



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

ESTUDIO DEL PROTEOMA DE Trypanosoma cruzi.
IDENTIFICACIÓN DE MOLÉCULAS CON
IMPORTANCIA BIOLÓGICA.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:
MARÍA LUISA MARTÍNEZ VELASCO

DIRECTOR DE TESIS: DRA. BERTHA ESPINOZA GUTIÉRREZ
ASESOR DE TESIS: QFB PATRICIA VIDAL MILLÁN

MÉXICO, D.F.

2004





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**ESTUDIO DEL PROTEOMA DE Trypanosoma cruzi.
IDENTIFICACIÓN DE MOLÉCULAS CON
IMPORTANCIA BIOLÓGICA.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:
MARÍA LUISA MARTÍNEZ VELASCO

DIRECTOR DE TESIS: DRA. BERTHA ESPINOZA GUTIÉRREZ

Se agradece a la Dirección General de Apoyo al Personal Académico el apoyo brindado a través del otorgamiento de la beca para la realización de este trabajo, el cuál forma parte de los proyectos IN-232399 e IN-226402.

DEDICATORIAS

*A mi mamá, María Luisa por todo el apoyo y cariño que siempre me ha brindado,
pese a las circunstancias que hemos vivido.*

A mi hermano Luis Tomás por estar a mi lado siempre.

*A Juan Carlos por todo el amor que me has dado, por tus consejos, tu apoyo,
simplemente por estar a mi lado.*

*A mis abuelitos, tíos y primos por sus consejos, apoyo y cariño que me han
brindado.*

Adriana Bonilla, gracias por ser mi amiga.

*A todos mis compañeros de laboratorio: Andrea, Andrea Cristina, Edgar,
Guiehdani, Fer, Rodrigo, Tere y a la Dra. Rosalía Lira por el apoyo que me
brindaron en el largo trayecto que he recorrido junto a ustedes.*

AGRADECIMIENTOS

Bertha: No tengo palabras para agradecerte por tus enseñanzas y sobre todo por no ser solamente mi guía en el desarrollo de este trabajo, sino algo más importante una AMIGA. Muchas gracias por todo.

Se agradece al Biólogo Ignacio Martínez por la ayuda otorgada en el cultivo de los parásitos.

También agradezco a la Bióloga Esther Pacheco por su apoyo y enseñanzas técnicas para el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Luz María López por la ayuda en el inicio de la estandarización de la electroforesis bidimensional.

Al Dr. Javier Ambrosio y a la Bióloga Olivia Reynoso por su apoyo en la estandarización de la electroforesis bidimensional.

Al comité de sinodales, por sus sugerencias a este trabajo y las enseñanzas que me brindaron como profesores.

A la FES Zaragoza.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

INDICE

	Páginas
I. Resumen.....	1
II. Antecedentes.....	3
II.1 Taxonomía.....	3
II.2 Ciclo de vida.....	4
II.3 Morfología.....	5
II.4 Genética del parásito.....	11
II.5 Enfermedad de Chagas.....	13
II.6 Enfermedad de Chagas en México.....	15
II.7 Diagnóstico.....	17
II.8 Tratamiento.....	20
II.9 Proteínas del parásito.....	20
II.10 Proteoma.....	28
III. Planteamiento del problema.....	35
V. Hipótesis.....	36
IV. Objetivos.....	37
VI. Material y Métodos.....	38
VI.1 Cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> empleadas.....	38
VI.2 Mezcla de sueros humanos y Anticuerpos Monoclonales.....	39
VI.3 Cultivo de epimastigotes.....	40
VI.4 Preparación de extracto proteico total.....	40
VI.5 Determinación de proteínas.....	41
VI.6 Electroforesis de proteínas en geles de archilamida (SDS-PAGE).....	41
VI.7 Electroforesis bidimensional (2D-PAGE) empleando sistema IPG.Multiphor.....	42
VI.8 2D-PAGE empleando geles cilindricos para el isoelectroenfoque.....	43
VI.9 2D-PAGE con el sistema IPG Protean IEF Cell.....	43
VI.10 Transferencia a membranas de nitrocelulosa.....	44
VI.11 Inmuno electrotransferencia.....	45
VI.12 Documentación de geles.....	46
VI.13 Análisis de geles.....	46
VII. Resultados.....	47
VII.1 Análisis de los extractos proteicos totales por SDS-PAGE.....	47

VII. 2 Estandarización 2D-PAGE.....	48
VII.2.a Equipo Multiphor.....	48
VII.2.b Geles cilíndricos.....	49
VII.2.c Equipo IEF Cell.....	57
VII.3 2D-PAGE en geles chicos.....	74
VII.5 Inmuno electrotransferencia con sueros humanos.	76
VII.6 Inmuno electrotransferencia con anticuerpos monoclonales.....	80
VIII. Discusión de resultados.....	84
IX. Conclusiones.....	96
X. Bibliografía.....	97
XI. Anexos.....	112
ANEXO 1. Electroforesis e losoelectroenfoqe.....	112
ANEXO 2. Preparación de medio de cultivo, buffer de lisis e inhibidores de proteasas, ..	123
ANEXO 3. Reactivos para SDS-PAGE y 2D-PAGE.....	127
ANEXO 4. Volúmenes de soluciones para la preparación de geles de acrilamida.....	133
ANEXO 5. Preparación de geles de archilamida en tubos cilíndricos.....	134
ANEXO 6. Tinción con nitrato de plata.....	136
ANEXO 7. Tabla de las proteínas de la cepa Ninoa.....	137
ANEXO 8. Proteínas de la cepa Ninoa con buffer de lisis de urea 8 M.....	143
ANEXO 9 Proteínas de la cepa Ninoa con buffer de lisis de urea 7 M y tiourea 2 M.....	148
ANEXO 10. Proteínas de la cepa Querétaro.....	152
ANEXO 11. Proteínas de la cepa Querétaro con buffer de lisis de urea 8 M.....	156
ANEXO 12. Proteínas de la cepa Querétaro con buffer de lisis de urea 7 M y tiourea 2 M.....	161
ANEXO 13. Proteínas de la cepa Ver-6,	165
ANEXO 14. Proteínas de la cepa Ver-6 con buffer de lisis de urea 8 M.....	170
ANEXO 15 Proteínas de la cepa Ver-6 con buffer de lisis de urea 7 M y tiourea 2 M....	175

I. RESUMEN

Trypanosoma cruzi es un parásito hemoflagelado causante de la enfermedad de Chagas, este parásito presenta una gran heterogeneidad genética que se ve reflejada en una gran variabilidad en sus propiedades biológicas. Esta variabilidad se puede reflejar en la expresión diferencial de proteínas que podrían ocasionar que las cepas posean propiedades variadas, en la capacidad de entrar a células hospederas, o en su capacidad de evadir la respuesta inmune. Es por esto que el presente trabajo tuvo como objetivo el de estandarizar la técnica de electroforesis bidimensional para estudiar el proteoma de *Trypanosoma cruzi*, además de realizar comparaciones en la expresión de proteínas entre cepas mexicanas con diferentes propiedades biológicas y genéticas, y finalmente estudiar posibles diferencias en aquellas proteínas que fueron antigénicas. Para cumplir los objetivos planteados se emplearon diversas metodologías, para separar proteínas en geles bidimensionales realizando la estandarización de la electroforesis bidimensional con el sistema comercial IPG IEF Cell, utilizando dos diferentes amortiguadores de lisis, urea 8 M y urea 7 M con tiourea 2 M; ambos proporcionaron buena resolución y reproducibilidad y su uso va estar dado en función de lo que se desee estudiar, puesto que el amortiguador de urea extrae un menor número de proteínas, de pesos menores a 65 KDa pero en todo el rango de pH estudiado, 3-10; en tanto que el amortiguador con tiourea extrae un mayor número de proteínas, con pesos de hasta 100 KDa pero preferentemente en las áreas con pI menores de 6. En cuanto al estudio

comparativo, se estudiaron las proteínas solubles totales del parásito, resolviendo en promedio 500 proteínas por cepa, de estas se realizó un análisis comparativo de las más abundantes, que varían en número dependiendo de la cepa, encontrándose que estas proteínas difieren entre las expresadas por cada cepa analizada. Finalmente, al realizar el estudio comparativo por inmuno electrotransferencia (Western-blot) empleando un mezcla de sueros de pacientes chagásicos crónicos se observó que al emplear como antígeno el extracto de la cepa Ver-6 los anticuerpos reconocieron un grupo de antígenos, entre los pI de 4 a 5 y pesos de 35 KDa que no están presentes en las otras dos cepas. Al emplear anticuerpos monoclonales contra proteínas del parásito, se detectaron diferencias al usar el anticuerpo 1D5, que reconoció una proteína de 38 KDa que presenta una serie de isoformas en las tres cepas, reconociendo 5 en las cepas del genotipo I y 6 isoformas en la cepa de genotipo II.

II. ANTECEDENTES

El parásito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* agente etiológico de la enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana, es un parásito que se caracteriza por la presencia del cinetoplasto; es transmitido por vectores del grupo de los triatóminos debido a que la fase infectiva es excretada en las heces del vector y puede introducirse en el hospedero mediante una lesión para invadir casi cualquier tipo de célula; después de replicarse sale hacia el torrente sanguíneo en su forma infectiva donde puede invadir otras células o a través de la picadura del vector completar su ciclo biológico que incluye otras transformaciones en el tracto digestivo del vector (Scharfstein et al., 2000). A continuación se muestra la taxonomía del parásito.

II.1. TAXONOMIA (Leedale y Vickerman, 2000).

Phylum:	Euglenozoa Cavalier-Smith, 1981
Clase:	Diplonemea Cavalier-Smith, 1993
Orden:	Kinetoplastea Honingberg, 1963
Suborden:	Trypanosomatina Kent, 1880
Familia:	Trypanosomatidae Duflein, 1901
Género:	<i>Trypanosoma</i> Gruby, 1843
Subgénero:	<i>Schizotrypanum</i> Chagas, 1909
Especie:	<i>Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi</i> Chagas, 1909

II.2 CICLO DE VIDA

El ciclo de vida del parásito incluye estadios tanto en los vectores como en los mamíferos que pueden ser reservorios u hospederos definitivos. En el intestino del vector proliferan epimastigotes replicativos donde se diferencian en tripomastigotes metacíclicos que es la forma infectiva no replicativa, estos son secretados en las heces u orina y pueden entrar a través de las mucosas, piel y llegar al torrente sanguíneo, una vez en el torrente sanguíneo los tripomastigotes pueden infectar una gran variedad de células nucleadas, como los macrófagos y las células cardíacas, donde intracelularmente se diferencian en amastigotes proliferativos los cuales posteriormente causan la lisis de la célula infectada liberando tripomastigotes sanguíneos que pueden invadir otras células o bien ser tomados por el vector al alimentarse y cerrar el ciclo (Piacenza et al., 2001 y Scharfstein et al., 2000). En la figura 1 se presenta el ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi* en la cual se ilustran las diversas transformaciones de este parásito.

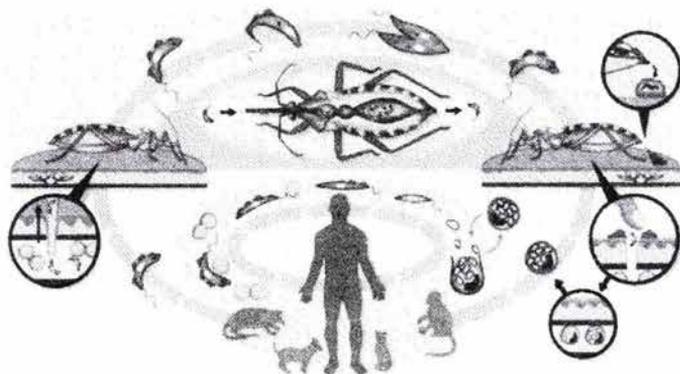


Fig.1 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. (tomado de www.tdr.int/tdr/)

II. 3 MORFOLOGÍA

La diferenciación del *Trypanosoma cruzi* durante su ciclo de vida en sus diferentes formas se puede identificar por la posición relativa del cinetoplasto respecto al núcleo y al flagelo. (Brenner, www.dbbm.fiocruz.br/tropical/chagas/).

El amastigote es la forma esférica intracelular, casi inmóvil y con una alta capacidad de dividirse binariamente (Pinto, 1984), carece de flagelo y membrana ondulante, posee un núcleo central y un cinetoplasto pequeño entre 1 a 4 μm . (Schmidth y Roberts, 1989). En la figura 2 se muestra una microfotografía de la ultraestructura del amastigote.

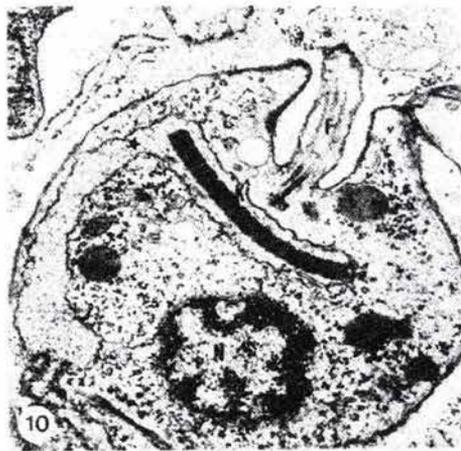


Fig 2. Ultraestructura del amastigote de *T. cruzi* por microscopía electrónica de transmisión.

Se pueden observar el cinetoplasto (K) dentro de la mitocondria ramificada (*), un flagelo corto (F) y el núcleo celular (N) (30000X) (De Souza, 1999).

El epimastigote tiene un tamaño entre 20 a 40 μm el cual presenta una forma de huso con el cinetoplasto localizado anterior al núcleo. Es capaz de dividirse pero no es infectivo y se pueden localizar en el intestino de los vectores o en cultivos axénicos (De Souza, 2002). En la figuras 3 y 4 se ilustran a través de microfotografías la ultraestructura del epimastigote y del tripomastigote respectivamente.

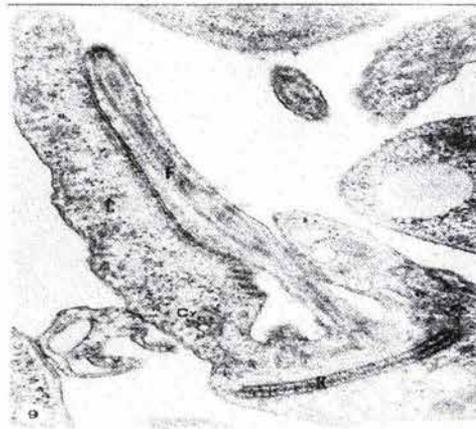


Fig. 3. Ultraestructura de epimastigote de *T. cruzi* por microscopía electrónica de transmisión. Estructuras como el flagelo (F), cuerpo celular (C), citostoma (Cy) y cinetoplasto (K). (60000X). (DeSouza, 1999).

El tripomastigote presenta dimensiones de 25 μm de longitud y un diámetro aproximado de 2 μm . El cinetoplasto se localiza posterior al núcleo y el parásito presenta membrana ondulante. Esta forma se puede observar en el intestino posterior, heces u orina de los vectores, en la fase estacionaria de cultivos axénicos y en la fase líquida de cultivos celulares. Esta forma es infectiva pero carece de capacidad de replicación (De Souza, 2002).



Fig. 4. Ultraestructura de tripomastigote de *T. cruzi* por microscopía electrónica de alto voltaje. Se pueden observar el cinetoplasto (K), la membrana ondulante, el flagelo y las áreas de adhesión del flagelo al cuerpo celular (flechas). (12000X) (De Souza, 1999).

En el siguiente esquema (figura 5), se pueden observar las estructuras más importantes del parásito en estudio.

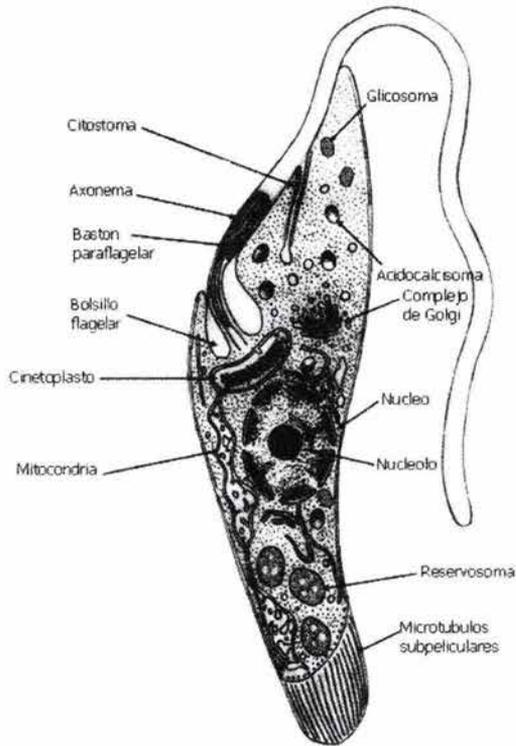


Fig. 5. Esquema de epimastigote de *Trypanosoma cruzi* (Tomado de De Souza, 2002).

La pared celular de los tripanosomátidos está conformada de dos partes; la primera es la membrana plasmática en tanto que la segunda es una capa delgada formada por los microtúbulos subpeliculares, los cuales se encuentran conectados

a la membrana mediante filamentos cortos de naturaleza desconocida; esta asociación probablemente es la responsable de la rigidez de la célula. Recientemente se ha obtenido información de la bioquímica de los microtúbulos de los tripanosomátidos, especialmente de *T. brucei* los cuales muestran que existe la presencia de seis tubulinas, alfa y beta que constituyen las subunidades del microtúbulo; gama que es el componente minoritario responsable de la nucleación del microtúbulo, además se encuentran las tubulinas delta, epsilon y zeta.

El flagelo que posee el parásito emerge de una invaginación denominada bolsa flagelar, la longitud del mismo va a depender de la etapa en que se encuentre, su composición es debida a un complejo altamente organizado de filamentos que se denomina bastón paraflagelar (De Souza, 2002). A su vez el flagelo esta involucrado en al menos dos procesos importantes: el movimiento celular y en la unión del parásito tanto a la superficie de las células de los vertebrados como a las microvellosidades del intestino de los vectores. (De Souza, 1999).

El cinetoplasto es ADN extranuclear condensado en forma de anillo en una región bien establecida de la única mitocondria y se ubica en la base del flagelo. El ADN del cinetoplasto representa del 25-30% del ADN total de la célula y consiste de una red de 20000 a 30000 minicírculos asociados con moléculas lineales largas y cada minicírculo tiene aproximadamente 1440 pares de base. Algunos estudios bioquímicos indican la presencia de proteínas asociadas al cinetoplasto entre las que destacan: la topoisomerasa tipo II, la ADN polimerasa P, la proteína ensambladora de minicírculos, las proteínas condensadoras k-ADN, la proteína

asociada-cinetoplasto, enzimas de restricción, proteínas mitocondriales de choque térmico, y un grupo de proteínas de unión de cinetoplasto para enlazar los mini y maxicírculos. La morfología del cinetoplasto varía de acuerdo al estadio del parásito; en los epimastigotes y amastigotes se observa como una estructura en forma de bastón en donde el k-ADN está organizado compactamente, en tanto que en los tripomastigotes se observa como un anillo y su K-ADN se observa más dispersado (De Souza, 1999).

El glicosoma es un organelo redondeado o elongado, que pertenece al grupo de los peroxisomas y puede contener catalasa en algunas especies, así como diversas enzimas involucradas en la oxidación de aminoácidos y lípidos (De Souza, 1999). En base a estudios recientes sobre las enzimas glicolíticas presentes en este organelo se determinaron que sus puntos isoeléctricos son similares a los de enzimas encontradas en el citoplasma de células de mamíferos. El glicosoma no posee un genoma, por lo que las proteínas ahí encontradas son codificadas por genes nucleares, trasladadas a los ribosomas libres y posteriormente transportadas al organelo (De Souza, 2002).

A su vez, se ha observado la presencia de algunos gránulos en las células al tñirlos con colorantes básicos, estos han recibido numerosos nombres tales como: reservorios de productos metabólicos, cuerpos de pigmentos, gránulos metacromáticos, gránulos polifosfatos o gránulos de volutina. Recientemente se ha determinado que en la familia de los tripanosomátidos estos gránulos presentan una gran concentración de Ca^{2+} por lo que se les denominó acidocalcisosomas. Se han mencionado varias de sus posibles funciones, entre las que destacan: a) una función en el proceso de almacenamiento de calcio para ser

utilizado en alguna etapa del ciclo de vida; b) una segunda función pudiera ser el de almacenar energía debido a su gran contenido de fósforo inorgánico, c) en la tercera función se destaca el efecto amortiguador de pH debido a la presencia de $H^+ATPasa$ en la membrana d) y por último el acidocalcisoma puede tener un efecto osmoregulador (De Souza, 2002).

El núcleo de los tripanosomátidos no se ha investigado a fondo, sin embargo en exámenes microscópicos se observa que la cromatina se localiza principalmente en la periferia nuclear ó centralmente al nucleolo. Durante la división la cromatina se dispersa y el nucleolo desaparece, dejando al núcleo con una apariencia homogénea y densa; por otro lado, microtúbulos y placas pequeñas aparecen durante la mitosis de esta manera la membrana nuclear permanece intacta. El número de placas varía de especie a especie, sin embargo en *T. cruzi* se observan al menos 10 (De Souza, 1999).

Las estructuras tales como ribosomas, retículo endoplasmático, complejo de Golgi y vacuolas se han observado pero no se han estudiado en detalle en *T. cruzi*.

II. 4 GENÉTICA DEL PARÁSITO.

En 1966 Coura y colaboradores propusieron el establecimiento del complejo "*cruzi*" para diferenciar las distintas cepas que hay del parásito, ya que como se sabe presentan una gran diversidad genética, variación morfológica, inducen variados fenómenos inmunológicos, distinta virulencia, así como diferencias en las patologías individuales y regionales de la enfermedad de Chagas.

La diversidad genética ha sido revelada por marcadores enzimáticos (Miles et al., 1978), con algunas técnicas moleculares como la RFLP de DNA del cinetoplasto (Morel et al., 1980), usando cariotipos moleculares (Henrikson et al. 1993), DNA fingerprints (Macedo et al., 1992), y RAPD (Tybayrenc et al., 1993), lo que ha permitido dividir en dos grupos genéticos bien definidos a la población parasitaria que comprenden los propuestos en los años setenta mediante marcadores isoenzimáticos.

El grupo genético *T. cruzi* I es observado principalmente en mamíferos y triatóminos silvestres en tanto que *T. cruzi* II se encuentra generalmente en humanos. Fernández y colaboradores encontraron la presencia de ambos grupos en el ciclo selvático, la preferencial asociación de los diferentes linajes con distintos hospederos ilustra la complejidad del parásito (Fernández et al., 1999, Devera et al., 2003).

Las cepas de *T. cruzi* mexicanas pertenecen al zimodema I de acuerdo a los estudios isoenzimáticos y genéticos (López-Olmos et al., 1998 y Bosseno et al., 2002). Por otra parte López-Olmos y colaboradores encontraron dos aislados mexicanos que muestran un genotipo diferente. Cabe mencionar que dichos aislados provienen de mamíferos silvestres (López-Olmos et al., 1998). Espinoza y colaboradores en 1998 realizó el aislamiento y caracterización biológica de 5 aislados obtenidos de pacientes mexicanos, encontrando mediante un análisis de RFLP que se pueden dividir en dos grupos diferentes, en cada grupo se encuentran los aislados que poseen propiedades biológicas parecidas en el modelo murino y que causan patologías similares; con lo que demuestra que

puede haber una relación entre la genética, la capacidad de matar ratones y los síntomas producidos en los pacientes.

II.5 ENFERMEDAD DE CHAGAS.

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es una enfermedad conocida desde principios del siglo XX a partir del descubrimiento de la misma por Carlos Chagas. Esta enfermedad es endémica en Centro y Sudamérica; principalmente en zonas rurales aunque actualmente debido a la migración y al crecimiento urbano es común encontrar personas infectadas en las grandes ciudades. De acuerdo a una estimación por parte de la OMS (1991) se calculaba que existían entre 14 a 16 millones de personas infectadas y que aproximadamente 100 millones más habitan en zonas de riesgo de infección (WHO; 1991). Actualmente, se cree que debido al control de los vectores y a un control mayor en los bancos de sangre existen actualmente 11 millones de personas infectadas (Schmunis, 1999).

La enfermedad de Chagas es una zoonosis capaz de permanecer en focos enzoóticos sin involucrar la enfermedad en los humanos, geográficamente se distribuye desde la latitud 42°N (norte de California) hasta la latitud 46° S (sudeste de Argentina y Chile); sin embargo la distribución de la infección en humanos se extiende un poco más allá de esos límites; debido principalmente a la migración humana (OMS, 1991).

El cuadro clínico de la enfermedad se ha dividido en tres etapas: la fase aguda que generalmente es corta, la fase crónica que se presenta a largo plazo, a su vez estas fases son separadas por una tercera fase clínicamente asintomática denominada fase indeterminada.

La fase aguda se caracteriza por una alta parasitemia, malestar general y una gran variedad de manifestaciones clínicas cuyos síntomas pueden pasar inadvertidos; esta fase se presenta después de la entrada del parásito en el organismo lo que puede ocasionar una inflamación local llamada chagoma. Por otro lado, también en esta fase se observan algunas alteraciones electrocardiográficas como la taquicardia, prolongación del intervalo P-R, cambios en la onda T y bajo voltaje QRS y mediante rayos X se puede observar cardiomegalia ligera. El diagnóstico se puede realizar a través de pruebas parasitológicas directas. Generalmente el cuadro resuelve en 4 a 8 semanas (OMS, 1991).

La fase indeterminada inicia de 8 a 10 semanas después de la fase aguda y pueden o no presentarse manifestaciones clínicas. Esta fase puede prolongarse por varios años y ser asintomática. Los sujetos presentan electrocardiogramas normales y solamente se puede establecer un diagnóstico mediante pruebas serológicas o en algunos casos por xenodiagnosis.

Se calcula que aproximadamente el 30 % de las personas que presentan la fase indeterminada evolucionaran hacia la fase crónica, que se caracteriza por daños cardiacos, digestivos o neurológicos. Esta etapa se manifiesta por la presencia de anticuerpos y una mínima presencia de parásitos circulantes (OMS, 1991).

Como se ha mencionado, el principal medio de infección es por la picadura del vector sin embargo, existen otros mecanismos tales como: la infección congénita, el contagio por transfusiones sanguíneas y transplantes de órganos.

II.6 ENFERMEDAD DE CHAGAS EN MÉXICO

Un factor muy importante para la presencia de la enfermedad de Chagas en México es la presencia de 31 especies de triatóminos en México, la mayoría de ellos infectados naturalmente por *T. cruzi*; como se puede observar en la figura 6, las especies con mayor importancia epidemiológica se encuentran distribuidas en gran parte del territorio nacional.

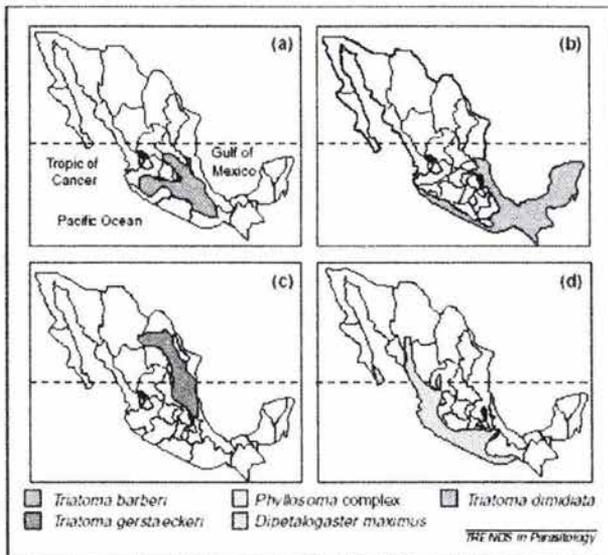


Fig. 6 Distribución en México de los principales vectores de la enfermedad de Chagas. Tomado de Guzmán-Bracho, 2001.

En México se cuenta con reportes de la existencia de vectores y reservorios infectados desde 1936 (Mazzoti, 1936), sin embargo fue hasta 1940 cuando el investigador reporto la infección en humanos. Actualmente se han reportado datos acerca de las prevalencias locales (Goldsmith et al., 1985; Tay et al., 1986) o nacionales (Velasco et al., 1992 y Guzmán-Bracho 2001) y de estudios de

seroprevalencia en bancos de sangre en varios estados de la república, incluso en el D.F., donde en donadores de sangre del Instituto Nacional de Cardiología se encontró una seroprevalencia del 0.28%, que incluso es más lata que para VIH ó el virus de la hepatitis (Ramos-Echevarria et al., 1993).

Se han realizado estudios en diferentes estados, uno de ellos en el Estado de Chiapas donde se encontró una seropositividad de 11.3 % en general, pero al realizar el análisis por las distintas zonas del mismo los seropositivos varían notablemente desde un 32.3 % en la selva lacandona hasta la zona central donde no se encontraron positivos. De acuerdo a los resultados de la última encuesta seroepidemiológica nacional se calculó que el 5 % de la población en general del estado de Chiapas es seropositiva en tanto que en donadores de bancos de sangre el 1.8 % (Mazariego-Arana et al., 2001).

En el centro del país se conoce la presencia de los vectores, lo que implica un riesgo para la población local, y existen algunos datos acerca de infección en la zona, Rangel-Flores y colaboradores realizaron un estudio en el estado de Morelos mediante pruebas serológicas encontrando una seropositividad del 20% e incluso aislaron el parásito de cinco pacientes; estos datos son importantes a nivel epidemiológico debido a que esta zona anteriormente no se consideraba endémica y sobre todo por su cercanía al Distrito Federal, aproximadamente 1 hora, lo que pudiera ocasionar un desplazamiento de los pacientes e incrementar el riesgo de infección (Rangel-Flores, 2001).

En el estado de Jalisco se ha dado un incremento en el número de casos reportados, este hecho tiene sus orígenes en 1986 con el reporte del brote epidémico de la fase aguda más importante hecho que llevo a que este estado

ocupara el primer lugar a nivel nacional (Trujillo 2000 et al., Hernández et al., 1987). Posteriormente Trujillo realizó un estudio que abarco el seguimiento a lo largo de 7 años de una población representativa de todas las regiones del estado, encontrándose 17.8% de positivos al inicio del estudio que al cabo de los 7 años se convirtió en 18.1%, encontrando casos nuevos además de seroconversiones de positivos a negativos; esto los hace concluir que las infecciones se dan de manera continua, pero no todos los infectados desarrollan la enfermedad puesto que en el estado la gran mayoría son reportes de infección no de enfermedad (Trujillo et al., 2000). Por otro lado, en el estado de Puebla se encontró una seropositividad del 7.7%, que es más alta que el de algunos países Sudamericanos como Argentina que reporta 3.5% y Brasil que presenta 0.7 %, este estudio se realizó en bancos de sangre de 7 regiones del estado, para ello emplearon como antígeno un extracto total obtenido a partir de una cepa mexicana (Sánchez-Guillén et al., 2002), lo que marca una gran diferencia en comparación con otros estudios que emplean antígenos comerciales provenientes de Sudamérica. Con base en resultados presentados en estudios seroepidemiológicos realizados entre 1987 y 1989 se ha calculado que a nivel nacional la seroprevalencia de anticuerpos contra *T. cruzi* es del 1.6% encontrándose casos positivos en todo el país. (Guzmán-Bracho, 2001).

II.7 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas se realiza mediante métodos parasitológicos, serológicos y más recientemente por métodos moleculares.

El diagnóstico parasitológico se emplea con alta sensibilidad en la fase aguda, ya que puede detectarse la presencia del parásito en circulación, sin embargo en la fase crónica la sensibilidad baja hasta aproximadamente 40% debido a la baja parasitemia (Sánchez et al., 2001).

Los métodos parasitológicos se dividen en directos e indirectos, entre los primeros se encuentran aquellos en los que se puede realizar una observación microscópica directamente de la muestra, como lo es el frotis de gota delgada, de gota gruesa, gota fresca y la técnica de Strout que implica la concentración de la muestra sanguínea para concentrar a los parásitos en el sedimento (WHO, 1991).

El diagnóstico serológico ha cobrado mayor auge debido a su relativa facilidad y a la rapidez con que se obtienen los resultados, aunado a que en las fases indeterminada y crónica es la manera más confiable de detectar a los casos positivos. El parásito es altamente inmunogénico y representa una gran gama antigénica para el hospedero, con proteínas localizadas en su membrana celular y cuya presencia e inmunogenicidad puede variar en los diferentes estadios del ciclo vital del parásito (De Lima et al., 2001).

Debido a los problemas arriba mencionados se han buscado preparaciones que funcionen como antígenos alternativos, entre los que destacan los antígenos recombinantes y pequeños péptidos sintéticos, obteniendo buenos resultados con alta sensibilidad y especificidad; sin embargo estas preparaciones no se emplean comercialmente debido a lo difícil de su preparación y purificación (Da Silveira et al., 2001; Ferreira et al., 2001; Peralta et al., 1994; Umezawa et al., 1999 y Vergara et al., 1992).

No solo se han realizado estudios con proteínas sino que se buscan nuevos y mejores antígenos en otros tipos de moléculas como los son las glicoproteínas y fracciones glicosídicas que son resistentes a la acción de proteasas del parásito (que pueden degradar el antígeno en cortos periodos de tiempo si no se emplean inhibidores de proteasas o no se almacenan en condiciones adecuadas); es por esto que se han realizado pruebas para tratar de emplear las fracciones glicosídicas purificadas por cromatografía, hecho que se justifica por demostraciones previas de que pacientes chagásicos presentan anticuerpos antigalactosil dirigidos contra fracciones glicosídicas de *T. cruzi* (De Lima et al., 2001).

Actualmente con el desarrollo de las técnicas de biología molecular se ha dado un paso más para desarrollar una metodología diagnóstica con más beneficios que las anteriores. Algunos investigadores han demostrado que la reacción en cadena de polimerasa (PCR) es altamente eficaz y sensible para detectar al parásito. Sin embargo, un paso crítico es el diseño de los primers, puesto que *T. cruzi* presenta reacción cruzada con otros parásitos, la detección de un gen que codifica para la proteína Tc-24, proteína flagelar antigénica que propicia una fuerte respuesta inmune, ha demostrado ser más sensible que la detección de otras secuencias (Guevara et al, 1996). Otra secuencia utilizada es la TcZ, que corresponde una región altamente variable del minicírculo del cinetoplasto, con el fin de identificar diferentes clones naturales (Hart et al., 1981). De igual manera se han empleado los iniciadores 121 y 122, que se anclan en las regiones externas de las 4 regiones conservadas que conforman el minicírculo del cinetoplasto; que amplifica una secuencia altamente conservada dentro del

minicírculo de *T. cruzi*, generando un amplificado de la región hipervariable de 330 pb, la que es específica a este parásito (Pacheco, 2000).

II.8 TRATAMIENTO

Como se ha mencionado, durante la fase aguda de la enfermedad se puede detectar la parasitemia en circulación, es por ello que el tratamiento es indicado principalmente en casos agudos, y en algunas investigaciones clínicas donde se tratan pacientes indeterminados o crónicos. Los fármacos de elección son el nifurtimox (un derivado nitrofurano) y el benznidazol (un nitroimidazol) que actúan sobre tripomastigotes y amastigotes (OMS, 1991).

Los mecanismos de acción son similares e involucran la generación de radicales libres que afectan al parásito que carece de mecanismos para eliminarlos, por otro lado se menciona que en el caso del benznidazol existe otro mecanismo que pudiera ser por uniones covalentes de los intermediarios generados por los radicales libres con componentes del parásito o su unión con DNA, lípidos o proteínas (Rodríguez y de Castro, 2002).

II.9 PROTEÍNAS DEL PARÁSITO.

Como cualquier célula eucarionte *T. cruzi* posee una gran cantidad de moléculas muy diversas, como son los lípidos, los azúcares, las proteínas, entre las más relevantes. Son muchas las proteínas que se han estudiado, esto se debe principalmente a su gran capacidad.

T. cruzi presenta en su superficie celular varios glicoconjugados que están involucrados en el reconocimiento e invasión de las células hospederas y que

permiten el establecimiento de la fase crónica. La mayoría de estas moléculas se unen al parásito mediante anclajes GPI; los glicoconjugados más abundantes presentes en todos los estadios son dos: los lipopeptidofosfoglicanos (LPPG) y las glicoproteínas tipo mucinas. Estos glicoconjugados tienen un alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos (treonina, serina, lisina y glicina), en el parásito las mucinas son los principales aceptores de ácido siálico vía la reacción de transialidasa. Las mucinas de *T. cruzi* migran en una electroforesis como un doblete o triplete de bandas con pesos moleculares de 35-43 kDa en epimastigotes y de 35-50 en tripomastigotes metacíclicos. Debido a su estructura, son altamente reconocidos por anticuerpos líticos anti- β -galactosil de pacientes con enfermedad de Chagas crónica, además de que los tripomastigotes son reconocidos y destruidos por estos anticuerpos. Estudios recientes muestran que las mucinas de los tripomastigotes sanguíneos pueden inducir la síntesis de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-12) y de óxido nítrico por medio de IFN- γ (Almeida et al., 1999).

Una parte muy importante del ciclo de vida del parásito es la invasión de las células del hospedero por parte de los tripomastigotes, para poder replicarse intracelularmente por lo que el fenómeno que da lugar a la internalización ha sido muy estudiado, entre los eventos que han destacado por su importancia es la movilización de calcio en el hospedero. En los tripomastigotes metacíclicos se han identificado las glicoproteínas tipo mucinas gp83 y la gp35/50 de las cuales se ha demostrado que participan en la invasión de las células del hospedero y quizá lo

más destacado es su expresión diferenciada en cepas distintas aunque no se ha podido relacionar con la infectividad de estas cepas (Ruiz et al., 1998).

La glicoproteína de 85 kDa y pl 6.3-7.5 fue una de las primeras estudiadas, sirviendo como ligando mediando el reconocimiento parásito-célula *in vitro*, la gp83 pl 8.1-8.6 que se une a la superficie del fibroblasto *in vitro* y es expresada en tripomastigotes de cultivo. Una de las primeras moléculas relacionadas con la capacidad infectiva es el polipéptido de 90 kDa (pl 4.6) específica de metacíclicos identificada mediante el anticuerpo monoclonal 1G7 que es capaz de reducir la infectividad en ratones al inhibir la adhesión y penetración de los metacíclicos en células Vero (Yoshida et al., 1989). Estos mismos autores encontraron que la infectividad de los tripomastigotes disminuye al interaccionar con el anticuerpo monoclonal 10D8, que reconoce una proteína de 35 y 50 kDa ubicada en la superficie celular.

La gp82 interactúa con la célula mediante la cadena del azúcar, aunque se ha observado que la parte del péptido es la fracción más importante ya que tripomastigotes tratados con un inhibidor específico de la N-glicosilación infectan en mayor proporción células en comparación con los no tratados (Santori et al., 1996). Esta proteína se identificó mediante el anticuerpo monoclonal 3F6. Y de acuerdo con el grupo que la descubrió es específica de los tripomastigotes metacíclicos y no se expresa en los sanguíneos, amastigotes y epimastigotes y sería esencial para infecciones que involucren a la mucosa, ya que al tratar a los parásitos con el anticuerpo 3F6 reduce significativamente la infección resultante de un reto oral además de que inhibió la entrada en células epiteliales HeLa en

presencia de mucinas gástricas, lo que sugiere su participación en la invasión de la mucosa (Neira et al., 2003).

Ortega-Barria y Pereira reportaron una proteína de 60 kDa, penetrina, proteína que se une a la heparina y que promueve la adhesión y penetración de tripomastigotes. Ellos mismos sugieren que las moléculas como la heparina y el colágeno pudieran ser los receptores para la penetrina, que tiene gran habilidad de unirse a los componentes de la matriz extracelular, además observaron que la heparina, el colágeno y el sulfato de heparán inhiben la penetración de los tripomastigotes in vitro al bloquear la asociación de la penetrina con los receptores de la célula (Ortega-Barria y Pereira, 1992).

Otros estudios indican que la gp82 induce la activación de la cinasa de tirosina de tripomastigotes y un incremento en la concentración del calcio intracelular del parásito, esta señalización ha sido reportada extensivamente. Otras glicoproteínas de superficie del mismo tipo que la gp82 se han estudiado como la gp83, la gp85 y la Tc85, todas ellas expresadas en tripomastigotes sanguíneos o cultivados. (Ramírez et al., 1993 y Neira et al., 2003.).

La gp83 está implicada en la adhesión-invasión de las células, a través de la activación de la proteína de cinasa que regula la entrada en macrófagos. La gp82 es un miembro de una familia de multigenes que presentan un alto grado de homología con otros miembros de la superfamilia gp85 transialidasa, que en lo único en que difieren es en sus propiedades adhesivas, puesto que la gp82 no se une a los componentes de la matriz extracelular (Manque et al., 2000). Se ha demostrado que la gp90, se expresa diferencialmente en distintas cepas y que la habilidad del parásito para invadir las células se relaciona inversamente a la

expresión de la gp90. La gp90 se une a las células de una manera receptor-ligando sin necesitar la señalización de calcio, en contraste con la gp82 (Málaga y Yoshida, 2001). La gp90 es la principal molécula de membrana que se ancla mediante un GPI, y es sintetizada a partir de un precursor de 75 kDa que es glicosilado rápidamente generando la gp90. Como se mencionó participa en la adhesión e internalización de los tripomastigotes, aunque el mecanismo no está claro, se mencionan dos posibilidades: que la célula hospedero reconozca y se una a la fracción de la molécula que tiene el epítipo 1G7 que es parecido a algunos carbohidratos, el segundo mecanismo es que la fracción de oligosacáridos de la cadena del gp90 se une a algún receptor tipo lectina del hospedero (Yoshida et al., 1990).

Una vez que el parásito ha entrado a la célula, los lisosomas celulares parecen migrar hacia el parásito formando una vacuola parasitófora donde se transforma en amastigotes para posteriormente salir al citoplasma y seguir su replicación. Todos los mecanismos involucrados no son totalmente conocidos, sin embargo *in vitro* se ha podido conocer pequeños datos como la participación de moléculas como la TC-TOX, proteína hemolítica ácido resistente secretada. Esta proteína forma poros en la membrana a pH bajo y presenta una reacción cruzada con el C9 del complemento y se ha propuesto que participa en el escape del parásito de la vacuola hacia el citoplasma (Andrews y Whitlow, 1989). Otra proteína de la que no se ha logrado elucidar su mecanismo pero que se sospecha participa en la infección del tripomastigote es la *cis* o *trans* peptidil-prolil isomerasa secretada, una proteína más es la oligopeptidasa B, que juega un rol importante en la invasión celular, se ha demostrado mediante el reemplazamiento del gene

que esta enzima media la producción de un agonista de la señalización para las células que se requiere para una eficiente invasión e infectividad. (Manning-Cela et al., 2001).

Las proteasas de cisteína son relevantes en varios aspectos del ciclo de vida del parásito y en su relación con el hospedero. La principal de estas enzimas es la cruzipaina que es expresada en todos los estadios siendo más abundante en las formas replicativas y sobre todo en los epimastigotes. La cruzipaina participa en la entrada del parásito a las células del hospedero, en la nutrición a expensas del hospedero y en los mecanismos de escape del *T. cruzi* del sistema inmune del hospedero; además se considera que es un blanco prometedor para el desarrollo de nuevos agentes antiparasitarios, ya que se ha observado que inhibidores de estas proteasas bloquean la replicación y diferenciación *in vitro* e *in vivo* (Cazzulo et al., 1990; Salvati et al., 2001 y Scharfstein et al., 1986). Por otro lado, se sospecha que pudiera estar involucrada en el daño tisular ocasionado por el parásito al ser secretada, lo que facilita la ruptura de la célula. La función de la cruzipaina *in vivo* no está bien elucidada, sin embargo se ha observado que al adicionar inhibidores de proteasas a tripomastigotes en cultivo la cantidad de amastigotes intracelulares disminuye notablemente comparado con el control. Por otro lado también se afecta la diferenciación de epimastigotes a tripomastigotes de una manera dosis dependiente del inhibidor, lo que parece sugerir que estas proteasas de cisterna tienen un papel preponderante en el desarrollo y diferenciación de los parásitos en varios estadios de su ciclo de vida (Eakin et al., 1992).

