticuerpos primarios empleados en el primer y segundo análisis de inmunotinción en el que se demostraba la efectividad del soporte S1, fueron el α -IgG de conejo acoplado a fosfatasa alcalina y el α -VSG de conejo respectivamente. En los carriles 1 y 5 de ambas membranas de nitrocelulosa se observa una banda polipeptídica de 53 KDa característica de la cadena pesada del anticuerpo α -VSG. En el caso del carril 1 de ambas membranas de nitrocelulosa, la banda observada se debe a una muestra de α -VSG sembrada directamente en los geles de electroforesis, mientras que en el carril número 5, la banda de 53 KDa reconocida por el anticuerpo α -IgG de conejo, pertenece al anticuerpo α -VSG que interaccionó con la proteína VSGs contenida en el soporte S1. Este último resultado confirmó que en efecto un porcentaje de la VSGs incubada con la resina de agarosa fue acoplada covalentemente. Sin embargo, el reconocimiento de una banda de 64 KDa por parte del anticuerpo α -VSG en el carril 6 del gel, el cual corresponde a un lavado realizado como control negativo del soporte S1, evidenció que cierta cantidad de la VSGs acoplada a la resina de agarosa se podía desprender y no estaba unida covalentemente.

Debido a que la banda de 64 KDa producida por el desprendimiento de la VSGs del soporte S1, podía generar confusiones en la determinación de las masas moleculares de las proteínas de *T. evansi* que interaccionaban con la VSGs, se tomó la decisión de descartar este soporte y realizar los mismos ensayos de inmunotinción al soporte S2, para verificar si el acoplamiento de la VSGs había resultado más efectivo. Los resultados de estos ensayos se muestran en el panel A y B de la figura 18. Afortunadamente se comprobó que la VSGs no se desprendía del soporte S2. Tomando como base este resultado, se procedió a la formación del soporte S3 utilizando la misma resina de sefarosa activada con CNBr pero empleando, en esta ocasión, a la VSGm durante los pasos de acoplamiento.

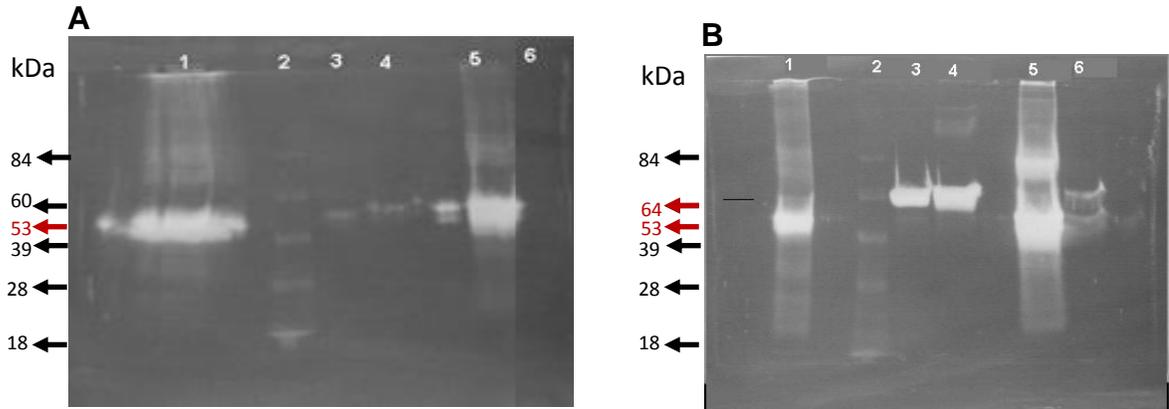


Figura 17: Ensayos de inmunotinción para garantizar la formación del soporte S1. Panel A: Membrana de nitrocelulosa incubada con el anticuerpo α -IgG de conejo. En el primer carril de la membrana de nitrocelulosa se observa la banda de 53 KDa perteneciente a la cadena pesada del α -VSG añadido como control. Las proteínas utilizadas como marcadores de masa molecular fueron agregadas en el carril 2. En el carril 3 y 4 se sembraron alícuotas de las muestras de VSGs y VSGm, respectivamente, con la finalidad de demostrar que el α -IgG de conejo solo reconoce las bandas provenientes del anticuerpo anti VSG. En el carril 5 se observa la banda de 53 KDa de la cadena pesada del α -VSG que interacciono con el soporte S1. En el carril 6 se colocó el control negativo, conteniendo una alícuota del soporte S1 que no se incubó con α -VSG. **Panel B:** Membrana de nitrocelulosa incubada con el anticuerpo α -VSG de conejo, las muestras contenidas en cada carril de esta membrana de nitrocelulosa fueron exactamente las mismas descritas en el ensayo anterior. En este caso el anticuerpo primario reconoció las bandas de 64 KDa en el carril 3, 4 correspondientes a la VSGs y VSGm colocadas al inicio del ensayo. En carril 6 también se reconoció la banda de 64 KDa generada por el desprendimiento de la VSGs del soporte S1.

Tal y como se observa en el panel B y D de la figura 18, no hubo reconocimiento de ninguna banda por parte del anticuerpo α -VSG, en los carriles número 6, que contenían muestras de los soportes S2 y S3 que no fueron incubados con α -VSG como control negativo. Estos resultados mostraron que la VSGs y la VSGm respectivamente, se acoplaron a la resina de sefarosa eficientemente ya que no hubo pérdidas de proteína tras cada lavado. Por esta razón, la resina seleccionada para

formar los soportes cromatográficos para la purificación de las proteínas presentes en los extractos de *T. evansi* fue la resina de sefarosa activada con CNBr.