La familia de los genes para transialidasas (TS) comprende al menos 140 miembros, que se clasifican en tres grupos de acuerdo a la estructura y función de los productos (proteínas). La familia de las transialidasas: la transialidasa, la transialidasa inactiva y la transialidasa de los epimastigotes; la familia de las parecidas a transialidasas: Tc-85, la proteína de superficie asociada a flagelo, el exoantígeno crónico, la proteína regulatoria del complemento y la Tc13 (Frasch, 2000).

El monosacárido, ácido siálico, de las mucinas participa en los procesos de interacción e invasión de las células, sin embargo *T. cruzi* es incapaz de sintetizarlo de novo, pero expresa la enzima transialidasa que transfiere el ácido de las moléculas que lo tienen a los aceptores que contienen residuos β -galactosil de la superficie del parásito (Di Noia et al., 1996).

La transialidasa se localiza en la superficie de los tripomastigotes anclada mediante GPI, por lo que se puede encontrar en el sobrenadante de cultivos, en el citoplasma de células infectadas o en circulación de pacientes infectados. Se ha postulado que participa en el escape del tripomastigote del fagolisosoma hacia el citoplasma, y en la resistencia del tripomastigote al complemento (Chuenkova y Pereira, 1995).

Actualmente se siguen estudiando las proteínas pero con un enfoque más moderno, como lo es estudiar el gen para ver en que afecta la expresión o no expresión de dicho gen. El empleo de mutantes de gp72 demostró que la habilidad de crecer en cultivo, la de infectar a los insectos y la capacidad de infectar a los hospederos se ven reducidos, esto pudiera explicarse por el hecho que los

epimastigotes con la gp72 deletada muestran una separación del flagelo y son incapaces de colonizar al vector (Basombrío et al., 2002).

Se ha observado que las proteínas de choque térmico (HSP) están involucradas en muchos procesos de regulación intracelulares en organismos eucariontes, en especial la HSP90, que se sabe está involucrada en el control de la diferenciación celular de *Leishmania donovani*. Por otro lado se ha visto que los cambios en el medio ambiente pueden inducir stress y llevar a una síntesis elevada de estas proteínas, esto sucede por ejemplo al momento de pasar del vector al hospedero ya que en ese momento existe un aumento de la temperatura (Graefe et al., 2002).

La Tc52, proteína secretada por el parásito presenta una secuencia similar a HSP de pesos pequeños; es crucial para la sobrevivencia del parásito y su virulencia. In vitro actúa como una tioltransferasa y como otras proteínas similares exagera las funciones inmunoregulatorias, además de que regula la proliferación de células T y activa los macrófagos en sinergia con el IFN γ incrementando los niveles de óxido nítrico y modulando la expresión de citocinas. Además se ha detectado Tc52 en circulación en ratones infectados (Ouassii et al., 2002).

Durante el ciclo de vida, el parásito para poder sobrevivir necesita cambiar rápidamente como respuesta al medio ambiente. Los procesos como diferenciación, metabolismo, crecimiento, expresión de genes y otros eventos celulares se dan a través de proteínas fosforilables reversiblemente. Las proteincinasas CK1, o caseincinasas 1 es una familia de proteincinasas comunes a todos los organismos eucariontes. La habilidad que tienen para fosforilar

proteínas componentes del citoesqueleto, moléculas de señalización, enzimas de vías metabólicas, proteínas relacionadas con la transducción de RNAm, en el procesamiento de los ácidos nucleicos pertenecientes a esta familia las hace de suma importancia. Las CK1 son proteínas que se encuentran en cualquier organelo celular, y pueden ser aisladas como proteínas con tamaños variables (25 a 60 KDa) en cualquiera de sus isoformas (α , β , δ , γ 1, γ 2, γ 3 y ϵ) (Spadafora et al., 2002).

II.10 PROTEOMA

En la actualidad nos encontramos en la era postgenómica, lo que ha llevado a nuevos descubrimientos, ha respondido varias preguntas pero al mismo tiempo ha creado muchas más, es por esto que actualmente la ciencia ha dado un paso adelante y se ha enfocado en el estudio de las proteínas.

El término de proteoma se acuñó en 1995 para describir el total de las proteínas expresadas por un genoma, y posteriormente se desarrolló el de proteómica para denominar cualquier tecnología desarrollada para el estudio del proteoma (Ashton et al., 2001).

De acuerdo a la teoría es posible separar hasta 100 000 proteínas, que son las que hay en promedio en un organismo multicelular, por lo que muchas veces para estudiar el proteoma se hace previamente un fraccionamiento celular, para estudiar cada organelo de interés, o bien cuando se trata de proteínas que se encuentran en pocas copias se puede realizar un enriquecimiento mediante otras técnicas como la cromatografía de afinidad, la inmunoprecipitación la cual requiere

tener el anticuerpo contra la proteína que se desea enriquecer. Otro aspecto es el estudio solo de las proteínas que son antigénicas mediante el Inmuno electrotransferencia, o bien purificar a las proteínas inmunodominantes para poder realizar comparaciones entre diferentes estadios por ejemplo lo que puede permitir identificar algún nuevo blanco ideal para el desarrollo de probables vacunas (Barreto et al., 2000).

El actual auge del que goza la proteómica coincide con el resurgimiento de la técnica de electroforesis bidimensional y el de la espectrometría de masas para biomoléculas, ya que estas técnicas por separado permiten el análisis de un gran número de proteínas complejas como lo son las proteínas de todo un organismo con buena resolución y sensibilidad, por lo que al combinarlas se obtienen métodos que nos permiten conocer el proteoma de cualquier célula, organismo o fluido biológico. Además de que permiten observar las diferencias entre tejidos sanos y enfermos, y desde el punto de vista industrial permite el estudio de las diferencias entre compuestos farmacéuticos diferentes. Ambas técnicas son tediosas y largas por lo que al poder automatizarlas se han optimizado los resultados obtenidos puesto que se pueden analizar un sin número de muestras en paralelo, lo que ayuda a realizar las comparaciones sin involucrar variables alternas.

Pero el analizar las proteínas no lo es todo, actualmente existen muchas bases de datos que permiten identificar las proteínas analizadas más rápidamente y de manera confiable (Cunningham, 2000).

La secuenciación de los genomas de bacterias es algo relativamente rápido, debido a su tamaño relativamente pequeño, algo que podemos extrapolar

a las proteínas; sin embargo esto no sucede con los protozoarios que por tener varios cromosomas y un genoma de mayor tamaño complican el análisis, en la actualidad solamente algunos cromosomas de *Plasmodium* y *Leishmania* han sido secuenciados en su totalidad (Ashton et al., 2001).

Uno de los principales objetivos del estudio del proteoma es identificar proteínas de un organismo que se ven involucradas en un proceso en particular. Para el caso de bacterias se han logrado identificar proteínas diferentes en cepas diferentes que presentan propiedades variadas, como lo es el caso de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium Bovis* BCG (Jungblut et al., 1999). Otro enfoque es el estudio de cepas de *Streptococcus pneumoniae* con diferentes sensibilidad a los antibióticos, o el estudio de proteínas inmunoreactivas de *Chlamydia trachomatis* en suero de pacientes infectados y correlacionar estas diferencias con cuadros clínicos diferentes (Washburn y Yates, 2000).

La electroforesis bidimensional no solo se ha aplicado a realizar comparaciones en búsqueda de diferencias, sino que también se ha empleado para realizar estudios filogenéticos de primates homínidos, que mediante la interpretación de las diferencias genéticas observadas entre taxas, evaluaron los cambios electroforéticos, lo que les permitió estimar el rango promedio de la sustitución de aminoácidos de las proteínas celulares detectadas por la 2D, de acuerdo a los autores los datos obtenidos por esta metodología pueden ser analizados por cualquiera de los métodos fenéticos y calcular la matriz de distancia, distancia genética de Nei, y empleando los diferentes programas para el diseño de árboles filogenéticos (Goldman y O'Brien, 1993).

En 1994 se estableció el proyecto para estudiar el genoma del *Trypanosoma cruzi*, y hasta el 2001 solo se conocía el 12% de su genoma, para ello se selecciono la clona CL-Brener para su análisis por que se considera que es representativa tanto en sus características biológicas y parasitológicas, esta cepa pertenece al genotipo II que representa a las cepas domésticas, y hasta este momento hay pocos datos de cepas del ciclo selvático, como la clona X-10 de la cepa Silvio ó Tulahuen, que pertenecen genotipo I. Algunos grupos sugieren que la cepa CL-Brener tiene un genoma más grande que la cepa Silvio X10 lo que indicaría alguna diferencia importante entre cepas de genotipos diferentes (Degraeve et al., 2001).

Hasta el momento son pocos los estudios del proteoma de *T. cruzi*, los únicos que hay datan de 1984 y fueron realizados mediante la técnica de geles cilindricos con anfólitos. En uno de ellos se analizaron las principales proteínas de superficie de diferentes estadios del ciclo de vida del parásito, donde encontraron que hay proteínas específicas de estadio y que además son reconocida de manera diferencial por suero de pacientes chagásicos y de ratones hiperinmunes; tal vez el dato más destacado de su trabajo fue el reconocimiento de una proteína de 90 KDa, en todos los estadios, pero que difería en sus puntos isoeléctricos aunque estos fueron cercanos, de 5.6-5.8 y 6.2 (Lanar y Manning, 1984).

Otro estudio se enfocó en las glicoproteínas diferenciales entre tripomastigotes y epimastigotes de la cepa Y, encontrando que hay dos glicoproteínas comunes a los dos estadios, de 90kDa, pI 5.5-6.5 y 80 KDa, pI 5.3-6.3; además de encontrar algunas específicas a cada estadio. En los epimastigotes solo encontraron una proteína específica de 70 KDa, pI 5.5;

mientras en los tripomastigotes encontraron 6 de rangos variados que van de 68 a 100 KDa y pI de 5 a 7.5 la mayoría con glucosa o manosa y una que contiene N-acetil-glucosamina (Andrews et al., 1984).

Son muy pocos los reportes recientes acerca del proteoma de *T. cruzi*, en la actualidad el estudio del proteoma de protozoarios está en la fase inicial y los pocos reportes que hay tratan acerca de la estandarización de la técnica. Para *Trypanosoma brucei*, el agente causal de la tripanosomiasis africana se acaba de estandarizar la metodología empleando el sistema IPG y optimizando la extracción empleando amortiguador de lisis con urea y tiourea; además de realizar la tinción con nitrato de plata optimizado para espectrometría de masas y azul coomasie con el mismo fin teniendo como resultado que al emplear el segundo solo se detectan del 10-25% de las reveladas por la plata (van Deursen et al., 2003).

Paba y colaboradores son el primero grupo en reportar un análisis del proteoma de *T. cruzi*, ellos realizaron la estandarización de la técnica e hicieron un estudio comparativo de los tres estadios del parásito y mediante el uso de MALDI identificaron algunas proteínas. En el estudio comparativo un dato importante es que resolvieron un máximo de 500 por gel, que es una cantidad menor a la esperada (Paba et al., 2004).

Se ha observado en diferentes estudios que el mantener por periodos prolongados de tiempo cultivos celulares ocasiona cambios en su genoma y por lo tanto en la expresión de proteínas, por lo que Contreras en 1998, estudio cultivos de tripomastigotes y epimastigotes, comparando los parásitos de las mismas cepas provenientes del vector para conocer si sus genes y los antígenos que expresan han cambiado a lo largo del tiempo, para ello empleo la electroforesis

bidimensional, encontrando que hay diferencias entre los antígenos expresados por los parásitos provenientes de cultivo y los del vector, lo que mostró que el hecho de mantenerlos en cultivo altera su antigenicidad (Contreras et al., 1998).

En el caso de *Leishmania*, otro parásito de la misma familia que *T. cruzi*, se ha logrado estandarizar la técnica, después de enfocarse en la preparación de la muestra, comparando extractos con diferentes detergentes, encontrando que el preparado con un detergente no iónico como el NP-40 se obtiene un mayor número de proteínas con buena resolución y reproducibilidad que incluso que el preparado con CHAPS en donde se extraen aproximadamente casi la mitad de las proteínas aunque con muy buena resolución (Acestor et al., 2002). Por otro lado han realizado estudios comparativos entre diferentes estadios de la transformación de promastigotes-amastigotes, marcando las células radioactivamente, para posteriormente realizar la separación bidimensional, encontrando que conforme avanza el proceso de diferenciación algunas proteínas dejan de expresarse y algunas otras comienzan a aparecer, lo que indica que hay proteínas esenciales para la transformación y específicas de cada estadio, esto con base en que cada fase del ciclo de vida se desarrolla en condiciones ambientales diferentes y el parásito necesita proteínas que le sean útiles para sobrevivir. Los principales cambios en el patrón de proteínas se dan entre los días 5 a 7 después del cambio de pH del medio, donde hay una disminución muy notable en la síntesis de proteínas, misma que permanece baja para al final del periodo de transformación, aunque las proteínas detectadas por estos días son las mismas que se observaban al inicio. Durante el seguimiento de la transformación se realizaron tinciones con plata para visualizar las proteínas presentes y además como las

células se marcaron radioactivamente se realizó el seguimiento de la síntesis de nuevas proteínas mediante autoradiografías, en este trabajo solo estudiaron a las proteínas pero no pudieron ser identificadas por las técnicas adecuadas, sin embargo cuando el genoma este disponible en su totalidad se podrá realizar la identificación de estas proteínas (Thiel y Bruchhaus, 2001).

Un nuevo aspecto es la comparación de promastigotes de *L. amazonensis* virulentos con avirulentos, con la finalidad de encontrar que diferencias hay entre ellos y tal vez explicar los diferentes grados de virulencia que muestran ambos promastigotes, enfocándose en el estudio de los perfiles de las enzimas proteolíticas, puesto que se ha observado que las proteasas de cisteína son esenciales para crecer dentro de los macrófagos; encontrando que en la forma avirulenta estas enzimas se encuentran notablemente disminuidas en comparación con las virulentas lo que pudiera explicar estas diferencias, puesto que aunque los promastigotes son capaces de invadir a los macrófagos no logran sobrevivir intracelularmente, otro hecho importante es que al cultivar por varios años a estos parásitos la actividad de las proteasas de cisteína disminuye y no son capaces de inducir las lesiones características en los hospederos (de Araujo et al., 2003).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a la diversidad genética del *Trypanosoma cruzi* existen cepas con genotipos y características biológicas diferentes. Por lo que se determinará el proteoma de las cepas mexicanas Ninoa y Querétaro, pertenecientes al genotipo I que presentan diferentes grados de virulencia en el modelo murino y de la cepa Ver-6 con genotipo II, que es más parecido genéticamente a las cepas sudamericanas que provocan un cuadro patológico más intenso y un mayor número de casos clínicos de la enfermedad de Chagas.

IV. HIPÓTESIS

Se piensa que la causa de la distinta virulencia entre cepas de *Trypanosoma cruzi* se debe a una expresión diferencial de algunas proteínas. Por lo que es posible que las cepas mexicanas que se analizarán y que presentan diferente virulencia "in vivo" presentaran patrones electroforéticos bidimensionales diferentes con la posibilidad de relacionar algunas de éstas con sus características biológicas.

V. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar el proteoma de tres cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi* que presentan características biológicas y genéticas diferentes.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Estandarizar la técnica de electroforesis en doble dimensión para las cepas mexicanas *Trypanosoma cruzi*.
2. Analizar las proteínas más abundantes en las cepas mexicanas estudiadas.
3. Realizar un estudio comparativo entre el proteoma de las diferentes cepas analizadas.
4. Determinar la antigenicidad de las proteínas detectadas por medio de reconocimiento de anticuerpos de pacientes chagásicos en fase crónica y de anticuerpos monoclonales anti *T. cruzi*.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS.

VI.1 CEPAS DE *Trypanosoma cruzi* EMPLEADAS.

Se analizaron 3 cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi* con diferentes características genéticas, biológicas y aisladas de diferentes orígenes y localidades y que han sido estudiadas previamente en nuestro grupo, la cepa Ninoa muestra en modelo murino un 0% de mortalidad en tanto que Querétaro mata entre 90 y 100% de los ratones. (Sosa, 2003). Para la cepa Ver-6 no se tienen datos acerca de su comportamiento en modelo murino, pero se sabe que a diferencia de las 2 cepas anteriores, esta pertenece al grupo genético II (López-Olmos et al., 1998).

Tabla 1. Características de las cepas de *Trypanosoma cruzi* estudiadas.

	Genéticas	Biológicas	Procedencia	Origen
Ninoa	Tc-I	Avirulenta	Oaxaca	Humano
Querétaro	Tc-I	Virulenta	Querétaro	Triatómico
Ver-6	Tc-II	ND	Veracruz	D. virginiana

VI.2 MEZCLA DE SUEROS HUMANOS Y ANTICUERPOS MONOCLONALES.

La mezcla de sueros humanos chagásicos crónicos se formó a partir de 5 sueros de pacientes mexicanos con enfermedad de Chagas crónica con serología positiva para anticuerpos contra *T. cruzi*, y la mezcla de sueros de individuos sanos negativos se formó de 5 sueros con serología negativa; analizados por ELISA e inmuno electrotransferencia estandarizados por nuestro grupo (Sánchez et al., 2001).

Los anticuerpos monoclonales usados, B106E, 1D5 y F14B, fueron producidos en ratón y caracterizados en nuestro grupo, los cuatro se estudiaron "in vitro" e "in vivo". El anticuerpo B106E, al ponerse en contacto con tripomastigotes previó a infectar células, mostró una inhibición parcial de la entrada del parásito a las células. Además al momento de observar su efecto "in vivo" se encontró que protegió parcialmente a ratones y produjo una bajada de la parasitemia y disminuyó la mortalidad con respecto al control. (López-Olmos, 1999). Las características de los anticuerpos monoclonales empleados se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 2. Características de los anticuerpos monoclonales utilizados en Inmuno electrotransferencia.

ANTICUERPO	ISOTIPO	LOCALIZACIÓN DEL EPÍTOPE	PESO DE LA PROTEÍNA RECONOCIDA
B106E	IgG2a	Superficie celular	180 KDa
1D5	IgG1	ND	45 KDa
F14B	IgM	Superficie celular	35-40 KDa

VI.3 CULTIVO DE EPIMASTIGOTES

Los parásitos se cultivaron a 28°C en medio LIT, suplementado con 10% de suero fetal bovino previamente inactivado a 56°C por 30 minutos y 25 µg/mL de hemina a pH 7.2. Los cultivos se iniciaron con 1 mL de cultivo anterior y llevándolo a 6 mL con medio fresco en cajas de cultivo de 25 cm², escalando el cultivo después de 6 días a cajas de 75 cm² con 5 mL de cultivo y completando a 25 mL para finalmente pasar a botellas roladoras con 180 mL de medio fresco, 20 mL de cultivo, manteniéndolas en agitación constante por 6 días. (López-Olmos et al., 1998).

VI.4 PREPARACIÓN DE EXTRACTO PROTEÍCO TOTAL.

Los cultivos se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se desecharon y el botón de parásitos se resuspendió en PBS para ser lavados dos veces en las mismas condiciones. Los parásitos se resuspendieron en el amortiguador de lisis, el indicado en cada ocasión y de acuerdo a la metodología indicada abajo, recién preparado y se agregaron los inhibidores de proteasas (Anexo XI.1.) para ser agitados vigorosamente en el vortex por 2 minutos, para después ser mantenidos en hielo por 10 minutos. Finalmente se centrifugaron a 10000 rpm durante 15 minutos a 4°C, el sobrenadante se colectó y se almacenó en alícuotas pequeñas a -70°C hasta su uso. Una alícuota se almacenó a 0°C para realizar la determinación de proteínas y realizar una electroforesis unidimensional para observar el patrón de bandeo.

VI.5 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.

La determinación de proteínas se realizó mediante el uso del kit BCA Protein Assay de Pierce, (cat. 23277), que se basa en la reacción del ácido bicinchonínico con las proteínas reducidas. Se preparó una curva estándar con albúmina sérica en concentraciones de 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 y 2000 $\mu\text{g/mL}$. Las muestras se diluyeron 1:100, 1:250 y 1:500 para su determinación. Después de agregar el reactivo de trabajo a las muestras se incubaron a 37°C por 30 minutos después de los cuales se realizó la lectura de densidad óptica con un lector de ELISA, Modelo 550 Bio-Rad a 595 nm. Las concentraciones se calcularon a partir de la construcción de la gráfica de la curva estándar e interpolando los valores obtenidos para las muestras desconocidas.

VI.6 ELECTROFORESIS EN CONDICIONES REDUCTORAS DE PROTEÍNAS EN GELES DE ACRILAMIDA (SDS-PAGE).

Se realizaron las separaciones de cada extracto preparado empleando minigeles de poliacrilamida al 12% (Laemmli, 1970), empleando la cámara Mini Protean de Bio-Rad. Después de realizar la separación los geles se tiñeron por 30 minutos con azul coomasie para posteriormente realizar la destinción del fondo toda la noche con solución destefnidora de coomasie.

VI.7 ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL (2D-PAGE) EMPLEANDO EL SISTEMA IPG, MULTIPHOR.

La rehidratación de la tira se realizó en la charola para ello, colocando la solución de rehidratación con la muestra y poniendo la tira con el gel hacia abajo evitando la formación de burbujas, después de 15 minutos se cubrió con fluido para cubrir IPG (Amersham, cat. 17-1335-01) y se dejó rehidratar por mínimo 12 horas. El isoelectroenfoco se realizó a 20°C en la cámara Multiphor con el programa enlistado abajo:

Paso	V	mA	W	Tiempo (h)
1	300	2	5	0:01
2	3500	2	5	1:30
3	3500	2	5	3:30
Total				5:30

Una vez realizado la primera dimensión la tira se equilibro 2 veces por 15 minutos cada vez en solución de equilibrio con DTT. Si no se realizaba la segunda dimensión inmediatamente, la tira se almacenaba a -70°C hasta su uso. La segunda dimensión se realizó en geles de acrilamida al 12% por aproximadamente 5 horas a 200 V para finalmente teñir el gel con azul coomasie (Berkelman y Stenstedt, 1998).

VI.8 2D-PAGE EMPLEANDO GELES CILÍNDRICOS PARA EL ISOELECTROENFOQUE.

El isoelectroenfoque se realizó en la cámara Protean Xi Cell de Bio-Rad en tubos de vidrio de 13 cm. de largo y 5 mm de diámetro, la separación se realizó toda la noche a 400 V y 1 hora a 500 V en el cuarto frío. Después de terminada la separación los tubos se extrajeron con ayuda de una jeringa. Los geles se equilibraron por 30 minutos para posteriormente realizar la separación de acuerdo a su peso molecular en geles de acrilamida al 12%. La segunda dimensión se realizó en cuarto frío por aproximadamente 5 horas a 200 V constantes, una vez terminado el gel se dejó toda la noche en solución removedora de anfolinas en agitación lenta para ser teñido al día siguiente con azul de Coomassie (O'Farrell, 1975).

VI.9 2D-PAGE CON EL SISTEMA IPG PROTEAN IEF CELL.

La muestra se preparó con la adición de urea y CHAPS para tener 8 M y 2% respectivamente, añadiendo el amortiguador de rehidratación para completar el volumen adecuado para cada tira, 125 y 350 μL para tiras de 7 y 18 cm. respectivamente. Esta solución se colocó en la charola de rehidratación y la tira con el gel hacia abajo por aproximadamente 1 hora hasta que la muestra se absorba casi en su totalidad para finalmente colocar fluido para cubrir IPG (Amersham, cat. 17-1335-01) y dejar rehidratar la tira por 12 horas mínimo. El isoelectroenfoque se realizó en la cámara Protean IEF Cell, Bio-Rad, a 20°C con el programa adecuado para cada tira:

Paso	Modo	mA	V	Tiempo	V	Tiempo
			Tiras 7 cm.		Tiras 18 cm.	
1	Lineal	50	250	0:20	250	0:20
2	Lineal	50	4000	2:00	10000	2:30
3	Rápido	50	4000	10000 VH	10000	40000 VH

Una vez realizado el isoelectroenfoque la tira se equilibro en solución de equilibrio en dos periodos de 15 minutos, el primero con DTT y el segundo con iodoacetamida. Sí no iba a realizar inmediatamente la segunda dimensión la tira se congelaba a -70°C hasta su uso (modificado de Berkelman y Stenstedt, 1998). La segunda dimensión se realizo en geles de acrilamida al 10% a 200 V por aproximadamente 6 horas a 4°C . Los geles se tiñeron con plata.

VI.10 TRANSFERENCIA A MEMBRANA DE NITROCELULOSA.

En geles de acrilamida al 10% se separaron 200 μg de proteína a 200 V por 40 minutos y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa con poro de 0.45 μm Protran, marca Schleicher&Schuell, Cat. 10401196; empleando la cámara Mini Trans Blot de Bio-Rad a 100 V por 1 hora 10 minutos (Towbin et al., 1979). Se verifico la transferencia tiñendo la membrana con solución de rojo Ponceaus (Sigma, Cat. P-7170) y destiñendo totalmente con PBS.

VI.11 INMUNO ELECTROTRANSFERENCIA.

Las membranas se bloquearon toda la noche a 4°C con leche descremada al 10% en PBS, para posteriormente incubarse por 2 horas a temperatura ambiente con el mezcla de sueros humanos diluido 1:500 en leche, volumen total de 5 mL que se colocaron en bolsas plásticas que se sellaron; después se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con Tween 20 al 0.1%. El segundo anticuerpo anti IgG (cadenas pesada y ligera) humano de Zymed (cat. 81-7120) se agregó diluido 1:10000 en Tween 20 0.1% y se incubo por dos horas para después realizar nuevamente lavados y finalmente revelar con una solución de 0.5 mg/mL de 3,3-diaminobenzidina (Sigma, cat, D-5637) y 0.02% de peróxido de hidrógeno, parando la reacción con agua bidestilada.

En el caso de los anticuerpos monoclonales, se emplearon 1 µg/mL de los anticuerpos B106E y 1D5 puros, y del F14B se emplearon sobrenadantes de cultivo diluidos 1:10 el volumen final fue de 5 mL, esto se incubaron por dos horas a temperatura ambiente, empleando bolsas de plástico, posteriormente se lavaron e incubaron con el anticuerpo anti IgG (gama)-HRP de Zymed (cat. 61-6020) de ratón diluido 1:1000 en los dos primeros casos y en los segundos se empleo un anticuerpo anti Ig (cualquier isotipo) de ratón biotinilado (Amersham, cat. RPN-1177) diluido 1:1000, esto se incubaron por dos horas para posteriormente lavar y los primeros revelarlos como se menciona arriba en tanto que los segundos se incubo por dos horas con un anticuerpo estreptoavidina-HRP (Amersham, cat. RPN-1231), diluido 1:1000 para finalmente revelar como se menciona arriba.

VI.12 DOCUMENTACIÓN DE GELES.

Todos los geles se fotografiaron o escanearon con el equipo Fluor S de Bio-Rad, de aquellos geles que solo se tenían fotografías, estas se escanearon con el mismo equipo para tener todas las imágenes del mismo tamaño y con la misma resolución.

VI.13 ANÁLISIS DE GELES.

Se empleó el programa PD-Quest versión 7.0 de Bio-Rad para realizar el análisis de los geles y la obtención de imágenes de geles representativos de todas las repeticiones.

VII. RESULTADOS

VII. 1 ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS PROTEÍCOS TOTALES POR SDS-PAGE.

Durante el desarrollo del trabajo experimental se emplearon extractos proteicos totales de tres cepas de *T. cruzi*, preparados con diferentes amortiguador de lisis, que al separarse mediante SDS-PAGE no permitió detectar diferencias significativas entre dichos extractos, Figura 7.

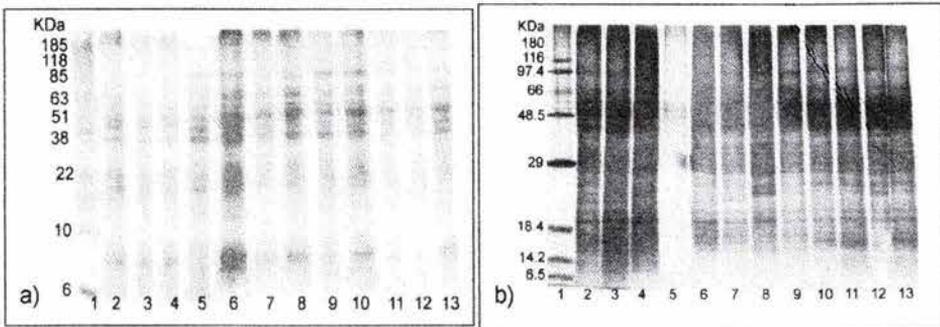


Fig. 7. Geles de SDS-PAGE de los diferentes extractos. Corrimiento electroforético desnaturizante en geles de poliacrilamida al 12%. a) Gel teñido con azul coomasie, donde se corrieron 10 μ g/carril de proteína y b) Gel teñido con nitrato de plata, cargado con 5 μ g/carril de proteína. Carriles: 1) Marcadores de Peso Molecular, 2) Ninoa CHAPS 2%, 3) Ninoa CHAPS 4%, 4) Ninoa Tiourea, 5) Ninoa Tritón X-100, 6) Querétaro CHAPS 2%, 7) Querétaro CHAPS 4%, 8) Querétaro Tiourea, 9) Querétaro Tritón X-100, 10) Ver-6 CHAPS 2%, 11) Ver-6 CHAPS 4%, 12) Ver-6 Tiourea y 13) Ver-6 Tritón X-100.

VII.2 ESTANDARIZACIÓN DE ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL.

VII.2.a. EQUIPO MULTIPHOR.

Al realizar los primeros experimentos de electroforesis bidimensional, con el equipo Multiphor se emplearon extractos preparados con amortiguador de lisis de CHAPS al 4%, obteniendo geles muy pobres y sin reproducibilidad entre cada experimento, pese a que se realizaron muy diversas modificaciones, que se resumen en la tabla 3. Un gel representativo de esta serie de experimentos se observa en la figura 8.

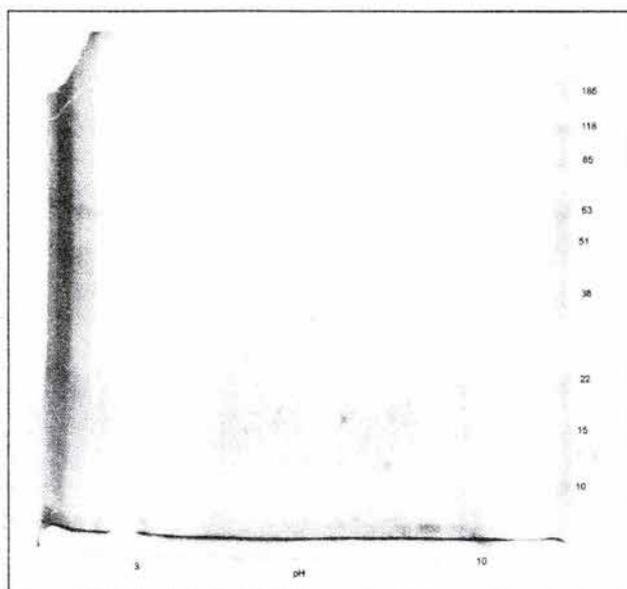


Fig. 8. Gel 2D-PAGE representativo del equipo Multiphor. Isoelectroenfoco del extracto (150 μ g proteína) de la cepa Querétaro obtenido con amortiguador de lisis urea 8M al igual que el amortiguador de rehidratación y se realizó en tiras de 13 cm de longitud con un gradiente de pH 3-10 NL en un equipo Multiphor, la segunda dimensión se realizó en gel de acrilamida al 12% y fue teñido con azul coomasie.

Tabla. 3 Resumen de las modificaciones realizadas durante la estandarización de 2D-PAGE con el equipo Multiphor.

VARIABLES	RESULTADOS
Preparación de la muestra, detergente empleado: <ul style="list-style-type: none"> • CHAPS 2 y 4% • Tritón X-100 2 y 4% 	Número reducido de proteínas observadas y no había reproducibilidad.
Aplicación de la muestra: <ul style="list-style-type: none"> • Con copas • Sin copas 	Número reducido de proteínas observadas y no había reproducibilidad.
Tiempo de rehidratación de tira IPG	Número reducido de proteínas observadas y no había reproducibilidad.
Modo de corrimiento: <ul style="list-style-type: none"> • Volts y tiempo • Volts/hora 	Número reducido de proteínas observadas y no había reproducibilidad.
Rango de pH de la tira IPG: <ul style="list-style-type: none"> • 4-7 • 3-10 No Lineal 	Número reducido de proteínas observadas y no había reproducibilidad.

VII.2.b GELES CILÍNDRICOS.

Dados los resultados anteriores, se cambió la metodología al realizar el isoelectroenfoque en geles cilíndricos y generando el gradiente de pH mediante el empleo de mezclas de anfólicas. Con esta modificación se logró mejorar tanto la reproducibilidad como la resolución. Sin embargo, pese a obtener resultados reproducibles tanto al momento de generar los gradientes, como en el número de proteínas resueltas y el patrón obtenido, se decidió no seguir empleando esta metodología debido a que el número máximo de proteínas separadas fue de aproximadamente 50. Un resumen de todas las modificaciones realizadas se puede ver en la tabla 4. Geles de cada una de las cepas se pueden observar en las figuras 9, 10 y 11.

Tabla 4. Resumen de las modificaciones realizadas durante la estandarización de 2D-PAGE en geles cilíndricos.

VARIABLE	RESULTADO
Preparación de la muestra, detergente empleado: <ul style="list-style-type: none"> • CHAPS 2 Y 4% • Tritón X-100 2 y 4% • Extracto fresco • Extracto congelado 	Mejor resolución y reproducibilidad que con el sistema Multiphor y sin diferencia en los resultados de cada variable,
Sistema empleado: <ul style="list-style-type: none"> • Capilares • Cilindros de 13 cm. 	Buenos resultados, con buena resolución y reproducibilidad al emplear cilindros de 13 cm. con diámetro de 5 mm.
Concentración de anfolinas: <ul style="list-style-type: none"> • 20% anfolinas 3.5-10 • 60% anfolinas 3.5-10 	Se mantienen los resultados iguales empleando ambas concentraciones.
Programa de corrimiento: <ul style="list-style-type: none"> • 12 h 30 m. • 15 h 30 m 	Mejora la resolución al emplear el programa de 15 horas.
Equilibración previa a SDS-PAGE	Mejora la resolución al equilibrar los geles.
Grosor del gel de SDS-PAGE: <ul style="list-style-type: none"> • 1.5 mm. • 3.0 mm. 	Se mantiene la resolución con ambas variables.

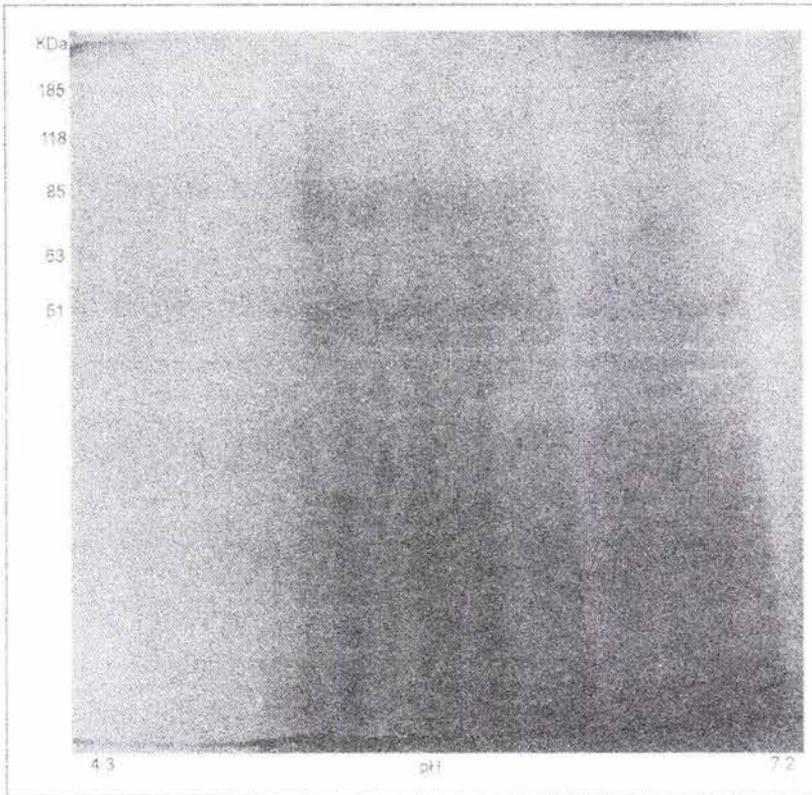


Fig. 9. Gel 2D-PAGE representativo de la cepa Ninoa en geles cilíndricos. El isoelectroénfoque se realizó en geles cilíndricos de 11cm de longitud con anfolinas de 5-7 y 3.5-10, la segunda dimensión se realizó en gel de acrilamida al 12% y fue teñido con azul coomasie

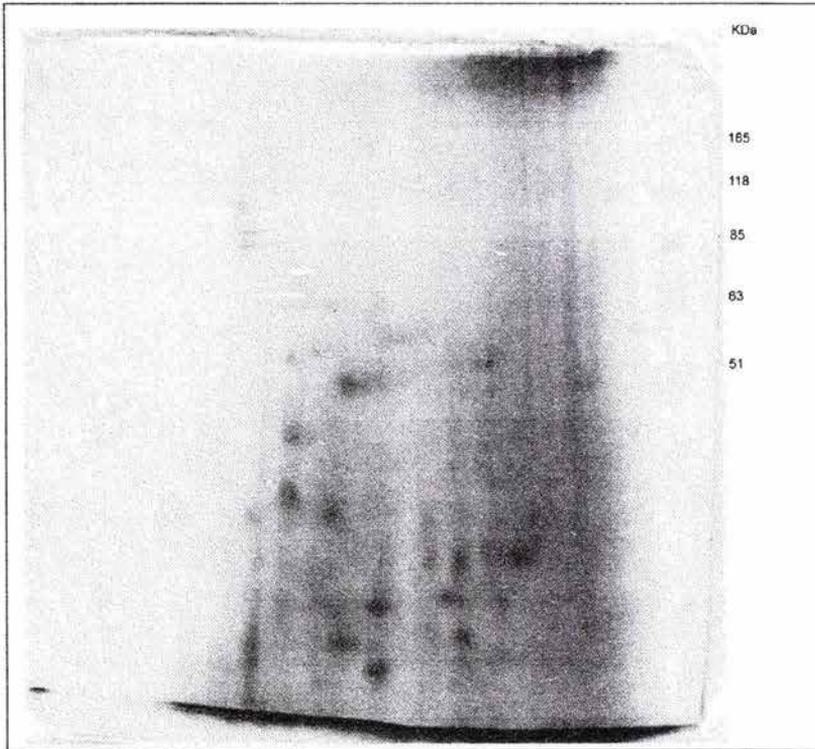


Fig. 10. Gel 2D-PAGE representativo de la cepa Querétaro en geles cilíndricos. El isoelectroenfoco se realizó en geles cilíndricos de 11cm de longitud con anfolinas de 5-7 y 3.5-10, la segunda dimensión se realizó en gel de acrilamida al 12% y fue teñido con azul coomasie.

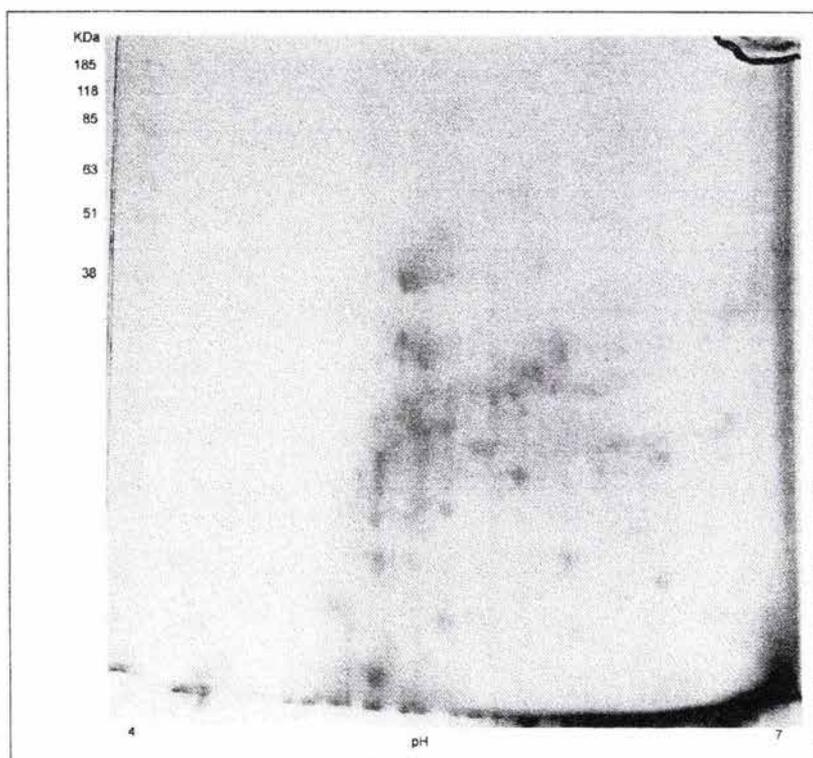


Fig. 11. Gel 2D-PAGE representativo de la cepa Ver-6 en geles cilíndricos. El isoelectroenfoque se realizó en geles cilíndricos de 11cm de longitud con anfolinas de 5-7 y 3.5-10, la segunda dimensión se realizó en gel de acrilamida al 12% y fue teñido con azul coomasie.

Uno de los principales problemas de esta metodología es la generación de gradientes de pH reproducibles, puesto que estos van a depender de la mezcla de anfólinas, pero sobre todo de la aplicación del voltaje que lo va a formar, sin embargo este último factor no es totalmente controlable, puesto que por la duración del corrimiento este se realizó en la noche y se presentó una variación del voltaje que ocasionó que el corrimiento se parara y esto afectara directamente la separación de las muestras y la formación del gradiente. (Fig. 12)

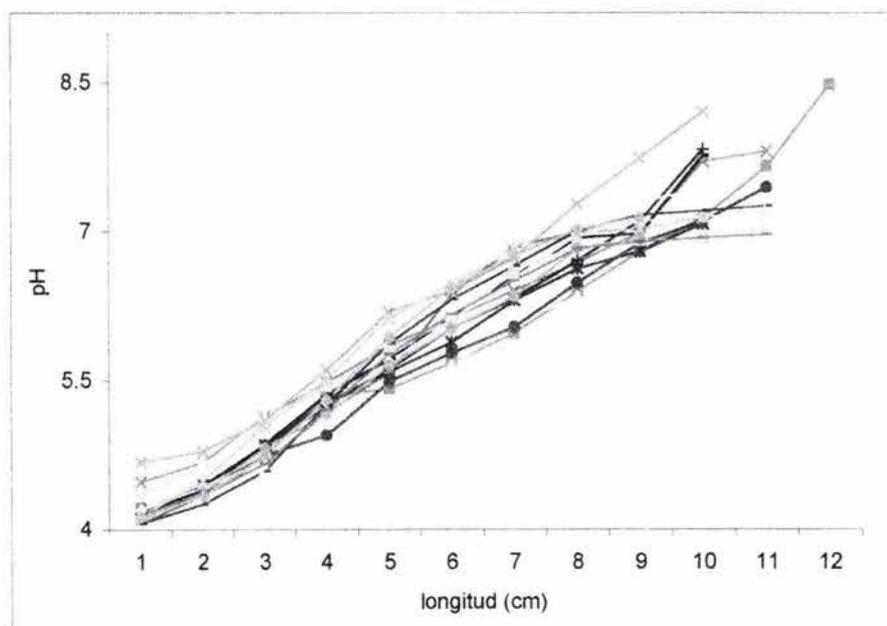


Fig. 12. Reproducibilidad en los gradientes de pH generados mediante el empleo de anfólinas durante el isoelectroenfoque en geles cilíndricos. Cada línea representa un experimento diferente, para determinar el gradiente de pH generado, un gel se corrió en blanco sin muestra, y posteriormente se cortaba en fracciones de 1 cm e incubaba en agua milliQ, para finalmente medir el pH de cada fracción.

Para generar el gradiente de empleo una mezcla de anfolinas de 3.5-10 y de 5-7, 20 y 80% respectivamente, por lo que se esperaba que el gradiente generado, abarcar este rango sin embargo como podemos ver en la figura 12 el gradiente iba de aproximadamente pH 4 a 8, por lo que se planteo que tal vez modificando las proporciones de las anfolinas se iba a lograr extender el gradiente, por lo que se realizaron geles por duplicado con concentraciones de anfolinas 3.5-10 de 20, 40, 60, 80 y 100% y el resto de anfolinas de 5-7 completó el 100%, dichos geles se corrieron el blanco con el mismo programa que al separarse las muestras. Las gráficas obtenidas se muestran en la figura 13. Como se puede ver el gradiente solo aumento en la parte alcalina del gradiente, llegando a un pH de 8.75, en tanto que la parte ácida no se observó un cambio significativo por lo que se pensó que quizá este comportamiento se debía al uso de anfolinas que habían sido almacenadas por un periodo largo de tiempo, por lo que se realizaron unos nuevos geles en blanco manteniendo las concentraciones de anfolinas 3.5-10 al 60%, con dos lotes diferentes de anfolinas las empleados hasta ese momento y unas frescas.

El gradiente generado no se vio afectado por el empleo de anfolinas de dos lotes distintos, puesto que como se puede ver en la figura 14, los gradientes generados son prácticamente iguales y se sobreponen en casi todos los puntos.

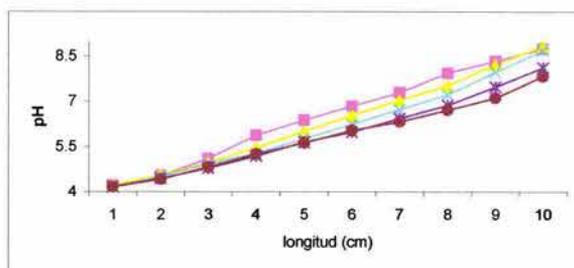


Fig. 13. Gradiente de pH generado con diferentes concentraciones de anfolinas 3.5-10. Se hicieron geles cilindricos con 20, 40, 60, 80 y 100% de anfolinas 3.5-10 por duplicado y se corrieron en blanco, para determinar el gradiente de pH generado, se cortaba en fracciones de 1 cm e incubaba en agua milliQ, para finalmente medir el pH de cada fracción (20%, 40%, 60%, 80% y 100%).

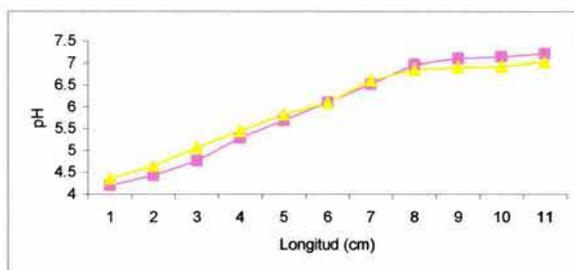


Fig. 14. Gradiente de pH generado al emplear dos lotes de anfolinas diferentes. Se corrieron en blanco geles con anfolinas almacenadas y frescas, 60 % de 3.5-10 y 40 % de 5-7; por duplicado y se determino el gradiente de pH generado como se menciona en las figuras 12 y 13 (anfolinas frescas y anfolinas almacenadas).

VII.2.c EQUIPO IEF CELL.

Posteriormente se retomó el uso de la metodología de IPG para realizar el isoelectroenfoque, cambiando la preparación de la muestra y el equipo usado; el equipo empleado tiene integrado la fuente de poder, que permite emplear voltajes más altos en comparación al iniciado con el equipo Multiphor, además de controlar la temperatura durante el corrimiento mediante un sistema peltier, Bio-Rad, que la mantiene constante.

Para la preparación de la muestra se continuó empleando el mismo amortiguador de lisis, el cambio consistió en añadir urea, CHAPS, DTT e IPG amortiguador al momento de rehidratar la tira, y permitir que la muestra se absorbiera por aproximadamente 30 minutos en la tira antes de colocar el aceite mineral, el isoelectroenfoque se realizó con un programa que incluía tres pasos, el último de ellos en modo Volts/hora lo que prolongó el corrimiento a por lo menos 10 horas. Finalmente, la detección de las proteínas separadas se realizó mediante una tinción con plata, lo que nos permitió detectar proteínas que se encuentran en bajas concentraciones.

Para el análisis de los geles obtenidos se empleó el software PDQuest, que permite realizar comparaciones de varios geles simultáneamente y construir en base a ellos un gel representativo que muestra los puntos que aparezcan en la mayoría de los geles experimentales, además de calcular el peso molecular y punto isoeléctrico de cada punto, realizar análisis densitométricos, entre otras funciones. En las figuras 15-17 se pueden observar los geles representativos contruidos para cada cepa.

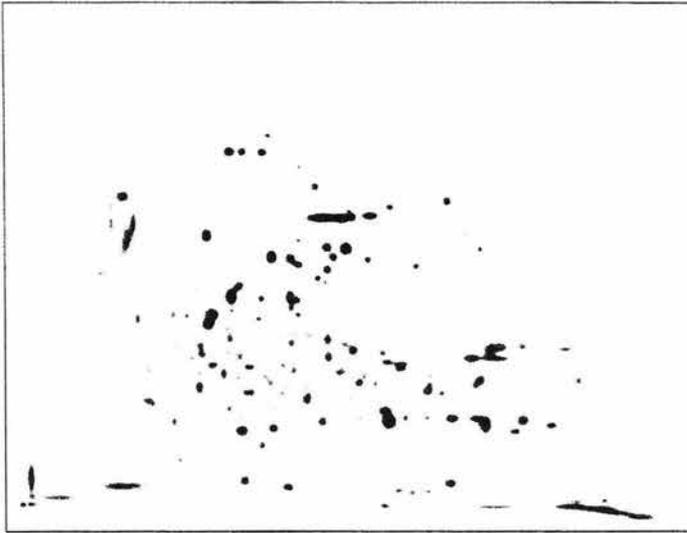


Fig. 15 Gel representativo de la cepa Ninoa. Gel construido por el programa PDQuest a partir de 3 geles experimentales.

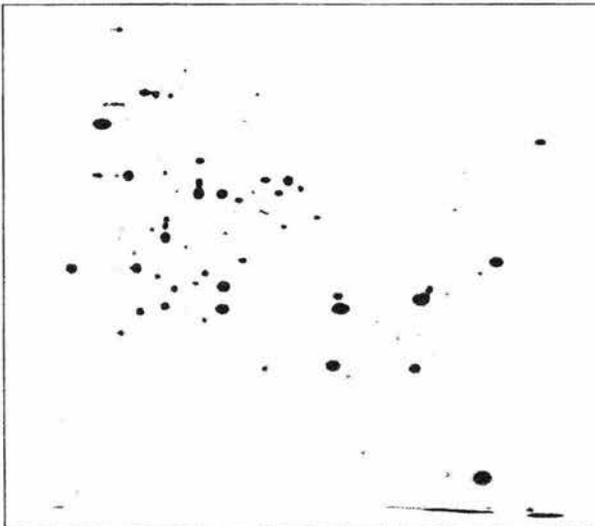


Fig. 16 Gel representativo de la cepa Querétaro. Gel construido por el programa PDQuest a partir de 1 gel experimental.

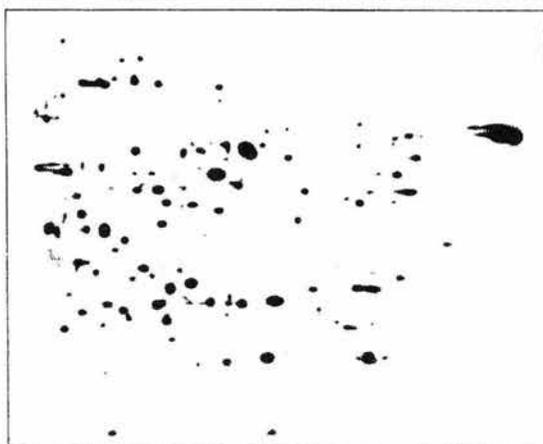


Fig. 17 Gel representativo de la cepa Ver-6. Gel construido por el programa PDQuest a partir de 4 geles experimentales.

Los geles pueden ser exportados por el programa con una cuadrilla de punto isoeléctrico y peso molecular, para una identificación más accesible de cada punto. Los geles con las cuadrillas se pueden observar en las figuras 18-20.

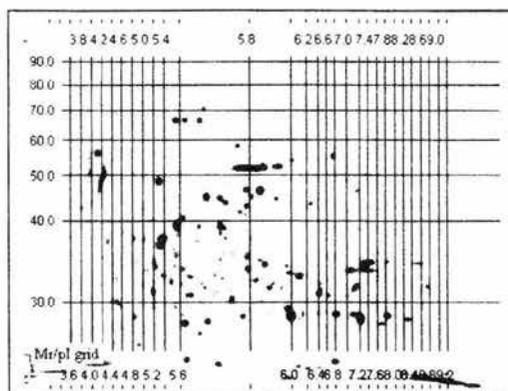


Fig. 18 Gel representativo de la cepa Ninoa. Gel construido por el programa PDQuest a partir de geles experimentales, donde se puede observar la cuadrilla para conocer el peso molecular y punto isoeléctrico.

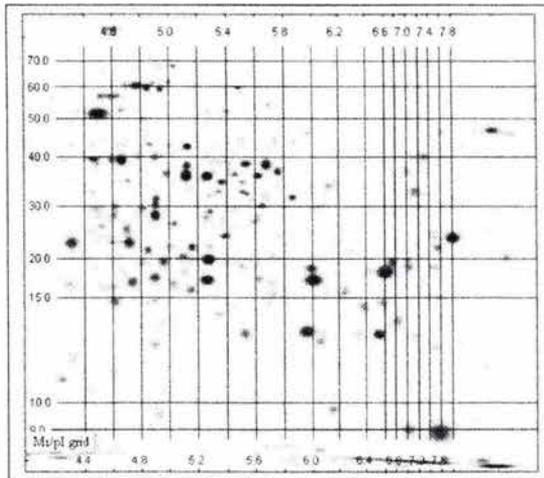


Fig. 19 Gel representativo de la cepa Querétaro. Gel construido por el programa PDQuest a partir de geles experimentales donde se puede observar la cuadrilla para conocer el peso molecular y punto isoeléctrico.

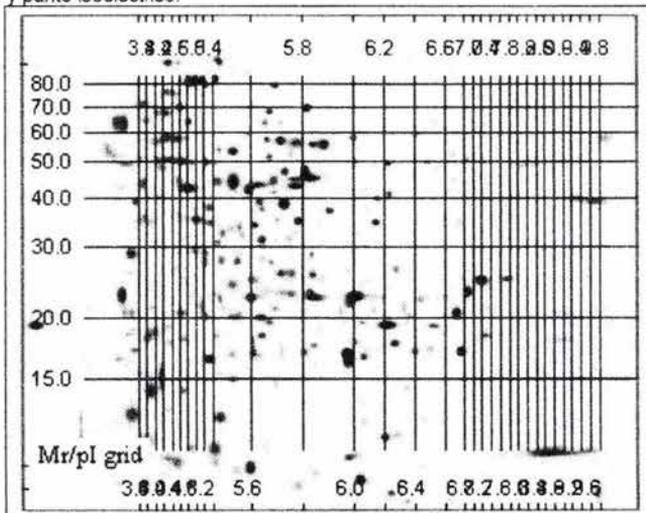


Fig. 20 Gel representativo de la cepa Ver-6. Gel construido por el programa PDQuest a partir de geles experimentales donde se puede observar la cuadrilla para conocer el peso molecular y punto isoeléctrico.

Debido a que como se puede observar en los geles de las figuras no se observan proteínas de pesos moleculares mayores a 70 KDa, por lo que se modificó el amortiguador de lisis añadiendo 2M de tiourea, además de agregarse al momento de preparar la muestra para hidratar la tira. Estos geles se pueden ver en las figuras 21-23. En las figuras 24 a 26 se observan las cuadrículas indicando los pesos moleculares y puntos isoeléctricos generados por el programa PD-Quest.

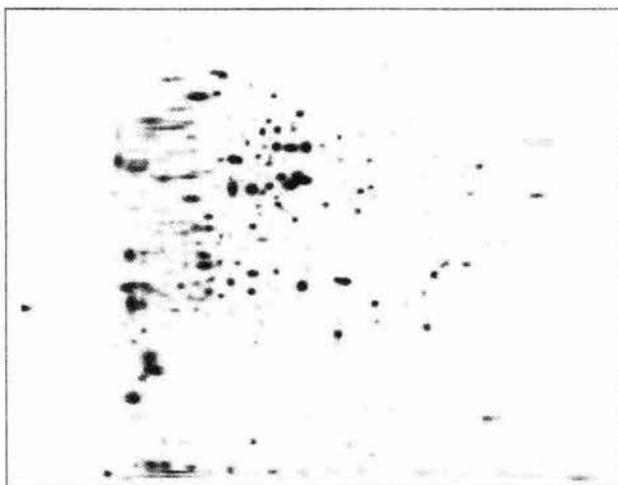


Fig. 21 Gel representativo de la cepa Ninoa con amortiguador de lisis tiourea 2M. Gel construido por el programa PDQuest a partir de 2 geles experimentales.

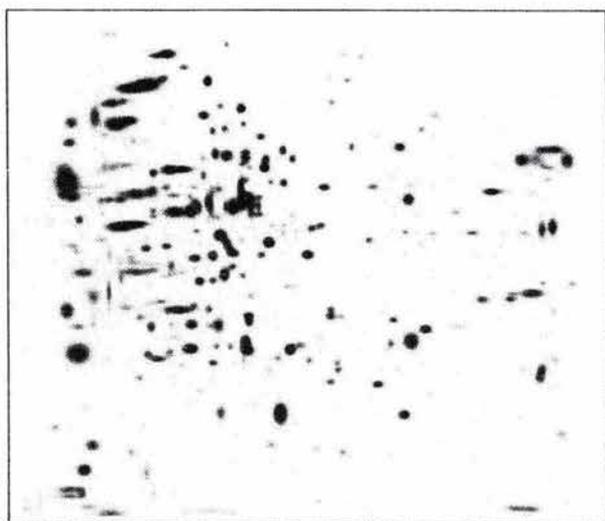


Fig. 22 Gel representativo de la cepa Querétaro con amortiguador de lisis tiourea 2M. Gel construido por el programa PDQuest a partir de 2 geles experimentales.

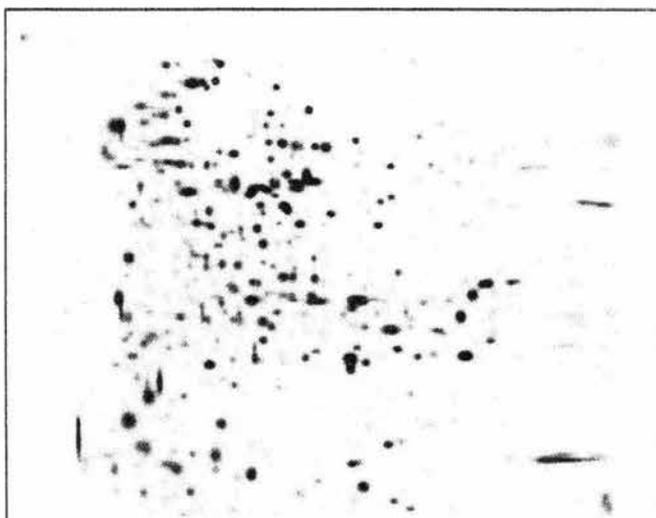


Fig. 23 Gel representativo de la cepa Ver-6 con amortiguador de lisis tiourea 2M. Gel construido por el programa PDQuest a partir de 3 geles experimentales.

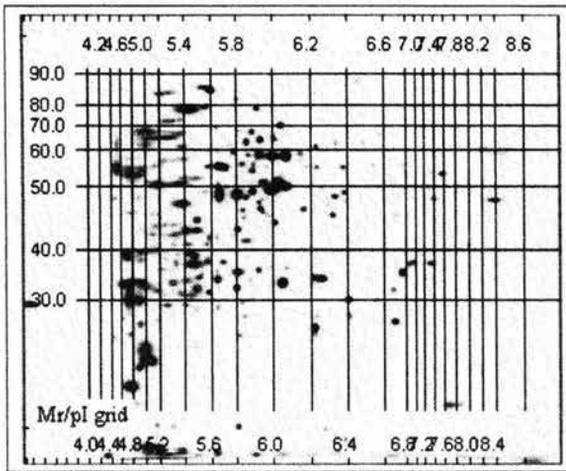


Fig. 24 Gel representativo de la cepa Ninoa con amortiguador de lisis tiourea 2M. Gel construido por el programa PDQuest a partir de geles experimentales donde se puede observar la cuadrilla para conocer el peso molecular y punto isoeléctrico.

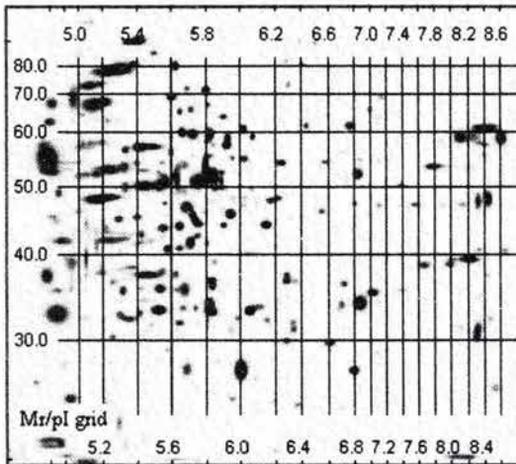


Fig. 25 Gel representativo de la cepa Querétaro con amortiguador de lisis tiourea 2M. Gel construido por el programa PDQuest a partir de geles experimentales donde se puede observar la cuadrilla para conocer el peso molecular y punto isoeléctrico.

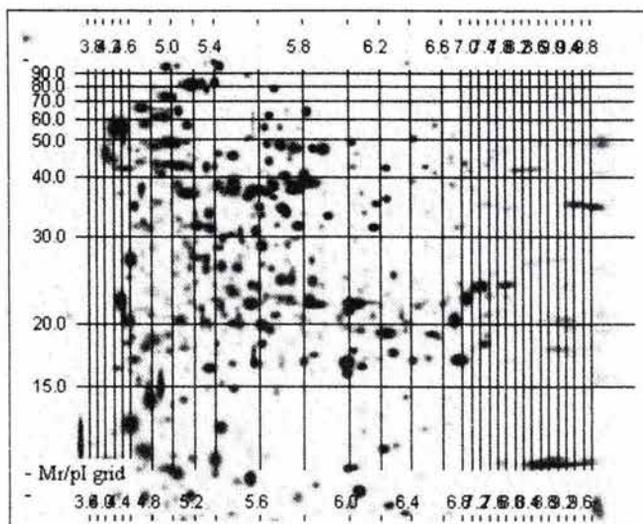


Fig. 26 Gel representativo de la cepa Ver-6 con amortiguador de lisis tiourea 2M. Gel construido por el programa PDQuest a partir de geles experimentales donde se puede observar la cuadrilla para conocer el peso molecular y punto isoeléctrico.

Como se aprecia en las figuras 21-26 al añadir tiourea al amortiguador de lisis se logró separar proteínas de hasta 100 KDa, se aumentó 30 KDa en la escala en comparación con el amortiguador que contenía solamente urea, sin embargo se perdieron proteínas de la zona básica principalmente.

Como se puede ver en la tabla 5, el número de proteínas resueltas en promedio con cada metodología, y en los geles construidos por el programa a partir de geles experimentales. En los geles construidos por el programa PD-Quest a partir de los geles con ambos amortiguador de lisis se puede observar que el número total de proteínas separadas mayor que con cada amortiguador por

separado. Sin embargo, también se puede ver que solo en el caso de la cepa Ver-6 se resolvieron más proteínas empleando el amortiguador de tiourea 2M que el de sólo urea 8M, hecho que no paso con las cepas Ninoa y Querétaro donde al emplear el amortiguador de urea 8M se resolvieron un mayor número de proteínas.

Tabla No. 5. Número de proteínas resueltas en electroforesis bidimensional. Número de proteínas resueltas con los diferentes amortiguadores de lisis y el gel construido a partir de la combinación de ambos amortiguador.

Cepa	# de proteínas
Ninoa urea	388
Ninoa tiourea	325
Ninoa	468
Querétaro urea	398
Querétaro tiourea	340
Querétaro	436
Ver-6 urea	347
Ver-6 tiourea	519
Ver-6	550

Finalmente, con el mismo programa se realizaron geles que combinan los geles obtenidos con los diferentes amortiguadores de lisis, Figuras 27-29.

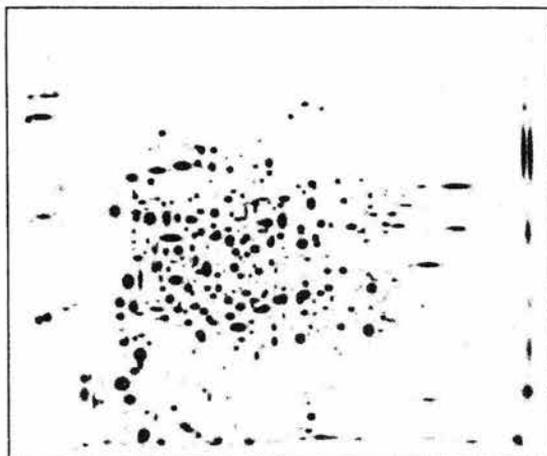


Fig. 27 Gel obtenido por el programa PDQuest a partir de los gels de la cepa Ninoa con ambos amortiguador de lisis.

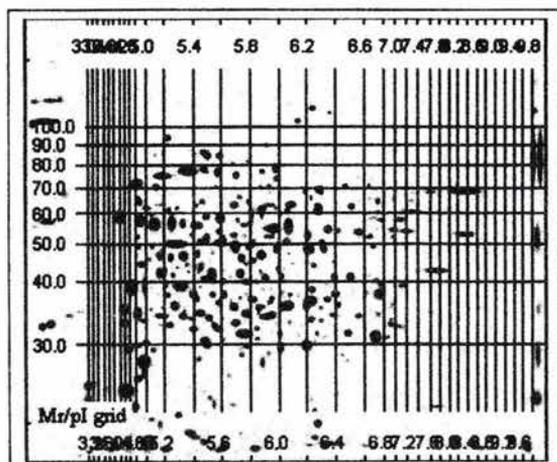


Fig. 28 Gel obtenido por el programa PDQuest a partir de los gels de la cepa Ninoa con ambos amortiguador de lisis, donde se observa la cuadrícula de peso molecular y punto isoeléctrico.

La suma de ambos análisis produjo un número mayor de proteínas que puede encontrarse completa en los anexos del 6 al 14 donde se ven las tablas que

enlistan todas las proteínas separadas de cada cepa con cada condición, indicando su peso molecular y punto isoeléctrico. En las tablas 6-8 se enlistan aquellas proteínas que presentan los valores de densidad mayores en el análisis densitométrico generado por el programa.

Tabla 6. Pesos moleculares y puntos isoeléctricos de las proteínas con mayor valor densitométrico de la cepa Ninoa.

SSP	Mr	pI	Ninoaurea	Ninoatiurea	SSP	Mr	pI	Ninoaurea	Ninoatiurea
103	25.32	-1	4141.8	5119.8	5103	28.92	5.92	2359.6	5323.9
109	24.21	-1	3590.4	85995.3	5201	32.11	5.85	3595.1	8967
302	33.97	-1	5394	9446.3	5502	42.36	5.87	3213.5	5820.8
304	34.85	-1	19540.2	34808.3	5802	69.88	5.87	2548.9	3769.8
705	58.93	-1	37270.3	46911.7	5901	76.75	5.88	4199.8	7743.3
1301	34.28	-1	1316.3	40725.1	6204	29.95	6.19	19741.9	49573
1305	33.99	5.13	7027.9	9033.4	6304	33.24	6.3	5341.5	5818.6
1401	39.1	4.98	2565.8	32207.3	6403	35.38	6.07	9601.3	39214
1607	46.91	5.14	10125.3	11884.8	6407	36.02	6.22	2967.9	45643
1804	61.98	5.01	5351.3	13074.7	6603	52.62	6.2	14360.5	23568.9
2306	33.51	5.37	3207.6	6341.6	6804	61.49	6.28	1839	46761.9
3105	22.3	5.54	7527.9	11395.9	7204	31.45	6.48	15539.2	18902.2
3201	30.48	5.48	2694.2	26517.3	7302	34.02	6.37	5436.8	8024.1
3204	31.96	5.57	11603.9	15189.3	7403	37.2	6.4	4783.6	20898.2
3301	34.27	5.44	18482.6	23697.2	7604	53.54	6.56	12813.1	33641.4
3302	33.58	5.51	15523	21625.3	7802	70.28	6.47	1309.6	9853.3
3701	55.8	5.44	4114.1	14353.3	8103	22	7.7	5461.1	15516.6
4301	32.93	5.69	5286.9	34791.6	8201	31.03	6.68	31813.5	65834.3
4303	34.27	5.77	1957.7	27161.6	8301	34.13	6.7	4415.2	8335.4
4401	37	5.61	7882.7	21567.8	8303	32.73	6.9	6096.4	8854.8
4603	49.18	5.69	3257.4	44263.1	8401	37	6.7	14459.7	37273.6
4701	57.65	5.71	6369.8	6432.5	8402	38.95	6.78	4012	4018
4705	58.6	5.81	7204.3	11127.9	8706	57.79	7.07	1642.2	14171.9
4802	63.06	5.69	9740.6	20902.1	8801	64.71	6.7	2056.8	9713.1
4904	81.7	5.78	2356.1	3260.9					

El análisis contiene las proteínas obtenidas de geles conjunto de ambos métodos de extracción.

(SSP: número asignado por el programa a cada punto, Mr peso molecular relativo y pI punto isoeléctrico).

Para conformar esta tabla se eligieron aquellas proteínas presentes en ambos geles, es decir que estuvieron presentes en los geles experimentales independientemente del amortiguador de lisis empleado, urea 8 M o urea 7M y tiourea 2M; y que fueran las de mayor concentración, se eligió aquellas que estuvieran al menos 5 veces más intensas que el fondo del gel. En el caso de la figura 27, que corresponde a la cepa Ninoa, 49 proteínas cumplieron con ambas características.

De estas 49 proteínas, 5 fueron las que mostraron un mayor valor densitométrico, estas son: la SSP 109 (PM:24.21, pl menor a 3), la SSP 4603 (PM:49.18, pl 5.69), la SSP 6407 (PM:36.02, pl 6.22), la SSP 6804 (PM: 61.49, pl 6.28) y la SSP 8201 (PM:30.03, pl 6.68).

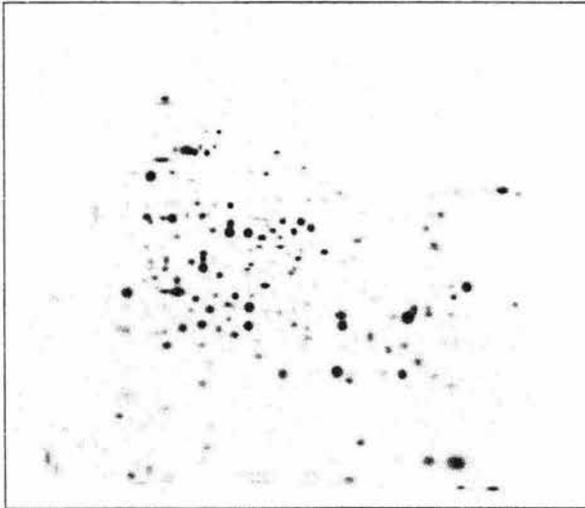


Fig. 29 Gel obtenido por el programa PDQuest a partir de los geles de la cepa Querétaro con ambos amortiguador de lisis.

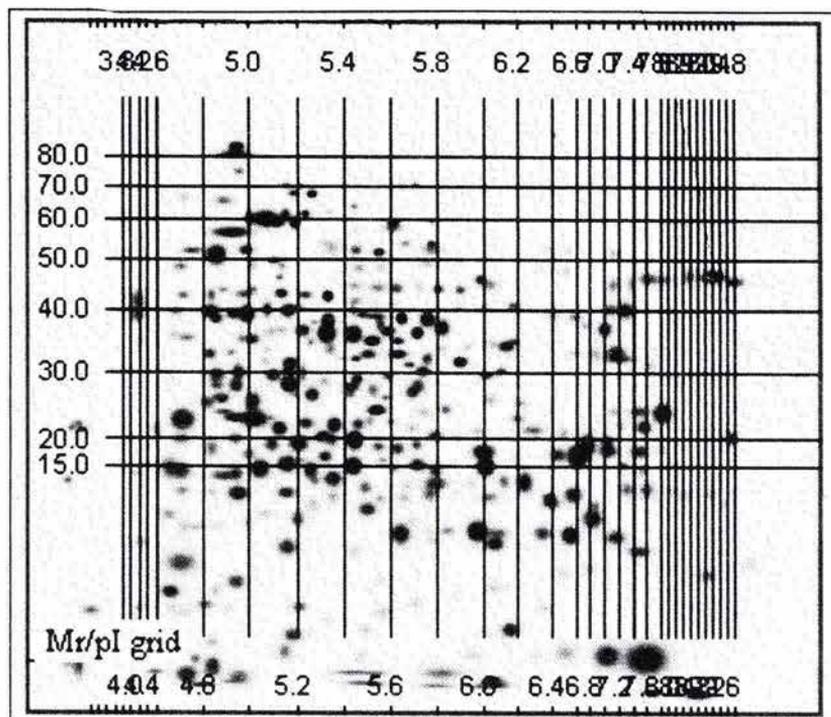


Fig. 30 Gel obtenido por el programa PDQuest a partir de los geles de la cepa Querétaro con ambos amortiguador de lisis. En la figura se muestra la cuadrícula de peso molecular y punto isoeléctrico.

Tabla 7. Pesos moleculares y puntos isoeléctricos de las proteínas con mayor valor densitométrico de la cepa Querétaro.

SSP	Mr	pl	Qrourea	Qrotiurea	SSP	Mr	pl	grourea	Qrotiurea
401	19.22	-1	22745.1	135120	5503	32.09	5.54	27941.4	4642.9
402	23.5	4.3	174155.9	16831.9	5505	27.3	5.58	25768	6967.9
702	39.3	-1	17677.8	25142.9	5601	32.5	5.34	35369.4	9245.3
703	42.43	4.3	13987.6	31522.5	5703	38.14	5.53	102462.8	4048
1202	14.73	4.6	35263.3	5428.7	2303	18.36	4.8	37700.2	35884.2
1401	25.93	4.44	18291.7	5108.6	2502	28.7	4.78	24132.3	14432.5
1402	26.62	4.52	32013.8	2744.1	2601	34.64	4.7	41142.6	57959.5
1404	23.58	4.6	34372	73090.2	2701	39.06	4.62	41076	48903.8
1501	29.43	4.48	59083.8	8934.9	2705	42.73	4.86	35592.7	17836.9
1503	28.29	4.6	51016.3	17711.8	2802	43.7	4.7	9681.7	14127.2
1601	32.42	4.46	24855.2	146468	3201	14.19	4.89	46472.3	76002.4
1701	42.46	4.46	19291.1	2240.3	3302	18.63	4.95	94608.7	44764.3
1702	39.17	4.46	69691.1	24680	3401	26.91	4.94	4972.6	6560.1
1704	38.92	4.58	25779	28240.3	3503	31.24	4.91	37340.8	6396.4
1804	56.3	4.58	70339.9	26530.8	3504	29.53	4.98	13591.5	30624
4404	19.16	5.27	163250.1	74664	3702	40.1	4.95	11166.5	16480
4604	35.57	5.26	134605.5	42263.7	6601	35.68	5.61	83704	6139.1
4701	42.15	5.12	63429.3	12467.6	6701	38.02	5.67	136814	13393.4
4703	41.3	5.26	9557.3	31019.4					

El análisis contiene las proteínas obtenidas de geles conjunto de ambos métodos de extracción.

(SSP: número asignado por el programa a cada punto, Mr peso molecular relativo y pl punto isoeléctrico).

Al igual que con los datos generados con la cepa Ninoa, se seleccionaron las proteínas de mayor densidad, en el caso de las proteínas de la cepa Querétaro se pueden ver en la tabla 6. Fueron 37 proteínas las que cumplieron con las características señaladas anteriormente. Las 5 proteínas más intensas son: la SSP 1404 (PM:23.58, pl 4.6), la SSP 2601 (PM:34.64, pl 4.7), la SSP 2701 (PM:39.06, pl 4.62), la SSP 3201 (PM:14.19, pl 4.89) y la SSP 3302 (PM:18.63, pl 4.95).



Fig. 31 Gel obtenido por el programa PDQuest a partir de los gels de la cepa Ver-6 con ambos amortiguador de lisis.

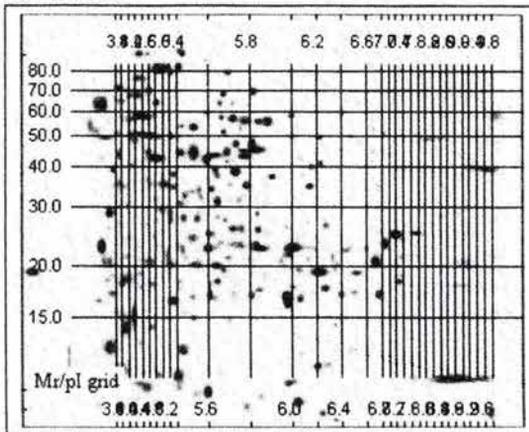


Fig. 32 Gel obtenido por el programa PDQuest a partir de los gels de la cepa Ver-6 con ambos amortiguador de lisis. En la figura se ve la cuadrícula con pesos moleculares y punto isoeléctrico.

Tabla No. 8 Pesos moleculares y puntos isoeléctricos de las proteínas con mayor valor densitométrico de la cepa Ver-6.

SSP	Mr	pl	tioureaver	ureaver	SSP	Mr	pl	tioureaver	ureaver
108	16.11	0.6	4294.8	23076	4504	28.85	5.56	6546	51216.5
302	20.75	-1	5071.8	11992.1	4701	53.05	5.53	31998.4	37824.8
602	39.2	0.86	21191.9	29838.8	5504	28.27	5.74	3732.9	4046.7
1602	34.54	1.62	20801.7	43779.8	5505	32.28	5.77	5445.4	7753.7
1705	50.53	2.75	20961.5	29350.7	5803	62.87	5.71	6521.7	21894.6
1801	57.47	1.44	5164.9	12201.8	5805	69.51	5.74	2832.6	6969
1904	90.38	2.71	22785	26802.7	6405	25.55	5.97	5890.5	13167.2
2401	26.07	3.22	5963.3	49529.4	6406	22	6	71523.6	90108.4
2404	24.82	4.35	4147.8	4733.7	6501	28.39	5.83	10217.9	12148.2
2601	40.06	2.95	2863	8331.3	6602	34.74	5.87	4265.6	8406
2603	34.95	3.62	8094.2	13459	7405	23.1	6.22	3695.4	7667.3
2704	49.38	4.13	8126.2	29996.7	8703	52.04	6.65	6219.2	9415.9
2804	63.62	3.89	19992.9	32897.2	8705	50.69	-1	6294.5	10981.3
3906	90.49	5.48	16520.6	20055.7					

El análisis contiene las proteínas obtenidas de geles conjunto de ambos métodos de extracción.

(SSP: número asignado por el programa a cada punto, Mr peso molecular relativo y pl punto isoeléctrico).

Para el caso la cepa Ver-6 fueron 27 proteínas que se separaron independientemente del amortiguador de lisis empleado y que fueron intensas, siendo la SSP 1602 (PM:34.54, pl 1.62), la SSP 2401 (PM:26.07, pl 3.22), la SSP 4504 (PM: 28.85, pl 5.56), la SSP 4701 (PM:5305, pl 5.53) y la SSP 6406 (PM:22, pl 6).

Debido a que como se puede ver en la tabla 5, el número de proteínas es muy grande para poder realizar un análisis de cada una de ellas, por lo que se realizó un primer análisis de aquellas proteínas más abundantes, esto en función de su intensidad al realizar el análisis densitométrico. En las tablas 6-8 se pueden observar el peso molecular y punto isoeléctrico de estas proteínas, que varían de

27 en Ver-6, 37 en la cepa Querétaro y 49 en la cepa Ninoa. Entre estas proteínas más abundantes no existen aquellas que se encuentren en dos ó más cepas, sin embargo sí hay varias que presentan pesos moleculares y puntos isoeléctricos muy cercanos, esto nos hace sospechar que tal vez sean las mismas proteínas que por cuestiones prácticas, al momento de asignar peso y punto isoeléctrico al realizar el análisis les fue asignado un valor diferentes pero muy cercano.

En la tabla 9 se resumen las 5 proteínas más abundantes de cada cepa.

Tabla No. 9 Tabla comparativa de las 5 proteínas más abundantes de cada cepa.

NINOA		QUERÉTARO		VER-6	
Peso molecular	Punto isoeléctrico	Peso molecular	Punto isoeléctrico	Peso molecular	Punto isoeléctrico
		14.19	4.89		
		18.63	4.95		
				22	6.0
		23.58	4.6		
24.21	Menor a 3				
				26.07	3.22
				28.85	5.56
30.03	6.68				
				34.54	1.62
		34.64	4.7		
36.02	6.22				
		39.06	4.62		
49.18	5.69				
				53.05	5.53
61.49	6.28				

También se emplearon geles de 7 x 6 cm para posteriormente transferirlos a membranas de nitrocelulosa para analizar las proteínas antigénicas con suero de pacientes chagásicos crónicos por Inmuno electrotransferencia. Los geles con cada una de las cepas se pueden ver en las figuras 33-35. En todos los casos se emplearon amortiguador de lisis con tiourea.

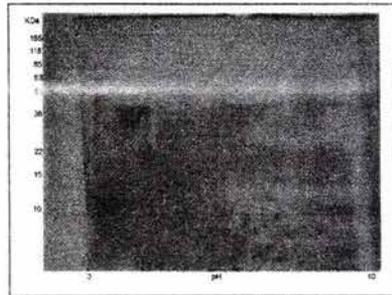


Fig. 33. Gel de 7x6 cm bidimensional de la cepa Ninoa. 150 μ g de proteína del extracto de la cepa Ninoa se separo en tiras IPG de pH 3-10 NL de 7 cm de longitud en un programa de aprox. 7 horas en un gradiente de voltaje para después realizar la segunda dimensión en geles de archilamida al 10% de 8 x 6 cm. y finalmente ser teñidos con nitrato de plata.

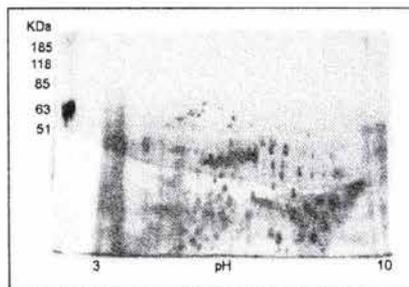


Fig. 34. Gel de 7x6 cm bidimensional de la cepa Querétaro. 150 μ g de proteína del extracto de la cepa Querétaro se separaron por electroforesis bidimensional de la misma manera que el extracto de la cepa Ninoa, fig. 33.

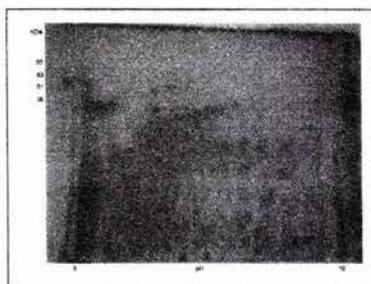


Fig. 35. Gel de 7x6 cm bidimensional de la cepa Ver-6. 150 μ g de proteína del extracto de la cepa Ver-6 se separó en electroforesis bidimensional como se menciona en la fig. 33

Como se puede ver no se logró obtener la misma resolución en los geles de 7x6 cm que en los de 18x18 cm, esto se debe que la mismas proteínas se separan en longitudes menores, por lo que quedan muy juntas, sin embargo al cargar cada gel con 150 μ g de proteína, en comparación de los 300 μ g que se cargan en los geles de 17 x 18 cm; se obtuvieron geles en los que se pueden observar las proteínas separadas, además de que como dichos geles se iban a transferir y emplearse en Inmuno electrotransferencia con sueros policlonales, la intensidad de los puntos iba a disminuir notablemente, debido a que no todas las proteínas son antigénicas, por lo que las imágenes de las Inmuno electrotransferencia que se observan en las figuras corresponden a 150 μ g de proteínas. En estos experimentos se empleó un mezcla de sueros de pacientes chagásicos crónicos, que al ser analizados en Inmuno electrotransferencia de una dimensión reconocieron 15 bandas, en tanto que el mezcla de controles negativos no mostró una sola banda (Fig. 36)

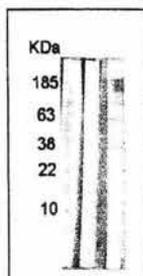


Fig. 36 Inmuno electrotransferencia unidimensional de sueros humanos. Se realizó una SDS-PAGE del extracto Querétaro y posteriormente se transfirió a membrana de nitrocelulosa para realizar un Inmuno electrotransferencia con mezcla de sueros humanos. Carriles: 1 Marcadores, 2 Mezcla de sueros humanos de controles negativos y 3 Mezcla de sueros humanos de pacientes crónicos chagásicos.

Posteriormente la mezcla de sueros de pacientes crónicos se empleó en un WB con geles separados por electroforesis bidimensional, estos blots fueron realizados con dos diluciones del suero, 1:500 y 1:1000; que posteriormente con el programa se unificaron para obtener las imágenes que se ven en las figuras 37-39.

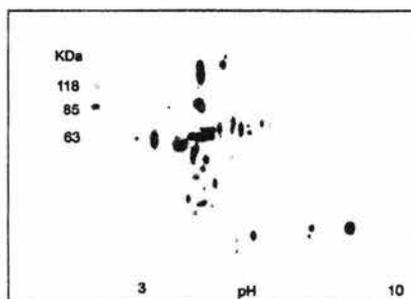


Fig. 37 Inmuno electrotransferencia bidimensional. Se realizó la separación bidimensional del extracto Ninoa con amortiguador de lisis tiourea, con las condiciones mencionadas en la fig. 33, y se transfirió a membrana de nitrocelulosa, posteriormente se incubó con el mezcla de sueros humanos chagásicos crónicos. Esta imagen corresponde a la creada con el programa PDQuest a partir de 2 Inmuno electrotransferencia experimentales.

Tabla 10. Pesos moleculares y punto isoeléctrico de los antígenos de la cepa Ninoa.

SSP	Mr	pI	SSP	Mr	pI	SSP	Mr	pI
501	45	3.35	3803	105.4	4.93	5902	135.8	5.25
1401	43.43	4.34	3901	120.2	4.92	6101	18.46	5.38
1501	44.59	3.79	4201	29.53	4.98	6102	19	5.6
1502	45.39	4.34	4202	26.16	4.98	6103	16.8	5.38
1801	68.39	4.16	4301	34.76	4.96	6301	38.32	5.32
1901	123.8	3.76	4302	37.83	4.99	6601	50.04	5.32
2201	27.01	4.63	4501	46.07	4.95	6602	48.67	5.55
2301	38.12	4.75	4502	46.53	5.02	6701	57.83	5.3
2302	40.99	4.75	4701	51.08	4.95	6702	56.56	5.33
2401	41.37	4.41	4702	50.72	5.02	6703	50.84	5.43
2402	43.25	4.54	4801	67.2	4.95	6704	53.57	5.53
2501	46.29	4.73	5201	25.44	5.07	6705	55.06	5.7
3201	23.85	4.81	5202	30.9	5.11	6706	53.63	5.79
3202	32.37	4.83	5501	46.23	5.08	7101	18.92	6.23
3203	25.66	4.9	5502	45.34	5.18	7102	20.99	6.26
3401	41.42	4.84	5701	50.76	5.08	7103	21	6.7
3801	89.35	4.86	5702	51.63	5.17			
3802	72.12	4.89	5901	121	5.21			

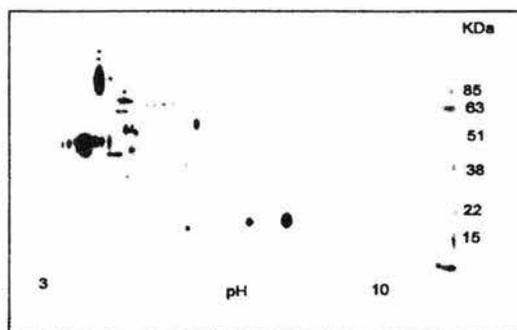


Fig. 38 Inmuno electrotransferencia bidimensional. Se realizó la separación bidimensional del extracto Querétaro con amortiguador de lisis tiurea, condiciones en fig. 33 y se transfirió a membrana de nitrocelulosa, posteriormente se incubó con el mezcla de sueros humanos crónicos chagásicos. Esta imagen corresponde a la creada con el programa PDQuest a partir de 2 Inmuno electrotransferencia experimentales.