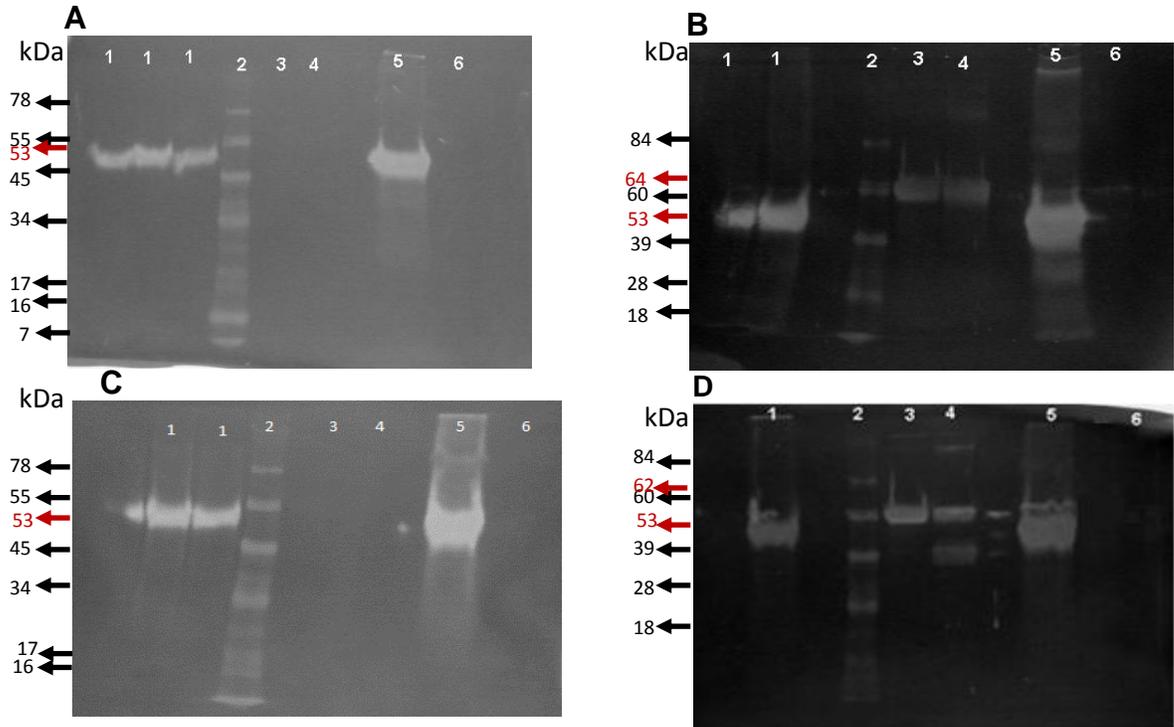


Figura 18: Ensayos de inmunotinción para garantizar la formación de los soporte S2 y S3. Panel A: Membrana de nitrocelulosa del ensayo de inmunotinción realizado al soporte S2 e incubada con el anticuerpo α -IgG de conejo. En el primer carril de la membrana de nitrocelulosa se observa la banda de 53 KDa perteneciente a la cadena pesada del α -VSG añadido como control. El carril 2 contiene los marcadores de masa molecular. En el carril 3 y 4 se encuentran las muestras de VSGs y VSGm, respectivamente. En el carril 5 se observa la banda de 53KDa de la cadena pesada del α -VSG que interaccionó con el soporte S2. En el carril 6 se colocó el control negativo del soporte S2 que no se incubó con el α -VSG; **Panel B:** Membrana de nitrocelulosa del ensayo de inmunotinción realizado al soporte S2 e incubada con el anticuerpo α -VSG de conejo, **Panel C:** Membrana de nitrocelulosa del ensayo de inmunotinción realizado al soporte S3 e incubada con el anticuerpo α -IgG de conejo; **Panel D:** Membrana de nitrocelulosa del ensayo de inmunotinción realizado al soporte S3 e incubada con el anticuerpo α -VSG de conejo. Los carriles en los paneles B, C y D contienen las mismas muestras descritas en el panel A.

Caracterización de proteínas purificadas por la cromatografía de afinidad.

Luego de llevar a cabo el protocolo correspondiente a la incubación de la FS y la FNS de *T. evansi* con los soportes S2 y S3, se realizaron análisis de Bradford para conocer la cantidad de proteína de cada fracción, que interaccionó con cada uno de los soportes. En el caso de la FS del *T. evansi*, la cantidad de proteína adherida al soporte S2 fue de 0,65 mg mientras que la cantidad de proteínas de la FNS que interaccionó con el mismo soporte fue de 0,44 mg. Por su parte, 1,01 mg de proteínas presentes en la FS de *T. evansi* se adhirieron a S3 y 0,96 mg de las proteínas de la FNS interaccionaron con el soporte S3.

La caracterización de las masas moleculares de las proteínas purificadas por cromatografía de afinidad, se llevó a cabo a través de SDS-PAGE al 8% de poliacrilamida. La figura 19 muestra el resultado de este análisis, y a continuación se hace una breve descripción del contenido de cada carril del gel de electroforesis, y de las bandas polipeptídicas obtenidas de cada fracción de *T. evansi* que interaccionó con los soportes S2 y S3.