Tabla 11. Pesos moleculares y punto isoelectrico de los antígenos de la cepa Querétaro.

SSP	Mr	pI	SSP	Mr	pI	SSP	Mr	pI
402	45	3.35	4902	160	4.35	5801	108.3	4.45
1404	45.52	3.57	5301	38.47	4.45	5901	152.1	4.57
1501	54.66	3.62	5302	32.29	4.7	6101	19.8	5.58
2401	46.16	3.72	5303	39.05	5.05	6102	21.34	6.28
2402	44.84	3.83	5401	45.48	4.45	6103	21	6.7
2403	46.66	3.92	5402	41.45	4.52	6104	21.07	6.31
2501	52.79	3.87	5403	41.87	4.75	6301	39.52	5.28
3201	25.26	4	5501	52.28	4.49	6302	40.18	5.54
3204	27.17	4.14	5502	52.65	4.63	6401	42.02	5.09
3301	41.31	4.03	5601	77.04	4.68	6503	51.43	5.5
3302	37.37	4.05	5602	67.89	4.73	6504	60.54	5.61
4302	39.5	4.35	5603	67.9	4.84	6505	57.5	5.71
4401	44.99	4.32	5604	67.33	4.99	7101	20.64	-1
4803	134.7	4.37	5701	78.4	4.48	7103	19.75	-1
4804	123.7	4.42	5702	82.54	4.5			
4901	141.2	4.35	5706	77.74	4.85			

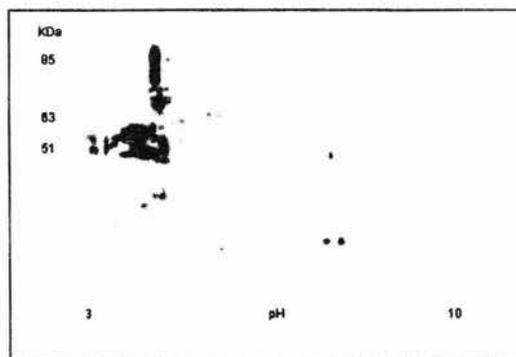


Fig. 39 Inmuno electrotransferencia bidimensional. Se realizó la separación bidimensional del extracto Ver-6 con amortiguador de lisis tiourea con las condiciones descritas en la fig. 33 y se transfirió a membrana de nitrocelulosa, posteriormente se incubó con el mezcla de sueros humanos crónicos chagásicos. Esta imagen corresponde a la creada con el programa PDQuest a partir de 2 Inmuno electrotransferencia experimentales.

Tabla 12. Pesos moleculares y punto isoeléctrico de los antígenos de la cepa Ver-6.

SSP	Mr	pI	SSP	Mr	pI	SSP	Mr	pI
1507	44.68	3.39	2608	65.39	4.2	3601	65.66	4.29
1508	44.31	3.52	2609	49.32	4.21	3603	55.36	4.31
1509	47.65	3.53	2701	84.18	4.2	3607	54.74	4.54
1608	49	3.35	2702	112.4	4.19	3609	55.01	4.78
2401	25.19	3.62	2703	92.55	4.2	3610	63.06	4.8
2402	24.61	3.73	2704	100.7	4.2	3611	64.14	4.93
2403	26.21	3.81	3301	20.61	4.84	3612	63.74	5.05
2404	29.04	4.05	3302	20.74	5.09	3613	64.22	5.19
2405	31.4	4.2	3303	20.59	5.49	3614	56.19	4.91
2501	45.8	3.6	3401	31.27	4.31	3701	107.6	4.25
2502	46.67	3.65	3402	33.08	4.32	3702	118.4	4.26
2503	48.17	3.79	3403	26.23	5.32	3703	88.66	4.26
2504	43.23	3.8	3404	24.52	5.53	3704	80.43	4.27
2505	47.7	3.82	3405	25.78	5.09	3705	84.36	4.37
2508	47.54	3.97	3406	25.99	4.89	3706	116	4.38
2509	43.77	4.14	3407	25.08	4.76	3707	84.4	4.54
2510	41.63	4.23	3408	25.64	4.6	4301	21.67	-1
2601	49.59	3.7	3409	26.07	4.44	4302	16.21	5.66
2602	53.23	3.83	3501	41.74	4.32	4401	22.05	6.52
2603	56.6	3.9	3502	45.18	4.32	4402	22	6.7
2604	53.05	4.01	3503	48.57	4.34	4403	23.53	6.07
2605	76.65	4.19	3504	40.66	4.36	4404	26.59	6.08
2606	55.94	4.19	3505	47.68	4.55	4501	42.61	6.57
2607	72.16	4.21	3506	44.91	4.67			

El número de antígenos reconocidos por el mezcla de sueros de pacientes chagásicos crónicos fue de 56 en la cepa Ninoá, 57 en la cepa Querétaro y 63 antígenos en la de Ver-6. Pese a que en el número de antígenos no hubo una gran diferencia como se puede ver en el caso de la membrana de la cepa Ver-6 se puede distinguir una zona en pH de 4-5 y pesos de 35 KDa donde fueron reconocidos lo que parece ser unas isoformas, que no se observan en las otras cepas, mientras que el resto de los antígenos reconocidos son muy similares.

Por otro lado, al observar la figura 36, donde se ve el número de bandas que reconoce este mismo mezcla en el extracto separado por una dimensión se

puede ver que al emplear geles bidimensionales se logra reconocer un mayor número de antígenos, puesto que en una dimensión solo se reconocen 15 bandas en tanto en los bidimensionales al menos se reconocen 56 antígenos, lo que sirva para manifestar el poder de la electroforesis bidimensional.

Posteriormente se realizaron Inmuno electrotransferencia empleando anticuerpos monoclonales previamente producidos en el laboratorio, las características de estos se pueden observar en la tabla 2. Cada cepa se analizó con cuatro Ac diferentes, B106E, 1D5, F14B y C16D. Se realizó un Inmuno electrotransferencia unidimensional con cada anticuerpo, que se puede observar en la fig.40. Los Inmuno electrotransferencia en doble dimensión se pueden ver en las figuras 41-44.

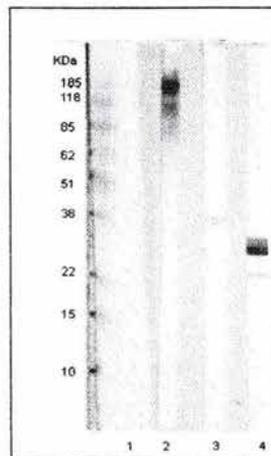


Fig. 40 Inmuno electrotransferencia unidimensional de Anticuerpos monoclonales. Extracto de la cepa Querétaro se separó por SDS-PAGE y se transfirió a nitrocelulosa para realizar Inmuno electrotransferencia empleando anticuerpos monoclonales. Carriles: 1) Marcadores, 2) AcMc B106E, 3) AcMc1D5 y 4) AcMc F14B.

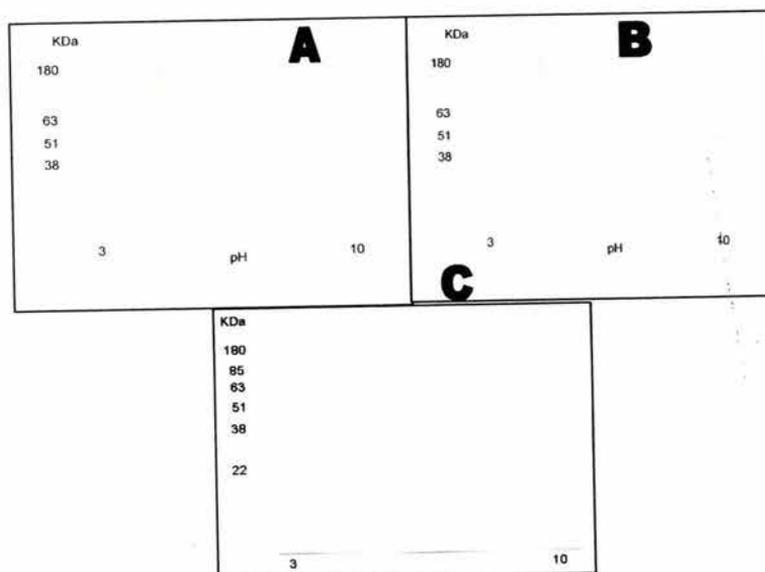


Fig. 41 Inmuno electrotransferencia del Anticuerpo monoclonal B106E. Se realizó la separación bidimensional de extracto de cada cepa con las condiciones anteriormente mencionadas para ser transferidas y realizar el Inmuno electrotransferencia con el AcMc B106E. En A) se observa la membrana de la cepa Ninoa, B) Querétaro y C) Ver-6.

El anticuerpo B106E reconoce una proteína de 180 KDa. Que se observa en una dimensión como una banda muy difuminada que alcanza hasta peso de 80 KDa, en las membranas separadas por electroforesis bidimensional de las tres cepas se observa algo similar una zona difuminada entre estos pesos y en el pH de 4.9, no encontrando diferencias entre las tres cepas analizadas.

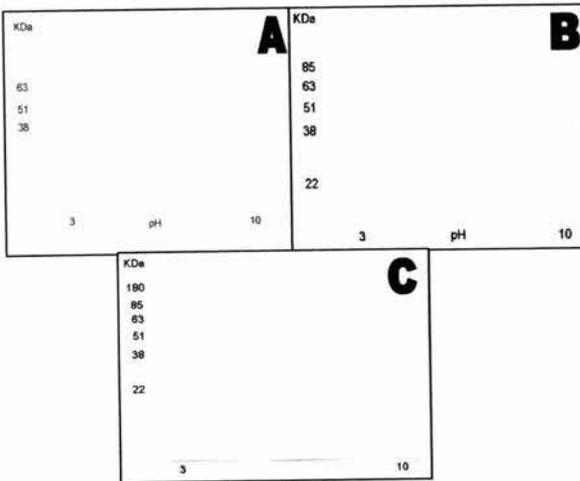


Fig. 42. Inmuno electrotransferencia del Anticuerpo monoclonal 1D5. Se realizó la separación bidimensional de extracto de cada cepa con las condiciones anteriormente mencionadas para ser transferidas y realizar el Inmuno electrotransferencia con el AcMc 1D5. En A) se observa la membrana de la cepa Nino, B) Querétaro y C) Ver-6.

El anticuerpo 1D5 reconoció 5 isoformas de una proteína de 38 KDa que van de un pH de 4.4-4.7, en las membranas de las cepas Nino y Querétaro en tanto que en la cepa Ver-6 reconoció 6 isoformas del mismo peso y pH mas una extra en el pH de 4.3.

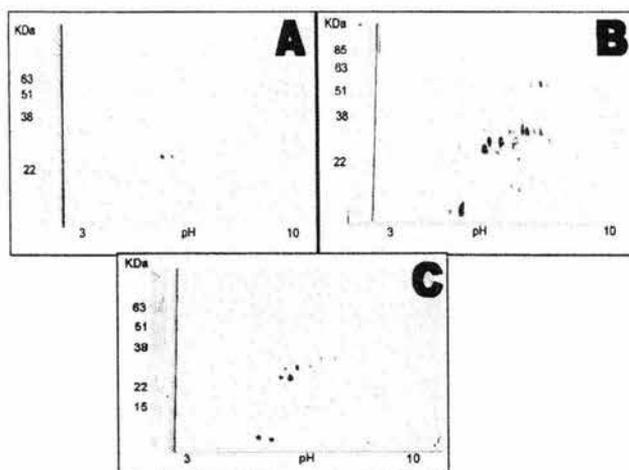


Fig. 43. Inmuno electrotransferencia del Anticuerpo monoclonal F14B. Se realizó la separación bidimensional de extracto de cada cepa con las condiciones anteriormente mencionadas para ser transferidas y realizar el Inmuno electrotransferencia con el AcMc F14B. En A) se observa la membrana de la cepa Ninoa, B) Querétaro y C) Ver-6.

El anticuerpo F14B reconoció en las membranas de las cepas Querétaro y Ver-6 una gran cantidad de proteínas, 38 y 18 respectivamente que se encontraron en pesos variados de 6 a 55 KDa y pH de 4 a 7.8, en tanto que en la membrana de la cepa Ninoa solo reconoció dos proteínas de peso molecular 25 KDa y pH 4.4 y 4.5.

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Durante la estandarización de la técnica de electroforesis bidimensional para extractos de *T. cruzi* uno de los factores más importantes fue la extracción proteica, esto se debe a que un extracto que va a ser separado por electroforesis bidimensional debe de cumplir con ciertas características, entre las que destaca su baja concentración salina y el empleo de detergentes no iónicos. La metodología estandarizada en el laboratorio no cumplía con estos requisitos por lo que se debió realizar una serie de experimentos con diferentes composiciones de los agentes caotrópicos (urea y tiourea) y del detergente empleado, para encontrar la metodología más adecuada, después de haber realizado comparaciones entre estos extractos por electroforesis unidimensional no se encontraron diferencias significativas entre las proteínas separadas de cada cepa a este nivel, por lo que se procedió a realizar la separación bidimensional de estos extractos con una metodología más poderosa, como es la electroforesis bidimensional, que permite separar más selectivamente complejas mezclas de proteínas (figura 7).

ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL EMPLEANDO EL SISTEMA IPG MULTIPHOR.

Los primeros ensayos para realizar una separación bidimensional se llevaron a cabo empleando un sistema IPG, donde se utilizan tiras con geles de poliacrilamida en gradientes de pH establecidos y reproducibles; de este manera, se eliminaba una fuente de variación inherente a la técnica. Inicialmente se siguió

el protocolo establecido por el proveedor de dicho sistema, este protocolo establecía la aplicación de la muestra al momento de rehidratar la muestra y realizar el isoelectroenfoque en un corto periodo de tiempo (5 horas y media), sin embargo los resultados que se obtuvieron no fueron adecuados, puesto que solo se observan unas pocas proteínas separadas de bajo peso molecular y de pH entre 5 y 7. A este protocolo inicial se le realizaron diversas modificaciones, algunas de ellas sugeridas por los asesores técnicos del proveedor sin obtener una separación de las proteínas, puesto que el número máximo de proteínas resueltas fue de 20, la imagen de un gel representativo se puede ver en la figura 8; por lo que después de comprobar que los extractos se encontraban en buenas condiciones (no degradado) se decidió cambiar la metodología seguida hasta ese momento.

ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL EMPLEANDO GELES CILÍNDRICOS.

En los primeros reportes de electroforesis bidimensional (O'Farrell, 1975) para desarrollar el isoelectroenfoque se empleaban geles cilíndricos donde el gradiente se generaba mediante el empleo de anfolinas, técnica que gradualmente evolucionó hasta llegar a los IPG's. Debido a que el primer sistema utilizado no funcionó, se comenzó a realizar el isoelectroenfoque empleando esta metodología. De esta manera se obtuvieron resultados que inicialmente se consideraron aceptables debido a que se obtuvo un mayor número de proteínas resueltas y a una mejora en la reproducibilidad, factor muy importante que no se logró obtener con la metodología IPG Multiphor. Desde los primeros experimentos se obtuvieron geles con un promedio de 50 proteínas bien separadas, en la zona

de pH entre 5 y 7 con pesos menores de 85 KDa, aunque con la presencia de bandas verticales, figuras 9-11, sin embargo, no fue posible eliminar estas líneas verticales, esto se atribuye principalmente a la alta concentración proteica que se debe de aplicar en esta metodología (hasta 2 mg de proteína por gel) (Görg et al, 1988).

Tratando de mejorar los resultados obtenidos se realizaron diversas modificaciones al protocolo inicial, uno de ellos fue el emplear un extracto recién preparado, ya que se sospechaba que la falta de un mayor número de proteínas se debía a una degradación de las mismas, pese a que el extracto contenía inhibidores de proteasas y se almacenaba a -70°C , sin embargo no fue posible mejorar el patrón obtenido.

Una desventaja muy importante de esta técnica, que incluso la llevo al desuso, es la falta de reproducibilidad del gradiente generado, puesto que este depende directamente de las concentraciones de las anfolinas, del porcentaje en que se encuentren estas y del voltaje aplicado. En los experimentos realizados siempre se corrieron geles blanco, donde no se colocaba muestra, para poder realizar las mediciones del gradiente generado, estos gradientes se presentan en la figura 12. Al realizar una análisis de varianza de un factor se obtuvo como resultado que la $F_{\text{calculada}} > F_{\text{tablas}}$ con un valor de $\alpha=0.01$, lo cuál quiere decir que existe diferencias significativas entre los gradientes generados. También en dicha gráfica se puede observar que el gradiente generado va de un pH entre 4 y 7, el cual de acuerdo a trabajos previos (Lanar, 1984 y Andrews, 1984) es adecuado para extractos de *Trypanosoma cruzi*, puesto que una gran cantidad de proteínas

se encuentran entre este intervalo. Sin embargo, se sospechaba que si se modificaba la concentración de las anfolinas se lograría ampliar dicho gradiente. Por lo que se realizó un experimento donde se emplearon 5 diferentes concentraciones de mezclas de anfolinas (20, 40, 60 80 y 100% v/v en un rango de 3.5-10). Al realizar el análisis estadístico correspondiente la $F_{calculada} < F_{tablas}$ lo que indica que no existen diferencias significativas a un valor de $\alpha=0.01$ entre los gradientes generados (figura 13).

Por otro lado, un factor del que se sospechó podría influir en el gradiente fueron las anfolinas empleadas, ya que inicialmente se usaron unas que habían permanecido mucho tiempo almacenadas, por lo que se corrieron geles en blanco simultáneamente con dos lotes de anfolinas diferentes, las almacenadas por largo periodo y unas nuevas del mismo rango y del mismo proveedor. El análisis estadístico correspondiente dio como resultado que la $F_{calculada} < F_{tablas}$ lo que indica que no existen diferencias significativas entre los gradientes generados a un valor de $\alpha=0.01$ (figura 14). De esta manera pese a las variaciones realizadas a la técnica y con base a la reproducibilidad obtenida en los gradientes de pH, se decidió realizar cambios en la metodología para mejorar aún más la resolución.

ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL EMPLEANDO EL SISTEMA IPG IEF CELL.

Durante esta fase de la estandarización básicamente se retomó la primera metodología con ligeras modificaciones, las cuales fueron suficientes para poder obtener una mejor resolución y reproducibilidad. Uno de los primeros cambios fue

la preparación de la muestra, puesto que al momento de rehidratar la tira se añadió urea, CHAPS, DTT y amortiguador IPG, lo que permitió evitar la posible degradación por el largo periodo de rehidratación, además de favorecer la total solubilización de las proteínas presentes en la muestra y mantener las concentraciones de cada uno de los componentes sin tener una dilución importante de las concentraciones idóneas de cada uno de ellos.

Otro de los cambios fue el programa de corrimiento, ya que cuando se ocupó el equipo Multiphor se utilizaba un programa de 5 horas y media donde se establecía un gradiente de voltaje. Sin embargo, con el equipo Protean el programa de corrimiento se encontraba en el modo v/h, lo que quiere decir que se programaba al voltaje que debe de correr y cuantos volts son necesarios para realizar el isoelectroenfoque y el tiempo va a depender del voltaje que este pasando por la tira; de esta manera el corrimiento solo va a finalizar cuando se haya alcanzado el voltaje marcado inicialmente. El tiempo promedio para tiras de 17 cm. de longitud fue de 12 horas en tanto que en las tiras de 7 cm. fue de 6 horas. El tiempo de isoelectroenfoque es un paso crucial, puesto que dependiendo de este es como se van a separar las proteínas en la primera dimensión. En este trabajo se realizaron diversos cambios en esta variable, encontrando que el tiempo optimo era de aproximadamente 12 horas para tiras de 17 cm. de longitud. En un reporte publicado muy recientemente acerca de un estudio proteómico de este organismo, se realizó el isoelectroenfoque en solo 6 horas, lo que pudiera ocasionar que las proteínas no se separen adecuadamente y esto se ve reflejado en los geles (Paba et al., 2004).

Otro factor importante fue el método de detección, inicialmente se empleaba azul de Coomassie con un límite de detección de 100 ng; posteriormente se empleó una tinción con nitrato de plata la cuál tiene un límite de detección muy superior (aproximadamente 0.5 ng) (Westermeier y Naven, 2002). Esta última técnica permitió detectar proteínas que se encuentran a muy baja concentración. De esta manera, se logró obtener geles con buena resolución y reproducibilidad con un promedio de 500 proteínas para cada cepa al conjuntar los geles con ambos amortiguador de lisis, urea 8M y urea 7M con tiourea 2M. Estos resultados concuerdan con lo reportado recientemente en un estudio del proteoma de la cepa sudamericana de *T. cruzi* Berenice, salvo que en este reporte Paba et al., emplearon tiras de pH 4-7 y utilizan Tritón X-100 al 2%, en lugar de CHAPS puesto que con este último no lograron una buena solubilización de la muestra, hecho contrario a este trabajo donde se obtuvieron mejores resultados al emplear CHAPS al 4% (Paba et al., 2004).

Sin embargo, a pesar de haberse encontrado las condiciones adecuadas para la realización de la electroforesis bidimensional, quedaba el problema de no detectar proteínas con peso molecular superior a 65 KDa, lo cual no era congruente, puesto que al realizar una separación en SDS-PAGE de una dimensión se detectan proteínas con pesos mayores a 180 KDa, por lo que se modificó la composición del amortiguador de lisis para extraer las proteínas a una concentración 2M y 7M de tiourea y urea respectivamente. También se utilizaron estos reactivos al momento de preparar la muestra para rehidratar la tira, con la finalidad de favorecer la separación bidimensional de proteínas de pesos mayores y obtener una mayor proporción de proteínas membranales (Herbert, 1999).

En los geles con muestras que contenían tiourea se observaron proteínas abundantes en la zona ácida, sin embargo, en la zona básica fue notable la disminución de proteínas en comparación con los extractos que solo contenían urea (Rabilloud et al., 1997). De esta manera se lograron separar proteínas hasta de 100 KDa, lo que se vio reflejado en un mayor número de proteínas separadas, aproximadamente 600 en la cepa Ver-6 puesto que en las otras cepas se logró separar un mayor número de proteínas con el extracto que solo contenía urea 8 M.

De las proteínas más abundantes en cada cepa, éstas difieren en peso y punto isoeléctrico entre ellas. Lo anterior nos pudiera indicar que la expresión proteica puede variar entre cada cepa, pese a que las proteínas seleccionadas por ser las más abundantes en las cepa analizadas existe cierta relación entre las proteínas de las cepas de genotipo 1, entre las que existe una mayor semejanza entre ellas que con las de la cepa de genotipo 2.

COMPARACIÓN DE PROTEÍNAS.

Debido a que como se ha mencionado se separaron entre 500 y 600 proteínas de cada cepa y resultaría muy difícil analizar cada una de ellas, se realizó una primera comparación entre las proteínas más abundantes. Para realizar una primera selección se determinó asignar a este grupo solo aquellas proteínas que tuvieran una intensidad de al menos 5 veces mayor que el fondo, con este requerimiento el número de proteínas fue diferente en cada caso, 49 para Ninoa, 37 en Querétaro y 27 en Ver-6. De estas proteínas, que se puede ver la lista completa con peso molecular y punto isoeléctrico en las tablas 6 a 8, no hay proteínas que se encuentren en dos o más cepas, lo que nos lleva a que la

expresión proteica en las tres cepas analizadas se da de manera diferencial, aunque no podemos asegurar que alguna proteína sea específica de alguna cepa, para ello se debería de realizar estudios más detallados.

Finalmente se realizó una nueva selección entre las proteínas más abundantes, seleccionando las 5 más intensas, que podemos ver en la tabla 9, donde ninguna proteína se encuentra en dos cepas, sin embargo entre estas proteínas existe una mayor semejanza, lo que nos hace sospechar que quizá alguna de ellas este presente en dos cepas, pero los datos no coinciden por una ligera diferencia al momento de realizar el análisis con el programa PD Quest.

Entre los reportes que existen del estudio del proteoma de *T. cruzi*, Lanar marcó la superficie celular de los diferentes estadios, encontrándose diferencias entre cada uno de ellos. Para los epimastigotes reportan 7 proteínas (PM 77, pl 5.4; 76, 5.2-5.4; 72, 5.2-5.4; 57, 5.8; 55, 5.2; 43, 5.8-6.1 y 33, 6.5-6.8). En el presente estudio se encontraron estas mismas proteínas, lo que sugiere que tal vez, debido a la metodología empleada, fue posible extraer proteínas de la membrana (Lanar y Manning, 1984).

INMUNO ELECTROTRANSFERENCIA CON MEZCLA DE SUEROS DE PACIENTES CHAGÁSICOS CRÓNICOS.

Como se puede ver en las figuras 37-39 y en las tablas 10-12, se encontraron diferencias en el patrón de antígenos reconocidos por el mezcla de sueros de pacientes con enfermedad de Chagas crónica, estas diferencias se pueden atribuir a la heterogeneidad antigénica de las cepas.

Estos sueros reconocieron 56 y 57 antígenos en las cepas Ninoa y Querétaro respectivamente, con un patrón parecido. Sin embargo, al realizar el análisis, del peso molecular y punto isoeléctrico de los antígenos (tablas 10 y 11), se encontraron diferencias entre estos valores, no son iguales por lo que se consideran antígenos diferentes.

En el caso de la cepa de genotipo II, Ver-6, la mezcla de sueros reconoció 63 antígenos que es un número mayor que en las cepas genotipo I. Entre los que destacan los antígenos de pesos de 24 a 27 KDa con pI entre 4.2 y 5.3, que están ausentes en las otras cepas. Entre los antígenos que sobresalen por su intensidad esta el de 21 KDa y pI 6.7, además de las zonas de altos pesos moleculares, superior a 120 KDa y pI de 4.9, y la zona con pesos alrededor de 63 KDa y una zona amplia de pI que va de 3 a 5 aproximadamente y que corresponde como los pesos donde se observan las bandas más intensas en separaciones unidimensionales.

En la inmuno electrotransferencia de SDS-PAGE unidimensional utilizando esta misma mezcla de sueros y como antígeno extracto proteico total de la cepa Querétaro sin detergente destacaron como las bandas más intensas las de pesos superiores a 120 KDa y la de 63 KDa, además de algunas otras más débiles (figura 36). Estos pesos corresponden a lo observado al emplear membranas separadas por 2D-PAGE, pero con la diferencia de que en estos últimos podemos ver que no es una sola proteína sino varias que se ubican en un mismo peso, quizá isoformas de una misma proteína.

Existen diversos reportes acerca de los antígenos inmunodominantes, entre ellos figuran las proteínas de pesos 25, 30, 32, 37, 40, 42, 65, 70, 75 y 83 KDa,

que fueron reconocidas por los anticuerpos generados por pacientes crónicos sintomáticos (Sánchez et al., 2001 y Vissoci et al., 1998). Los antígenos reconocidos en las tres cepas corresponden a los pesos de las proteínas que han sido reportadas como los principales antígenos reconocidos por sueros de pacientes chagásicos. Sin embargo, con la inmuno electrotransferencia en 2D-PAGE se detectaron hasta 6 antígenos del mismo peso.

INMUNO ELECTROTRANSFERENCIA CON ANTICUERPOS MONOCLONALES.

Se utilizaron anticuerpos monoclonales contra moléculas de *T.cruzi* cepa Querétaro producidos con anterioridad en el laboratorio (López-Olmos, 1999) con la finalidad de emplear anticuerpos que reconocen un solo epítopo que ayudara a encontrar diferencias de manera más exacta entre las cepas que al emplear un suero policlonal.

Esto se pudo realizar con el anticuerpo monoclonal 1D5, que en una dimensión reconoce una sola banda de 38 KDa, mientras que en las membranas de 2D-PAGE se pudieron distinguir una serie de isoformas de esta proteína, que en el caso de las cepas de genotipo I fueron 5 isoformas, en tanto que en la de genotipo II se reconocieron 6, siendo esta proteína extra más ácida, con pI de 4.3.

En tanto que el anticuerpo F14B, que reconoce una proteína de la superficie celular, con esta metodología se pudo resolver en la cepa Ninoa dos isoformas de 25 KDa y pI de 4.4. y 4.5. Mientras que en las otras dos cepas reconoció un mayor

número de antígenos; 38 en Querétaro y 18 en Ver-6, lo que pudiera señalar que el epítoto reconocido por el anticuerpo monoclonal F14B se encuentra distribuido en una serie de proteínas con pesos y puntos isoelectrónicos variados. Estos resultados muestran claramente la diversidad de expresión de proteínas en cepas de diferente tipo genético, hecho ya encontrado por estudios realizados en cepas sudamericanas de *T. cruzi*.

En el caso del anticuerpo B106E, no se encontraron diferencias entre los antígenos reconocidos por cada uno de ellos, con el anticuerpo B106E no se observó un punto definido sino una zona difuminada entre los pesos de 180 a 51 KDa y en el pI de 4.9 en las tres cepas, mientras que en la inmuno electrotransferencia de un gel de una sola dimensión sí bien se observa una zona entre estos pesos, es posible observar dos bandas claramente definidas en 180 KDa. El hecho de observar una zona amplia y no una banda nos pudiera indicar que se trata de glicoproteínas, hecho que corresponde con la caracterización realizada al momento de su producción, ya que se demostró que era de naturaleza proteica (López-Olmos, 1999).

El estudio del proteoma de *T. cruzi* ha sido complejo, puesto que la estandarización de la técnica es un paso crucial y nada fácil, debido a las características del extracto proteico que difiere del empleado en SDS-PAGE. En la literatura solo existen 3 reportes del estudio de proteoma de *T. cruzi*, solo uno de ellos reciente (Lanar y Manning, 1984; Andrews et al., 1984 y Paba et al., 2004).

Esta metodología ha demostrado en numerosos estudios lo poderosa que puede ser al momento de realizar separaciones de mezclas de proteínas complejas, como lo es un extracto total de cualquier organismo eucarionte; en este

trabajo permitió la resolución de un promedio de 500 proteínas en comparación de 30 que se logran separar en SDS-PAGE, de estas 500 proteínas separadas no fue posible encontrar alguna proteína específica de alguna cepa, sin embargo, sí permitió asociar la expresión de algunas proteínas con las características genéticas de la cepa analizada, ya sea genotipo I o genotipo II.

Por otro lado, esta metodología proporciona un nuevo panorama antigénico de diferentes cepas, ya que el mezcla de suero de pacientes chagásicos crónicos reconoce 15 proteínas separadas por SDS-PAGE unidimensional, mientras que al emplear proteínas separadas por 2D-PAGE se reconocieron alrededor de 57 antígenos, la mayoría de ellos de los mismos pesos que los antígenos inmunodominantes separados por SDS-PAGE en este mismo trabajo y reportados en diversos trabajos acerca de los principales antígenos de *T. cruzi*.

Para estudios posteriores se planea utilizar esta técnica para realizar un estudio detallado de proteínas de membranas en general y en particular de aquellas moléculas que en tripomastigotes participan en el fenómeno de invasión a las células hospederas.

IX. CONCLUSIONES

- En este trabajo se logro estandarizar la técnica de electroforesis bidimensional para extractos de *Trypanosoma cruzi*.
- De las proteínas más abundantes para cada cepa, no se detectó su presencia en dos o más cepas, lo que nos indica la expresión diferencial en las proteínas para cada cepa.
- Al realizar la inmuno electrotransferencia con una mezcla de sueros de pacientes chagásicos crónicos no se encontraron diferencias entre las membranas de cepas del mismo genotipo, pero sí con la membrana de la cepa de genotipo 2, que muestra una serie de isoformas ausentes en las otras membranas.
- Al emplear anticuerpos monoclonales se detecto que el anticuerpo 1D5 reconoce una serie de isoformas de 38 KDa, destacando que en las cepas de genotipo I se observan 5 isoformas en tanto que en la de genotipo II detecta una isoforma más, con un pI de 4.3.
- El anticuerpo F14B, que reconoce una proteína de la superficie celular; reconoce a dos antígenos de 25 KDa y pI de 4.4 y 4.5 en la cepa Ninoa; en tanto que en las otras dos cepas reconocen una gran cantidad de proteínas.

X. BIBLIOGRAFIA.

- Acestor N., Masina S., Walker J., Saravia N., Fasel N. Y Quadroni M. Establishing two-dimensional gels for the analysis of *Leishmania* proteomes. *Proteomics*. 2002; 2:877-879.
- Almeida I. , Gazzinelli R., Ferguson M. y Travassos L. *Trypanosoma cruzi* mucins: Potential functions of a complex structure. *Memories of Institute Oswaldo Cruz*. 1999;94(suppl. 1):173-176.
- Andrews N. y Whitlow M. Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a hemolysin a low pH. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1989;33:249-256.
- Andrews N., Katzin A. y Colli W. Mapping of surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi* by two-dimensional electrophoresis. A correlation with the cell invasion capacity. *European Journal of Biochemistry*. 1984 ; 140:599-604.
- Ashton P., Curwen R. y Wilson A. Linking proteome and genome: how to identify parasite proteins. *TRENDS in Parasitology*. 2001;17(4):198-202.
- Barrett J., Jefferies J. y Brophy P. Parasite proteomics. *Parasitology today*. 2000;16(9):400-404.
- Basombrío M., Gómez L., Padilla A., Ciaccio M., Nozaki T. y Cross G. Targeted deletion of the gp72 gene decreases the infectivity of *Trypanosoma cruzi* for mice and insect vectors. *Journal of parasitology*. 2002;88(3):489-493

-
- Berkelman T. y Stenstedt T. 2-D Electrophoresis using imMobilized pH gradients principles & methods. Amersham Pharmacia Biotech. 1998.
 - Bonnie Dunbar. Two-dimensional electrophoresis and imMunological techniques. Plenum Press. Nueva York. 1987.
 - Bosseno M.F., Barnabé C., Magallón E., Lozano F., Raysey J., Espinoza B. y Breniere F. Predominante of *Trypanosoma cruzi* Lineage I in México. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002;40(2):627-632.
 - Cazzulo J., Cazzulo-Franke M.C. Martínez J. y Franke de Cazzulo B.M. Some kinetic properties of a cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Biophys. Acta*. 1990;1037:186-191.
 - Cevallos A.M., López-Villaseñor I., Espinosa N., Herrera J. y Hernández R. *Trypanosoma cruzi*: allelic comparisons of the actin genes and analysis of their transcripts. *Experimental Parasitology*. 2003;103(1-2):27-34.
 - Chuenkova M. y Pereira M. E. *Trypanosoma cruzi* trans-Sialidase: Enhancement of virulence in a murine model of Chagas' Disease. *Journal of Experimental Medicine*. 1995;181:1693-1703.
 - Contreras V., De Lima Z.R. y Zorrilla G. *Trypanosoma cruzi*: maintenance in culture modify gene and antigenic expression of metacyclic trypomastigotes. *Memories of Institute Oswaldo Cruz*. 1998; 93(6):753-760.
 - Coura JR., Ferreira LF., Rubens J. Pereira NC. y Silva JR. *Tripanosoma do "complexo cruzi"* em reservatório silvestre no Estado da Guanabara. Estudo de sua patogenicidades. *Re. Inst. Med. Trop. Sau Paulo*. 1966; 8:125-133.

-
- Cunningham M.J. Genomics and proteomics. The new millennium of drug discovery and development. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2000;44:291-300.
 - Da Silveira J. F., Umezawa E.S. y Ostermayer Luquetti A. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *TRENDS in Parasitology*. 2001;17(6):286-291.
 - De Araujo R., Souza A., Bonaldo M.C., Feitosa A., Sales C., Angluster J. y Goldenberg S. *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: differential expression of proteinases and cell-surface polypeptides in avirulent and virulent promastigotes. *Experimental Parasitology*. 2003;104:104-112.
 - De Lima Rivero A.R., Farías Tamoy M. N., Tortolero Leal E., Navarro Aguilera M. C. y Contreras Alvarez V. T. Purificación parcial y empleo de fracciones glicosídicas de *Trypanosoma cruzi* en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Acta Científica Venezolana*, 2001;52:235-247.
 - De Souza W. A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. *Memoria de Instituto Oswaldo Cruz*. 1999;94(Suppl 1):17-36.
 - De Souza W. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. *Kinetoplastid Biology and Disease*. 2002;1(3) en <http://www.kinetoplastids.com/content/1/1/3>
 - Degraeve W., Tran A., TamMi M., Sanchez D. y Aslett M. The *Trypanosoma cruzi*. Genome initiative on the web. *TRENDS in Parasitology*. 2001;17(3):155-156.

-
- Devera R., Fernández O. Y Rodríguez J. Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection. *Memories of Institute Oswaldo Cruz*. 2003;98(1):1-12.
 - Di Noia J., Pollevick G., Xavier M., Previato J. O., Nedoca-Previato L., Sánchez D. y Frasch A. High diversity in mucin genes and mucin molecules in *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Biological Chemistry*. 1996;271(50):32078-32083.
 - Eakin A. E., Mills A., Harth G., McKerrow J. y Craik C. The sequence, organization, and expression of the Major Cysteine protease (Cruzain) from *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Biological Chemistry*. 1992; 267(11):7411-7420.
 - Espinoza B., Vera-Cruz J.M., González H., Ortega E. y Hernández R. Genotype and virulence correlation within Mexican stocks of *Trypanosoma cruzi* isolated from patients. *Acta Tropica*. 1998;70:63-72.
 - Fernandes O., Mangia R.H., Lisboa C.V., Pinho Ap. Morel C.M., Zingales B., Campbell D.A. y Jansen A.M. The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. *Parasitology*. 1999;118:161-166.
 - Ferreira A.W., Belem Z.R., Lemos A., Reed S.G. y Campos-Neto A. Enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of Chagas' disease employing a *Trypanosoma cruzi* recombinant antigen that

consists of four different peptides. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001;39(12):4390-4395.

- Frasc A.C. Functional diversity in the Trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today*. 2000;16(7): 282-285.
- Garfin D. Electrophoretic methods in Introduction to biophysical methods for protein and nucleic acid research. Academic Press. 1995.
- Garfin D. Isoelectric focusing in Handbook of bioseparation. Academic Press. 2000.
- Goldman D. y O'Brien S. Two-dimensional protein electrophoresis in phylogenetic studies. *Methods in Enzymology*. 1993;224:113-121.
- Goldsmith RS. Zárate RJ. Zárate LG. Kagan y Jacobson LB. Clinical and epidemiological studies of Chagas' disease in rural communities in Oaxaca State, México, and a seven year follow up: I. Cerro del aire. *Bull Pan Am Health Organ*. 1985;19:120-138.
- Görg A., Postel W. y Günther S. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 1988;9:531-546.
- Graefe S. Wiesgigl M. Gaworski I. Macdonald A. y Clos J. Inhibition of HSP90 in *Trypanosoma cruzi* induces a stress response but no stage differentiation. *Eukaryotic Cell*. 2002;1(6):936-943.
- Guevara EA. Taibi A., Bilaut MO. Y Ouaiissi A. PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* useful for specific diagnosis of human Chagas' disease. *Journal of Clinical Microbiology*. 1996;34:483-486.

-
- Guzmán-Bracho C. Epidemiology of Chagas disease in Mexico: an update, *TRENDS in Parasitology*, 2001;17(8):372-376.
 - Hart DT., Vickerman K, Coombs GH. A quick, simple method for purifying *Leishmania mexicana* amastigotes in large numbers. *Parasitology*. 1981;82:345-355.
 - Henriksson J. Petterson U., Solari A. *Trypanosoma cruzi*: correlation between karyotype variability and isoenzyme classification. *Experimental Parasitology*. 1993;77:334-348.
 - Herbert B. Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*. 1999;20:660-663.
 - Hernández M. Ericson C. Delgadillo C. New focus of chagas disease in Mexico. *Lancet* 1987;100:23.
 - Hernández R., Herrera J., Bosseno M.F., Breniere S.F. y Espinoza B. *Trypanosoma cruzi*: Data supporting clonality in Mexican stocks. *The Journal of Parasitology*. 2001;87(5):1178-1181.
 - Jungblut P., Schaible U., Mollenkopf H., Zimmermann U., Raupach B., Halada P., Lamer S., Hagens K. y Kaufmann H. Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogens. *Molecular microbiology*. 1999;33(6):110-1117.
 - Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-685.

- Lanar D. Y Manning J. Major surface proteins and antigens on the different in vivo and in vitro forms of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1984;11:119-131.
- Leedale, G.F. y K. Vickerman. Phylum Euglenozoa. En: Lee, J.J., G.F. Leedale y P.C. Bradbury. And Illustrated guide to the protozoa. Organisms traditionally referred to as protozoo, or newly discovered groups. Society of Protozoologists, Lawrence. 2000. 1432 pp.
- López-Olmos V., Pérez-Nasser N., Piñero D., Ortega E., Hernández R. Y Espinoza B. Biological characterization and genetic diversity of Mexican aislates of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*. 1998;69:239-254.
- López-Olmos, María Victoria. 1999. Tesis de Maestría en Investigación Biomédica Básica. Identificación y caracterización de epitopos proteicos de una cepa mexicana de *Trypanosoma cruzi* a través del uso de anticuerpos monoclonales. Colegio de Ciencias y Humanidades. Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Macedo AM., Martins SM., Chiari E., Pena SDJ. DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1992;55:147-154.
- Málaga S. y Yoshida N. Targeted reduction in expresión of *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein gp90 increases parasite infectivity. *Infection and ImMunity*. 2001;69(1):353-359.

-
- Manning-Cela R., Cortés A., González-Rey E., Van Boris W., Swindle J. Y González A. LYT1 Proteins is required for efficient in vitro infection by *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity*. 2001;69(6):3916-3923.
 - Manque P. M., Eichinger D., Juliano M. A., Jiluiano L., Araya J.E. y Yoshida N. Characterization of the cell adhesión site of *Trypanosoma cruzi* metacyclic stage surface glycoprotein gp82. *Infection and Immunity*. 2000;68(2):478-484.
 - Mazariego-Arana MA. Monteón V. Ballinas-Verdugo MA. Hernández-Becerril N. Alejandro-Aguilar R. Reyes P. Seroprevalence of human *Trypanosoma cruzi* infection in diferent geografic zones of Chiapas, México. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2001;34(5):453-458.
 - Mazzoti L. Investigación sobre la existencia de la enfermedad de Chagas en el país. Demostración de Tripanosomas en los redúvidos transmisores. *Med Rev Mex* 1936;16: 584-585.
 - Miles MA., Souza AA., Pova M., Shaw JJ., Lainson R. Toye PJ. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with disease in Amazonian Brazil. *Nature*. 1978;272:819-821.
 - Monteón V. M., Guzmán-Rojas L., Negret-García C., Rosales-Encina J.L. y Reyes López P. Serodiagnosis of american trypanosomosis by using nonpathogenic trypanosomatid antigen. *Journal of Clinical Microbiology*. 1997;35:3316-3319.
 - Morel CM., Chiari E. Camargo EP., Mattei DM., Romanha AJ., Simpson L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of

restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980;77:6810-6814.

- Neira I. Silva F.A., Cortez M. y Yoshida N. Involvement of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes surface molecule gp82 in adhesion to gastric mucin and invasion of epithelial cells. *Infection and Immunity*. 2003;71(1):557-561.
- Nilo ME. Alvarado J. Ramírez M. Espejo E. Hallazgo de tripomastigoto en estudio citoquímico de líquido amniótico. *Parasitología al día*. 2000;24 (1-2).
- O'Farrell P. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. 1975;250(10):4007-4021.
- Ortega-Berria E. y Pereira ME., Entry of *Trypanosoma cruzi* into eukaryotic cells. *Infect Agents Dis*. 1992;1(3):136-45.
- Ouaisi A. Guilvard E. Delneste Y. Caron G. Magistrelli G. Herbault N. Thieblemont N. y Jeannin P. The *Trypanosoma cruzi* Tc52-Released Protein Induces Human Dendritic Cell Maturation, Signals Via Toll-Like Receptor 2, and Confers Protection Against Lethal Infection. *Journal of Immunology*. 2002 ;168: 6366–6374.
- Paba J., Santana J., Teixeira A. Fontes W., Sousa M. Y Ricart C. Proteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Proteomics*. 2004;4:1052-1059.
- Pacheco Álvarez D. 2000. Evaluación de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como prueba de diagnóstico de la enfermedad de Chagas en pacientes mexicanos. Tesis para obtener el título de Licenciada en Biología. Universidad Simón Bolívar.

- Peralta J., Teixeira M., Shreffler W., Pereira J., Burns J., Sleath P. y Reed S. Serodiagnosis of Chagas' disease by enzyme-linked immunoadsorbant assay using two synthetic peptides as antigens. *Journal of Clinical Microbiology*. 1994;32:971-994.
- Piacenza L. Peluffo G. Radi R. L-Arginine-dependent supresión of apoptosis in *Trypanosoma cruzi*: Contribution of the nitric oxide and polyamine pathways. *PNAS*. 2001;98(13):7301-7306.
- Pinto DJC. Chagas disease and blood transfusion. *Memories of Institute Oswaldo Cruz* 1984;79(Suppl):139-147.
- Rabilloud T., Hadéis C., Giraudel A. y Lunardi J. Improvement of the solubilization of proteis in two-dimensional electrophoresis with imMobilized pH gradients. *Electrophoresis*. 1997;18:307-316.
- Ramirez M.I., Cassia R.R., Araya J.E., da Silveira J.F. y Yoshida N. Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesión molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasión. *Infection and ImMunity*. 1993;61(9):3636-3641.
- Ramos-Echeverría A, Monteon-Padilla V. Reyes-López P. Detección de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en donadores de sangre. *Salud Pública de México*, 1993;35(1):56-63.
- Rangel-Flores H. Sánchez B. Mendoza-Duarte J. Barnabé C. Brenière F. Ramos C. Espinoza B. Serologic and parasitologic demonstration of *Trypanosoma cruzi* infections in an urban area of central Mexico: correlation

with electrocardiographic alterations. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2001;65(6):887-895.

- Rodrigues Coura J. y de Castro S.L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97(1):3-24.
- Ruiz R.C.; Favoreto S., Dorta M., Oshiro M. E., Ferreira A., Manque M. y Yoshida N. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca^{2+} signalling activity. *Biochemical Journal*. 1998;330:505-511.
- Salvati L., Mattu M., Polticelli F., Tiberi F., Gradoni L., Venturini G., Bolognesi M. y Ascenzi P. Modulation of the catalytic activity of cruzipain, the major cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*, by temperature and pH. *European Journal of Biochemical*. 2001;268:3253-3258.
- Sánchez B., Monteón V., Reyes P.A. y Espinoza B. Standardization of micro-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blot for detection of *Trypanosoma cruzi* antibodies using extracts from Mexican strains as antigens. *Archives of Medical Research*. 2001;32:382-388.
- Sánchez-Guillén MC. Barnabé C. Juegan JF. Tibayrenc M. Velásquez-Rojas M. Martínez-Munguía J. Salgado-Rosas H. Torres-Rasgado E. Rosas-Ramírez MI. Pérez-Fuentes R. High Prevalence of Anti-*Trypanosoma cruzi* Antibodies, among Blood Donors in the State of Puebla, a Non-endemic Area of Mexico. *Memories of Institute Oswaldo Cruz*. 2002;97(7): 947-952.

-
- Santori F., Dorta M., Juliano L., Juliano M.A., da Silverio J.F., Ruiz R. y Yoshida N. Identification of a domain of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecule gp82 required for attachment and invasión of mamMalian cells. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1996;78:209-216.
 - Scharfstein J., Schechter M. Senna M. Peralta J.M., Mendonca-Previato L y Miles M.A. Characterization and isolation of a 57/51,000 m.w. surface glycoprotein (GP 57/51). Expressed by epimastigotes and bloodstream tripomastigotes. *J. Immunol*. 1986;137:1336-1341.
 - Schmidth G.D. and Roberts L.S. *Foundations of Parasitology*. Timer Mirror/Mosby College Publishing. USA. 1989. 750 pp.
 - Schmunis GA. Prevention of transfusional *Trypanosoma cruzi* infection in Latin American. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;94 (Suppl. I):93-101.
 - Sosa Aguilar Sandro. 2003. Tesis de licenciatura Biología. Respuesta inmune celular contra cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi*. Facultad de Ciencias. UNAM.
 - Spadafora C., Repetto Y., Torres C., Pino L., Robello C., Morello A., Gamarro F. Y Castany S. Two casein kinase 1 isoforms are differentially expressed in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular & Biochemical Parasitology*. 2002;124:23-36.
 - Tay, J., Salazar-Schettino, P.M., Ontiveros, A., Jimenez, J., de Haro, I., Garcia, Y., Gutierrez, M., Epidemiologic study of Chagas' disease in a town in Oaxaca México. *Bull. Pan am. Health Organ*. 1986;20: 358-365.

- Teixeira M. y Yoshida N. Stage-specific surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* identified by monoclonal antibodies. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1986;18:271-282.
- Thiel M. y Bruchhaus I. Comparative proteome análisis of *Leishmania donovani* at different stages of transformation from promastigotes to amastigotes. *Medicine and Microbiology Immunology*. 2001;190:33-36.
- Tibayrenc M. Neubauer K., Barnabé C., Guerrini F. Skarecky D., Ayala F. Genetic characterization of six protozoa: parity between random primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:1335-1339.
- Towbin, H. Staehelin T. y Gordon. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and applications. *PNAS*. 1979;76:4350-4354.
- Trujillo F. Villanueva MA. Soto M. Raygoza M. Jiménez A. Seguimiento serológico de infección por *Trypanosoma cruzi* en individuos estudiados de 50 municipios del Estado de Jalisco, México de 1987 a 1994. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2000;33(6):591-596.
- Umezawa E.S., Bastos S., Camargo M.E., Yamauchi L., Santos M., Gonzalez A., Zingales B., Levin M., Sousa O., Rangle-Aldao R. y Da Silveira J.F. Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999;37(5):1554-1560.

- Van Deursen F., Thornton D. y Matthews K. A reproducible protocol for analysis of proteome of *Trypanosoma brucei* by 2-dimensional gel electrophoresis. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2003;128:107-110.
- Velasco Castrejón O. La enfermedad de Chagas. Una revisión histórica sucinta y parcial de lo que ocurre en México y en el mundo. INDRE. 1991.
- Vera-Cruz J.M., Magallón-Gastelum E., Grijalva G., Rincón A.R., Ramos-García C. y Armendáriz-Borunda J. Molecular diagnosis of Chagas' disease and use of an animal model to study parasite tropism. *Parasitology Research*. 2003;89:480-486.
- Vergara U., Veloso C., Gonzales A. y Lorca M. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of Chagas' disease using synthetic peptides. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1992;46:39-43.
- Vidal-Acosta V. Ibáñez-Bernal S. Martínez-Campos C. Infección natural de chinches Triatominae con *Trypanosoma cruzi* asociadas a la vivienda humana en México. *Salud Pública México*. 2000;42:496-503.
- Vissoci Reiche EM., Cavazzana M. Okamura H., Tagata EC., Jankevicius S. y Jankevicius JV. Evaluation of the western blot in the confirmatory serologic diagnosis of chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1998;59(5):750-756.
- Washburn M. y Yates III J. Analysis of the microbial proteome. *Current Opinion in Microbiology*. 2000;3:292-297.

- Watarai H., Inagaki Y., Kubota N., Fujii K., Nagafune J., Yamaguchi Y. y Kadoya T. Proteomic approach to the identification of cell membrane proteins. *Electrophoresis*. 2000;21:460-464.
- Westermeier R. y Naven T. Proteomics in practice. A laboratory manual of proteome analysis. Wiley-Vch. Alemania. 2002.
- WHO, Control of Chagas disease. Report of a WHO Expert Committee. WHO technical report series; 811. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 1991.
- Yoshida N., Blanco S.A., Araguth M.F., Russo M. y González J. The stage-specific 90-kilodalton surface antigen of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1990;39:39-46.
- Yoshida N., Mortara R., Araguth M. González J. Y Russo M. Metacyclic neutralizing effect of monoclonal antibody 10D8 directed to the 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity*. 1989;57(6):1663-1667.

XI. ANEXOS

ANEXO 1. ELECTROFORESIS E ISOELECTROENFOQUE.

Dado la importancia de las proteínas se han implementado diversas técnicas para su análisis, entre las que destaca la electroforesis de proteínas. El término electroforesis se refiere al movimiento de partículas con carga eléctrica a través de un campo eléctrico aplicado externamente; es un método de alta resolución para la separación de proteínas y ácidos nucleicos. Teóricamente se puede predecir el patrón con el que van a desplazarse las moléculas a través de este campo eléctrico sin embargo cuando se trata de mezclas de macromoléculas en presencia de matrices rígidas como lo es la poliacrilamida, esto es muy complicado.

Las proteínas poseen cargas como resultado de los aminoácidos básicos (arginina y lisina) y ácidos (glutámico y aspártico), además de que pueden tener modificaciones postranslacional como la glicosilación, sulfatación y fosforilaciones. Básicamente son tres los tipos de electroforesis: límite móvil, continua y de zona, esta última puede ser con sistema de amortiguador continuo, con amortiguador discontinuo o con amortiguador disociante; donde las diferencias son la composición del amortiguador empleado.

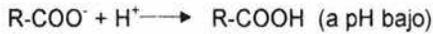
A lo largo del tiempo se han usado varias matrices como el soporte para la separación de las moléculas, siendo las más comunes el papel, acetato de celulosa, almidón, agarosa y poliacrilamida.

La electroforesis en gel es la de uso más popular por ser una técnica simple y de fácil aprendizaje; por lo que es el método analítico más empleado para la separación de proteínas.

Los geles son los principales soportes empleados debido a sus características químicas que facilitan la formación de poros de tamaño uniforme con lo que es posible realizar la separación de estas macromoléculas. Los más empleados son los de agarosa y de poliacrilamida. Los poros de agarosa son más grandes que los de poliacrilamida, por lo que se emplea para separar proteínas de más de 500 kDa y DNA con más de 2000 pares de bases (pb). Los geles de poliacrilamida son formados por la copolimerización de acrilamida y un monómero cross-linking generalmente la N,N-metilenbisacrilamida; esta última es un agente acrílico que se une covalentemente a las cadenas de acrilamida formando una red. La reacción formadora de geles es iniciada por la generación de radicales libres, para lo que generalmente se emplea persulfato de amonio y un aceptor, TEMED, que va a acelerar la descomposición del persulfato en radicales libres que iniciaran la polimerización. Otro factor importante es la elección del sistema de amortiguador empleado ya que va a determinar las condiciones, los efectos y la resolución de la separación, la selección va a depender de las proteínas a separar. El sistema continuo, que es un amortiguador a pH constante y es el mismo en el gel que el amortiguador de corrida. El sistema discontinuo emplea diferentes iones en el gel y en el amortiguador de corrida. El sistema más empleado es el desarrollado por Laemmli, que emplea dos amortiguador con diferentes aniones (cloruro y Glicina) y un catión común (Tris) para separar las proteínas; además

incorporo 0.1% de SDS y desnaturaliza la muestra al calentarla en un amortiguador que contiene 2% de SDS y 5% de mercaptoetanol (Garfin, 1995).

Las proteínas están compuestas por diferentes aminoácidos, muchos de los cuales tienen grupos funcionales que presentan alguna carga dependiendo del medio en que se encuentren. Los grupos carboxilos a pH bajo tienen carga neta de cero pero a pH altos tienen carga negativo:



caso contrario a los grupos amino (residuos de lisina), grupos imidazólicos (residuos de histidina) y grupos guanidínicos (residuos de arginina) que a pH bajo presentan carga positiva y a altos pH tienen carga neta de cero.



La carga neta de cualquier proteína es la suma de las cargas positivas y negativas de todos los residuos de los aminoácidos así como de otros grupos, carbohidratos, fosfatos y sulfatos. A un valor de pH específico la proteína no tiene una carga neta (la cantidad de cargas positivas es igual a las cargas negativas), a este punto se le conoce como punto isoelectrico. (Bonnie, 1987).

En enfoque isoelectrico (IEF) es una técnica de separación de alta resolución que generalmente se realiza bajo condiciones no desnaturizantes, por lo que las proteínas mantienen muchas de sus características físicas y químicas. La resolución de la técnica es tan alta como 0.02 unidades de pH o menos.

El principio de la técnica es la aplicación de un campo eléctrico a un soporte

que contiene moléculas que van a formar un gradiente de pH que va a permitir separar a las proteínas de acuerdo a su punto isoelectrónico.

Se han usado diferentes métodos para establecer y mantener los gradientes de pH, siendo tres los más empleados: a) mezclas de molécula sintéticas llamadas anfólitos acarreadores que van a formar el gradiente al aplicar el voltaje, es la técnica más común; b) amortiguador sintéticos que tienen dobles enlaces reactivos (grupos acrilamido) que son incorporados covalentemente a los geles de poliacrilamida y sirven como soporte de separación. Estos gradientes de pH inmovilizados (IPG) son más caros que los anfólitos sin embargo actualmente es el método de elección para el IEF; y c) pares de amortiguador especialmente seleccionados para formar gradientes de pH muy cercanos. Los tres métodos generan gradientes de pH que dependen de los mecanismos electrolíticos y protolíticos, estos gradientes formados por los anfólitos son lineales en tanto que los de IPG pueden ser lineales o no lineales (Garfín, 2000).

ELECTROFORESIS EN DOBLE DIMENSIÓN.

La técnica de electroforesis en doble dimensión es una poderosa herramienta para el análisis, detección y separación de proteínas de fuentes biológicas complejas con gran poder de resolución y sensibilidad. Las proteínas pueden ser separadas en función de su punto isoelectrónico (isoelectroenfoque en la primera dimensión) y en función de su peso molecular (electroforesis con SDS en la segunda dimensión).

Esta técnica fue introducida por O'Farrell en 1975 y empleo para su desarrollo geles cilíndricos de poliacrilamida que contenían anfólitos, en presencia

de urea durante periodos prolongados de tiempo y altos voltajes (1ª. Dimensión); Sin embargo, estableció que era mejor emplear geles discontinuos en gradientes (2ª. Dimensión). Para poder medir el pH y conocer el gradiente formado era necesario cortar un gel después de la primera dimensión y colocarlo en agua destilada y posteriormente medir a esta solución el pH. Teóricamente se pueden resolver hasta 7000 proteínas, sin embargo, en la práctica no se resuelve ese número (O'Farrell, 1975).

Por otro lado, está metodología presentaba grandes problemas, principalmente una baja reproducibilidad, su dificultad para realizarse y la fragilidad del gel al extraerlo del tubo después de la primera dimensión; por lo anterior, en 1988 Görg y col. introdujeron la técnica de gradientes de pH inmovilizados (IPG). Los IPG's se basan en el principio de que el gradiente de pH es generado por un número limitado de reactivos químicos bien definidos (Immobilinas) que van a copolimerizar con una matriz de acrilamida, estos geles se cortan en tiras de 0.5 mm de ancho con diferentes longitudes, lo cual proporciona una mayor reproducibilidad. Entre las ventajas de esta técnica están:

- El soporte y el gel son fácilmente manejables.
- Los gradientes de pH inmovilizados son reproducibles.
- Posibilidad de emplear gradientes amplios y estables.
- Las mezclas de gradientes no son modificadas por la composición de la muestra.
- Intervalos de pH cercanos en geles largos pueden ser preparados con una alta resolución y con cargas proteicas altas.

- Posibilidad de aplicar la muestra de distintas formas, principalmente se rehidratan las tiras en soluciones que contienen la muestra, y están conformadas adicionalmente con detergentes y reductores.

Sin importar el método empleado, un paso crítico es la preparación de la muestra. Como se ha mencionado; muchas proteínas se encuentran asociadas con membranas, ácidos nucleicos y otras proteínas por lo que se debe elegir un buen método de extracción y de conservación en solución. Esto va a depender del método de disgregación empleado, la concentración de proteínas, la presencia de detergentes, otro factor clave es la presencia de proteasas liberadas al momento de disgregar las células, para evitar su acción es conveniente agregar al extracto inhibidores de proteasas.

En la composición de la muestra debe de existir una alta concentración de urea (8M), que va a proporcionar las condiciones desnaturalizantes y solubilizar la gran mayoría de las proteínas presentes en la muestra. Recientemente, se comenzó a emplear tiourea en combinación con urea para mejorar la solubilización, particularmente de las proteínas de membrana.

Otro componente esencial es un detergente no iónico ó switeriónico que va asegurar la solubilización y evitar la agregación por medio de interacciones hidrofóbicas. Inicialmente se empleó detergentes no iónicos como NP-40 o Tritón X-100 sin embargo, en la actualidad se prefieren los detergentes switeriónicos como el CHAPS o CHAPSO.

Los agentes reductores son frecuentemente incluidos en la muestra para romper los enlaces disulfuro y mantener a las proteínas en su estado reducido. El

más empleado es el ditiotreitól (DTT) en concentraciones entre 20 a 100 mM. Por último, se agregan anfólitos acarreadores o IPG amortiguador, en concentraciones al 2% v/v para aumentar la solubilización y minimizar la agregación de proteínas por interacciones carga-carga. (Berkemlan, 1998).

Después de haber realizado la separación bidimensional es importante seleccionar un buen método para la detección de las proteínas, se recomiendan las siguientes propiedades:

- ❖ Ser muy sensible, para detectar proteínas con bajas copias.
- ❖ Permitir un análisis cuantitativo.
- ❖ Tener amplio rango lineal y dinámico.
- ❖ Ser compatible con la espectrometría de masas.
- ❖ Ser de baja o nula toxicidad.

Desafortunadamente no existe un método que cumpla con todas las características anteriores, por lo que cada investigador debe elegir el método que convenga mejor a sus propósitos.

Los métodos más empleados son el azul de coomasie y la tinción con nitrato de plata, aunque los dos tienen varias ventajas, al realizarse una comparación de dos geles teñidos con cada método se observan patrones diferentes; por lo que actualmente se realiza una combinación de estos métodos, después de haber teñido con azul de coomasie se vuelve a teñir con nitrato de plata obteniendo patrones donde permanece el patrón con coomasie pero añade más proteínas detectadas por la alta sensibilidad de la plata. Con esta metodología se intensifica la señal obtenida resultando en una mejor sensibilidad

además de prevenir la tinción negativa con la plata.

El siguiente paso a la detección de las proteínas es el análisis de las mismas, por tratarse de moléculas complejas se deben emplear técnicas específicas y sensibles tal como la espectrometría de masas (EM). Sin embargo, antes de analizar mediante esta técnica a las proteínas es necesario realizar una digestión de la muestra para poder fragmentarla ya sea mediante métodos químicos o enzimáticos, en péptidos más pequeños.

La proteólisis enzimática es el método más empleado ya que tiene como ventajas su alta especificidad, muy buenos rendimientos y una alta eficiencia. La enzima más empleada es la tripsina que rompe los enlaces arginina-X o lisina-X, (donde X es cualquier aminoácido excepto prolina), la proteólisis se realiza en medios ligeramente básicos (7-9); generando péptidos de menor tamaño para un análisis eficiente por EM.

Aunque los métodos químicos no son muy empleados, son útiles cuando no hay enzimas disponibles para generar los péptidos deseados. El bromuro de cianógeno fragmenta específicamente en los residuos de metionina obteniendo péptidos relativamente grandes, de tamaños similares al emplear 2(2-nitrofenilsulfonil-3-indolenina). La hidrólisis con ácido fórmico diluido ha sido reportada como un método efectivo al ser un buen disolvente para la gran mayoría de las proteínas, obteniendo buen rendimiento para los residuos de ácido aspártico.

En los años ochenta la secuenciación de Edman era el método de elección, combinaba la derivatización del N-terminal con una fragmentación del residuo derivatizado, que se realiza con cada aminoácido del péptido, por último mediante

HPLC se comparaban los tiempos de retención de los fragmentos generados con estándares. Sin embargo, esta técnica es lenta (1 ó 2 péptidos por día) y poco sensible (fmol).

La espectrometría de masas es una técnica analítica que determina el peso molecular de moléculas basado en el movimiento de partículas con carga en un campo eléctrico o magnético. La muestra es convertida en iones en una fase gaseosa y separada de acuerdo a su masa y carga por la formación de iones positivos ó negativos.

Un espectrómetro de masas se puede dividir básicamente en tres componentes principales: sistema de ionización, área de separación y detección.



La fuente de iones es la región del aparato es donde se forman los iones a partir de la muestra, se han desarrollado varias técnicas para generar los iones sin embargo muchos de ellos no aplican para biomoléculas.

Desorción y ionización de matriz con ayuda laser (MALDI) es una técnica que ioniza rápidamente biomoléculas con buena sensibilidad, mediante la energía de un laser desorbe y ioniza las moléculas en presencia de una matriz sólida generando los iones que van a pasar a una fase gaseosa para posteriormente

entrar al separador de iones, generalmente un ToF (time on flight) y finalmente llegar al detector.

Los iones MALDI son creados mezclando la biomolécula digerida con una molécula orgánica pequeña que absorbe la energía del láser, esta energía causa la desorción e ionización de la matriz y el analito, por protonación (generando iones positivos) o por desprotonación (iones negativos).

Los iones generados por ionización por electrospray (ESI) son producidos a presión atmosférica aplicando la muestra disuelta en un solvente a un capilar que está bajo la influencia de un campo eléctrico. El potencial generado que se crea entre el capilar y la entrada del espectrómetro va a formar pequeñas gotas como neblina donde van los iones, que mediante la evaporación las gotas van a disminuir de tamaño hasta tener gotas con longitudes de nanómetros. Después de que los iones en fase gaseosa han sido producidos, son acelerados hacia el analizador donde van a ser separados de acuerdo a su masa y carga radio (m/z).

Son muchos los tipos de analizadores sin embargo los más empleados en el análisis de proteínas son el de tiempo de vuelo (ToF) y el cuadrupolo.

Tiempo de vuelo (ToF) es el analizador más simple y consisten en que los iones generados son acelerados por un alto voltaje, adquiriendo una velocidad inicial que va a depender de su masa, por lo que los péptidos más pequeños serán los primeros en llegar al detector y los más pesados los últimos.

Por último, la técnica de huella digital de péptidos comprende la digestión de la proteína, el análisis por MALDI ToF y la búsqueda en bases de datos.

Esta técnica se basa básicamente en el conocimiento teórico de la estructura de la proteína y realizando digestiones virtuales para encontrar una proteína que coincida con los datos generados prácticamente. Presenta varias dificultades como es conocer aquellas modificaciones que pueda sufrir la proteína de interés, la especificidad de la metodología para la digestión, el error que puede haber al determinar la masa, además de que podría estarse trabajando con mezclas de proteínas (Westermeier y Naven, 2002).

ANEXO 2. PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO, AMORTIGUADOR DE LISIS E INHIBIDORES DE PROTEASAS.

MEDIO LIT.

Cloruro de sodio	Sigma	Cat. S-9888	4.0 g
Cloruro de potasio	Baker	Cat. 3040	0.4 g
Fosfato de sodio dibásico	Baker	Cat. 3828-20	8.0 g
Glucosa	Merck	Cat. 8342	2.0 g
Triptosa	Disco	Cat. 0124-01	5.0 g
Infusión de caldo de hígado	Disco	Cat. 0269-17-7	5.0 g

Se disuelven en agua bidestilada todos los reactivos, midiendo el pH 7.2 para posteriormente aforar a 1L. Esterilizar a 120°C y 15 libras de presión por 20 minutos. Dejar mínimo 3 días en oscuridad como prueba de esterilidad.

Se complementa con hemina (25 µg/mL) y suero fetal bovino inactivado (56°C por 30 minutos) al 10%. Filtrar con filtro de 0.22 µ en esterilidad.

Se almacena a temperatura ambiente en oscuridad.

AMORTIGUADOR DE FOSFATO DE SODIO (PBS) 20x

Cloruro de sodio	Sigma	Cat. S-9888	180.0 g
Fosfato de sodio monobásico	Baker	Cat. 3818	22.0 g
Fosfato de sodio dibásico	Baker	Cat. 3828-20	7.2 g

Disolver en 500 mL de agua bidestilada y aforar a 1L.

AMORTIGUADOR DE FOSFATOS DE SODIO (PBS) 1x

Se aforan 50 mL de PBS 20x a 1L de agua bidestilada.

AMORTIGUADOR DE LISIS (8M UREA, 4% CHAPS, 40 mM Tris)

Urea	Organic Research	Cat. 4110U	0.48 g
CHAPS	Sigma	Cat. C-5070	0.04 g
Tris base	Sigma	Cat. T-1503	0.00485 g

Se disuelven para tener un volumen final de 1 mL con agua milli Q. El amortiguador se debe preparar justo antes de usarse.

AMORTIGUADOR DE LISIS (8M UREA, 2% CHAPS, 40 mM Tris)

Urea	Organic Research	Cat. 4110U	0.48 g
CHAPS	Sigma	Cat. C-5070	0.02 g
Tris base	Sigma	Cat. T-1503	0.00485 g

Se disuelven para tener un volumen final de 1 mL con agua milli Q. El amortiguador se debe preparar justo antes de usarse.

AMORTIGUADOR DE LISIS (0.15 M CLORURO DE SODIO, 4% TRITON X-100, 20 mM Tris-HCl pH 8)

Cloruro de sodio	Sigma	Cat. S- 9888	0.175 g
Triton X-100	Sigma	Cat. X-100	0.8 mL

Se disuelven en para un volumen final de 20 mL en amortiguador Tris-HCl pH 8.0

AMORTIGUADOR TRIS-HCl pH 8.0

Tris base	Sigma	Cat. T-1503	0.1211 g
-----------	-------	-------------	----------

Se disuelve en 25 mL de agua milli Q, se ajusta el pH a 8 con ácido clorhídrico y se afora a 50 mL.

AMORTIGUADOR DE LISIS (7M UREA, 2M TIUREA, 4% CHAPS, 10 mM Tris)

Urea	Organic Research	Cat. 4110U	0.42 g
Tiurea	Sigma	Cat. T-7875	0.152 g
CHAPS	Sigma	Cat. C-5070	0.04 g
Tris base	Sigma	Cat. T-1503	0.0008 g

Se disuelven para tener un volumen final de 1 mL con agua milli Q. El amortiguador se debe preparar justo antes de usarse.

AMORTIGUADOR DE LISIS (8M UREA, 4% CHAPS, 10 mM Tris)

Urea	Organic Research	Cat. 4110U	0.48 g
CHAPS	Sigma	Cat. C-5070	0.04 g
Tris base	Sigma	Cat. T-1503	0.0008 g

Se disuelven para tener un volumen final de 1 mL con agua milli Q. El amortiguador se debe preparar justo antes de usarse.

INHIBIDORES DE PROTEASAS.

	Concentración stock	Estabilidad	μ L agregados / 5 de amortiguador	Concentración final
EDTA	0.5 M	Meses 4°C	125	0.012 M
PMSF	200 mM	9 meses 4°C	25	1 mM
Leupeptin	10 mM	1 mes -20°C	50	0.1 mM
Pepstatin	1 mM	Meses -20°C	5	1×10^{-3} mM

PMSF (Sigma Cat. P-7626)se disuelven 34.84 mg en 1 mL de metanol.

Leupeptin (Sigma Cat. L-2884) se disuelven 1 mg en 235 μ L de agua milli Q.

Pepstatin (Sigma Cat. P-5318) se disuelven 1 mg en 1.47 mL de metanol.

El EDTA se emplea la solución 0.5 M de Sigma Cat. E-7889

ANEXO 3. REACTIVOS PARA SDS-PAGE Y 2D-PAGE**ACRILAMIDA/BISACRILAMIDA (30%/0.8%)**

Acrilamida	Bio-Rad	Cat. 161-0101	30.0 g
------------	---------	---------------	--------

N,N-metilen-bisacrilamida	Bio-Rad	Cat. 161-0201	0.8 g
---------------------------	---------	---------------	-------

Aforar a 100 mL con agua milli q. Filtrar por 0.22 μ y mantener a 4°C en frasco ambar.

4X TRIS-CI/SDS (0.5 M TRIS-CI con 0.4 % SDS) pH 6.8

Tris base	Sigma	Cat. T-1503	6.05 g
-----------	-------	-------------	--------

SDS	Bio-Rad	Cat. 161-0301	0.4 g
-----	---------	---------------	-------

Disolver en 40 mL de agua milli Q, ajustar el pH a 6.8 con ácido clorhídrico. Aforar a 100 mL y filtrar por 0.2 μ . Guardar en obscuridad a 4°C.

4X TRIS-CI/SDS (1.5 M TRIS-CI CON 0.4 % SDS) pH 8.8

Tris base	Sigma	Cat. T-1503	91 g
-----------	-------	-------------	------

SDS	Bio-Rad	Cat. 161-0301	2.0 g
-----	---------	---------------	-------

Disolver en 300 mL de agua milli Q, ajustar el pH a 8.8 con ácido clorhídrico.

Aforar a 500 mL y filtrar por 0.2 μ . Guardar en obscuridad a 4°C

PERSULFATO DE AMONIO (15%)

Persulfato de amonio	Bio-Rad	Cat. 161-0700	0.15 g
----------------------	---------	---------------	--------

Aforar a 1 mL con agua milli Q. Mantener en refrigeración, máximo 7 días.

AMORTIGUADOR DE CORRIDA ELECTROFORESIS 5X

Tris base	Sigma	Cat. T-1503	15.1 g
Glicina	Bio-Rad	Cat. 161-0718	72.0 g
SDS	Bio-Rad	Cat. 161-0301	5.0 g

Llevar a 1 L con agua milli Q. Mantener a temperatura ambiente.

AMORTIGUADOR DE CORRIDA ELECTROFORESIS 1X.

Aforar 200 mL de amortiguador de corrida electroforesis 5X a 1L con agua milli Q.

AMORTIGUADOR DE LAEMMLI (SAMPLE AMORTIGUADOR) 4X

Tris base	Sigma	Cat. T-1503	3.04 g
Glicerol	Baker	Cat. 2136-02	40 mL
SDS	Bio-Rad	Cat. 161-0301	4.0 g
2-mercaptoetanol	Bio-Rad	Cat. 161-0710	4 mL
Azul de bromofenol	Bio-Rad	Cat. 161-0404	2 mg

Aforar a 100 mL con agua milli Q. Poner en frasco ambar o protegido de la luz, en refrigeración.

AZUL DE COOMASIE.

Azul de coomasie R-250	Bio-Rad	Cat. 161-0400	0.25 g
Metanol	Baker	Cat. 9070-03	250 mL
Acido acético	Baker	Cat. 9507-05	50 mL

Disolver el colorante perfectamente, y aforar a 500 mL con agua bidestilada. Filtrar con papel filtro de poro mediano.

DESTENIDOR DE COOMASIE.

Metanol	Baker	Cat. 9070-03	200 mL
Acido acético	Baker	Cat. 9507-05	70 mL

Aforar a 1L con agua bidestilada.

AMORTIGUADOR DE REHIDRATACIÓN (8M UREA, 2% CHAPS, AZUL DE BROMOFENOL).

Urea	Organic Research	Cat. 4110U	0.48 g
CHAPS	Sigma	Cat. C-5070	0.02 g
Azul de bromofenol	Bio-Rad	Cat. 161-0404	Trazas

Aforar a 1 mL con agua milli Q, el DTT e IPG amortiguador se añaden antes de ocuparse, 2.8 mg/ mL de DTT, y 2% de IPG amortiguador de acuerdo al rango de la tira. Preparar justo antes de usarse.

AMORTIGUADOR DE REHIDRATACIÓN (7M UREA, 2M TIUREA, 4% CHAPS, AZUL DE BROMOFENOL).

Urea	Organic Research	Cat. 4110U	0.42 g
Tiurea	Sigma	Cat. T-7875	0.152 g
CHAPS	Sigma	Cat. C-5070	0.04 g
Azul de bromofenol	Bio-Rad	Cat. 161-0404	Trazas

Aforar a 1 mL con agua milli Q, el DTT e IPG amortiguador se añaden antes de ocuparse, 2.8 mg/ mL de DTT, y 2% de IPG amortiguador de acuerdo al rango de la tira. Preparar justo antes de usarse.

AMORTIGUADOR DE EQUILIBRACIÓN. (50 mM TRIS-Cl pH 8.8, 6 M UREA, 30% GLICEROL, 2% SDS, AZUL DE BROMOFENOL).

Tris-Cl pH 8.8			0.67 mL
Urea	Organic Research	Cat. 4110U	7.2 g
Glicerol	Baker	Cat. 2136-02	6.9 mL
SDS	Bio-Rad	Cat.	0.4 g
Azul de bromofenol	Bio-Rad	Cat. 161-0404	Trazas

Disolver y aforar a 20 mL con agua milli Q.

Esta es la solución stock, que se divide en dos partes iguales, a una de ellas se le agrega el DTT (Sigma D5545) a una concentración de 10mg por 10 mL de solución y la iodoacetamida (I-1149) a una concentración de 250 mg por 10 mL

SOLUCIÓN DE AGAROSA.

Agarosa	Gibco Ultra Pure	Cat. 15510-027	0.5 g
Azul de bromofenol	Bio-Rad	Cat. 161-0404	Trazas

Búfer corrida electroforesis

Dispersar la agarosa en el búfer, para disolver calentar en horno de microondas, sin permitir que ebulle. Se puede almacenar en alícuotas de 1 mL a temperatura ambiente.

AMORTIGUADOR DE MUESTRA PARA DOBLE DIMENSIÓN, GELES CILÍNDRICOS.

Urea	Organic Research	Cat. 4110U	2.85 g
NP-40 10%	Particle Data Lab.	Cat.312-832-5658	1.0 mL
Anfolinas pH 5-7	Bio-Rad	Cat. 163-1152	0.08 mL
Anfolinas pH 3.5-10	Bio-Rad	Cat. 163-1112	0.02 mL
2-mercaptoetanol	Bio-Rad	Cat. 161-0710	0.25 mL

Aforar a 5 mL con agua milli Q, mantener en alícuotas de 0.5 mL y congelar.

SOLUCIÓN REMOVEDORA DE ANFOLINAS.

Etanol			450 mL
Acido acético	Baker	Cat. 9507-05	100 mL

Aforar a 1L con agua milli Q.

AMORTIGUADOR DE CÁTODO (Hidróxido de sodio 20 mM)

Para 600 mL disolver 0.48g de hidróxido de sodio (NaOH, Sigma, Cat. S-5881).

Usar inmediatamente.

AMORTIGUADOR DE ANODO (Acido fosfórico 10 mM)

Para 2.5 L disolver 1.675 mL de ácido fosfórico concentrado (H₃PO₄, Baker, Cat. 0260)

AMORTIGUADOR DE TRANSFERENCIA

Tris base	Sigma	Cat. T-1503	3.03 g
Glicina	Bio-Rad	Cat. 161-0718	14.4 g
Metanol	Baker	Cat. 9070-03	200 mL

Se mezclan los reactivos y se aforar a 1L con agua milli Q. Preparar al menos 3 horas antes de emplearlo y mantenerlo antes de su uso en cuarto frío o en refrigeración.

ANEXO 4. VOLÚMENES DE SOLUCIONES PARA LA PREPARACIÓN DE GELES DE ACRILAMIDA.

	Gel Concentrador		Gel Separador			
	4% (a)	4% (b)	10% ©	10% (d)	12 % (e)	12% (f)
Acrilamida 30%	0.21 mL	2.52 mL	3.32 mL	20 mL	2.0 mL	40 mL
Tris-Cl pH 8.8			2.5 mL	15 mL	1.25 mL	25 mL
Tris-Cl pH 6.8	0.417 mL	5.04 mL				
Agua	1.017 mL	12.28 mL	4.16 mL	25 mL	2.5 mL	35 mL
APS 15%	8.5 µL	102.8 µL	32 µL	192 µL	16 µL	320 µL
TEMED	1.6 µL	19.4 µL	6.6 µL	34.6 µL	3.3 µL	66 µL

(a) Geles de 5 x 8 cm. Grosor 0.75 mM

(b) Geles de 18 x 16 cm. Grosor 3.0 mM

(c) Geles de 5 x 8 cm. Grosor 1.5 mM

(d) Geles de 18 x 18 cm. Grosor 1.5 mM

(e) Geles de 5 x 8 cm. Grosor 0.75 mM

(f) Geles de 18 x 16 cm. Grosor 3.0 mM

ANEXO 5. PREPARACIÓN DE GELES DE ACRILAMIDA EN TUBOS DE VIDRIO.

Los tubos de vidrio de 13 cm de largo y 5 mM de diámetro se sellaron por un extremo con parafilm y se colocan verticalmente en una gradilla, con mucho cuidado se agrega la solución sin formar burbujas con ayuda de una manguera conectada a una jeringa; hasta 1 cm de la orilla del tubo, en la parte superior se agrega agua y se deja polimerizar.

Una vez polimerizado se les quita el papel parafilm y el agua, se colocan en la cámara, a la que se agregó el amortiguador de ánodo, en la parte superior de la cámara se colocan los tapones en los orificios no ocupados y se agrega el amortiguador de cátodo, cuidando que no se derrame. Se realizó una precorrida a 200, 300 y 400 V cada uno por 10 minutos. Una vez finalizada la precorrida se retira con cuidado el amortiguador de cátodo, y con una micropipeta se agrega la muestra que se preparo previamente mezclando el extracto con el amortiguador de muestra 2D en una proporción 1:1 en la parte superior del tubo sin formar burbujas, siempre dejando un tubo sin muestra como blanco. Se coloca nuevamente el amortiguador de cátodo y se corre por 14 horas 30 minutos a 400 V y 1 hora a 500 V. Los tubos se sacan y el gel se extrae con ayuda de una jeringa empujando aire, recibiendo el gel en un tubo con amortiguador Tris-Cl pH 6.8 para equilibrarlo y realizar la segunda dimensión.

El gel sin muestra se corta en fracciones de 1 cm, cada una de las cuales se coloca por una hora en un tubo con 2 mL de agua milliQ, y posteriormente se mide el pH de cada tubo.

La solución de acrilamida se prepara mezclando todas las soluciones excepto el APS y el TEMED, se desgasifica por 10 minutos con agitación constante y después se agregan los iniciadores y vaciar la mezcla a los tubos.

Urea	13.2 g
Acrilamida al 30%	3.6 mL
NP-40 10 %	4.8 mL
Agua	4.8 mL
Anfolinas pH 3-10	720 μ L
Anfolinas 5-7	480 μ L
APS 15%	60 μ L
TEMED	30 μ L

Solución suficiente para 8 tubos.

ANEXO 6. TINCIÓN CON NITRATO DE PLATA.

Se fija el gel en una solución 50% metanol, 10 % ácido acético durante toda la noche, posteriormente se cambia por una con 5% de metanol y 1 % de ácido acético durante 15 minutos; se realizan 3 lavados con agua milliQ de 5 minutos cada uno, después se sensibiliza con una solución de tiosulfato de sodio (Baker, Cat. 3496) 0.2 g/L durante 90 segundos para después realizar 3 lavados de 30 segundos, posteriormente se incuba en una solución de nitrato de plata al 0.2% (Merck, Cat. 15855) por 40 minutos para geles grandes y 30 minutos para minigeles incubando en oscuridad. Se realizan 3 lavados de un minuto para revelar con una solución 6% carbonato de sodio (Merck, Cat. 106392), 0.0185% de formaldehído (solución al 37%, Baker, Cat. 2106) y 0.4 mg de tiosulfato de sodio por máximo 10 minutos para desarrollar el color y parando la reacción con la adición de ácido acético al 6% agitando suavemente para eliminar las burbujas que se forman. Por último se lava varias veces con agua milliQ.

ANEXO 7. TABLA DE LAS PROTEÍNAS DE LA CEPA NIÑO A.