El primer carril del gel de electroforesis contenía las proteínas estándares de masa molecular. En el segundo carril, se colocó una muestra de homogénato de *T. evansi* obtenida luego de la lisis de una tanda de parásito, el carril 3 contenía las proteínas purificadas con el soporte S2 a partir de la FS del *T. evansi*, obteniéndose bandas con masas moleculares aparentes de 90, 75, 64 y 55 KDa. En el carril 5 se encontraban las proteínas presentes en la FS de *T. evansi* purificadas haciendo uso del soporte S3, vale la pena recalcar que este soporte estaba compuesto por una resina de sefarosa acoplada a la VSGm, las masas moleculares de los polipéptidos obtenidos en esa ocasión fueron de 100, 90, 80 y 64 KDa.

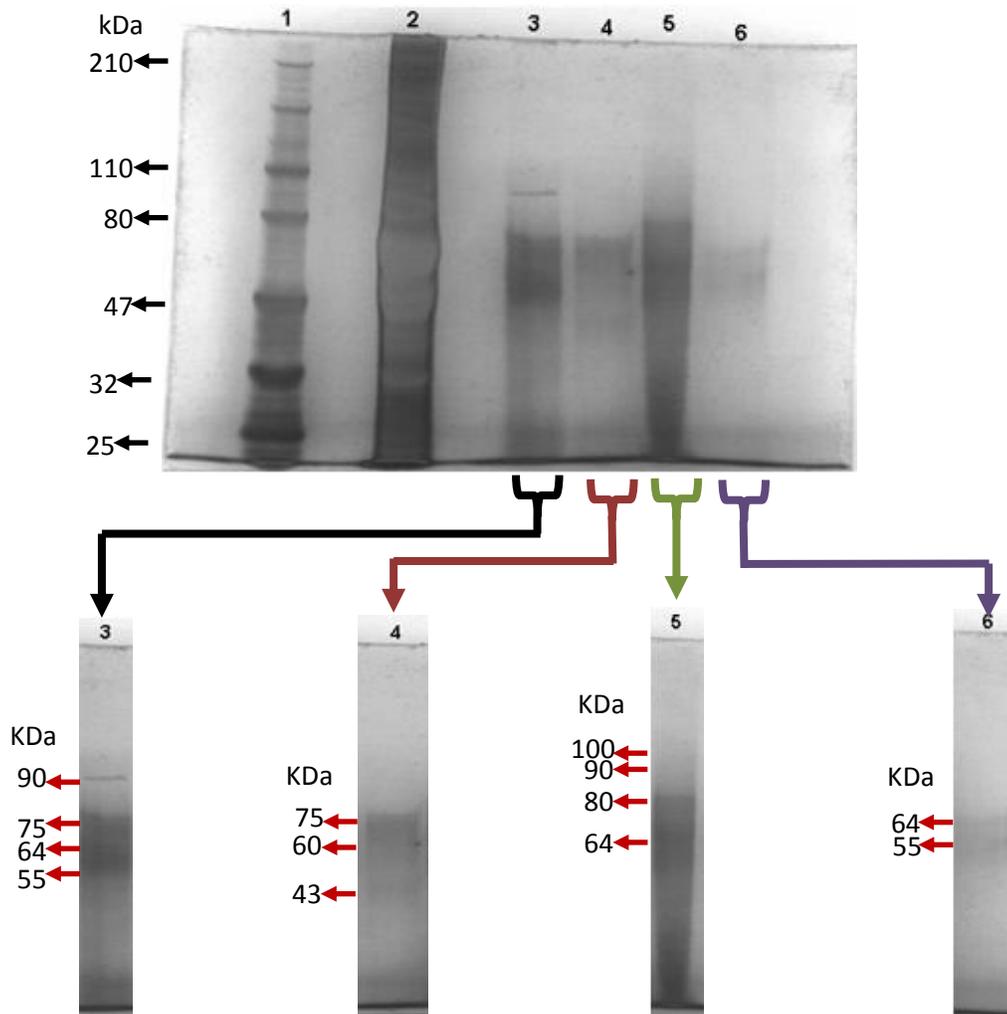


Figura 19: Proteínas de *T. evansi* que interactúan con la VSGs y VSGm de los soportes S2 y S3. Carril 1: Marcador de masa molecular, Carril 2: Homogénato de *T. evansi*, Carril 3: Proteínas de la FS que interactuaron con el soporte S2, Carril 4: proteínas de la FNS que se adhirieron al soporte S2, Carril 5: proteínas de la FS que se unieron al soporte S3, Carril 6: proteínas de la FNS que interactuaron con el soporte S3.

En los carriles 4 y 6 se observan las bandas polipeptídicas de las proteínas inicialmente contenidas en la FNS del *T. evansi* y que fueron extraídas a través del uso de los soportes S2 y S3 respectivamente, durante la cromatografía de afinidad. En el

carril 4 se lograron observar 3 bandas polipeptídicas cuyas masas moleculares fueron 75, 60 y 43 kDa, en el carril 6 se observan dos bandas de 64 y 55 kDa. Posiblemente las bandas de 64 kDa que se logran distinguir en las eluciones de las diferentes fracciones de *T. evansi* correspondan a la VSG de parásito, ya que esta proteína tiene la característica de formar homodímeros, es decir, la VSG acoplada a los soportes cromatográficos es capaz de capturar a la VSG contenida en las fracciones solubles y no solubles del *T. evansi*. De hecho en los análisis de inmunotinción realizados posteriormente en este trabajo de investigación y cuyas membranas de nitrocelulosa se observan en la figura 20, fueron reconocidas las bandas polipeptídicas de 64 kDa por parte del anticuerpo primario α -VSG (panel A). En esta misma membrana se observan bandas polipeptídicas de masa molecular 40 kDa reconocidas por el anticuerpo α -VSG las cuales se indican con una flecha de color rojo. Dado que el anticuerpo α -VSG, reconoce únicamente a la VSG, estas bandas polipeptídicas deben corresponder a productos proteolíticos de la VSG, la cual tiende a degradarse a medida que pasa el tiempo. Sin embargo, los epítomos en común con el anticuerpo se mantienen en su estructura, y es lo que permite que se lleve a cabo el reconocimiento por parte del anticuerpo α -VSG.