SSP	Mr	pl	Ninoaurea	Ninoatiurea	SSP	Mr	pl	Ninoaurea	Ninoatiurea
1	16.41	-1	134.6	2642.1	1201	29.96	4.91	134.6	9575.7
2	16.79	-1	134.6	5818.2	1202	30.4	4.99	134.6	10223.5
3	17.06	-1	134.6	12643.2	1203	32.48	5	134.6	1677.1
4	17.04	-1	134.6	3116.7	1204	29.38	5.08	134.6	6518.1
5	16.75	-1	134.6	3602.8	1301	34.28	-1	1316.3	40725.1
6	18.59	-1	134.6	4120.7	1302	33.26	4.92	134.6	827
101	25.05	-1	134.6	20602.8	1303	33.25	4.98	14860.9	8765.1
102	22.73	-1	134.6	36698.4	1304	34.84	5.05	134.6	3760.9
103	25.32	-1	4141.8	5119.8	1305	33.99	5.13	7027.9	9033.4
104	21.78	-1	134.6	11786.4	1401	39.1	4.98	2565.8	32207.3
105	21.61	-1	134.6	7037.4	1402	38.54	5.06	134.6	1415.5
106	21.7	-1	134.6	8722.2	1403	37.13	5.13	134.6	1787.1
107	24.44	-1	134.6	5531.1	1501	44.47	4.95	134.6	19775.6
108	19.57	-1	134.6	6452.8	1502	45.85	5.03	134.6	5723.4
109	24.21	-1	3590.4	85995.3	1503	40.5	5.06	134.6	960.7
110	27.68	-1	134.6	2167.7	1504	41.97	5.14	134.6	22501.2
111	20.4	-1	134.6	4774.2	1601	46.88	-1	134.6	2596.7
112	22.08	-1	134.6	43700.9	1602	52.2	-1	134.6	6798.8
201	32.4	-1	38845.7	29987.4	1603	48.88	4.9	134.6	6014.2
202	31.08	-1	23673	4277	1604	51.58	4.98	134.6	937.2
203	29.43	-1	134.6	27980.8	1605	49.21	5.06	134.6	7826.5
204	29.91	-1	134.6	6935.3	1606	53	5.08	134.6	713.3
301	32.81	-1	134.6	37644.9	1607	46.91	5.14	10125.3	11884.8
302	33.97	-1	5394	9446.3	1701	61.15	-1	134.6	626.2
303	34.49	-1	29603.2	6440.4	1702	56.54	4.93	134.6	17831.6
304	34.85	-1	19540.2	34808.3	1703	58.28	4.93	134.6	23733.2
305	32.91	-1	134.6	24917.4	1704	55.16	5.02	134.6	675.3
401	38.59	-1	134.6	71284.9	1705	59.46	5.05	6110.1	3061.5
701	55.45	-1	33256.5	3276.3	1706	56.25	5.09	134.6	57802.6
702	56.95	-1	134.6	22949.3	1801	71.86	-1	134.6	43478.9
703	58.33	-1	134.6	4012.4	1802	66.13	4.91	134.6	3024.8
704	54.39	-1	134.6	3632.2	1803	64.17	4.92	134.6	14089.8
705	58.93	-1	37270.3	46911.7	1804	61.98	5.01	5351.3	13074.7
801	67.52	-1	134.6	13287.8	1805	63.09	5.1	134.6	2480.6
802	66.22	-1	134.6	2531.6	1806	70.08	5.11	134.6	18407.1
901	101.93	-1	14818.9	5031	1901	85.15	5.1	134.6	3621.6
902	100.59	-1	134.6	5147.5	2001	17.06	5.2	134.6	20549.7
903	116	-1	134.6	8494.3	2002	16.55	5.35	134.6	1988.6
904	117.71	-1	12432.7	1879.4	2003	18.31	5.4	134.6	13034
905	103.12	-1	134.6	50796.6	2004	16.86	5.41	134.6	3222.2
906	116.97	-1	134.6	15174.4	2101	19.8	5.15	134.6	11866.2
907	147.06	-1	134.6	2415.7	2102	27.83	5.16	134.6	2550.5
908	116.69	-1	134.6	3214	2103	25.74	5.25	134.6	3734.8
909	118.16	-1	134.6	8362.2	2104	20.94	5.29	134.6	13553.9

1001	17.18	4.97	134.6	7416.8	2105	24.68	5.36	134.6	2899.4
1002	16.74	5.01	134.6	2784.8	2106	18.83	5.37	134.6	22231.5
1003	17.83	5.01	134.6	71763.9	2201	32.65	5.15	134.6	1370.4
1101	26.1	4.9	134.6	27007.9	2202	32.6	5.19	134.6	4859.7
1102	20.64	4.95	134.6	2170.9	2203	31.46	5.23	134.6	1041.5
1103	28.02	4.97	134.6	68220.7	2204	31.61	5.33	134.6	2832.4
1104	27	4.97	134.6	25819.7	2205	32.03	5.39	134.6	16990.7
1105	20.38	5.05	134.6	7747.7	2301	35.09	5.18	134.6	5232
2302	33.92	5.19	134.6	12532.4	3302	33.58	5.51	15523	21625.3
2303	32.67	5.24	134.6	20815	3303	34.88	5.58	134.6	2837.4
2304	33.9	5.32	134.6	21488.1	3304	33.47	5.6	134.6	2901.1
2305	34.71	5.34	134.6	5115.5	3401	36.3	5.43	134.6	7719.3
2306	33.51	5.37	3207.6	6341.6	3402	38.7	5.44	134.6	3144
2401	36.96	5.22	134.6	10102.3	3403	35.2	5.53	134.6	2165.5
2402	35.36	5.27	134.6	31725.1	3404	37.09	5.53	134.6	15590.1
2403	38.97	5.31	134.6	50614.7	3405	35.83	5.58	134.6	11650.6
2404	38.96	5.39	134.6	1645.6	3501	42.22	5.43	134.6	2571
2405	37.16	5.4	134.6	27768.8	3502	43.82	5.45	134.6	17669.6
2501	45.69	5.15	134.6	4915.6	3503	40.85	5.48	17980.1	17435
2502	42.34	5.2	134.6	15378.3	3504	45.28	5.52	134.6	1627.6
2503	39.27	5.2	20889.3	9798.8	3505	41.55	5.53	134.6	60283.7
2504	43.63	5.24	134.6	1153.9	3601	47.23	5.43	134.6	13571.4
2505	41.56	5.26	134.6	7855.1	3602	50.82	5.45	134.6	11475.2
2506	43.54	5.28	134.6	3759	3603	51.82	5.49	134.6	19214.6
2507	43.37	5.32	134.6	2546.7	3604	48.35	5.53	134.6	2087.3
2508	44.28	5.35	134.6	6052	3605	47.41	5.53	134.6	2650.6
2509	42.4	5.37	134.6	2841.1	3606	50.32	5.59	134.6	31423.7
2510	43.92	5.41	134.6	3788.3	3607	47.41	5.6	134.6	2312.9
2601	48.36	5.18	134.6	2452.6	3701	55.8	5.44	4114.1	14353.3
2602	46.11	5.24	134.6	15055.8	3702	58.61	5.49	134.6	14171.7
2603	50.13	5.27	134.6	64949.5	3703	53.86	5.58	134.6	11881.4
2604	46.57	5.33	41658.8	33666	3704	58.09	5.59	134.6	35535.9
2605	52.74	5.39	134.6	4609	3801	64.4	5.46	134.6	9828.6
2701	54.1	5.2	134.6	680.1	3802	70.08	5.56	134.6	4147.6
2702	56.43	5.25	134.6	46655.8	3803	63.66	5.59	134.6	2871.7
2703	56.49	5.33	134.6	21320.7	3804	65.63	5.6	134.6	2516.9
2704	55.97	5.4	134.6	15993.6	3901	85.24	5.42	134.6	1714.6
2801	63.27	5.18	134.6	7102.8	3902	86.2	5.46	134.6	8227.2
2802	61.47	5.23	134.6	7268.5	3903	78.13	5.47	134.6	15520
2803	62.04	5.29	134.6	5442.4	3904	76.27	5.5	134.6	2676.3
2804	63.99	5.33	134.6	2406.3	3905	84.52	5.5	31403.4	25497.4
2805	62.88	5.41	134.6	6447.8	3906	76.63	5.57	134.6	24646
2901	75.08	5.18	134.6	40732.9	3907	84.53	5.59	134.6	18380.3
2902	86.2	5.19	134.6	4431.1	4001	17.27	5.61	134.6	16147.9
2903	93.62	5.22	134.6	16016.1	4002	16.97	5.61	134.6	4250.6
2904	74.97	5.27	134.6	813.4	4003	16.77	5.69	134.6	2563.8
2905	76.96	5.36	134.6	66512.6	4004	17.04	5.74	134.6	472.1

2906	87.02	5.39	134.6	2474	4101	26.42	5.65	134.6	5384.8
3001	17.77	5.46	134.6	11761.4	4102	22.29	5.67	134.6	7174.4
3002	17.1	5.52	134.6	3348	4103	18.7	5.73	134.6	4741.2
3003	16.86	5.57	134.6	6365.8	4104	28.75	5.74	134.6	9432.8
3101	28.34	5.43	43068.1	9147.3	4201	30.64	5.61	134.6	3873
3102	24.15	5.46	134.6	4150.8	4202	29.44	5.73	134.6	2249.9
3103	21.17	5.47	134.6	3504.7	4203	31.38	5.75	134.6	64301.9
3104	23.24	5.51	134.6	6528.9	4204	29.8	5.77	25222.7	10655.3
3105	22.3	5.54	7527.9	11395.9	4301	32.93	5.69	5286.9	34791.6
3106	28.46	5.6	134.6	3797.9	4302	33.11	5.76	134.6	1873.6
3201	30.48	5.48	2694.2	26517.3	4303	34.27	5.77	1957.7	27161.6
3202	29.9	5.5	134.6	13788.8	4401	37	5.61	7882.7	21567.8
3203	32.59	5.54	134.6	14088.7	4402	36.14	5.66	134.6	2940.1
3204	31.96	5.57	11603.9	15189.3	4403	35.18	5.68	134.6	26213.1
3301	34.27	5.44	18482.6	23697.2	4404	37.89	5.69	134.6	1757
4405	36.47	5.72	134.6	4655.8	5405	36.44	5.95	134.6	8731.7
4406	37.01	5.77	134.6	3317	5501	39.85	5.84	134.6	4546.7
4407	36.25	5.81	134.6	19619.6	5502	42.36	5.87	3213.5	5820.8
4501	42.88	5.6	134.6	3247.3	5503	40.97	5.9	134.6	21787.8
4502	40.15	5.61	134.6	10059.9	5504	43.12	5.99	134.6	11460.2
4503	41.09	5.66	11701.8	3289.7	5601	49.61	5.86	134.6	2051.9
4504	41.91	5.73	134.6	32258.1	5602	46.85	5.88	134.6	38757.1
4505	44.4	5.77	134.6	4477.7	5603	52.13	5.92	134.6	10446.2
4506	39.91	5.77	134.6	14277.7	5604	52.73	5.96	134.6	4553.1
4507	43.33	5.8	134.6	1818.8	5605	48.6	5.99	134.6	29597.8
4508	45.38	5.82	134.6	12054.5	5606	49.94	6	134.6	7700.1
4601	51.65	5.81	134.6	14573.3	5701	59.34	5.88	134.6	9111.9
4602	52.83	5.68	134.6	11531.9	5702	54.85	5.91	54732.4	11479.3
4603	49.18	5.69	3257.4	44263.1	5703	59.1	5.93	134.6	845.5
4604	46.03	5.74	134.6	20275.5	5704	54.79	5.96	134.6	36354.2
4605	52.33	5.76	134.6	3780.3	5801	61.63	5.83	134.6	2226
4606	49.1	5.79	134.6	12247.8	5802	69.88	5.87	2548.9	3769.8
4607	53.66	5.8	134.6	2525.5	5803	72.29	5.88	134.6	1365
4608	50.29	5.82	21840.8	19413.8	5804	61.64	5.88	134.6	14912.7
4701	57.65	5.71	6369.8	6432.5	5805	70.29	5.93	134.6	6869.1
4702	55.98	5.75	134.6	8493.8	5806	63.18	5.94	134.6	12520.6
4703	56.4	5.79	134.6	6019.6	5807	67.73	5.94	134.6	1651.9
4704	61.11	5.79	134.6	2363	5808	61.82	5.98	134.6	3303.5
4705	58.6	5.81	7204.3	11127.9	5901	76.75	5.88	4199.8	7743.3
4801	67.35	5.68	134.6	1156.1	5902	89.47	5.91	134.6	3721.9
4802	63.06	5.69	9740.6	20902.1	5903	78.33	5.98	134.6	28737.5
4803	66.24	5.72	134.6	7782.8	5904	73.73	5.98	134.6	10962.1
4804	64.42	5.79	134.6	7900.4	6001	17.1	6.03	134.6	3207.6
4901	80.53	5.61	134.6	1165.2	6002	17.69	6.1	134.6	2352
4902	80.77	5.68	134.6	3214.1	6003	18.54	6.19	134.6	3638.9
4903	75.24	5.7	134.6	17936.7	6004	17.41	6.21	134.6	7001.7
4904	81.7	5.78	2356.1	3260.9	6005	18.23	6.25	134.6	12081.9

5001	17.13	5.83	134.6	20232	6101	22.93	6.22	134.6	3664.3
5002	16.78	5.83	134.6	1384.2	6102	21.54	6.25	7090.8	5216.3
5003	17.18	5.89	134.6	991.6	6103	19.85	6.27	134.6	25745.6
5004	17.07	5.9	134.6	1498.9	6201	29.55	6.01	134.6	20644.8
5005	16.98	5.97	134.6	2338.2	6202	31.34	6.13	134.6	3049.2
5006	17.64	6	134.6	1197.2	6203	32.48	6.15	134.6	1844.3
5101	26.21	5.86	134.6	2326.3	6204	29.95	6.19	19741.9	49573
5102	27.82	5.88	134.6	14074.5	6205	30.5	6.25	134.6	2117.3
5103	28.92	5.92	2359.6	5323.9	6206	31.44	6.27	134.6	6649.8
5201	32.11	5.85	3595.1	8967	6301	32.98	6.08	134.6	7709.7
5202	30.74	5.85	134.6	6528.1	6302	33.42	6.22	134.6	16489.5
5203	31.76	5.94	134.6	1376.7	6303	35.03	6.29	134.6	5265.2
5204	32.66	5.97	134.6	2094.2	6304	33.24	6.3	5341.5	5818.6
5205	31.39	6.01	134.6	12015.7	6401	37.34	6.02	134.6	5539.7
5301	35.12	5.85	134.6	8401.4	6402	35.25	6.02	134.6	21519.8
5302	34.4	5.85	18147.4	3012.8	6403	35.38	6.07	9601.3	39214
5303	33.75	5.9	134.6	22129.6	6404	36.93	6.08	134.6	6109
5304	34.03	5.94	134.6	23973.1	6405	36.82	6.14	134.6	3224
5401	35.2	5.88	134.6	7352	6406	35.31	6.19	134.6	24257.7
5402	38.15	5.88	134.6	2689.4	6407	36.02	6.22	2967.9	45643
5403	35.8	5.93	134.6	6329.4	6408	38.08	6.23	134.6	12687.6
5404	38.13	5.94	134.6	2711	6501	41.22	6.02	134.6	6846.4
6502	43.07	6.02	134.6	864.2	7505	41.45	6.62	134.6	3246.9
6503	42.99	6.05	134.6	3100.9	7601	50.16	6.31	134.6	16199.9
6504	44.61	6.1	134.6	3033.5	7602	48.43	6.32	134.6	19374.2
6505	44.9	6.19	134.6	4051.5	7603	49.42	6.39	134.6	2290.8
6506	39.56	6.2	134.6	3862.5	7604	53.54	6.56	12813.1	33641.4
6507	40.03	6.24	134.6	1220.8	7605	52.08	6.62	134.6	5258
6508	44.09	6.25	134.6	7351	7606	52.29	6.65	134.6	6661.5
6601	50.63	6.06	134.6	16679	7701	54.6	6.35	134.6	27224
6602	47.22	6.07	134.6	3527.8	7702	54.09	6.42	134.6	8255.7
6603	52.62	6.2	14360.5	23568.9	7703	57.74	6.64	134.6	810.8
6604	48.3	6.21	134.6	50782.2	7704	58.45	6.65	134.6	3738.4
6605	50.3	6.29	134.6	4225.9	7801	68.59	6.3	134.6	12414
6701	59.65	6.01	134.6	4465.5	7802	70.28	6.47	1309.6	9853.3
6702	60.87	6.06	134.6	9231.8	7803	62.57	6.51	134.6	14462.7
6703	55.43	6.07	134.6	56802.5	7804	64.37	6.56	134.6	1716.8
6704	58.27	6.2	134.6	1309.1	7805	70.68	6.63	134.6	4254.8
6801	63.34	6.09	134.6	51104.3	7806	65.3	6.64	134.6	2362.4
6802	68.16	6.19	134.6	5326.5	7901	73.96	6.56	134.6	2335
6803	65.81	6.23	134.6	5251.4	7902	73.78	6.66	134.6	1645.6
6804	61.49	6.28	1839	46761.9	7903	108.46	6.36	6124.9	157.7
6805	69.08	6.28	134.6	15562.8	8001	17.39	6.67	134.6	1803.3
6901	114.54	6.07	134.6	2484.2	8002	17.47	7.43	134.6	980.4
6902	103.44	6.14	9040.1	157.7	8003	17.46	-1	134.6	7927
6903	111.58	6.24	12305.4	157.7	8004	17.37	-1	134.6	1751.3
7001	17.55	6.34	134.6	24395.6	8101	29.2	6.68	134.6	2084.4

7002	17.53	6.43	134.6	7245.4	8102	21.9	7.39	134.6	4199.4
7003	17.35	6.6	134.6	7247.9	8103	22	7.7	5461.1	15516.6
7101	23.7	6.41	134.6	5006	8201	31.03	6.68	31813.5	65834.3
7102	28.74	6.44	134.6	3955.9	8202	32.48	6.77	134.6	1261
7103	28	6.48	134.6	3602.1	8203	30.95	6.85	134.6	6020.5
7201	30.95	6.32	134.6	3525.8	8204	32.41	7.02	134.6	8240.6
7202	31.4	6.38	134.6	2907	8205	31.98	7.12	134.6	5491.1
7203	32.3	6.4	134.6	2477.8	8301	34.13	6.7	4415.2	8335.4
7204	31.45	6.48	15539.2	18902.2	8302	34.92	6.86	134.6	3092.3
7205	32.16	6.59	134.6	2612.7	8303	32.73	6.9	6096.4	8854.8
7301	34.81	6.36	134.6	1237.2	8304	33.47	6.91	134.6	3780.3
7302	34.02	6.37	5436.8	8024.1	8305	34.35	7.61	17816.3	4177.4
7303	33.91	6.42	134.6	2593.3	8306	33.9	-1	134.6	2153.8
7304	33.87	6.56	134.6	12170.6	8307	33.67	-1	134.6	2972.3
7305	33.27	6.59	134.6	2155.1	8401	37	6.7	14459.7	37273.6
7306	34.69	6.65	134.6	2039.1	8402	38.95	6.78	4012	4018
7401	37.67	6.33	134.6	1615.5	8403	35.49	6.93	134.6	3858.8
7402	36.25	6.34	134.6	14939	8404	36.23	6.97	134.6	4899.4
7403	37.2	6.4	4783.6	20898.2	8405	38.95	7.1	134.6	7919.5
7404	35.46	6.42	134.6	8749.3	8406	37.27	7.13	134.6	3192.1
7405	38.59	6.44	134.6	1620.9	8501	40.16	6.68	134.6	6501.5
7406	36.62	6.5	134.6	2288.7	8502	39.43	6.71	134.6	3870.5
7407	37.72	6.52	134.6	2223.2	8503	40.97	6.97	134.6	3315.3
7408	36.62	6.59	134.6	3039	8504	42.36	7.38	4513.4	3510.8
7409	37.54	6.62	134.6	4095.4	8505	42.63	-1	134.6	45305.7
7501	39.29	6.33	134.6	2057.7	8601	49.28	6.66	134.6	7153.5
7502	45	6.39	134.6	3898	8602	52.1	6.95	134.6	5795
7503	41.09	6.39	134.6	17123.7	8603	52.9	-1	134.6	2312.2
7504	41.2	6.5	134.6	23322.9	8604	53.08	-1	134.6	8568.3
8701	58.33	6.67	134.6	1284.8					
8702	54.74	6.68	134.6	2094.9					
8703	60.5	6.69	134.6	5118.7					
8704	57.58	6.74	134.6	10214.3					
8705	54.36	6.95	134.6	11771.6					
8706	57.79	7.07	1642.2	14171.9					
8707	61.29	7.14	134.6	2448.4					
8708	53.86	7.18	134.6	16916.2					
8709	60.95	7.26	134.6	4456.9					
8710	60.81	7.37	134.6	6412.8					
8711	60.39	7.59	134.6	3128.9					
8801	64.71	6.7	2056.8	9713.1					
8802	62	6.76	134.6	1123.4					
8803	64.9	6.95	6936.8	2648.1					
8804	66.5	6.97	134.6	4193					
8805	67	7.13	134.6	2081.9					
8806	64.55	7.26	134.6	3246.3					
8807	67.75	7.3	134.6	1746.4					

8808	68.11	7.6	134.6	10149
9001	17.24	-1	134.6	2808
9002	17.12	-1	134.6	10733.9
9003	17.83	-1	134.6	976.7
9004	16.49	-1	134.6	2550.1
9005	17.42	-1	134.6	24115.7
9006	16.92	-1	134.6	7639.2
9101	23.14	-1	134.6	44761.2
9102	28.68	-1	134.6	38879.5
9201	29.29	-1	134.6	8526.9
9301	35.11	-1	134.6	3548.5
9302	34.71	-1	134.6	14925.2
9401	35.21	-1	134.6	3057.5
9601	52.91	-1	134.6	19988.5
9602	51.92	-1	134.6	41209
9801	68.29	-1	134.6	58489
9802	66.11	-1	134.6	2135
9901	83.79	-1	134.6	118162.4
9902	130.95	-1	134.6	8433.9
9903	109.92	-1	134.6	11097.5
9904	162.91	-1	134.6	3009.4
9905	83.26	-1	134.6	103875.7

ANEXO 8. PROTEÍNAS DE LA CEPA NINOA CON AMORTIGUADOR DE LISIS DE UREA 8 M.

SSP	Mr	pl	ninoa 1601 03	ninoa 40403	Ninoa15 1102	SSP	Mr	pl	ninoa 1601 03	ninoa 40403	ninoa151 102
1	15.92	-1	0.2	0	0	1503	33.48	4.23	0.2	0	0
2	15.97	-1	0.1	0	0	1601	36.92	3.6	0.2	0	0
3	16.02	-1	0.2	0	0	1602	35.78	4	0.1	0	0
4	16.81	3.22	1.5	0	0	1603	38.04	4.06	0.2	0	0
101	19.36	-1	1.2	0	0	1604	37.3	4.14	0.1	0	0
102	23.32	-1	0.2	0	0	1605	36.26	4.32	0.5	0	0
103	25.09	-1	0.1	0	0	1701	45.79	3.72	0.3	0	0
104	25.57	3.33	0.2	0	0	1702	42.14	3.78	0.1	0	0
105	25.63	3.55	0	0	0	1703	47.27	3.82	0.1	0	0
106	23.29	3.59	0.3	0	0	1704	42.32	3.84	0.2	0	0
201	29.26	-1	0.1	0	0	1705	43.16	3.94	0.3	0	0
202	28.1	-1	0.1	0	0	1706	45.38	4.08	0.5	0	0
203	28.17	3.33	0.3	0	0	1707	42.6	4.09	0.1	0	0
204	29.76	3.49	0.2	0	0	1708	43.53	4.1	0	0	0
205	28.63	3.55	0.1	0	0	1801	54.26	3.67	0.1	0	0
401	31.05	3.15	0.3	0	0	1802	53.05	3.71	0.1	0	0
402	31.16	3.33	0	0	0	1803	50.62	3.96	0.6	0	0
501	32.2	3.45	0.1	0	0	1804	54.47	3.96	0.3	0	0
502	33.59	3.45	0.1	0	0	1805	47.94	4.17	1.1	0	0
601	39.97	-1	0.2	0	0	1806	55.33	4.26	0.1	0	0
602	37.6	-1	0.2	0	0	1807	50.88	4.27	0.8	0	0
603	36.8	3.45	0	0	0	1901	68.83	3.68	0.2	0	0
701	41.99	-1	0.1	0	0	1902	56.11	4.12	0.9	0	0
702	44.23	-1	0.3	0	0	2001	16.88	4.75	0.2	0	0
703	46.99	-1	0.1	0	0	2101	22.48	4.44	0.3	0	0
704	42.39	-1	0	0	0	2102	27	4.49	0.3	0	0
705	44.4	3.1	0.1	0	0	2103	18.42	4.7	0.1	0	0
706	43.43	3.55	0.1	0	0	2104	19.65	4.75	0.2	0	0
801	53.06	3.29	0.1	0	0	2105	18.24	4.9	0.1	0	0
901	95.07	-1	0.2	0	0	2106	22.22	4.9	0.3	0	0
902	79.38	3.3	0.1	0	0	2201	29.8	4.54	0.3	0	0
903	90.44	3.35	0.2	0	0	2202	29.45	4.67	0.1	0	0
904	91.53	3.52	0.1	0	0	2203	29.13	4.83	0.3	0	0
905	65.26	3.52	0.1	0	0	2204	29.44	4.88	0.1	0	0
906	68.77	3.53	0.2	0	0	2205	30.01	4.94	0.1	0	0
907	104.53	3.55	0.1	0	0	2301	30.1	4.45	0.5	0	0
1101	25.55	3.68	0.1	0	0	2302	30.09	4.7	0.1	0	0
1102	22.54	3.71	0.3	0	0	2401	31.44	4.47	0.2	0	0
1103	20.85	3.8	0	0	0	2402	31.36	4.83	0.2	0	0
1104	18.31	4.09	2.7	0	0	2403	31.06	4.96	0.3	0	0
1105	20.21	4.1	0.1	0	0	2501	33.75	4.46	0.2	0	0

1106	19.75	4.33	0.2	0	0				
1201	29.74	3.71	0.1	0	0				
1301	30.86	3.69	0.1	0	0				
1302	30.18	4.14	0.1	0	0				
1303	30.62	4.29	0.1	0	0				
1401	31.05	3.91	0.1	0	0				
1402	31.92	3.92	0.2	0	0				
1403	31.11	4.17	0.1	0	0				
1501	33.89	3.91	0.4	0	0				
1502	32.02	4.17	0.4	0	0				
2605	36.55	5	0.2	0	0				
2606	37.29	5.04	0.1	0	0				
2701	44.68	4.62	0.1	0	0				
2702	43.03	4.64	0.2	0	0				
2703	42.88	5.04	0.1	0	0				
2801	50.1	4.83	0.1	0	0				
2802	47.85	4.9	0.1	0	0				
2803	53.31	5.01	0.1	0	0				
2804	48.86	5.11	0.1	0	0				
2901	55.43	4.52	0.1	0	0				
3101	18.12	5.15	0.2	0	0				
3102	17.83	5.51	0.1	0	0				
3103	24.87	5.53	0	0	0				
3104	22.31	5.58	0.1	0	0				
3105	19	5.62	0.6	0	0				
3201	29.68	5.2	0.3	0	0				
3202	27.88	5.3	0.1	0	0				
3203	29.73	5.58	0.3	0	0				
3204	29.27	5.61	0.2	0	0				
3205	27.75	5.61	0.8	0.9	0.4				
3206	29.7	5.62	0	0	0				
3301	30.7	5.18	0.6	0	0				
3302	30.13	5.21	0.2	0	0				
3303	30.43	5.58	0.4	0	0				
3304	30.46	5.63	0.7	0	0				
3401	31.35	5.19	0.2	0	0				
3402	31.7	5.38	0.5	0	0				
3403	31.32	5.53	0.4	0	0				
3404	31.11	5.6	0.3	0	0				
3405	31.69	5.6	0.1	0	0				
3501	33.14	5.2	0.5	0	0				
3502	32.22	5.23	0.4	0	0				
3503	32.3	5.58	0.3	1.1	0.2				
3504	33.99	5.59	0.5	0	0				
3505	32.16	5.61	0.4	0	0				
3601	40.18	5.15	0.2	0	0				
3602	35.53	5.31	0.9	0	0				
2502	32.01	4.48	0.7	0	0				
2503	31.99	4.83	0.1	0	0				
2504	32.94	4.86	0.4	0	0				
2505	34.03	4.9	0.1	0	0				
2506	34.86	4.96	0.1	0	0				
2507	32.04	5.06	0.2	0	0				
2601	37.83	4.59	0.1	0	0				
2602	40.2	4.6	0.1	0	0				
2603	38.11	4.77	0	0	0				
2604	36.77	4.82	0.4	0	0				
4101	17.65	5.64	0.1	0	0				
4102	24.8	5.66	0.3	0.3	0.4				
4103	17.9	5.68	0.3	0	0				
4104	22.2	5.7	0.2	0	0				
4105	18.17	5.71	0.5	0	0				
4201	29.6	5.64	0.1	0	0				
4202	30	5.66	0.1	0	0				
4203	28.34	5.68	0.6	0.4	0.6				
4204	29.77	5.68	0.3	0	0				
4301	30.91	5.65	0.1	0	0				
4302	30.9	5.67	0.4	0	0				
4303	30.41	5.7	0.3	0	0				
4304	30.68	5.7	0.1	0	0				
4305	30.69	5.72	0.2	0	0				
4401	31.63	5.63	0.5	0	0				
4402	31.23	5.66	0.2	0	0				
4403	31.98	5.66	0.2	0	0				
4404	31.7	5.7	0.2	0	0				
4405	31.45	5.72	0.4	0	0				
4501	33.18	5.64	0.4	0	0				
4502	34.27	5.67	0.1	0	0				
4503	32.26	5.68	0.1	0	0				
4504	33.2	5.68	0.1	0	0				
4505	34.05	5.69	0.2	0	0				
4506	33.38	5.72	0.4	0	0				
4507	32.11	5.72	0.2	0	0				
4508	34.37	5.72	0.2	0	0				
4601	36.25	5.65	0.3	0	0				
4602	38.87	5.65	0.3	0	0				
4603	37.87	5.67	0.1	0	0				
4604	35.29	5.7	0.1	0	0				
4605	38.98	5.71	0.6	0	0				
4606	37.47	5.72	0.2	0	0				
4701	46.4	5.64	0.1	0	0				
4702	44.62	5.64	0.1	0	0				
4703	44.69	5.68	0.9	0	0				
4704	41.88	5.71	0.1	0	0				

3603	36.8	5.37	1	0	0	4705	44.44	5.71	0.6	0	0
3604	35.19	5.58	0.1	0	0	4801	50.25	5.68	0.1	0	0
3605	39.12	5.59	1.1	0	0	4802	52.14	5.72	0	0	0
3606	37.12	5.59	0.2	0	0	4901	66.17	5.66	0.4	0	0
3607	40.52	5.61	0.4	0	0	4902	70.68	5.67	0.2	0	0
3701	44.44	5.59	0.2	0	0	5001	16.66	5.76	0.4	0	0
3801	48.5	5.3	0.7	0.4	0.3	5101	17.6	5.73	0.2	0	0
3802	51.06	5.58	0	0	0	5102	17.81	5.76	0.2	0	0
3803	48.3	5.58	0.1	0	0	5103	19.19	5.78	0.1	0	0
3804	49.26	5.6	0.1	0	0	5104	17.48	5.79	0.1	0	0
3805	51.17	5.6	0.1	0	0	5201	28.76	5.74	0.1	0	0
3806	48.53	5.62	0.1	0	0	5202	29.14	5.78	0.5	0	0
3807	50.92	5.62	0	0	0	5203	29.83	5.78	0.1	0	0
3901	66.42	5.59	0.6	0	0	5204	29.55	5.79	0.1	0	0
3902	66.45	5.62	0.4	0	0	5301	30.95	5.74	0.1	0	0
3903	72.87	5.62	0	0	0	5302	30.73	5.75	0.1	0	0
4001	16.57	5.64	0.1	0	0	5303	30.17	5.75	0.6	0	0
5304	30.52	5.76	0.1	0	0	6502	32.12	5.79	0.7	0	0
5305	30.82	5.79	0.1	0	0	6503	33.3	5.83	0.2	0	0
5401	31.32	5.77	0.1	0	0	6504	32.62	5.86	0.6	0	0
5402	31.67	5.78	0.1	0	0	6601	36.73	5.8	0.2	0	0
5403	31.41	5.79	0.1	0	0	6602	37.99	5.8	0.1	0	0
5501	32.03	5.75	0.1	0	0	6603	37.33	5.83	0	0	0
5502	34.34	5.75	0.2	0	0	6604	35.36	5.88	0.1	0	0
5503	33.3	5.76	0.2	0	0	6701	44.64	5.8	0.4	0	0
5504	33.78	5.79	0.4	0	0	6702	42.59	5.82	0.1	0	0
5601	40.49	5.73	0.1	0	0	6703	46.2	5.83	1	0	0
5602	38.57	5.73	0.3	0	0	6704	44.23	5.91	0.3	0	0
5603	36.72	5.73	0.2	0	0	6801	51.77	5.82	0.7	0	0
5701	43.48	5.73	0.4	0	0	6802	53.19	5.84	0.1	0	0
5702	41.33	5.74	0.1	0	0	6803	51.93	5.85	0.4	0	0
5703	44.76	5.75	0.1	0	0	6804	52.25	5.92	0.8	0	0
5704	44.22	5.76	0	0	0	6805	48.75	5.96	0	0	0
5705	41.6	5.77	0.3	0	0	6901	55.99	5.83	0	0	0
5706	44.34	5.79	0.1	0	0	6902	59.69	5.83	0.1	0	0
5707	41.02	5.79	0.1	0	0	6903	57.61	5.84	0.1	0	0
5708	46.33	5.79	0.6	0.4	0.2	7001	16.97	5.96	0.1	0	0
5709	42.77	5.79	0.4	0	0	7002	15.79	5.97	0.4	0	0
5801	47.59	5.73	0.1	0	0	7003	16.61	6.09	0.1	0	0
5802	49.02	5.73	0.1	0	0	7004	16.62	6.24	0.1	0	0
5803	48.17	5.76	0.1	0	0	7005	16.65	6.61	0.1	0	0
5804	51.91	5.78	1.9	0	0	7006	16.57	6.83	0.1	0	0
5805	49.15	5.79	0.1	0	0	7101	17.62	6.06	0.4	0	0
5901	58.42	5.73	0.1	0	0	7102	17.42	6.2	0.3	0	0
5902	62.78	5.73	0.2	0	0	7103	17.51	6.39	0.2	0	0
5903	67.14	5.73	0.1	0	0	7104	27.1	6.55	0.1	0	0
5904	58.31	5.77	0.4	0.4	0.2	7105	18.6	6.79	0.6	0.8	0

5905	64.62	5.79	0	0	0
6001	16.8	5.82	0.1	0	0
6002	17.17	5.94	0.1	0	0
6101	22.01	5.79	0	0	0
6102	17.96	5.85	0.2	0	0
6103	19.96	5.91	0.1	0	0
6201	29.65	5.81	0.1	0	0
6202	29.91	5.81	0.1	0	0
6203	30.04	5.82	0.1	0	0
6204	28.78	5.83	0.1	0	0
6205	29	5.87	0.1	0	0
6206	29.35	5.88	0.2	0	0
6207	29.98	5.89	0	0	0
6301	30.34	5.81	0.1	0	0
6302	30.73	5.83	0.1	0	0
6303	30.15	5.84	0.2	0	0
6304	30.9	5.88	0.5	0	0
6305	30.87	5.94	0.4	0	0
6401	31.33	5.81	0.3	0	0
6402	31.65	5.82	0.1	0	0
6403	31.43	5.84	0.2	0	0
6404	31.77	5.85	0	0	0
6405	31.24	5.9	0.2	0	0
6501	34.91	5.79	0.1	0	0
7504	32.99	6.21	0.1	0	0
7505	32.23	6.31	0.1	0	0
7506	33.8	6.7	0.1	0	0
7601	35.55	6.22	0	0	0
7602	39.83	6.4	0.1	0	0
7701	43.13	6.07	0.1	0	0
7702	43.3	6.24	0.2	0	0
7703	43.9	6.3	0.1	0.7	0.2
7801	54	6	0.2	1.1	0.9
7802	55.21	6.75	0.4	0.4	0.1
8001	16.87	7.16	0.4	0	0
8002	15.64	7.34	1	0	0
8003	16.83	7.51	0.2	0	0
8004	16.62	7.72	0.2	0	0
8101	25.78	7.15	0.1	0	0
8102	27.57	7.68	0.5	0	0
8201	29.28	7.08	0.5	0	0
8202	29	7.2	1.3	0.3	1.5
8203	29.94	7.52	0.1	0	0
8204	29.19	7.82	0.8	0	0
8301	30.91	6.96	0	0	0
8302	30.37	6.98	0.3	0	0
8303	30.76	7.08	0.3	0	0

7106	17.43	6.8	0	0	0
7201	29.67	5.97	0.4	0	0
7202	29.16	5.99	1.6	0.6	0.1
7203	29.03	6.09	0.1	0	0
7204	29.32	6.14	0.3	0	0
7205	29.31	6.38	0.1	0	0
7206	29.48	6.44	0.2	0	0
7207	29.28	6.81	0.8	0	0
7301	30.54	5.97	0.1	0	0
7302	30.62	6.09	0.2	0	0
7303	30.99	6.16	0.1	0	0
7304	30.51	6.39	0.5	0	0
7305	30.83	6.44	0.2	0	0
7306	30.44	6.64	0.2	0	0
7401	31.37	5.98	0.1	0	0
7402	31.85	5.98	0.4	0	0
7403	31.53	6.09	0.3	0	0
7404	31.79	6.09	0.5	0	0
7405	31.78	6.34	0	0	0
7406	31.18	6.43	0.2	0	0
7407	31.48	6.67	0.1	0	0
7501	33.61	5.96	0.1	0	0
7502	32.34	5.97	0.3	0	0
7503	32.63	6.04	0	0	0
9006	16.39	9.16	0.3	0	0
9007	14.96	-1	0.7	0	0
9008	14.56	-1	0.9	0	0
9101	17.47	8.03	0	0	0
9201	28.84	8.29	0.5	0	0
9301	30.97	8.29	0.1	0	0
9302	31	8.73	0.4	0	0
9303	30.52	8.74	0.2	0	0
9304	30.43	8.86	0.1	0	0
9401	31.56	7.89	0.1	0	0
9402	31.15	9.02	0	0	0
9501	32.22	7.9	0.1	0	0
9502	32.74	8.52	0.5	0	0
9503	34.5	9.3	0.1	0	0
9601	36.4	8.44	0.1	0	0
9801	54.78	8.39	0.2	0	0

8304	30.42	7.23	0	0	0
8305	30.51	7.41	0.1	0	0
8306	30.39	7.53	0.1	0	0
8307	30.52	7.86	0.1	0	0
8401	31.04	7.15	0.5	0	0
8402	31.2	7.4	0.1	0	0
8403	31.32	7.55	0.1	0	0
8404	31.6	7.63	0.1	0	0
8501	32.05	7.03	0.8	0	0
8502	32.7	7.26	0.7	0	0
8503	32.04	7.39	1	0	0
8504	32.99	7.45	0.7	0	0
8505	34.45	7.59	0.1	0	0
8506	33.06	7.81	0.4	0	0
8601	40.41	7.26	0.1	0	0
8602	35.63	7.28	0.1	0	0
8603	36.39	7.87	0.1	0	0
8701	41.68	7.01	0.1	0	0
8702	45.99	7.15	0.2	0	0
8801	48.75	6.98	0.1	0	0
8802	47.68	7.04	0	0	0
8803	51.68	7.13	0.1	0	0
8804	50.66	7.32	0.1	0	0
8805	49.49	7.38	0.1	0	0
8806	53.4	7.5	0	0	0
8807	53.54	7.88	0.1	0	0
9001	16.56	8.22	0.4	0	0
9002	16.25	8.47	0.2	0	0
9003	15.61	8.58	0.9	0	0
9004	16.32	8.71	0.3	0	0
9005	15.42	9.05	1.2	0	0

**ANEXO 9. PROTEÍNAS DE LA CEPA NINOA CON AMORTIGUADOR DE LISIS
DE UREA 7 M Y TIOUREA 2 M.**

SSP	Mr	pl	ninoatu 230603	ninoatu13 0603	SSP	Mr	pl	ninoatu 230603	ninoatu130 603
1	18.03	4.32	0.6	0	1601	47.52	4.9	0.1	0
2	17.73	4.62	0.2	0	1602	51.26	5.02	0.1	0
101	23.22	3.82	0.1	0.2	1701	52.92	4.9	0.4	0
102	20.87	4.4	0.1	0	1702	54.67	4.95	0.5	0
103	27.08	4.45	0.1	0	1703	55.29	5.11	0.2	0.2
104	26.72	4.63	0	0	1801	57.52	4.95	0	0
105	23.73	4.75	1.8	1.4	1802	62.02	5	0.9	0
106	27.24	4.75	0.3	0	1901	67.6	5.01	1.6	2.2
107	20.73	4.77	0.1	0	2001	17.87	5.23	0.3	0
108	18.6	4.78	0.2	0	2002	18.15	5.23	0.4	0.2
201	29	2.95	1.2	0.4	2101	19.43	5.15	0.1	0
202	28.09	4.61	0.1	0.2	2102	20.31	5.15	0.2	0
203	30.11	4.72	1.8	0.3	2103	18.59	5.18	0.9	0
204	28.4	4.75	0.1	0.2	2104	20.19	5.3	0.2	0.3
301	33.88	4.63	1	0.8	2201	28.94	5.15	0	0.1
302	37.32	4.66	0	0	2202	28.02	5.17	0.1	0
303	34.64	4.78	0.3	0	2203	30.87	5.23	0.1	0
401	39.24	4.7	1.3	0.2	2204	28.9	5.26	0.4	0
501	45.28	4.77	0.3	0.1	2301	31.98	5.17	0.3	0
601	47.54	4.46	0.1	0.1	2302	34.36	5.2	0.1	0
602	51.26	4.81	0.2	0	2303	37.35	5.22	0.2	0.4
701	54.99	4.51	1.1	0.3	2304	37.26	5.29	0	0
702	53.02	4.72	0.8	0	2305	32.04	5.3	0	0
703	54.92	4.74	0.4	0	2306	34.1	5.3	0.6	0
801	62.08	4.51	0.4	0.2	2401	39.9	5.16	0.3	0
802	62.05	4.69	0	0	2402	40.97	5.17	0	0
803	57.89	4.75	0.2	0.1	2403	38.66	5.24	0.1	0
901	97.62	0.9	0	0.2	2404	39.7	5.25	0.1	0
902	116.3	2.85	0	0.1	2405	40.66	5.31	0.2	0
1001	17.85	4.98	0.6	0	2501	43.26	5.14	0.3	0
1002	18.19	5.01	0.3	0	2502	45.07	5.19	0.1	0
1101	22.11	4.84	0.3	0.1	2503	43.41	5.24	0.2	0.1
1102	19.09	4.84	0.1	0	2504	41.99	5.25	0.1	0.2
1103	25.5	4.9	0.5	0	2505	43.47	5.31	0.2	0
1104	25.91	4.98	0.9	0	2506	42.04	5.32	0.4	0
1105	26.47	4.99	1.9	1.2	2601	47.83	5.12	0	0
1106	18.64	5	0.9	0	2602	50.62	5.16	1.1	0.6
1107	25.85	5.1	0.9	0	2701	55.49	5.19	0.1	0
1201	29.89	4.91	1.1	0	2702	52.48	5.21	0.1	0
1202	27.79	4.92	0.4	0.1	2703	56.96	5.22	0.2	0
1203	29.88	5.11	0.1	0	2704	57.05	5.28	0.2	0
1301	34.44	4.93	0.5	0	2801	64.71	5.13	0.6	0

1302	33.09	5	0.9	0.4	2802	65.27	5.29	0.5	0
1401	38.53	4.92	0.3	0	2901	93.3	5.21	0.1	0
1402	39.58	4.92	0.4	0	2902	86	5.21	0.5	0
1403	39.5	5.05	0.2	0	2903	72.36	5.25	0.3	0.9
1404	40.26	5.06	0.1	0	2904	67.41	5.25	0.1	0
1501	42.74	4.93	0.1	0	2905	86.25	5.27	0.1	0
1502	42.07	5.1	0.3	0	2906	72.44	5.31	0.2	0
1503	45.04	5.1	0.2	0	2907	86.24	5.31	0.2	0
2908	67.14	5.31	0	0	4603	48.27	5.66	1.6	0.6
3001	18.15	5.34	0.3	0	4604	50.08	5.72	0.1	0
3002	17.88	5.36	0.4	0	4701	55.29	5.58	0.3	0
3003	18.42	5.37	0.5	0.1	4702	55.43	5.66	0.7	0.6
3004	17.95	5.5	0.1	0	4703	55.17	5.71	0.6	0
3005	18.14	5.5	0.1	0	4801	59.94	5.65	0.1	0
3101	18.47	5.33	0.1	0	4802	62.31	5.75	0.1	0
3102	26.65	5.48	0.1	0	4803	59.66	5.77	0.3	0
3201	31.64	5.36	0.2	0.2	4901	87.33	5.54	0.5	0.4
3202	28.95	5.4	0.2	0.2	4902	79.39	5.56	0.4	0
3203	31.01	5.43	0.6	0	4903	73.43	5.57	0	0
3204	28.7	5.48	0.1	0	4904	86.74	5.6	0.6	0
3301	34.79	5.41	0.4	0	4905	69.06	5.64	0.1	0
3302	32.83	5.49	0.7	0.4	4906	86.77	5.69	0	0
3303	35.56	5.5	0.2	0	4907	67.98	5.71	0	0
3304	36.1	5.53	0.1	0	5001	17.99	5.79	0.1	0
3401	38.16	5.33	0.3	0	5002	18.14	5.9	0.4	0.2
3402	39.37	5.34	0.1	0	5101	20.26	5.8	0.3	0.1
3403	40.72	5.42	0.3	0	5102	27.19	5.81	0.2	0.1
3404	39.43	5.43	0.4	0	5103	18.56	5.91	0	0
3405	38.05	5.47	1.3	0	5201	29.41	5.83	0.2	1
3406	39.18	5.48	0.5	0	5202	28.24	5.84	0.1	0
3501	43.73	5.37	0	0.3	5203	30.41	5.88	0.1	0
3502	46.72	5.37	1.1	0.5	5301	32.81	5.8	0.6	0.5
3503	42.66	5.41	0.7	0.1	5302	37.09	5.8	0.9	0.2
3504	42.65	5.49	0.7	0	5303	34.78	5.87	0.1	0.5
3505	44.22	5.49	0.5	0.6	5304	33.26	5.91	0.1	0
3601	47.83	5.33	0	0	5305	37.3	5.92	0.4	0
3602	50.95	5.35	0.8	0.5	5401	39.21	5.85	0	0
3701	52.2	5.39	0.4	0	5402	41.17	5.85	0.4	0
3702	52.3	5.49	0.4	0	5501	42.84	5.8	0.4	0
3801	61.35	5.38	0.4	0	5502	45.67	5.83	0.2	0
3802	57.45	5.39	0.3	0	5503	44.53	5.84	0.1	0
3901	67.02	5.37	0.3	0	5504	43.34	5.9	0.1	0
3902	72.94	5.37	0.1	0	5505	45.9	5.93	0.3	0
3903	88.35	5.38	0.1	0	5601	48.2	5.8	1.4	0.3
3904	77.86	5.42	2	1.1	5602	47.67	5.85	0.2	1.2
4001	18.25	5.64	0.6	0.2	5603	51.19	5.87	0.1	0
4101	25.8	5.67	0	0	5604	48.89	5.88	0.7	0

4201	29.52	5.64	0	0	5605	46.91	5.92	0.2	0
4202	28.77	5.65	0.1	0	5701	52.82	5.79	0.1	0.1
4203	29.95	5.69	0.1	0	5702	55.37	5.82	0.1	0
4301	31.78	5.58	0.3	0.3	5703	56.16	5.83	0.2	0
4302	37.13	5.64	0.1	0	5704	51.67	5.84	0	0.2
4303	35.08	5.65	0.6	0.1	5705	54.1	5.88	0.3	0
4401	40.68	5.56	0.1	0	5706	55.93	5.89	0.2	0
4402	38.45	5.57	0.3	0.3	5801	63.36	5.85	0.5	0
4403	41.62	5.58	0.2	0.8	5802	58.71	5.86	0.2	0.1
4404	41.71	5.64	0.1	0	5803	60.68	5.89	0	0
4405	38.32	5.7	0.3	0	5804	58.65	5.92	0.8	0
4406	39.92	5.74	0	0	5805	64.24	5.93	0.5	0.1
4501	41.89	5.77	0.1	0	5901	83.09	5.8	0.1	0
4601	48.83	5.55	0.1	0	5902	67.84	5.81	0.1	0
4602	50.89	5.65	0.1	0	5903	67.46	5.88	0.3	0
5904	78.16	5.91	0.3	0	7302	32.37	6.65	0.2	0
6001	18.11	6.04	0.4	0.2	7501	43.22	6.25	0	0.1
6002	18.1	6.2	0.2	0.2	7502	46.59	6.29	0.1	0
6101	21.03	6.08	0	0	7503	44.95	6.32	0.3	0
6301	37.62	5.97	0.1	0.1	7601	49.68	6.26	0.1	0
6302	33.92	5.99	0.1	0	7602	47.61	6.28	0	0
6303	34.14	6.05	1.2	1.2	7603	47.84	6.33	0.4	0
6304	37.59	6.07	0.1	0	7604	48.58	6.38	0.2	0.3
6305	32.21	6.19	0.1	0	7605	47.08	6.4	0.1	0
6306	33.64	6.21	0.1	0.2	7606	51.2	6.65	0.1	0.1
6307	35.69	6.22	0.3	0	7701	51.43	6.22	0	0
6401	41.45	5.97	0.1	0	7702	55.22	6.23	0.2	0
6402	38.29	6.06	0	0	7703	55.13	6.38	0.2	0
6403	39.98	6.07	0.1	0	7704	55.42	6.54	0.1	0.1
6501	45.28	5.95	0.2	0	7801	61.49	6.23	0.2	0.1
6502	44.76	5.98	0.1	0	7802	58.27	6.25	0	0
6503	42.35	5.99	0	0	7803	62.79	6.34	0.1	0.2
6504	43.75	6.01	0.3	0.1	7804	62.72	6.49	0.1	0.1
6505	45.84	6.16	0.3	0	7901	88.5	6.46	0.1	0
6601	47.34	5.94	0.1	0	7902	66.77	6.58	0.1	0
6602	51.08	5.94	0.8	0	8001	18.32	6.68	0	0
6603	49.01	5.99	1.2	1.6	8002	18.1	6.79	0.1	0
6604	50.99	6.03	1.4	0.5	8003	17.81	6.93	0.1	0
6605	50.13	6.07	0.8	0	8004	17.96	7.28	0.2	0
6701	55.31	5.96	0.1	0	8005	18.02	7.91	0.3	0.1
6702	53.66	6.05	0	0	8101	22.08	7.17	0.1	0
6703	57.18	6.15	0.1	0	8102	22	7.7	0.5	0.1
6704	55.24	6.18	0.1	0.2	8103	22.04	7.84	0.3	0.3
6801	58.34	5.99	1.3	0.3	8201	27.95	6.66	0.5	0.9
6802	65.92	6	0.2	0	8202	28.72	6.99	0	0.1
6803	64.17	6.01	0.2	0	8203	28.31	8.02	0.1	0
6804	58.46	6.07	1.3	0	8301	37	6.7	0.6	0.6

6805	59.07	6.15	0.2	0
6901	70.19	5.95	0	0
6902	70.37	6.04	0.5	0.2
6903	70.1	6.09	0.1	0
7001	18.23	6.33	0.2	0.4
7002	17.96	6.55	0.1	0.1
7003	18.06	6.64	0.3	0
7101	27.18	6.22	0.1	0
7102	18.54	6.27	0.1	0
7103	20.03	6.28	0.2	0.3
7104	22.86	6.35	0.1	0
7105	19.26	6.39	0.1	0
7106	26.39	6.46	0	0.1
7201	27.6	6.22	0.7	1.3
7202	28.23	6.23	0.1	0
7203	27.54	6.27	0.1	0.1
7204	30	6.4	0.6	0.1
7205	28.27	6.41	0.2	0
7206	27.99	6.47	0	0.2
7207	28	6.53	0	0
7208	29.88	6.56	0.2	0.1
7301	35.22	6.26	0.9	0.9
9002	17.62	-1	1.5	0
9101	22.05	8.27	0.1	0
9102	18.91	8.45	0.1	0
9103	21.73	-1	0.1	0
9601	47.22	8.37	0.6	0.1
9801	60.39	8.23	0.2	0.5
9802	59.11	8.29	0	0
9803	59.1	8.48	0.3	0
9804	60.5	8.5	0.2	0.6
8302	33.68	7.02	0.1	0
8303	37.14	7.23	0	0
8401	38.47	6.67	0.1	0
8402	38.01	6.85	0.2	0.1
8403	38.31	6.95	0.2	0
8404	38.21	7.31	0.4	0.1
8405	40.58	7.75	0.1	0.1
8406	40.91	7.94	0.1	0
8501	44.89	6.66	0.1	0.1
8601	50.34	6.87	0	0
8602	47.62	6.98	0	0
8603	47.2	7.21	0	0
8604	50.62	7.23	0.1	0.1
8605	49.64	7.31	0	0
8606	47.43	7.39	0.2	0.4
8701	55.88	6.72	0.1	0.1
8702	54.08	6.76	0	0
8703	55.29	7.03	0	0
8704	53.83	7.34	0.1	0
8705	53.61	7.57	0.4	0.1
8801	58.76	7.39	0	0
9001	17.87	8.27	0.3	0

ANEXO 10. PROTEÍNAS DE LA CEPA QUERÉTARO.