En cuanto a las diferentes proteínas purificadas con los soportes S2 y S3, es necesario destacar que la presencia del grupo GPI en la molécula de VSGm permitió la captura de dos proteínas de masas moleculares 100 y 80 kDa que no se lograron purificar haciendo uso de soporte S2, compuesto por la VSGs acoplada a la resina de sefarosa. Lo que da a entender, que efectivamente el grupo GPI es lo que permite la interacción de al menos dos proteínas presentes en el *T. evansi* con la VSG del mismo parásito, Por su parte, a través del uso del soporte S2 se logró la captura de dos proteínas cuyas masas moleculares fueron 75 y 43 kDa, que no se obtuvieron empleando el soporte S3, posiblemente sitios activos de la VSG con los que son capaces de interactuar estas proteínas, se encontraban obstruidos por la presencia del anclaje GPI cuando la VSG se encuentra en su forma de membrana (VSGm), lo

cual posiblemente impide la purificación de estas proteínas a través del uso del soporte S3. Sin lugar a duda queda claro que la ausencia o la presencia del GPI juega un papel fundamental en la interacción de la VSG con otras proteínas del parásito *T. evansi*.

Adicionalmente, ensayos de inmunotinción en los que se utilizaron los anticuerpos anti-idiotípicos (α -Ids), dieron como resultado el reconocimiento de múltiples bandas polipeptídicas de masas moleculares aparentes de 98, 80, 64, 55, 50, 45 y 36 KDa, que se lograron distinguir en las membranas del panel B y C de la figura 20. La banda de 64 KDa reconocida en ambas membranas de nitrocelulosa podría tratarse de la VSG de *T. evansi* la cual interacciona con VSG que son parte de los soportes de afinidad, para formar dímeros. Al comparar las masas moleculares de las bandas polipeptídicas obtenidas en este trabajo de tesis con las identificadas por Carrasquel^[27] en su trabajo doctoral, se pudieran generar hipótesis respecto a la identidad de algunas de las bandas.

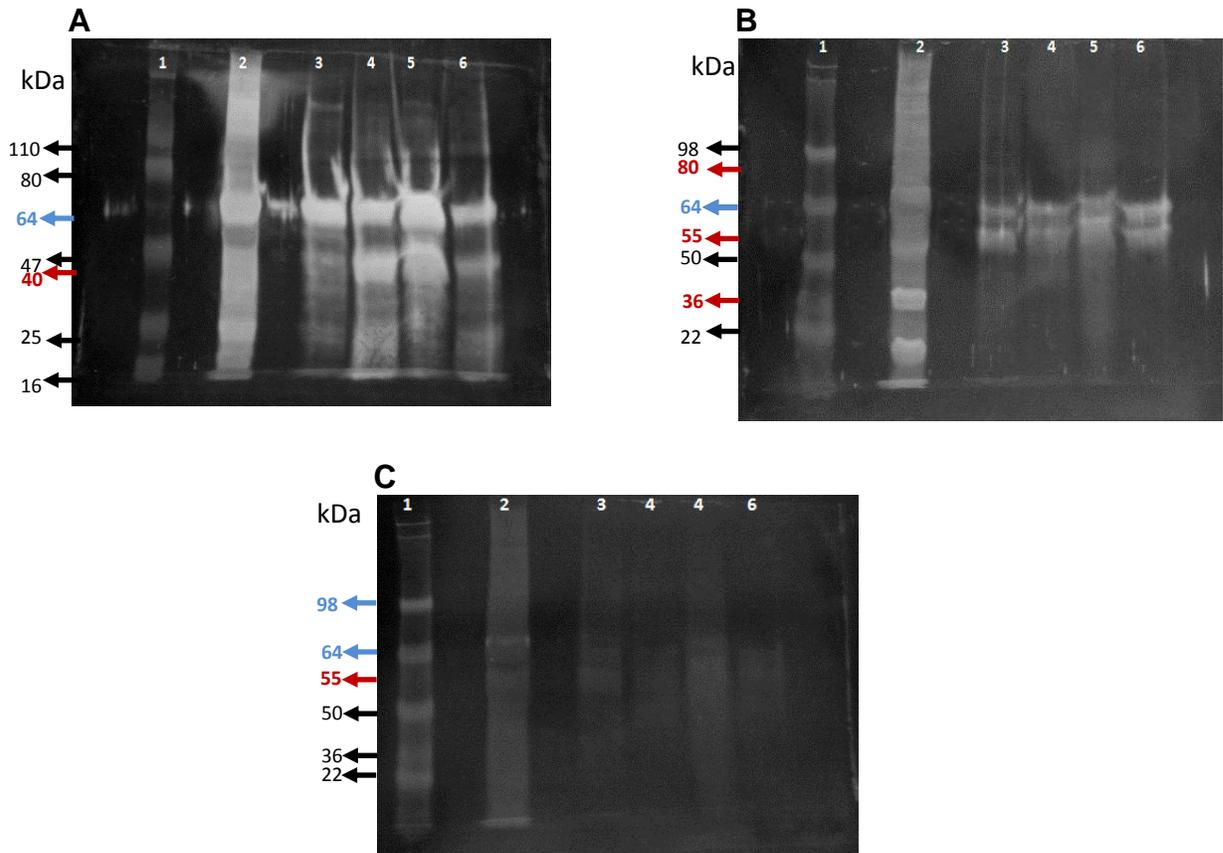


Figura 20: Ensayos de inmunotinción de las proteínas purificadas de la FS y FNS del *T. evansi*.

Carril 1: marcadores de masas moleculares, Carril 2: Homogénato de *T. evansi*, Carril 3: proteínas de la FS eluidas con el uso del soporte S2, Carril 4: proteínas de la FNS que se adherieron al soporte S2, Carril 5: proteínas de la FS que se unieron al soporte S3, Carril 6: proteínas de la FNS que enlazaron al soporte S3.

Panel A: Membrana de nitro celulosa incubada con α -VSG como anticuerpo primario.

Panel B: Membrana de nitro celulosa incubada con α -Ids de conejo como anticuerpo primario.

Panel C: Membrana de nitro incubada con α -Ids de ratón como anticuerpo primario. Las flechas de color **negro** indican la posición y masa de las proteínas correspondientes a los marcadores de masa molecular ubicados, en el primer carril de todas las membranas de nitrocelulosa. Las flechas de color **rojo** ubican las posiciones y masas de las proteínas purificadas a través de la cromatografía de afinidad y reconocidas por los anticuerpos primarios de cada caso. Algunas de las masa moleculares de las bandas polipéptidicas purificadas coinciden con las correspondientes al marcador de masas moleculares, por lo que se utilizaron flechas de color **azul** para resaltar estas bandas y evitar confusiones.

DISCUSIÓN

Este trabajo de investigación tuvo como finalidad principal la purificación de proteínas que interaccionan con la glicoproteína variante de superficie (VSG) del *T. evansi*, lo cual darán pie a futuras investigaciones en las que se confirmen si estas proteínas juegan un papel relevante en los cambios de superficie del parásito que permiten evadir la respuesta inmune del hospedador, a través de mecanismos de señalización celular mediados por Ca^{2+} .

Luego de la proliferación y purificación del *T. evansi*, seguido de la obtención de la VSGs y VSGm por métodos cromatográficos, se realizaron análisis de SDS-PAGE en los que se caracterizaron ambas proteínas a través de sus masas moleculares, las cuales fueron 64 y 62 kDa respectivamente. Lo interesante de esta diferencia de masas es que la VSGs refleja una mayor masa que su homóloga la VSGm, a pesar de que esta última posee el GPI como parte de su estructura, lo cual debería aumentar su masa. Sin embargo, el rearrreglo estructural que sufre la VSGm por la presencia del GPI, ocasiona constricción en su extremo carboxi-terminal que permite un mayor desplazamiento en los geles de poliacrilamida traduciéndose a una menor masa molecular aparente. Por otra parte, una desventaja que se presenta para llevar a cabo la purificación de la VSGm, es que una vez que se produce la ruptura de los parásitos por el uso de un disruptor de ultrasonido o mediante el congelamiento y descongelamiento, la VSG tiende a solubilizarse al desprenderse de la membrana del parásito *T. evansi* por el rompimiento del enlace fosfodiéster presente en la estructura GPI-PLC la VSG. Aún en presencia de un inhibidor de la GPI-PLC el rendimiento obtenido durante la purificación la VSGm en comparación con la VSGs es muy bajo, en el caso específico de este trabajo de investigación, la diferencia en el rendimiento de ambas proteínas, fue de aproximadamente 15 mg.

Con la finalidad de conocer cuán relevante era la presencia o ausencia del grupo GPI para las posibles interacciones de tipo proteína-proteína que se pudieran presentar entre la VGS del *T. evansi* y las otras proteínas del mismo parásito, ambas formas de la VSG de *T. evansi*, la VSGs y la VSGm, fueron utilizadas para generar los soportes cromatográficos de afinidad identificados como S2 y S3, los cuales tenían acoplados covalentemente la VSGs y la VSGm, respectivamente, a una resina de sefarosa. A través del análisis de SDS-PAGE realizado a las proteínas purificadas de las fracciones solubles y no solubles del *T. evansi* por cromatografía de afinidad, se pudo conocer que existen aproximadamente ocho proteínas del *T. evansi* que interactúan con alguna o ambas formas de la VSG del parásito y cuyas masas moleculares aparentes son de 100, 90, 80, 75, 64, 60, 55 y 43 KDa.

Haciendo uso del soporte S3, el cual estaba conformado por la resina de sefarosa acoplado a la VSGm, se lograron purificar tres proteínas cuyas masas moleculares fueron similares a las obtenidas haciendo uso del soporte S2 (90, 64, y 55 KDa). Sin embargo, con el uso de S3 se lograron purificar dos proteínas adicionales de masas moleculares aparentes de 100 y 80 KDa, las cuales no se obtuvieron con el soporte S2. Estos resultados sugieren que el grupo GPI se encuentra implicado en algunas de las interacciones entre la VSG y las otras proteínas presentes en el *T. evansi*. También llamó la atención el haber observado dos bandas polipeptídicas de 75 kDa y 43 KDa que solamente fueron purificadas con el soporte S2 conteniendo la VSGs, pero no con el soporte S3 que contenía la VSGm. Como se mencionó anteriormente, cuando se libera el anclaje GPI de la VSG, la VSGs se descompacta estructuralmente, lo cual pudiera generar nuevos sitios de interacción con otras proteínas del parásito que posiblemente están bloqueados cuando la VSG contiene el anclaje GPI.