SSP	Mr	pl	qromedicina	Qrotiourea	SSP	Mr	pl	qromedicina	Qrotiourea
1	9.44	-1	28927.8	323.8	2301	16.72	4.67	17695.7	323.8
2	9.46	-1	12282.6	323.8	2302	14.91	4.74	115779.8	323.8
3	9.5	-1	22520.4	323.8	2303	18.36	4.8	37700.2	35884.2
4	9.37	-1	72027.3	323.8	2401	23.6	4.67	8734.9	323.8
5	9.57	4.35	7741.9	323.8	2402	26.38	4.69	43478.8	323.8
6	9.48	4.42	47792.8	323.8	2403	23.46	4.72	136614.3	323.8
101	9.67	-1	32319.9	323.8	2404	21.45	4.85	69373.4	323.8
102	10.21	-1	19086.9	323.8	2501	29.83	4.62	46295.5	323.8
103	11.53	-1	64889	323.8	2502	28.7	4.78	24132.3	14432.5
104	12.24	4.31	61889.4	323.8	2503	29.62	4.81	48290.2	323.8
105	9.71	4.33	54946.4	323.8	2601	34.64	4.7	41142.6	57959.5
106	9.97	4.37	14548.1	323.8	2701	39.06	4.62	41076	48903.8
107	11.2	4.42	29015.4	323.8	2702	42.6	4.65	19456.5	323.8
201	13.57	-1	12082.6	323.8	2703	39.03	4.67	130198.3	323.8
202	14.82	-1	65799.9	323.8	2704	39.71	4.78	33069.2	323.8
401	19.22	-1	22745.1	135120	2705	42.73	4.86	35592.7	17836.9
402	23.5	4.3	174155.9	16831.9	2801	51.97	4.66	38297.6	323.8
601	34.99	4.32	19665.1	323.8	2802	43.7	4.7	9681.7	14127.2
701	38.91	-1	37532.9	323.8	2803	49.45	4.81	24247.9	323.8
702	39.3	-1	17677.8	25142.9	2804	45.96	4.85	11760	323.8
703	42.43	4.3	13987.6	31522.5	2901	74.2	4.62	10002	323.8
801	48.3	-1	24225.6	323.8	2902	60.23	4.69	24214.6	323.8
802	51.82	4.35	22317	323.8	2903	59.77	4.77	145684.8	323.8
1001	9.5	4.59	15985.2	323.8	2904	59.03	4.84	58021.1	323.8
1101	9.94	4.46	40111.8	323.8	3101	10.15	4.87	17592.3	323.8
1102	9.72	4.47	35329.4	323.8	3102	12.66	4.89	64220.4	323.8
1103	11.76	4.6	44319.3	323.8	3103	10.52	4.92	44064.6	323.8
1201	14.71	4.53	36254.4	323.8	3104	11.16	4.96	24758.4	323.8
1202	14.73	4.6	35263.3	5428.7	3201	14.19	4.89	46472.3	76002.4
1203	14.16	4.61	88217.6	323.8	3202	13.43	4.95	30942.1	323.8
1301	17.74	4.46	26318.8	323.8	3203	14.52	5.05	13873.1	323.8
1401	25.93	4.44	18291.7	5108.6	3301	15.42	4.89	118308.7	323.8
1402	26.62	4.52	32013.8	2744.1	3302	18.63	4.95	94608.7	44764.3
1403	24.99	4.53	17385.1	323.8	3303	14.86	5.02	50571.9	323.8
1404	23.58	4.6	34372	73090.2	3401	26.91	4.94	4972.6	6560.1
1405	19.44	4.6	24856.5	323.8	3402	22.38	5	37404	323.8
1501	29.43	4.48	59083.8	8934.9	3501	30.2	4.9	27121	323.8
1502	28.14	4.49	9474	323.8	3502	28.31	4.9	104926.2	323.8
1503	28.29	4.6	51016.3	17711.8	3503	31.24	4.91	37340.8	6396.4
1601	32.42	4.46	24855.2	146468	3504	29.53	4.98	13591.5	30624
1701	42.46	4.46	19291.1	2240.3	3505	27.08	5.03	52737	323.8
1702	39.17	4.46	69691.1	24680	3601	36.05	4.97	62648.7	323.8
1703	38.08	4.49	24624.1	323.8	3602	34.39	5.02	8779.5	323.8

1704	38.92	4.58	25779	28240.3	3603	37.55	5.04	5833	323.8
1801	50.96	4.5	297321.9	323.8	3701	39.57	4.89	68027.2	323.8
1802	56.34	4.51	41546.6	323.8	3702	40.1	4.95	11166.5	16480
1803	43.46	4.53	10195.9	323.8	3703	42.44	4.99	23466.6	323.8
1804	56.3	4.58	70339.9	26530.8	3801	58.78	4.93	54983.5	323.8
1901	64.96	4.54	22630.2	323.8	3901	60.82	4.88	26770.7	323.8
1902	81	4.6	68047.9	323.8	3902	69.42	4.89	7422.6	323.8
1903	83	4.61	40803	323.8	3903	67.15	4.93	14644	323.8
2101	9.66	4.62	30266.2	323.8	3904	69.43	4.97	5523.5	323.8
3905	61.19	4.99	27190.6	323.8	5803	43.72	5.5	23254.9	323.8
3906	66.93	5.03	28458.6	323.8	5804	53.56	5.55	7491.8	323.8
4001	9.53	5.2	16838.5	323.8	5901	59.19	5.48	22007	323.8
4201	14.61	5.14	69175	323.8	6001	9.47	5.6	11670.2	323.8
4202	14.34	5.32	22522.1	323.8	6002	9.34	5.83	34618.1	323.8
4301	16.53	5.1	30658	323.8	6101	12.76	5.69	18932.8	323.8
4302	15	5.26	200486.6	323.8	6102	9.68	5.77	52421.7	323.8
4401	19.84	5.09	64158.8	323.8	6201	14.11	5.68	21654	323.8
4402	18.98	5.14	12680.5	323.8	6202	14.47	5.71	33409.8	323.8
4403	22.23	5.15	69230.6	323.8	6203	13.1	5.95	227514.6	323.8
4404	19.16	5.27	163250.1	74664	6301	18.38	5.61	20920.6	323.8
4405	22.36	5.28	25280.2	323.8	6302	15.21	5.62	55919.8	323.8
4501	27.09	5.24	15222.9	323.8	6303	14.9	5.71	18922.2	323.8
4502	28.09	5.25	32882.1	323.8	6304	17.27	5.99	96558.2	323.8
4503	31.77	5.27	17822.5	323.8	6305	15	6	159846.7	323.8
4504	29.04	5.28	37045.7	323.8	6401	19.98	5.71	29922.5	323.8
4601	35.57	5.11	173607.4	323.8	6402	25.34	5.78	17088.7	323.8
4602	37.74	5.12	96065.1	323.8	6501	27.93	5.61	42649.5	323.8
4603	33.25	5.14	8076.3	323.8	6502	30.03	5.65	47131.7	323.8
4604	35.57	5.26	134605.5	42263.7	6503	31.77	5.67	23900.6	323.8
4605	36.35	5.31	16338.5	323.8	6504	31.45	5.86	63257.2	323.8
4701	42.15	5.12	63429.3	12467.6	6505	29.53	6	21094.4	323.8
4702	39.45	5.25	12311.3	323.8	6601	35.68	5.61	83704	6139.1
4703	41.3	5.26	9557.3	31019.4	6602	33.95	5.75	12392.5	323.8
4704	38.8	5.31	18198.3	323.8	6603	36.54	5.75	79965	323.8
4801	52	5.27	21002.5	323.8	6604	34.19	5.88	7783.6	323.8
4802	47.98	5.28	8693.1	323.8	6701	38.02	5.67	136814	13393.4
4901	63.25	5.26	6341	323.8	6702	42.61	5.72	14504	323.8
5001	9.35	5.57	7522	323.8	6801	53.56	5.69	18046.4	323.8
5101	10.56	5.34	17302.7	323.8	6802	43.71	5.73	18296.5	323.8
5201	13.72	5.34	48860.9	323.8	6803	43.43	5.86	16977	323.8
5202	14.02	5.42	15872.9	323.8	6804	45.5	5.97	24512.6	323.8
5203	13.02	5.52	102451.1	323.8	6901	70.36	5.61	4350.6	323.8
5301	18.1	5.39	23946.6	323.8	7001	9.57	6.05	40983	323.8
5302	18.75	5.47	20509.7	323.8	7002	9.29	6.16	13015.3	323.8
5303	17.75	5.5	30065.7	323.8	7003	9.38	6.17	22399.3	323.8
5401	25.25	5.39	81010.4	323.8	7004	9.24	6.32	24006.3	323.8

5402	26.73	5.44	10443.8	323.8
5501	27.53	5.37	23254.9	323.8
5502	29.33	5.45	17466.1	323.8
5503	32.09	5.54	27941.4	4642.9
5504	30.94	5.57	14014.2	323.8
5505	27.3	5.58	25768	6967.9
5601	32.5	5.34	35369.4	9245.3
5602	34.41	5.36	73002.8	323.8
5603	37.18	5.41	20527.4	323.8
5604	35.93	5.45	40296.7	323.8
5605	32.51	5.5	37870.8	323.8
5606	34.41	5.51	27529	323.8
5701	38.53	5.39	23419.6	323.8
5702	40.78	5.46	5538.2	323.8
5703	38.14	5.53	102462.8	4048
5801	51.64	5.4	33247	323.8
5802	57.77	5.48	23271.8	323.8
7501	30.12	6.09	19049.5	323.8
7601	33.62	6.12	40149.3	323.8
7602	34.4	6.17	17018.5	323.8
7701	40.5	6.17	15750.4	323.8
8001	9.17	6.85	51916.4	323.8
8002	9.28	6.87	96684.5	323.8
8003	9.25	7.27	75383.7	323.8
8004	9.23	7.58	56185.8	323.8
8005	9.32	7.66	49765.8	323.8
8101	10.09	7.01	112711.1	323.8
8102	12.94	7.14	50221	323.8
8103	12.57	7.49	39858.6	323.8
8104	10.01	7.56	389318.3	323.8
8201	13.46	6.82	75308.6	323.8
8202	13.84	6.85	8556.4	323.8
8203	14.32	7.29	20859.3	323.8
8204	14.3	7.58	30021.7	323.8
8301	17.41	7.03	50657.6	323.8
8302	15.2	7.25	10320.4	323.8
8303	17.37	7.46	46729.4	323.8
8401	18.85	7.02	35085.3	323.8
8402	25.56	7.45	21596.2	323.8
8403	24.92	7.5	12273.6	323.8
8404	21.98	7.53	52903.6	323.8
8405	25	7.8	207636.2	323.8
8601	36.54	6.99	46737.3	323.8
8602	32.53	7.14	100300.2	323.8
8701	39.83	7.08	37656.8	323.8
8702	39.69	7.3	57842.6	323.8
7005	9.35	6.32	56065.4	323.8
7006	9.32	6.49	79515	323.8
7101	12.76	6.05	51285.3	323.8
7102	10.64	6.15	70474.5	323.8
7201	13.04	6.08	24149.4	323.8
7202	14.53	6.1	19162.9	323.8
7203	14.55	6.24	81180.3	323.8
7204	13.02	6.34	41468.7	323.8
7205	13.98	6.38	73872.9	323.8
7206	13	6.5	160432.5	323.8
7207	14.12	6.56	73350.2	323.8
7301	16.89	6.42	34318	323.8
7302	16.66	6.6	209065	323.8
7303	18.56	6.74	84688.6	323.8
7401	23.63	6.19	12317.1	323.8
7402	26.2	6.21	8750.7	323.8
7403	21.27	6.28	24730.5	323.8

8801	44.49	7.11	13444.2	323.8
8802	44.46	7.4	8270.8	323.8
8803	45.81	7.61	33252.4	323.8
9001	9.28	-1	99581.7	323.8
9002	9.15	-1	20745.7	323.8
9101	11.95	-1	17455	323.8
9401	19.7	-1	41135.6	323.8
9801	46.28	-1	26433.2	323.8
9802	46.26	-1	133870.1	323.8
9803	45.79	-1	18888.3	323.8
9804	45.06	-1	22536.8	323.8

ANEXO 11. PROTEÍNAS DE LA CEPA QUERÉTARO CON AMORTIGUADOR DE LISIS DE UREA 8 M.

SSP	Mr	pl	qromedicina
2	10.42	-1	31496.4
3	10.14	-1	34468.3
6	9.89	-1	32411
101	14.56	-1	7074.4
102	11.07	-1	10123.1
103	10.58	-1	17810.8
201	22.36	-1	4459.9
202	23.07	-1	5439.2
203	22.19	-1	8932.1
1003	10.42	-1	12015.8
1004	9.75	-1	8693
1007	9.68	4.73	55320.8
1008	9.42	4.75	880.8
1009	10.02	4.76	12089.3
1010	9.48	4.79	21196.4
1011	10.46	4.71	4642.4
1101	10.73	-1	12430.8
1102	14.92	4.66	33031.2
1103	11.54	4.66	35070.2
1104	12.26	4.7	58102.6
1105	14.82	4.71	37303.5
1106	13.21	4.77	5957.2
1107	13.57	4.65	9257
1108	14.24	4.71	9562.1
1109	13.23	4.71	5078.5
1110	12.79	-1	5117.8
1111	11.12	-1	3227.2
1112	11.13	4.67	4321.8
1113	11.03	4.72	5110.8
1114	14.77	-1	2617.5
1115	14.22	-1	16.1
1201	20.03	4.7	17084.6
1202	23.85	4.71	100705.1
1203	22.1	4.6	9056.2
1301	35.12	4.73	9360.7
1302	35.82	4.67	2260.5
1303	29.6	4.66	1524.1
1304	34.49	-1	2244.9
1305	28.93	4.73	482.6
1401	41.56	-1	28374.5
1402	38.62	-1	8201.7
1403	39.71	-1	6024.8

SSP	Mr	pl	qromedicina
2101	11.22	4.81	14885.3
2102	14.71	4.88	23399.8
2103	14.75	4.94	27071.2
2104	11.76	4.94	24199.7
2105	14.17	4.95	53106.8
2106	14.75	4.81	2194.9
2107	11.55	4.85	4744.8
2108	13.24	4.86	2307.4
2109	14.2	4.83	3240.5
2110	11.16	4.92	1757.3
2111	12.47	4.89	15.4
2201	25.94	4.82	11854.1
2202	26.62	4.82	4822.4
2203	18.14	4.84	15648.2
2204	26.67	4.88	28985.6
2205	25	4.89	12598.6
2206	23.85	4.94	28297
2207	24.83	4.94	4158.2
2208	20.11	4.94	14570.3
2301	32.58	4.83	14990.3
2302	38.33	4.85	17524.6
2303	29.54	4.85	31514.3
2304	28.2	4.86	13959.8
2305	28.3	4.94	29593.3
2306	29.58	4.95	17796.1
2307	30.39	4.95	10626.7
2308	32.85	4.92	4849.3
2401	39.68	4.83	45682.8
2402	42.75	4.83	10054.3
2403	51.53	4.86	180279
2404	57.09	4.87	22194.9
2405	57.04	4.92	38067
2406	39.22	4.93	24902.9
2407	43.88	4.89	4874.5
2501	66.08	4.89	10815.7
2502	84.61	4.91	23069.5
2503	81.65	4.94	29336.6
2504	84.5	4.95	22376.2
2505	75.66	4.95	6099.7
3001	10.16	5.15	16430.8
3002	10.03	5.02	1004.8
3101	14.91	5.04	63233.4

1404	48.79	4.7	9494.2	3102	14.2	5.16	24881
1405	42.77	4.71	7330.2	3103	12.67	5.16	37663
1406	52.51	4.75	12608	3104	10.51	5.18	29033.3
1407	39.6	4.68	8049.5	3105	13.33	4.99	4010.5
1514	66.91	4.72	2791.5	3106	13.57	5.06	3427.1
2001	9.76	4.84	28180.3	3107	12.69	4.96	1207.3
2002	9.94	4.84	19265.2	3201	23.96	4.99	9684.1
2003	9.53	4.91	8746.2	3202	16.95	4.99	14102.1
2004	9.63	4.95	30926.2	3203	26.23	5.01	47172.1
2005	10.36	4.84	5611.8	3204	23.93	5.03	74675.8
3205	24.03	5.09	3429.1	4204	20.72	5.31	34400.5
3206	18.96	5.09	23793.6	4205	16.72	5.32	23729.4
3207	22.34	5.13	39685.4	4206	19.73	5.35	14111.1
3208	15.43	5.16	62637.3	4207	22.91	5.36	45638.8
3209	26.92	5.19	3551	4208	19.89	5.45	115582.1
3301	34.89	5.02	19098.5	4209	23.06	5.46	15597.3
3302	28.71	5.07	13914.2	4301	36.28	5.22	32694.5
3303	29.68	5.1	30306.7	4302	29.79	5.22	13381.1
3304	28.43	5.17	87070.5	4303	34.54	5.26	6673.3
3305	30.2	5.17	28207.5	4304	27.17	5.26	33003.1
3306	31.4	5.17	33996.6	4305	35.84	5.33	107379.2
3307	34.8	4.97	7872.4	4306	38.15	5.33	39984.4
3308	33.29	5.07	1527.4	4307	33.4	5.34	7412.6
3309	36.01	5.08	4449.1	4308	34.57	5.42	13482.2
3310	36.35	5.14	4867.1	4309	27.15	5.42	8953.6
3311	31.44	5.07	2937.4	4310	28.19	5.43	20366.8
3401	56.98	4.97	15601	4311	35.81	5.44	90181.1
3402	42.97	4.97	14656.8	4312	31.87	5.45	9166.4
3403	52.6	4.98	20066.3	4313	29.12	5.45	19205.3
3404	39.23	4.99	89223.1	4314	37.8	5.27	3105
3405	40.02	5.07	19754.7	4315	37.75	5.39	1354.9
3406	50.08	5.1	11963.8	4316	32.02	5.39	2178
3407	57.91	5.12	14777.3	4317	28.73	5.31	4352
3408	46.4	5.13	5794.3	4401	40.41	5.2	9295.6
3409	43.17	5.13	20738	4402	42.78	5.24	12662.6
3410	39.82	5.16	34130.8	4403	42.51	5.33	49436.1
3411	44.16	5.01	4719.8	4404	39.84	5.43	5823.1
3412	48.84	5.14	4160.2	4405	52.75	5.45	10743.9
3413	49.09	5.01	4161.5	4406	41.73	5.44	5726.6
3501	84.88	4.99	3895.8	4407	53.23	5.35	8577.9
3502	60.98	5	18609.9	4408	54.33	5.31	1283.5
3503	60.64	5.07	88546.9	4409	44.67	5.44	5796.1
3504	60.07	5.12	30121.9	4410	48.5	5.46	5191.3
3505	61.87	5.15	15540.9	4411	57.51	5.45	1135.1
3506	70.83	5.15	4336	4501	70.68	5.22	3147
3507	68.41	5.19	8073.1	4502	62.18	5.23	14041.1
3508	59.69	5.19	32280.2	4503	68.14	5.26	16544.7

4001	9.73	5.43	17126.2
4002	9.52	5.46	13285
4101	13.43	5.2	20180.9
4102	11.17	5.21	13370.2
4103	14.87	5.26	34628.1
4104	14.53	5.28	6235.6
4105	14.62	5.35	43847.2
4106	15.06	5.44	110629.3
4107	13.86	5.27	5647.4
4108	14.06	5.35	7900.8
4109	12.34	5.24	1337.8
4110	13.09	5.34	3132.6
4111	12.57	5.44	2835.4
4112	10.89	5.33	1566.6
4201	19.24	5.21	62073.6
4202	15.91	5.22	3671.9
4203	23.06	5.24	24090.5
5112	11.03	5.56	6355.3
5113	11.84	5.55	1701.6
5114	11.27	5.7	3189.4
5115	12.51	5.59	489.9
5201	25.29	5.54	41865.9
5202	18.62	5.54	13157.1
5203	26.74	5.57	5617.6
5204	18.21	5.62	19387.7
5205	18.95	5.71	12443.1
5206	16.04	5.56	5225.9
5207	23.56	5.51	5471.2
5208	23.42	5.6	4510.4
5209	20.6	5.52	1086.3
5210	22.54	5.69	3484.1
5211	25.36	5.65	246.2
5212	24.89	5.74	4983.9
5301	36.9	5.48	8836.4
5302	32.69	5.5	20008.2
5303	34.65	5.52	40693.2
5304	27.63	5.52	12867.7
5305	37.42	5.55	14869.5
5306	29.39	5.59	9854.8
5307	36.16	5.59	27639.2
5308	32.64	5.62	21245.1
5309	34.66	5.63	14902.5
5310	32.21	5.65	15957
5311	31.08	5.68	8622.6
5312	27.39	5.69	21201.6
5313	35.92	5.71	50957.3
5314	28.21	5.72	17496.6
4504	64.35	5.44	3539.9
4505	62.5	5.33	1731.5
5001	9.51	5.53	10824.7
5002	9.72	5.54	5496.2
5003	10.06	5.48	1914.3
5004	10.03	5.71	805.3
5101	14.35	5.49	14636.1
5102	13.72	5.5	30434.7
5103	13.03	5.64	61318
5104	15.32	5.71	29805.1
5105	14.94	5.61	6716
5106	14.02	5.55	4815.8
5107	14.06	5.65	4076.5
5108	14.42	5.66	2816.4
5109	13.15	5.75	1955.4
5110	13.44	5.7	1857.9
5111	10.64	5.49	3454.5
6007	10.13	5.93	1896.7
6008	10.06	5.96	2303
6101	14.14	5.76	16501.4
6102	14.49	5.78	31256.1
6103	14.89	5.79	17157.4
6104	13.11	5.96	140634.4
6105	15	6	151803.8
6106	14.06	6.02	13823
6107	12.77	6.05	36162.3
6108	13.05	6.07	15620.2
6109	14.55	6.11	11973.5
6110	10.66	6.15	37256.8
6111	13.11	5.84	7288.7
6112	12.85	5.78	3467.7
6113	11.64	6.05	4654.6
6114	12.51	5.91	140.8
6115	10.6	5.99	1593
6116	11.59	6.17	1267.4
6117	11.47	5.87	1574
6118	14.22	5.94	1490.4
6119	14.24	5.88	1229.6
6120	14.49	5.94	2638.5
6201	20.81	5.78	16063.1
6202	25.32	5.83	9773
6203	17.56	5.99	62867.6
6204	21.95	5.96	3479.5
6205	26.47	6.02	4897.4
6206	16.29	6.18	1921.6
6207	15.72	5.86	859
6208	19.14	5.85	71.9

5315	30.14	5.73	25204.5
5316	31.93	5.75	12816.6
5317	38.3	5.76	83973.9
5401	39.15	5.47	11711.6
5402	38.89	5.53	14227.4
5403	52.22	5.54	17746.2
5404	44.18	5.62	11615.5
5405	38.42	5.64	58988.1
5406	54.35	5.66	4821.6
5407	40.94	5.6	2048
5408	40.94	5.53	1579.8
5409	44.32	5.54	9464.1
5410	48.67	5.56	2421.8
5411	44.68	5.71	2480.5
5412	49.39	5.75	3095.7
5501	59.99	5.61	15170.7
5502	58.39	5.61	11030.5
5503	71.52	5.71	2811.3
5504	71.49	5.64	1164.7
6001	9.46	5.78	12518
6002	9.71	5.81	36597.4
6003	9.43	5.95	3711.4
6004	9.47	6.04	24806.3
6005	9.58	6.05	22681.7
7005	10.08	6.3	1616.9
7101	14.54	6.23	45996.9
7102	13.04	6.34	24283.8
7103	14.05	6.38	21919.3
7104	13.88	6.39	13918.5
7105	13	6.5	92537.6
7106	14.15	6.55	39082.2
7107	13.38	6.79	25591.2
7108	13.56	6.83	24544.9
7109	13.84	6.84	6623
7110	12.13	6.78	2927.9
7111	11.15	6.35	3285
7112	12.01	6.45	2850.9
7201	24.04	6.19	7552.9
7202	22.17	6.28	15756.5
7203	17.12	6.42	20508.9
7204	16.87	6.59	174020.9
7205	19.48	6.69	12710.1
7206	18.98	6.77	33739.3
7207	21.35	6.47	4266.7
7208	26.13	6.21	4210.7
7209	25.22	6.39	982.7
7301	37.16	6.72	3503.3

6209	20.31	5.88	1822
6301	36.76	5.81	47959.8
6302	31.55	5.89	34367.8
6303	29.59	6	12079.7
6304	30.28	6.09	9187.8
6305	33.86	6.12	26948.8
6306	34.74	6.17	7611.4
6307	34.22	6.03	3055.5
6308	33.7	5.92	2925
6309	33.44	5.81	2864.8
6310	30.75	5.95	117.4
6401	54.35	5.77	11753.8
6402	52.71	5.77	10178.5
6403	44.08	5.8	11676.5
6404	43.91	5.89	9511.4
6405	46.01	5.98	15074
6406	40.88	6.17	8553
6407	49.81	5.89	1032.5
6408	47.13	5.86	1120.7
6409	40.46	5.99	2605.2
6410	40.46	5.88	1511.7
6411	44.88	6.02	10223
6501	60.19	5.77	3221.4
7004	10.16	6.47	14743.8
8204	25.17	7.48	20602.8
8205	22.79	7.53	31023.4
8206	25	7.8	114827.9
8207	23.06	7.21	4520.6
8208	25.22	7.12	4458.5
8209	18.12	7.8	3437.4
8301	36.35	6.99	23427.1
8302	37.23	6.99	8197.2
8303	33.08	7.14	23076.8
8304	32.1	7.17	32196.2
8305	30.91	7.62	4556.8
8401	40.2	7.07	18053.4
8402	40.1	7.29	33235.1
8403	46.39	7.6	17989
8404	46.81	-1	12491.6
8405	46.74	-1	66639.6
8406	44.91	7.12	8824.6
8407	45.25	7.36	6822.8
8408	46.14	-1	8670.6
8409	52.02	7.12	2993.7
9101	13.88	-1	2134.3
9102	12.26	-1	3218.7
9201	20.55	-1	20532.3

7302	32.82	6.57	2172.5	9401	45.7	-1	19847.5
7303	32.82	6.85	4701.6				
7401	38.84	6.57	6489.9				
7402	39.42	6.4	7584.6				
7403	48.59	6.33	1543.2				
7404	47.85	6.48	2047.8				
7405	52.04	6.73	888.9				
7406	52.75	6.49	1481.9				
7407	52.82	6.38	1122.3				
7408	56.16	6.82	821.5				
7501	89.62	6.42	2351.1				
7502	64.92	6.41	224.4				
8003	10.09	7.02	86794.6				
8006	10.03	7.56	254033.8				
8008	9.34	7.66	25408.1				
8010	9.3	-1	45533.6				
8101	12.85	7.12	10597.6				
8102	13.02	7.14	16798.3				
8103	15.3	7.26	4924.3				
8104	14.34	7.3	11477.5				
8105	12.58	7.48	23306.3				
8106	14.3	7.58	15674.3				
8107	11.95	-1	9716.5				
8108	14.88	7.52	6471.3				
8109	14.17	-1	3021.8				
8110	14.3	-1	3092.3				
8111	14.12	-1	3493.4				
8112	11.41	-1	3002.7				
8201	19.68	7.01	15798.1				
8202	17.98	7.03	39052.9				
8203	17.74	7.47	25291.1				

**ANEXO 12. PROTEÍNAS DE LA CEPA QUERÉTARO CON AMORTIGUADOR
DE LISIS DE UREA 7 M Y TIOUREA 2 M.**

SSP	Mr	pl	qrotu26 0803	qrotu250803	SSP	Mr	pl	qrotu26 0803	qrotu250803
1	20.47	-1	0.2	0.2	1705	57.38	5.12	0.3	0
2	23.27	-1	0.1	0	1801	68.58	4.92	0.9	0
3	23.22	-1	0	0	1802	59.8	5.02	0	0
4	21.11	-1	0.1	0	1803	63.39	5.05	0.1	0
5	23.5	-1	0	0.2	1804	72.31	5.06	0.2	0
6	26	4.4	0.1	1.3	1805	66.48	5.14	1.7	0
7	23.69	4.49	0.2	0	1901	84.65	5	0.1	0
8	23.46	4.58	0.4	0.8	1902	76.43	5.01	0	0
9	23.74	4.61	0.4	0.5	1903	97.4	5.1	0.1	0.6
10	23.7	4.73	0.2	0	1904	72.83	5.13	0.5	0
11	23.51	4.75	0.1	0	1905	97.84	5.14	0.1	0.1
12	24.43	4.77	0.9	0.5	2001	26.08	5.28	0	0.1
13	27.74	4.78	0.1	0.1	2002	25.08	5.21	0	0.3
101	32.75	4.7	2.4	0.4	2003	24.33	5.29	0	0.5
201	35.42	4.69	0.3	0	2004	23.55	5.33	0	0.2
301	37.3	4.55	1.1	0.5	2101	32.14	5.2	0.1	0
302	39.6	4.79	0	0	2102	30.34	5.26	0.2	0
401	44.49	4.68	0.1	0.2	2103	32.68	5.3	0.3	0
402	43.05	4.75	0.1	0	2201	35.48	5.32	0.4	0
403	41.76	4.76	0.9	0	2301	40.88	5.16	0.2	0
501	48.84	-1	0.1	0.1	2302	38.7	5.19	0.1	0
502	45.39	4.62	0.2	0	2303	37.62	5.19	0.4	0
503	48.97	4.72	0.4	0	2304	39.58	5.24	0.1	0
601	52.71	4.5	0.2	0.3	2305	36.49	5.26	0.2	0
602	52.4	4.64	0.6	0	2306	38.08	5.3	0.1	0.1
701	57.49	4.51	0.5	0	2307	40.36	5.31	0.1	0
702	55.01	4.56	3.2	0.1	2308	36.9	5.32	0	0
801	61.98	4.6	0.6	0.1	2401	43.49	5.15	0.1	0
802	66.84	4.62	0.6	0	2402	42.86	5.16	0	0
1001	21.52	4.81	0.3	0	2403	44.69	5.2	0.1	0
1002	25.34	4.87	0.7	0	2404	43.66	5.22	0.2	0
1003	19.01	5.1	1.3	0	2405	41.9	5.24	1	0
1101	32.18	5.08	0.1	0.3	2406	42.94	5.24	0.2	0
1201	35.61	4.88	0.1	0	2407	44.98	5.29	0.4	0.2
1202	35.6	5.1	0	0	2408	42.85	5.32	0	0
1301	38.89	4.89	0.8	0	2501	47.93	5.16	1.4	0.2
1302	36.53	4.89	0.1	0	2502	48.43	5.25	0.9	0
1303	37.05	5	0.1	0	2503	46.3	5.3	0.1	0
1304	37.06	5.1	0.1	0.1	2601	52.11	5.16	0.4	0
1305	39.4	5.1	0.4	0	2602	53.19	5.16	0.1	0
1401	43.32	4.95	0.1	0	2603	52.95	5.24	1	0.1
1402	44.09	5.1	0.2	0	2604	50.37	5.33	0.2	0

1501	46.18	4.99	0.2	0
1601	53.06	4.85	0.1	0
1602	51.79	5	0.3	0
1603	49.83	5	0.1	0.2
1604	52.01	5.1	0.2	0
1701	54.14	4.86	0.1	0
1702	56.87	4.95	0.1	0
1703	54.31	5.02	0.1	0
1704	57.49	5.04	0.3	0
2904	78.78	5.31	1.7	0.7
2905	91.09	5.31	0.1	1
3001	20.13	5.5	0	0
3002	23.73	5.44	0	0.1
3003	28.13	5.53	0	0.1
3101	32.21	5.35	0.5	0.3
3102	32.81	5.41	0.3	0
3103	30.43	5.43	0.1	0
3104	31.54	5.48	0.1	0
3201	35.66	5.42	0.1	0
3202	34.35	5.44	0.2	0
3203	33.16	5.52	0.9	0.6
3204	35.66	5.53	0.6	0
3301	38.36	5.37	0.2	0.1
3302	36.8	5.4	0	0
3303	37.31	5.46	1.3	0
3401	42.13	5.33	0.1	0
3402	42.74	5.37	0.1	0
3403	41.3	5.39	0.1	0.1
3404	41.42	5.42	0	0
3405	42.66	5.43	0.3	0
3406	41.49	5.43	0.1	0
3407	41.79	5.48	0.1	0
3501	45.24	5.4	0.3	0
3502	46.97	5.4	0.1	0
3503	45.9	5.52	0	0
3601	49.4	5.33	0.2	0.2
3602	52.72	5.43	0.3	0
3603	50.16	5.44	1.2	0
3604	52.66	5.52	0.1	0
3605	50.25	5.53	0.7	0
3701	56.56	5.33	0.3	0.6
3702	54.17	5.4	0.3	0
3703	57.03	5.41	0.6	0
3704	57.11	5.48	1	0
3901	89.02	5.34	0.3	0
3902	80.65	5.39	0.2	0
3903	89.72	5.41	0.8	0

2701	57.92	5.19	0.4	0
2702	53.42	5.33	0.6	0
2801	62.65	5.16	0.1	0
2802	67.41	5.22	0.6	0.2
2803	62.27	5.23	0.2	0.1
2804	62.28	5.3	0.1	0
2901	73.24	5.18	0.2	0.1
2902	77.48	5.21	1.3	0
2903	73.47	5.22	0.1	0
4403	42.12	5.6	0	0
4404	43.94	5.65	0.6	0.4
4501	47.34	5.56	0.2	0
4502	45.57	5.57	0.1	0
4503	48.81	5.62	0	0
4504	49.3	5.67	0.2	0
4505	46.72	5.68	1	0.3
4601	51.83	5.55	0.1	0
4602	50.79	5.57	0.3	0
4603	51.79	5.61	0.2	0
4604	51.39	5.63	0.7	0
4701	54.18	5.54	0.1	0
4702	56.01	5.6	0.3	0
4703	53.75	5.67	0.3	0
4801	58.96	5.59	0.1	0
4802	68.85	5.6	0.5	0
4803	64.58	5.65	0.2	0
4804	59.87	5.66	0.5	0
4805	71.79	5.69	0.2	0.2
4901	83.96	5.62	0	0
4902	79.66	5.62	0.5	0.5
5001	19.68	5.74	0.1	0
5101	31.85	5.75	0	0
5102	31.97	5.81	0.1	0
5103	31.17	5.81	0	0
5201	33.39	5.74	0.2	0.2
5202	33.92	5.81	0.8	0.6
5203	32.98	5.83	0.6	0.7
5204	36.02	5.83	0.5	0
5301	36.73	5.83	0.4	0.9
5401	41.54	5.71	0.8	0.3
5402	44.46	5.74	0.5	0.5
5403	42.55	5.75	0.3	0.1
5404	44.15	5.77	0.2	0
5405	41.43	5.8	0.1	0.2
5501	45.56	5.72	0.4	0.4
5502	46.02	5.8	0.1	0.1
5503	47.75	5.83	0.1	0.1

3904	84.67	5.5	0.2	0
4001	29.13	5.57	0.1	0.4
4002	20.3	5.63	0.3	0
4003	27.28	5.69	0	0.7
4101	30.03	5.63	0	0
4102	31.78	5.65	0.3	0.2
4103	30.39	5.65	0.1	0
4201	35.5	5.62	0.2	0
4202	33.39	5.66	0.2	0.3
4203	35.62	5.67	0.8	0.3
4301	37.93	5.54	0.2	0
4302	40.71	5.58	0.4	0.4
4303	37.46	5.62	0.3	0.1
4304	40.79	5.64	0.3	0.2
4401	42.35	5.55	0.1	0
4402	43.66	5.55	0.5	0
6001	27.2	6	1.9	0.9
6002	26.4	6.08	0.1	0
6003	25.33	5.95	0	0.2
6101	31.04	5.94	0.1	0.1
6102	32.26	5.98	0.2	0
6201	35.22	5.89	0	0.2
6202	36.31	5.92	0	0
6203	35.4	5.98	0	0.1
6204	33.12	6.05	0.7	1.1
6301	39.02	5.85	0.2	0.4
6302	36.7	5.99	0.1	0
6303	40.07	6.03	0.1	0.2
6304	40.11	6.07	0.1	0
6401	44.03	5.9	0.3	0.3
6402	44.15	6.01	0	0.2
6403	41.99	6.03	0	0.2
6501	46.41	5.88	0	0
6502	45.69	5.94	0.8	0.6
6503	48.22	5.96	0.1	0
6504	47.13	6.02	0.1	0
6505	48.23	6.02	0.1	0
6601	51.37	5.85	0.6	0
6602	49.8	5.85	0.2	0
6603	51.01	5.89	0.2	0
6604	49.72	5.89	0.2	0.3
6605	52.51	5.89	0.1	0.1
6606	49.6	6.06	0.1	0
6701	57.43	5.84	0.1	0.1
6702	57.39	5.92	0.5	0
6703	54.98	5.95	0.2	0.3
6704	54.88	6.02	0.3	0.4

5601	50.96	5.71	0.1	0
5602	50.99	5.75	1.1	0
5603	51.26	5.8	0.4	0
5604	52.69	5.84	0.4	0
5701	55.44	5.72	0	0
5702	53.72	5.79	0.9	0
5703	57.97	5.8	0.1	0
5704	55.34	5.82	0.1	0
5801	65.05	5.71	0.2	0
5802	59.49	5.72	0.8	0.1
5803	67.1	5.73	0	0.1
5804	64.12	5.75	0	0
5805	71.04	5.8	0.6	0
5806	66.52	5.81	0.2	0.2
5807	59.5	5.82	0.8	0
5901	93.39	5.72	0.1	0.4
7301	36.53	6.28	0.3	0.3
7302	37.35	6.29	0.2	0.3
7303	36.53	6.36	0.1	0
7401	44.08	6.15	0.6	1
7501	47.33	6.09	0.1	0.2
7502	47.79	6.17	0.3	0.4
7503	48.15	6.22	0.3	0.7
7504	46.09	6.55	0.2	0.7
7601	52.16	6.66	0	0.1
7602	50.82	6.73	0.1	0.3
7701	54.1	6.25	0.5	0.8
7702	54.27	6.58	0.2	0.1
7703	56.02	6.72	0.1	0.3
7801	61.25	6.44	0.2	0.9
7802	63.6	6.6	0.1	0.7
7803	61.2	6.77	0.5	0.7
7901	89.46	6.39	0	0.1
7902	90.77	6.51	0	0.1
7903	90.77	6.28	0	0.1
7904	81.41	6.28	0	0.1
7905	80.24	6.41	0	0.2
7906	88.81	6.5	0	0.1
7907	90.77	6.25	0	0
7908	73.01	6.3	0	0.2
8001	28.82	7.07	0.1	0.1
8002	20.56	7.43	0	0
8003	21.1	8	0.4	0
8004	20.97	-1	0.4	0
8101	31.25	-1	0.1	0
8102	30.45	-1	0.5	0.4
8103	31.31	-1	0.3	0

6801	63.18	5.9	0.3	0.5
6802	58.89	5.93	0.4	0.7
6803	60.58	6.02	0.4	0.3
6804	58.97	6.07	0.3	0.4
7001	23.3	6.2	0.1	0.3
7002	27.19	6.57	0.1	0.4
7003	27.1	6.79	0.6	1.2
7004	24.95	6.7	0	0.1
7005	25.08	6.36	0	0.2
7006	25.2	6.19	0	0.1
7101	32.03	6.15	0.2	0.4
7102	29.99	6.28	0.3	0.7
7103	31.84	6.33	0.1	0.1
7104	31.11	6.34	0.2	0.1
7105	30.02	6.38	0	0.3
7106	29.79	6.6	0.5	0.6
7107	31.2	6.75	0.1	0.2
7201	33.5	6.1	0.3	0
7202	33.07	6.21	0	0.1
7203	34.26	6.21	0.1	0.2
7204	33.05	6.67	0.1	0.8
7205	33.75	6.7	0.3	0
7206	36.2	6.72	0.3	0.6
8706	53.32	-1	0.1	0
8801	58.86	-1	0.7	1.6
8802	59	-1	0.7	0
8803	65.01	6.99	0	0.2
8804	62.94	7.12	0	0.1
8805	68.89	7.14	0	0.2
9001	25.75	-1	0.3	0.4
9101	32.38	-1	0	0
9102	32.18	-1	0.1	0
9103	29.69	-1	0.1	0
9201	34.78	-1	0.1	0
9301	40.55	-1	0.1	0
9302	37.26	-1	0.1	0
9303	40.42	-1	0.2	0.7
9501	47.69	-1	0.6	0.5
9502	48.06	-1	0.8	1.2
9701	57.7	-1	0.1	0
9702	55.57	-1	0.1	0
9703	57.48	-1	0.2	0
9801	60.84	-1	0.4	0
9802	60.9	-1	0.5	0
9803	58.72	-1	0.9	0.4

8201	33.98	6.87	1.3	1.3
8202	35.2	7.04	0.6	0.6
8203	34.1	7.11	0	0
8204	35.49	7.39	0.2	0.8
8301	38.69	7.97	0.3	0
8302	39.3	7.99	0.1	0.2
8303	39.31	-1	1	0.4
8304	38.53	7.66	0	0.5
8401	44.15	6.8	0.1	0.4
8501	47.29	6.81	0.1	0.3
8502	45.55	6.97	0.1	0.3
8503	47.04	7.11	0.1	0
8504	47.11	7.56	0.3	0.9
8505	47.02	7.89	0.1	0.2
8506	47.17	-1	0.2	0
8601	52.12	6.84	0.6	0.5
8602	49.71	6.93	0.1	0.1
8603	50.21	7.37	0.2	0.8
8701	54.6	6.87	0.1	0
8702	54.49	7.12	0.1	0.4
8703	53.4	7.76	0.6	1.9
8704	57.85	7.87	0.1	0.1
8705	53.52	7.91	0.2	0.2

ANEXO 13. PROTEÍNAS DE LA CEPA VER-6, UNIÓN DE LAS GELES DE VER-6 CON AMBOS MÉTODOS DE LISIS.