Por su parte, uno de los análisis de inmunotinción realizados a las muestras obtenidas durante la purificación por cromatografía de afinidad con los soportes S2 y

S3, dio a conocer que la banda de 64 KDa obtenida a partir de las dos fracciones de *T. evansi* (FS y FNS) con las que interaccionaron los soportes. Se trataba de la VSG del parásito, la cual es capaz de interaccionar con la VSGs y la VSGm que son parte los soportes de afinidad a través de la formación de homodimeros según lo publicado por Vervoort et al.^[23] El uso del anticuerpo α -VSG como anticuerpo primario en este análisis de inmunotinción dio pie a la identificación de esta proteína, ya que como se recordara, los anticuerpos policlonales específicos contra la VSG cuentan con determinantes antigénicos que reconocen únicamente a las VSG, por lo que se tiene la certeza de que la proteína de 64 KDa identificada durante el ensayo de inmunotinción corresponde a la VSG de *T. evansi*

Los análisis de inmunotinción en los que se utilizaron como anticuerpos primarios los α -Igs preparados en líquido ascítico de ratón y en sueros de conejo, dieron como resultado el reconocimiento de múltiples bandas polipeptídicas de masas moleculares 98, 80, 64, 55 y 36 KDa. Comparando estas bandas con las publicadas en trabajos de investigación previos, se pueden hacer suposiciones de la identidad de alguna de estas proteínas. Cabe destacar que en los estudios realizados por Carrasquel^[27] durante su trabajo doctoral, se utilizaron soportes de afinidad compuestos por los anticuerpos α -Igs de conejo y de ratón, para purificar proteínas de *T. evansi* que interaccionan con la VSG. En este, la proteínas purificadas fueron secuenciadas por espectrometría de masa y comparadas con la base de datos de otros tripanosomátidos (*T. brucei*, *T. cruzi*, *T. congolense* y *Leishmania spp.*), algunas de las proteínas secuenciadas presentaron homología con las presentes en la bases de datos. En esta ocasión se hará hincapié en aquellas proteínas identificadas a partir de la secuenciación de las bandas polipeptídicas con masas moleculares similares a las obtenidas en el presente trabajo de investigación. Tal es el caso de una proteína Ser/Thr quinasa, putativa de *T. vivax*, identificada a partir la secuencia de una banda polipeptídica de 100KDa. Las proteínas quinasas son mediadores de la señales de transducción, que transmiten señales del medio ambiente y coordinan procesos

celulares, se clasifican según su dominio catalítico en dos súper familias las proteínas Ser/Thr quinasas y las tirosinas quinasas (Tyr quinasa). Los tripanosomátidos poseen una gran cantidad de proteínas quinasas, que comprenden aproximadamente el 2% del genoma de estos parásitos, lo cual indica que la fosforilación de proteínas es un mecanismo clave para la regulación de procesos en el parásito.^[45] En eucariotas las PKC son activadas por Ca^{2+} , además poseen un dominio PH, el cual reconoce lípidos

Péptidos secuenciados a partir de una banda de 80 KDa presentaron homología con una proteína de choque térmico conocida como Hsp70 de *T. brucei*, varios estudios han señalado que la familia de las Hsp70 interaccionan con la VSG de *T. brucei*, y destacan su importancia por estar involucrada en el correcto plegamiento, mantenimiento de la estructura, transporte y expresión de la VSG en la membrana del parásito.^[41; 42] La masa molecular de la Hsp70 de *T. brucei* reportada en la base de datos es de ~ 75367 Da. La discrepancia en la masa molecular obtenida en los análisis de SDS-PAGE con la masa de la proteína identificada en la base de datos pueden deberse a la presencia de modificaciones postraduccionales tales como glicosilaciones, las cuales no son consideradas durante la traducción del producto genético.

Adicionalmente a partir de las bandas de 55 KDa, se identificaron dos genes asociados a los sitios de expresión de la VSG (ESAGs) como son ESAG 6 y ESAG 7 de *T. brucei*. Estas últimas proteínas son capaces de formar un heterodimero entre sí, para conformar el receptor de la transferrina ESAG 6/7. La transferrina es una proteína que específicamente se encarga de transportar hierro. El receptor de la transferrina ESAG 6/7 está localizado en la membrana de *T. brucei* y presenta homología con las estructuras primaria y terciaria de la VSG, mostrando epítopes similares a aquellos presente en la VSG. El receptor de la transferrina ESAG 6/7 también se encuentra anclado a la membrana del parásito a través de un grupo GPI.^[36] Las bandas de 55 KDa obtenidas durante la cromatografía de afinidad del presente trabajo de tesis,

fueron reconocidas en los ensayos de inmunotinción por los mismos anticuerpos α -Igs de conejo y α -Igs de ratón utilizados para purificar las proteínas de 55 KDa en el trabajo de Carrasquel. Estos resultados sugieren que las bandas de 55 kDa encontradas aquí, pudieran corresponder al receptor de transferrina ESAG 6/7 de *T. evansi* previamente identificado.

Haciendo un recuento de las proteínas obtenidas en este trabajo de investigación, de las ocho proteínas purificadas y cuyas masas moleculares son: 100, 90, 80, 75, 64, 60, 55 y 43 KDa, una de ella fue identificada a plenitud, se trata de la banda de 64 KDa la cual corresponde a la VSG del *T. evansi*. Con excepción de las bandas de 90, 60 y 43 KDa, el resto presentaron similitud con las identificadas en trabajos anteriores. Tal es el caso de la banda de 100 KDa, la cual podría tratarse de una proteína homóloga a una Ser/Thr quinasa, putativa de *T. vivax*. Por su parte la banda de 80 KDa secuenciada en trabajos previos, presenta homología con la proteína Hsp70 del *T. brucei* y finalmente la banda de 55 KDa podría tratarse de genes asociados a los sitios de expresión de la VSG, conocidos como ESAGs. A fin de lograr la identificación completa de las bandas polipeptídicas obtenidas en este trabajo, se recomienda que en trabajos futuros estas bandas sean secuenciadas mediante espectrometría de masas para lograr la plena identificación de dichas proteínas.

CONCLUSIONES

1. Parásito *Trypanosoma evansi* fueron expandidos en ratas experimentales y su purificación mediante el uso de cromatografía de intercambio iónico.
2. A partir de la lisis de estos microorganismos y el uso de cromatografía de intercambio iónico se purificó la forma soluble y de membrana de la VSG del *Trypanosoma evansi*. Las masas moleculares que presentaron ambas proteínas en geles de poliacrilamida fueron de 64 y 62 kDa, respectivamente.
3. Las glicoproteínas VSGs y VSGm fueron acopladas a resinas de sefarosa previamente activadas con CNBr, para formar los soportes de afinidad con los que se purificaron las proteínas de *T. evansi* que interactúan con la VSG. A través de análisis de inmunotinción en los que la VSGs y la VSGm se enlazaron al anticuerpo α -VSG, se comprobó que los soportes funcionaban.
4. Se determinó que ciertamente existen proteínas del parásito que interactúan con la VSG cuyas masas moleculares aparentes son de 100, 90, 80, 75, 64, 60, 55 y 43 kDa. Se pudo constatar que la proteína de 64 kDa se trataba de la VSG de *T. evansi*, ya que fue reconocida por el anticuerpo α -VSG.
5. La presencia del grupo GPI en el soporte VSGm-sefarosa, permitió la purificación de bandas polipeptídicas de 100 y 80 kDa, a partir del parásito *T. evansi*, las cuales no se obtuvieron haciendo uso del soporte VSGs-sefarosa. Esto sugiere que el anclaje GPI juega un papel relevante en las interacciones de la VSGm con otras proteínas presentes en el parásito.
6. Mediante el uso del soporte VSGs-sefarosa se purificaron dos bandas polipeptídicas de 75 y 43 kDa, que no se obtuvieron haciendo uso del soporte VSGm-sefarosa. Este resultado sugiere que la VSGs posee sitios de interacción

disponibles para interactuar con otra proteína una vez que el anclaje GPI es hidrolizado por la GPI-PLC.

BIBLIOGRAFIA

1. Mendoza M., Uzcanga G., Pacheco R., Rojas H., Carrasquel L., Gracia Y., Serrano X., Benaim G., Bubis J., y Mijares S., 2008 Anti-VSG antibodies induce an increase in *Trypanosoma evansi* intracellular Ca^{2+} concentration. *Parasitology* 135:1303- 1315.
2. Hoare, C.A. 1972. The Trypanosomes of Mammals. *A Zoological Monograph. Blackwell Scientific Publications Oxford. U.K.* pp. 555-593.
3. Luckins, A.G. 1998. Epidemiology of surra: Unanswered Questions. *J. Protozool. Res.* 8: 106-119.
4. Brun, R., Hecker, H. y Lun, Z. 1998. *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship. *Vet. Parasitol.* 79: 95- 107.
5. Diaz C. 1970. Parasitología en animales domésticos Vol I. Universidad del Zulia. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Maracaibo-Venezuela. pp. 183-425.
6. Roche, M. 1978. Rafael Rangel: Ciencia Política en la Venezuela de principios de siglo. Monte Avila Editores. Caracas. pp. 259.
7. Gómez, R. 1956. Estudio de la tripanosomiasis natural del camino en Venezuela". *Rev. Med. Vet. Parasit.* 15: 63- 103.
8. Yokubu, B. 2011. Trans-sialidase-like gene from the bloodstream form of *Trypanosoma evansi* conserves most of the active site residues and motifs found in Trypanosomal sialidases and trans-sialidases. *African Journal of Biotechnology.* Vol 10 (13). pp. 2388-2398.
9. Hoare, C.A. 1954. Morphological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes. X. *Revision of the Systematics Journal of Protozoology* 11: 200-207.
10. Turner, C.M. 1988. Trypanosome variant surface glycoprotein in the Biology of Parasitism. *MBL Lectures in Biology vol. 9, Alan Liss Inc. Editors Paul T. Englund and Alan Sher. New York. USA* pp: 438-448.
11. Zhou Huai-Yu 1977. London School of Hygiene and Tropical Medicine, London Protozoology. Vol 3. Disponible en: <http://www.pathobio.sdu.edu.cn/sdjsc/webteaching/Course/webteach/Protozoan/introduction.htm>

12. Rivera, M. 1990. Manual de Prácticas de Enfermedades parasitarias. Primera edición. FCV-UCV. Maracay, Mimeo. pp. 39.
13. Rivera, M. 1996. Hemoparasitosis bovina. Conejos de Desarrollo Científico y Humanístico. UCV. Venezuela. Caracas. pp. 22- 35.
14. Girardina, S. y García, F. 1990 Hemoparásitos: Biología y Diagnóstico. Manual de Laboratorio. Colección cuadernos USB. Serie Biología 1., pp 14-27.
15. Donelson, J.E. 2003. Antigenic variation and the African trypanosome genome. *Acta Tropical*, 85: 391- 404.
16. McCulloch, R. 2004. Antigenic Variation in African trypanosomes: monitoring progress. *Trends in Parasitology* 20: 117-121.
17. Barry, J.D. 1997. The relative significance of Mechanism os Antigenic Variation in African Trypanosomes. *Parasitol. Today* 13: 212-218.
18. Soulsby E.J.L. 1982. Parasitología y Enfermedades Parasitarias en los Animales Domésticos, 7th ed., Interamericana, Mexico, pp. 539-541.
19. Ferguson M. 1997. The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences.*;352(1359):1295-302.
20. Mehlert A, Bond CS, J MA. 2002 The glycoforms of a *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein and molecular modeling of a glycosylated surface coat. *Glycobiology*. 12(10):607-612.
21. Camargo E, Uscanga GL, Bubis J. 2004. Isolation of two antigens from *Trypanosoma evansi* that is partially responsible for its cross-reactivity with *Trypanosoma vivax*. *Vet. Parasitology* 123:67-81.
22. Cummings R. y Turco S. (2009). Parasitic Infections Capítulo 40. Essentials of Glycobiology. (2a Edición). Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York.
23. Vervoort, T., et. al. 1981. Isotypic surface glycoproteins of trypanosomes. *Immunology* 44: 223-232.

24. Cardoso de Almeida M.L, Allan L.M, Turner M.J. 1984. Purification and properties of the membrane form of variant surface glycoproteins (VSGs) from *Trypanosoma brucei*. *J. Protozool.* 31 (1):53-60.
25. Low M. G. 1989. Glycosil-phosphatidylinositol: a versatile anchor for cell surface proteins. *FASEB* 3: 1600-1608.
26. Mendoza M., Uzcanga G., Pacheco R., Bubis J. y Mijares A. 2004. Effects of Anti-Variant Surface Glycoprotein antibodies on the *Trypanosoma evansi* intracellular Ca^{2+} concentration. *IX European multicolloquium of Parasitology. EMOP*. España.
27. Carrasquel L. Interacciones de la glicoproteína variante de superficie de *Trypanosoma evansi*. [tesis doctoral]. Venezuela. Universidad Simon Bolivar. Biología; 2012.
28. Lanham. S. y Godfrey, D. 1970. Isolation of salivarian trypanosomes from man and other animals using DEAE-cellulose. *Experimental Parasitology*. Vol 28, pp. 521-534.
29. Uzcanga G. et al. 2002. Purification of a 64 kDa antigen from *Trypanosoma evansi* that exhibits cross-reactivity with *Trypanosoma vivax*. *Parasitology*: 287-299.
30. Schell D. y Overath P. 1990. Purification of the membrane-form variant surface glycoprotein of *Trypanosoma brucei*. *J. Chromatography*. 521: 239-243.
31. Stijlemans B., Baral T. N., Guilliams M., Brys L., Korf J., Drennan M., Van Den Abbeele J., De Baetselier P, y Magez S. 2007. A Glycosylphosphatidylinositol-Based Treatment Alleviates Trypanosomiasis-Associated Immunopathology. *The Journal of Immunology* 179: 4003–4014.
32. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259):680-685.
33. Towbin H, Staehelint T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Biochemistry*. 76(9):4350-4354.
34. Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

35. Toei M., Saum R. y Forgac M. (2010). Regulation and Isoform Function of the V-ATPases. *Biochemistry*. 49(23): 4715–4723.
36. Mehlert A. y Ferguson M. A. (2007). Structure of the glycosylphosphatidylinositol anchor of the *Trypanosoma brucei* transferrin receptor. *Molecular and Biochemical Parasitology* 151 (2): 220-223.
37. Mehlert A., Wormald M.R., Ferguson M. A. J. (2012). Modeling of the N-Glycosylated Transferrin Receptor Suggests How Transferrin Binding Can Occur within the Surface Coat of *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathog* 8 (4): e1002618. doi:10.1371/journal.ppat.1002618
38. Goldsby, R. A; Kindt, T. J; Osborne, B. A y Kuby, J. (2003). *Inmunology* (5 Ed). pp 148-151. Freeman. Houndmills.
39. Jerne, N. 1974. Towards a network theory of the immune system *Ann Immunol (Paris)* 125C, 373-389.
40. Shoenfeld Y. (2004). The idiotypic network in autoimmunity: antibodies that bind antibodies that bind antibodies. *Nature Medicine* 10 (1): 17-18.
41. Field M. C., Sergeenko T., Wang Ya-Nan, Bohm S., Carrington M. (2010). Chaperone Requirements for Biosynthesis of the Trypanosome Variant Surface Glycoprotein. *PLoS ONE* 5 (1): e8468.
42. Bangs J. D., Brouch E. M., Ransom D. M. y Roggy J. L. (1996). A Soluble Secretary Reporter System in *Trypanosoma brucei*. *The Journal of Biological Chemistry*. 271 (31): 18387–18393.
43. Toei M., Saum R. y Forgac M. (2010). Regulation and Isoform Function of the V-ATPases. *Biochemistry*. 49(23): 4715–4723.
44. Moreno, SNJ y Docampo, R. (2009) El papel de acidocalcisomes en protistas parasitarios. *J. Eukaryot. Microbiol.* 56, 208-213.
45. Parsons M., Worthey E. A., Ward P. N. y Mottram J. C. (2005). Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics* 6:127