SSP	Mr	pl	tioureaver	ureaver	SSP	Mr	pl	tioureaver	ureaver
1	10.58	-1	16245.6	261	1402	23.52	1.94	13674.4	1929.3
2	10.22	-1	25233.7	261	1403	22.24	2.7	5544.7	261
3	9.26	-1	7357.7	261	1501	26.9	1.31	3161.8	261
4	10.39	1.1	6584.2	261	1502	29.68	1.35	1937.5	261
101	11.49	-1	25027	261	1503	30.62	1.94	7791.7	261
102	12.55	-1	8750	261	1601	35.87	1.39	7352.2	261
103	11.67	-1	4006.7	261	1602	34.54	1.62	20801.7	43779.8
104	10.9	-1	2247.2	261	1603	40.13	2.18	13496.9	2470.9
105	10.92	-1	14768.1	261	1604	36.14	2.34	5163.9	261
106	12.25	-1	5363.1	261	1701	51.14	1.2	11560.9	261
107	12.74	0.6	83794.3	261	1702	43.56	1.31	22998.1	261
108	16.11	0.6	4294.8	23076	1703	50.32	2.13	15683.9	261
109	15.49	1.07	9185.9	261	1704	47.88	2.41	14453.4	261
201	16.37	-1	11284.2	261	1705	50.53	2.75	20961.5	29350.7
202	18.34	-1	8802.8	261	1801	57.47	1.44	5164.9	12201.8
203	18.82	0.73	5318.2	261	1802	64.09	1.49	19115.5	261
204	17.03	0.82	23901.6	261	1803	56.22	2.03	22160.7	261
301	19.23	-1	57695.9	261	1804	67.01	2.08	9877.4	261
302	20.75	-1	5071.8	11992.1	1805	67.15	2.6	29323.6	261
303	20.4	-1	10037.4	261	1806	57.54	2.69	35867.6	261
304	20.35	0.61	22646.3	261	1901	70.69	1.29	32227.5	261
401	22.2	-1	65455.6	10965.8	1902	69.92	2.01	1897	261
402	25.54	-1	5833.9	261	1903	75.69	2.65	24743.3	5179.1
501	28.5	0.65	48343.7	261	1904	90.38	2.71	22785	26802.7
601	42.32	-1	5973.1	261	2001	9.13	3.14	5441.9	261
602	39.2	0.86	21191.9	29838.8	2002	10.23	3.24	39744.9	261
603	34.9	0.95	6997.2	261	2003	9.24	4	26005.7	261
701	51.67	-1	17389.6	261	2101	13.9	2.97	4588.8	261
702	49.15	-1	25517.1	261	2102	11.09	3.04	6052.5	261
801	53.78	-1	29400.6	4078.8	2103	14.2	3.62	13522.7	261
802	62.93	-1	58962.4	261	2104	10.95	4.1	13289.9	261
803	62.62	-1	47035.7	2898.9	2201	17.97	3.68	16203.9	261
804	55.49	0.61	2922	261	2202	16.26	3.84	4043.3	261
805	54.83	1.08	2537.3	261	2301	20.37	3.48	25670.2	261
1001	9.21	1.42	23156	261	2401	26.07	3.22	5963.3	49529.4
1002	9.61	2.5	4687	261	2402	23.96	3.82	8882	261
1003	8.9	2.64	6472.6	261	2403	22.16	4.06	7375.3	261
1004	10.45	2.64	19712.8	261	2404	24.82	4.35	4147.8	4733.7
1101	11.28	1.45	65969.5	261	2501	28.86	3.28	7217.3	261
1102	15.15	1.63	15662.7	261	2502	31.43	3.84	11979.8	261
1103	14.17	1.72	62348.8	261	2503	27.09	3.99	5972.2	261
1104	15.13	2.34	49704.1	261	2504	29.1	4.31	20659.6	18809.5

1105	12.02	2.46	2662.6	261	2505	31.76	4.4	1662.6	261
1106	13	2.71	7174.2	261	2601	40.06	2.95	2863	8331.3
1201	17.95	1.46	14378.3	261	2602	36.36	3.35	7883.6	261
1202	18.59	1.89	47229.2	261	2603	34.95	3.62	8094.2	13459
1203	17.58	2.2	945.7	261	2604	42.32	3.92	66826.3	261
1204	17.67	2.83	7797.5	261	2605	37.17	4.33	6862.4	261
1301	20.88	1.81	10123.3	2450.4	2606	35	4.42	33292.5	261
1302	20.62	2.72	3859.6	261	2701	44.48	3.34	15514.2	261
1303	19.04	2.76	8361	261	2702	49.94	3.48	41988.8	261
1401	25.9	1.63	2805.3	261	2703	53.1	4	2968.3	261
2704	49.38	4.13	8126.2	29996.7	4401	23.6	5.52	33014.9	261
2705	52.17	4.46	2071.3	261	4402	24.48	5.59	7286.2	261
2801	57.21	3.27	23566.1	18516.3	4403	21.94	5.6	48436.9	261
2802	69.2	3.4	19555	261	4404	24.32	5.62	18247.2	261
2803	57.75	3.84	7770.2	261	4405	22.12	5.64	4020.4	261
2804	63.62	3.89	19992.9	32897.2	4406	22.88	5.66	9046.4	4998.1
2805	58.66	4.51	2076.4	261	4501	33.22	5.52	10463.7	261
2901	75.43	3.14	6724.6	261	4502	27.17	5.54	22808.9	261
2902	90.74	3.35	7036.3	261	4503	33.7	5.56	13518.3	261
2903	81.06	4.13	70232.6	261	4504	28.85	5.56	6546	51216.5
3001	10.19	5.39	11889.7	261	4505	31.94	5.56	8189.4	261
3101	14.95	4.95	4989.8	261	4506	33.91	5.62	22197.3	261
3102	10.88	5.39	53732.3	261	4507	27.7	5.64	7748.1	261
3103	12.54	5.48	42548.3	261	4508	31.01	5.64	30943.8	261
3104	15.31	5.48	5100.3	261	4601	41.9	5.59	40225.5	261
3201	16.37	5.09	39317.7	261	4602	37.05	5.6	2506.5	261
3202	17.54	5.46	3531.6	261	4603	38.99	5.63	18458.9	261
3203	18.28	5.47	6626.1	261	4604	37.29	5.64	10950.6	261
3301	21.17	4.68	17225	12881.6	4701	53.05	5.53	31998.4	37824.8
3302	20.08	4.91	24037.8	261	4702	44.23	5.53	78385.6	261
3303	21.73	5.48	15004.7	261	4703	43.38	5.63	46475.1	261
3304	20.85	5.49	5819.3	261	4704	48.36	5.64	2315.9	261
3401	24.43	5.35	3224.2	261	4801	58.84	5.59	8357.8	261
3402	22.42	5.41	9655.3	261	4802	62.88	5.65	12796.7	261
3501	28.68	4.92	13090.3	261	4901	85.43	5.59	3741.1	261
3502	26.97	4.93	16938.7	261	5001	9.18	5.78	19690.6	261
3503	30.66	5.47	13024.9	261	5101	14.73	5.69	10409.6	261
3504	27.37	5.48	22642.2	261	5201	16.87	5.71	13462.2	261
3505	32.41	5.49	15472.4	6547.9	5202	18.45	5.75	3772.2	261
3601	37.7	5.1	20045.9	261	5203	16.87	5.8	20330.1	261
3602	34.36	5.19	19623	261	5301	19.45	5.67	16766.6	261
3701	49.57	4.94	15305.2	261	5302	20.81	5.69	13153.4	261
3702	49.71	5.34	12406.4	261	5303	20.56	5.79	9057.2	261
3703	44.34	5.47	28267	261	5401	22.56	5.71	17215.4	8706.2
3801	53.69	5.47	10143.5	261	5402	25.26	5.71	29970.8	7251.3
3901	81.55	4.75	16454.9	261	5403	25.34	5.75	27086.1	261
3902	92.27	4.94	2303.8	261	5404	22.32	5.75	20585.5	261

3903	78.9	4.98	13275.9	4560.1	5501	27.04	5.68	10149.2	261
3904	82	5.46	21203.4	261	5502	31.15	5.7	3078.1	261
3905	92.6	5.46	15299	261	5503	31.28	5.74	10638	261
3906	90.49	5.48	16520.6	20055.7	5504	28.27	5.74	3732.9	4046.7
4001	9.85	5.54	11659.9	261	5505	32.28	5.77	5445.4	7753.7
4002	10	5.59	55205.1	261	5601	41.37	5.69	7238.2	261
4101	14.9	5.53	15447.9	261	5602	35.01	5.7	5867.7	261
4102	11.32	5.59	7303.1	261	5603	38.51	5.73	59004.6	261
4103	11.05	5.65	6440.7	261	5604	43.15	5.77	40549.7	261
4201	16.71	5.52	12078.5	261	5605	34.87	5.78	28977.7	261
4202	17.75	5.61	8997	261	5701	51.35	5.67	14485.1	3251.2
4203	16.85	5.61	24491.2	261	5702	44.47	5.69	29670.6	261
4204	16.67	5.63	8384.1	261	5703	46.97	5.73	26359	261
4205	18.28	5.64	18980.4	261	5704	52.3	5.75	6283.8	261
4301	20.05	5.52	11057.2	261	5705	44.81	5.76	21934.1	15980
4302	20.03	5.55	21564.7	261	5801	56.82	5.66	15530.9	261
4303	19.93	5.64	31310.7	261	5802	67.58	5.67	14141.4	261
5803	62.87	5.71	6521.7	21894.6	7202	17.07	6.07	4523.6	261
5804	56.46	5.71	33634	261	7203	17.08	6.16	6820.8	261
5805	69.51	5.74	2832.6	6969	7204	17.56	6.26	24781	261
5806	55.65	5.77	45316.3	261	7205	16.98	6.39	18070.5	261
5807	62.62	5.79	2408	261	7301	19.44	6.05	14388	261
5901	79.1	5.69	15838.6	261	7302	20.74	6.13	6809.4	261
6001	9.7	5.85	10747.3	261	7303	21.76	6.18	4108	261
6002	10.46	5.97	20815.1	261	7304	19.21	6.21	68068.4	261
6003	8.86	5.98	9923.1	261	7305	20.87	6.32	11092.7	261
6004	10.53	6	10728.5	261	7306	19.47	6.34	5639.7	261
6101	16.14	5.83	2694.1	261	7307	20.19	6.35	7183.6	261
6102	16.09	5.97	38226.1	6101.3	7308	21.74	6.43	13882.4	261
6201	17.4	5.84	13904.9	261	7401	23.68	6.04	4949.5	261
6202	18.92	5.86	6367.3	261	7402	26.61	6.09	3350.2	261
6203	16.83	5.97	59761.3	261	7403	24.34	6.09	2570.2	261
6204	17.72	6	11728.5	261	7404	22.11	6.12	8578.7	261
6301	19.08	5.81	4799	261	7405	23.1	6.22	3695.4	7667.3
6302	20.49	5.94	12209.6	261	7406	22.01	6.26	2046.8	261
6303	19.6	5.97	9192.6	261	7407	25.97	6.27	15168.8	6550.4
6304	21.26	5.98	25236.6	261	7501	29.9	6.07	2473.9	261
6401	22.64	5.82	18198.4	261	7601	42.33	6.05	3943.7	261
6402	25.06	5.84	26232.9	261	7602	37.65	6.07	3426.4	261
6403	21.87	5.85	52801.2	261	7603	34.59	6.14	21092	3663.7
6404	24.45	5.87	6425.1	261	7604	39.84	6.15	12937.5	261
6405	25.55	5.97	5890.5	13167.2	7605	40.98	6.22	13466.7	261
6406	22	6	71523.6	90108.4	7701	49.35	6.22	14757.5	261
6501	28.39	5.83	10217.9	12148.2	7702	45.5	6.4	5295.7	261
6502	30.22	5.87	4688.4	261	7801	58.92	6.4	7866.9	261
6503	32.16	6.01	2403.2	261	7901	92.55	6.36	3242.2	261
6601	37.51	5.8	3403.9	261	8001	8.57	6.62	3628.5	261

6602	34.74	5.87	4265.6	8406	8002	10.72	-1	10984.6	261
6603	42.54	5.88	2649	261	8101	12.73	6.62	3128.8	261
6604	37.04	5.9	20791.6	261	8201	17.15	6.49	11444.2	261
6701	46.96	5.81	42216.5	261	8202	17	6.7	37172.6	261
6702	44.99	5.83	57483.6	261	8203	17.94	-1	3217.7	261
6703	49.72	6	7227	2079.3	8204	18.28	-1	19175.8	261
6801	68.95	5.82	25171.5	261	8205	18.98	-1	4152.4	261
6802	55.46	5.84	15743.3	261	8206	16.97	-1	4995.8	261
6803	55.23	5.88	47630.7	261	8301	19.14	6.52	23106.4	261
6804	57.52	5.99	14753.5	7997.1	8302	21.08	6.53	1459.7	261
6805	53.68	6.02	3066.9	261	8303	20.37	6.67	49059	261
7001	9.44	6.03	48169.1	261	8304	20.15	-1	4258.3	261
7002	8.86	6.23	18999.1	261	8305	20.87	-1	7798.3	261
7003	9.21	6.3	3725.7	261	8306	21.2	-1	4300.7	261
7004	8.57	6.34	10891	261	8401	22.27	6.48	3834.9	261
7005	10.12	6.45	4205.6	261	8402	21.95	6.59	10196.2	261
7101	13.49	6.04	4796.3	261	8403	24.65	6.7	4918	261
7102	12.32	6.07	7554.2	261	8404	22.64	-1	43797.5	261
7103	13.25	6.18	3919.4	261	8405	24.31	-1	53207.9	7804.6
7104	11.42	6.2	24772.2	261	8406	23.05	-1	7781.9	261
7105	11.59	6.28	10724.9	261	8407	26.19	-1	2064.7	261
7106	14.37	6.34	6280.4	261	8408	24.49	-1	23541.5	261
7107	12.47	6.47	6805.5	261	8409	22.83	-1	3088.7	261
7201	16.52	6.05	19214.9	261	8601	37.79	6.49	2162	261
8602	34.59	6.69	5923.2	261					
8603	39.68	-1	7507.4	261					
8604	39.03	-1	5559	261					
8701	49.73	6.48	5699.3	261					
8702	47.97	6.54	2942.4	261					
8703	52.04	6.65	6219.2	9415.9					
8704	44.6	6.66	5229.6	261					
8705	50.69	-1	6294.5	10981.3					
8706	43.54	-1	2099.3	261					
8707	50.4	-1	4730.9	261					
8708	48.79	-1	13769.1	261					
8801	63.6	6.54	3878.5	261					
8802	59.95	6.66	1818.9	261					
9001	10.66	-1	84821.2	261					
9002	10.66	-1	30330	261					
9003	10.78	-1	24704.4	261					
9004	8.9	-1	32653.9	261					
9101	10.94	-1	16961.8	261					
9102	15.6	-1	9854	261					
9201	17.88	-1	22330.6	261					
9202	17.84	-1	4820.1	261					
9301	20.41	-1	21516.6	261					
9302	19.72	-1	7349.7	261					

9303	20.95	-1	7668.6	261
9304	19.38	-1	5893.3	261
9401	24.44	-1	5675	261
9501	27.99	-1	3872.5	261
9502	28.5	-1	7656.9	261
9503	27.04	-1	6611	261
9601	39.79	-1	22007.8	261
9602	39.15	-1	36689.6	261
9701	49.08	-1	7219.1	261
9702	47.97	-1	5596.2	261
9801	57.29	-1	4940.7	261
9802	57.31	-1	3057.4	261
9803	57.56	-1	34506.3	261
9901	99.98	-1	1835.2	261

**ANEXO 14. PROTEÍNAS DE LA CEPA VER-6 CON AMORTIGUADOR DE LISIS
DE UREA 8 M.**

SSP	Mr	pl	ver24 0103	ver10 0103	ver15 1102	ver04 0403	SSP	Mr	pl	ver24 0103	ver10 0103	ver15 1102	ver04 0403
1	8.41	-1	0.2	0	0	0	1502	33.1	-1	0.6	0	0	0
101	16.3	-1	0.1	0	0	0	1601	36.5	-1	1	2.7	1.7	0
201	17.4	-1	0.2	0.2	0	0.3	1602	37.7	-1	0.2	0	0	0
202	18.7	-1	0	0	0	0	1603	37	-1	0.2	0.2	0.4	0
301	20	-1	0.1	0.2	0	0	1604	37.8	-1	0.2	0	0	0.1
401	24.4	-1	0.3	0	0	0	1701	40.6	-1	0.1	0	0	0
402	28.6	-1	1.5	0	0	0	1801	45.6	-1	0.3	0	0	0
403	25.2	-1	0.3	0.3	0	0.2	1802	47.3	-1	0.4	0.4	0	0
404	24	-1	0.4	0	0.3	0	1803	50	-1	0.3	0.4	0.6	0
405	30.4	-1	0.1	0	0	0	1804	47.7	-1	0.1	0	0	0
501	32.4	-1	0.1	0	0.3	0	1805	50.5	-1	0.1	0	0.1	0.5
502	35.3	-1	0	0	0	0	1806	46.1	-1	0	0	0	0
601	37.3	-1	0.4	0.6	2.1	0	1807	52.5	-1	0.7	0	0	0
602	35.8	-1	0.1	0	0	0	1901	67.5	-1	0	0	0	0
603	36.8	-1	0.4	0	0	0	1902	56.5	-1	0.1	0	0	0
604	37.7	-1	0.5	0	0	0	1903	62.3	-1	0.3	0	0	0
605	36.4	-1	0.2	1.8	0.6	0	1904	67.6	-1	0	0	0	0
701	39.8	-1	0	0	0	0	2001	12.2	-1	0.3	0.6	1.5	0
702	40.5	-1	0.1	0	0	0	2002	8.46	5.32	0.5	0	0	0
703	40.8	-1	0.1	0	0.2	0	2003	8.81	5.35	0.2	0	0	0
801	46.7	-1	0.5	0	0.9	0	2004	8.4	5.43	0.1	0	0	0
802	45.9	-1	0.1	0	0	0	2101	16.1	-1	0.3	0.6	0.2	0
803	47.6	-1	0.2	0	0	0	2102	13.9	5.33	0.2	0	0	0
804	49.3	-1	0.3	0	0	0	2201	18.3	5.3	0.7	1.3	0.5	0.2
805	45.3	-1	0.4	0	0	0	2202	17.7	5.39	0.6	0.8	0.1	0
806	49.8	-1	0.3	0.3	0	0	2203	16.8	5.42	0.4	0.9	0.6	0
901	56.2	-1	0.1	0	0	0	2301	22.1	-1	0.4	0.1	0.6	0
1001	8.36	-1	0.1	0	0	0	2302	20.9	-1	0.1	0	0	0
1101	13.1	-1	0.2	0.3	0.5	0	2303	23.7	-1	0.1	0	0.3	0
1102	15.8	-1	0.7	0.9	0.4	0	2304	19.7	5.31	0.1	0.1	0	0
1103	13.9	-1	0.1	0.2	0.7	0	2305	22.5	5.35	0.1	0	0	0
1104	13.3	-1	0.1	0	0	0	2306	19.8	5.41	0.2	0	0.5	0
1201	17.4	-1	0.3	0	0	0	2307	21.2	5.45	0.3	0.1	0.3	0.3
1202	19.4	-1	0.5	1.3	0.3	0	2401	28.2	-1	1.6	0.6	2	0
1203	17.5	-1	0.7	1.3	0.5	0	2402	30.3	5.34	0.1	0	0.2	0.3
1301	20.9	-1	0.2	0	0	0	2403	25.2	5.35	0.3	0	0	0.3
1302	23	-1	0.3	0	0	0	2404	26.7	5.4	0.6	0	0	0
1303	22.2	-1	0.3	0	0	0	2501	34.7	-1	0.1	0	0	0
1304	23.4	-1	0.7	1.5	0.3	0.2	2502	31.6	-1	0	0	0	0
1305	19.9	-1	0.2	0.6	1	0	2503	34.3	5.32	0.5	0.4	0.5	0
1306	23.4	-1	0.2	0	0.7	0	2504	32.7	5.42	0.1	0	0	0

1401	27.7	-1	0.4	0	0	0	2601	37.2	-1	0.5	0	0	0
1402	23.9	-1	0.2	0	0	0	2602	37.9	5.32	0.2	0	0	0
1403	29.8	-1	0.2	0.2	0	0	2701	39.7	5.35	0.1	0	0	0
1404	27.5	-1	0.1	0	0	0	2801	50.4	-1	0.1	0	0	0
1405	30.7	-1	0.2	0.1	0.2	0.1	2802	52.3	-1	0.6	0	1.8	0
1406	26	-1	0.1	0	0.5	0	2803	53.7	-1	0.2	0.7	0	0
1407	24.7	-1	0.1	0	0.2	0	2804	52.2	-1	0.7	0	0	0.2
1408	28.4	-1	0.2	0	0	0	2805	53.6	5.35	0.3	0.2	0	0
1409	30.8	-1	0.9	0.5	0.9	0	2901	59.1	-1	0.1	0	0	0.1
1410	28.4	-1	0.6	0.2	1	0	2902	57.8	5.3	0.1	0	0	0
1501	32.9	-1	0.2	0.3	0.3	0	2903	59	5.33	0.1	0	0	0
2904	57.8	5.4	0.3	0	0	0	4204	18.4	5.76	0.2	0	0	0
3001	12.6	5.48	0	0	0	0	4301	20	5.62	1.2	0	0	0
3002	8.7	5.51	0.1	0	0.1	0	4302	22.3	5.67	0.3	0	0	0
3003	10.9	5.52	0.1	0	0	0.5	4303	20.7	5.72	1.3	1.1	0.9	0
3004	8.46	5.56	0.2	0	0	0	4401	26.3	5.69	0.2	0	0.2	0
3101	16.1	5.45	0.1	0	0	0	4402	27.6	5.78	0.2	0	0	0.8
3102	13.6	5.46	0.1	0.7	0.3	0	4501	34.3	5.66	0.2	0	0.4	0
3103	14.8	5.5	0	0	0	0	4502	31.7	5.68	0.1	0	0.7	0
3104	16.5	5.61	0.6	0	0	0	4503	34.3	5.69	0.3	0.7	0.7	0
3201	19.2	5.46	0.1	0	0	0	4504	32	5.73	0.6	0.1	1.1	1
3202	17.9	5.48	0.1	0.1	0.5	0.1	4505	34.4	5.75	0.1	0	0	0
3203	18.2	5.56	0.7	1.2	0.7	0	4506	33.5	5.8	0.1	0	0	0
3204	18.5	5.59	0.4	0.8	0	0	4601	36.8	5.63	0.1	0	0	0.3
3205	17.1	5.61	0.3	0	0.2	0.3	4602	36	5.65	0.3	0	0	0
3301	20.5	5.5	0	0	0	0	4603	38.9	5.68	0.2	0	0	0.1
3302	22.6	5.51	0.8	0.1	0.8	0.2	4604	37	5.69	0.3	0.4	1.1	0
3303	21.6	5.54	0.3	0	0.4	0	4605	37	5.76	0.2	0	0.4	0
3304	22.6	5.59	0.2	0	0	0.3	4701	41.3	5.68	0.1	0	0	0
3401	25.2	5.5	0.1	0	0	0	4702	39.7	5.69	0.5	0	0	0
3402	29.3	5.53	0.1	0	0	0	4703	41	5.73	0.3	0	0	0
3403	26.8	5.54	0.1	0	0	0	4704	39.9	5.76	0.4	0	0.2	0
3404	29.4	5.59	0.7	0	0.3	0.3	4705	39.7	5.78	0.2	0	0	0.2
3405	26.5	5.61	0.2	0	0.1	0	4801	44.1	5.66	0.1	0	0	0
3501	34	5.47	0.7	0.5	1.4	0	4802	46.8	5.74	0.1	0	0	0
3502	34.8	5.5	0.2	0	0	0	4803	46.6	5.8	0.1	0	0	0.1
3503	34	5.57	1	1.2	3.4	0	4901	55.5	5.67	0	0	0	0
3504	32.2	5.61	0.6	0.5	1.1	0	4902	60.4	5.79	0.1	0	0	0
3601	36.3	5.46	0.3	0	0	1.3	5001	8.4	5.82	0.2	0	0	0
3602	36.3	5.55	0.4	0	0	0	5002	12.9	5.88	0.6	1.4	2.4	1.6
3603	37.5	5.56	0	0	0	0	5003	13	5.99	0.1	0.2	0	0.1
3604	39.4	5.56	0.1	0	0	0	5101	15.7	5.83	0.2	0	0	0
3605	37.2	5.6	0.1	0	0	0	5201	18.6	5.81	0.9	0.6	0	0
3606	38.6	5.61	0.1	0	0	0	5202	17.1	5.84	0.1	0	0	0
3701	39.8	5.47	0.9	0.2	0.2	0.4	5203	17.1	5.88	0.2	1.6	0.5	0.2
3702	43.7	5.56	0	0	0	0	5204	18.4	5.88	0.4	0	0	0
3801	48.3	5.45	0.1	0	0	0	5205	19.2	5.89	0.3	0	0	0

3802	53.9	5.47	0.3	0	0	0	5206	18.4	5.95	0.9	0.4	0.3	0.8
3803	52.7	5.47	0.6	0.2	0.1	1.2	5301	21.2	5.81	0.2	0.1	0	0.1
3804	47.3	5.57	0.1	0	0	0	5302	20.7	5.88	0.2	0.3	0.6	0.4
3805	52.3	5.58	0.6	0	0	0.4	5303	19.7	6	0.1	0.2	0.3	0.4
3806	45.4	5.6	0.1	0	0	0	5304	20.5	6	0.1	0	0	0.3
3807	44.1	5.61	0.1	0	0	0	5401	31.2	5.85	0.6	0.2	1	1
3901	58	5.5	0.4	0	0	0	5501	33.6	5.86	0	0	0	0
3902	55.3	5.5	0	0	0	0	5502	33	5.88	0.1	0	0	0
3903	55.4	5.57	0.1	0	0	0	5503	34.9	5.91	0.3	0	0	0
4001	8.57	5.64	0	0	0	0	5504	34.5	5.93	0.4	0	0	0.7
4002	8.38	5.7	0.1	0	0	0	5505	35.5	5.95	0.2	0	0	0
4003	12.8	5.75	0.3	0.3	0.5	0.2	5601	36.1	5.84	2.2	0	1.9	0
4004	8.34	5.75	0	0	0	0	5602	38.4	5.88	0.2	0	0	0.1
4101	14.8	5.63	0.3	0.3	0.5	0.1	5603	39.3	5.99	1.5	0.1	0.2	0
4102	15.3	5.7	0.1	0	0	0	5701	41.1	5.81	0.3	0	0	0
4201	19.1	5.69	0.3	0	0	0	5702	40.8	5.87	0.3	0	0	0
4202	17	5.69	0.1	0	0	0	5703	40.3	5.89	0.5	0	0	0.8
4203	18.4	5.71	0.4	1	0.7	0	5704	40	5.95	0.4	0	0	0
5705	40.8	5.97	0.7	0	0	0	7108	16.2	-1	0.3	0	0	0.1
5706	40.7	6.04	0.3	0	0	0.4	7201	17.1	6.77	0.1	0.2	0.6	0
5801	45.2	5.83	0.1	0	0	0	7301	22.6	6.52	0.2	0.5	0	0.6
5802	51.7	5.85	0.4	0	0	0	7302	20.1	6.59	0.1	0	0	0
5803	48.9	5.85	0.2	0	0	0	7303	20.1	6.69	0.6	0.3	0.1	0.3
6001	8.45	6.07	0.7	0	0	0	7304	22	6.69	0.2	0.4	0.5	0.5
6002	8.68	6.08	0.2	0	0.1	0	7305	20.2	6.77	0.3	0	0	0
6003	13	6.13	0.1	0.4	0.4	0	7306	22	-1	0.3	0.2	0	0.3
6004	8.8	6.39	0.1	0	0	0	7501	32.8	6.61	0.4	0.4	0	0.4
6005	12.5	6.44	0.1	0.2	0	0	7502	32.2	6.73	0.5	0.6	0	1
6006	8.44	6.48	0.2	0	0.2	0	7503	33.7	-1	0.3	0.2	0	0.4
6101	13.3	6.06	1.4	2.5	1.2	0.1	7601	39	6.52	0.2	0	0	0.2
6102	14.2	6.08	0.1	0	0	0.4	7602	38	6.66	0.2	0.7	0.5	0
6103	15.9	6.09	0.1	0	0	0.2	7603	36.1	6.71	0.2	0	0	0
6104	13.7	6.15	0.2	0.4	0	0.4	7604	38.9	6.77	0	0	0	0
6105	15.6	6.16	0.1	0.8	0.6	0.5	7605	36.4	-1	0.1	0.1	0	0.1
6106	16.3	6.3	0.1	0	0	0	7701	40.1	6.62	0.1	0	0	0
6107	14.9	6.41	0	0.2	0	0	7702	40.6	6.72	0.3	0.6	0.6	0.8
6108	13.8	6.48	0.1	0	0	0	7703	42.1	6.72	0.1	0.1	0	0
6201	18.6	6.09	1.8	3.5	0.6	0	7801	46.3	6.62	0.1	0	0	0
6202	19.2	6.15	0	0	0	0	7802	44.4	6.73	0.2	0.1	0	0.1
6203	17.5	6.17	0.1	0.5	0	0	7803	46.1	6.77	0.1	0	0	0
6204	18.9	6.26	0.1	0.2	0	0	8001	8.45	-1	0.2	0.8	0	0
6205	17.8	6.37	0.2	1.2	0.2	0.3	8101	14.6	-1	0.1	0	0.1	0
6206	17.1	6.38	0.2	0	0.4	0	8102	13.3	-1	0.3	0	0	0.5
6301	20.5	6.11	0.1	0.1	0	0.2	8103	15	-1	0.2	0.3	0	0
6302	20.1	6.24	0.1	0	0	0	8104	15.9	-1	0.1	0	0	0
6303	20	6.32	0.4	0.4	0.4	1.3	8105	14	-1	0.1	0	0	0
6401	30.2	6.07	0.1	0	0	0	8106	16.1	-1	0.1	0.4	0.5	0.4

6402	30.7	6.08	0.1	0	0	0.4	8201	17.5	-1	0.2	0	0	0
6403	30.1	6.14	0	0	0	0	8202	18.1	-1	0.1	0.1	0	0
6404	30	6.2	0.4	0.9	0.1	0.8	8203	18.8	-1	0.2	0.5	0	0.2
6405	24	6.31	0	0	0	0.1	8204	19.5	-1	0.1	0	0	0
6501	33.7	6.08	0.1	0.1	0	0.2	8205	16.8	-1	0.1	0	0	0
6502	33	6.11	0.1	0	0	0.2	8301	20	-1	0.8	1.2	1.7	1
6503	33.8	6.26	0.4	0.4	0	0.8	8302	21.4	-1	0.1	0	0	0
6504	33.5	6.39	0.1	0.1	0	0.3	8303	23.1	-1	0.1	0.9	0	0.3
6601	38.7	6.16	0.5	0.6	0	0.8	8304	19.8	-1	0.1	0	0	0
6701	43.1	6.06	0.2	0.1	0	0.4	8305	21.4	-1	0.5	0.7	0.4	0
6702	41.9	6.11	0.1	0	0	0.1	8306	21.3	-1	0.2	0	0	0.2
6703	43.6	6.15	0.2	0	0	0.3	8401	25.6	-1	0.1	0.2	0	0.3
6704	42.6	6.19	0.2	0.1	0	0.3	8501	32.4	-1	0	0	0	0
6801	44	6.48	0.1	0	0	0.1	8502	32.4	-1	0.2	0	0	0.2
6901	59.5	6.41	0.1	0	0	0	8503	33.8	-1	0.3	0	0	0.3
7001	9.29	6.55	0	0	0	0	8504	33.7	-1	1	0.6	0.2	0.9
7002	8.55	6.75	0.1	0.2	0	0	8601	38.6	-1	0.1	0	0	0
7003	13	6.8	0.6	3.5	1.5	0.8	8602	36.2	-1	0.3	0	0	0
7101	16.5	6.52	0.2	0.4	0	0	8603	38.8	-1	0.1	0	0	0
7102	13.4	6.54	0.2	0.3	0	0.8	8604	36.2	-1	0.7	0.1	0	0.1
7103	15.9	6.6	0.3	1.3	0.2	0.5	8605	38.7	-1	0.2	0	0	0
7104	14.2	6.65	0	0.2	0	0	8606	38.7	-1	0.6	0	0	0.2
7105	15.9	6.67	0.4	0	0	0	8607	38.4	-1	0.1	0	0	0
7106	13.3	6.7	0.3	0	0	0	8701	39.6	-1	0.1	0.4	0	0.2
7107	13.5	6.79	0.7	0	0	0	8702	41	-1	0	0	0	0
8703	42.2	-1	0.2	0	0	0.2							
8704	40.9	-1	0.2	0	0.6	0.2							
8705	42.1	-1	0.3	0.1	0.4	0.2							
8706	42.5	-1	0.5	0	0.5	0.9							
8707	41.3	-1	0.1	0	0	0							
8708	42.4	-1	0.2	0	0	0							
9001	13	-1	0.3	0	0	0.4							
9002	8.42	-1	0.3	2.8	0	0							
9101	16.5	-1	0.1	0	0	0							
9102	15.7	-1	0.1	0.3	0	0							
9201	17.3	-1	0.2	0	0	0							
9202	17.3	-1	0.1	0.5	0	0							
9203	17.2	-1	0.1	0	0	0							
9301	22.8	-1	0.1	0	0	0							
9401	26.1	-1	0.3	0	0	0							
9402	26	-1	0.3	0	0	0.4							
9403	25.4	-1	0.2	0	0	0							
9404	24.9	-1	0.2	0	0	0							
9501	33.4	-1	0.2	0	0	0							
9502	32.7	-1	0.2	0	0	0							
9701	43.5	-1	0.2	0	0	0.1							
9702	43.5	-1	0.3	0	0	0							

9703	42.7	-1	0.8	0.1	0	0
9704	42	-1	1.5	0	0	0
9705	42.3	-1	2.4	1.3	0	0
9801	44	-1	0.7	0	0.4	0
9802	44	-1	1.1	0	0	0.6

**ANEXO 15. PROTEÍNAS DE LA CEPA VER-6 CON AMORTIGUADOR DE LISIS
DE UREA 7 M Y TIOUREA 2 M.**

SSP	Mr	pl	vertu3 01003	vertu2 30603	vertu13 0603	SSP	Mr	pl	vertu3 01003	vertu2 30603	vertu1 30603
1	10.03	-1	0	0	0.1	1103	14.04	4.78	0	0	1
2	10.46	-1	0	0	0.2	1104	12.75	4.87	0	0	0.1
3	10.01	-1	0	0	0.5	1105	15.59	4.88	0	0	0.4
4	9.04	-1	0	0.9	0.2	1106	14.75	4.89	0	0	0.4
5	10.19	4.67	0	0	0.1	1107	11.84	4.9	0	0	0.1
101	12.52	-1	0	0	0.2	1108	12.88	4.95	0	0	0.1
102	11.4	-1	0	0	0.7	1201	17.93	4.74	0	0	0.3
103	11.49	-1	0	0	0.1	1202	16.19	4.78	0	0	0.1
104	10.73	-1	0	0	0.1	1203	18.61	4.81	0	0	0.7
105	10.76	-1	0	0	0.1	1204	17.56	4.86	0	0	0
106	10.67	-1	0	0	0.1	1205	17.63	4.96	0	0	0.1
107	12.08	-1	0	0	0.1	1301	20.8	4.8	0	0	0.1
108	10.87	-1	0	0	0.1	1302	20.6	4.92	0	0	0.1
109	16.07	-1	0	0	0.1	1303	19	4.95	0	0	0.2
110	12.6	4.6	0.5	1.3	1.2	1401	23.27	4.73	0	0	0
111	15.98	4.62	0	0	0	1402	21.39	4.76	0	0	0.1
112	15.36	4.68	0	0	0.2	1403	23.64	4.8	0	0	0
113	11.17	4.68	0	0	0.4	1404	22.88	4.82	0	0	0.1
202	16.3	-1	0	0.3	0.2	1405	22.33	4.95	0	0	0.1
203	18.3	-1	0	0	0.2	1406	21.67	4.96	0	0	0
204	18.79	4.61	0	0	0.1	1501	25.72	4.71	0	0	0.1
205	17	4.63	0	0	0.4	1502	27.79	4.72	0	0	0
303	20.72	-1	0	0	0.1	1503	24.92	4.77	0	0	0.1
304	21.16	-1	0	0	0.1	1504	28.53	4.82	0	0	0.1
305	20.27	-1	0	0	0.2	1505	26.55	4.89	0	0	0
306	20.29	4.61	0	0	0.4	1506	24.17	4.92	0	0	0
401	22.2	-1	0	0	1	1601	29.31	4.7	0	0	0
402	21.38	4.68	0	0	0.1	1602	32.28	4.72	0	0	0.1
501	24.67	-1	0	0.1	0.1	1603	31.25	4.77	0	0	0.2
502	26.93	4.6	0	0	0.7	1604	34.36	4.8	0	0	0
601	34.61	4.64	0	0.2	0.4	1605	35.28	4.86	0	0	0.2
602	31.57	4.65	0	0	0.1	1606	32.52	4.89	0	0	0.1
701	36.78	-1	0	0	0.1	1701	36.64	4.7	0	0	0.1
702	41.42	-1	0	0.1	0.4	1702	38.04	4.71	0	0	0.3
801	44.8	-1	0	0	0.4	1703	42.3	4.85	0	0	0.2
802	48.8	-1	0	0	0	1704	38.68	4.85	0	0	0
803	43.22	-1	0	0	0.3	1705	40.68	4.87	0	0	0.1
804	55.53	-1	0	0	1	1706	40.46	4.91	0	0	0.1
805	49.39	-1	0	0.2	0.1	1707	38.4	4.92	0	0	0
806	55.42	-1	0	0	0.4	1708	42.31	4.95	0	2.9	0.3
807	46.37	-1	0	0	0.1	1801	42.82	4.69	0	0	0.2
808	45.52	4.68	0	0	0.1	1802	48.89	4.73	0	0	0.1

901	120.4	-1	0	0	0.4
902	79.45	4.62	0	0	0
1001	10.37	4.73	0	0	0
1002	8.98	4.73	0	0	0.4
1003	8.2	4.79	0	0	0.1
1004	9.38	4.92	0	0	0.1
1005	8.67	4.93	0	0	0.1
1006	10.26	4.93	0	0	0.5
1101	11.07	4.76	0	0	0.6
1102	15.05	4.77	0	0	0.2
1907	72.81	4.94	0	0	0.4
1908	94.53	4.95	0	0	0.3
2001	8.89	5.02	0	0	0.1
2002	10.01	5.03	0	0	0.6
2003	9.44	5.08	0	0	0
2004	7.97	5.09	0	0.2	0.3
2005	9	5.16	0	0	0.4
2006	8.23	5.18	0	0	0
2101	13.8	4.98	0	0	0.1
2102	10.9	5	0	0	0.1
2103	11.97	5.01	0	0	0
2104	12.53	5.08	0	0	0
2105	14.1	5.09	0	0	0.2
2106	11.78	5.1	0	0	0
2107	10.76	5.17	0	0	0.2
2201	17.87	5.1	0	0	0.2
2202	18.43	5.11	0	0	0.1
2203	16.23	5.13	0	0	0.1
2204	17.09	5.2	0	0	0
2205	18.12	5.21	0	0	0
2301	20.57	4.98	0	0	0
2302	19.14	5.06	0	0	0
2303	20.35	5.07	0	0	0.4
2401	23.53	5	0	0	0
2402	21.66	5.04	0	0	0
2403	23.45	5.13	0	0	0.2
2404	22.12	5.16	0	0	0.2
2405	21.47	5.22	0	0	0.1
2501	25.04	5.03	0	0	0.1
2502	27.15	5.04	0	0	0.2
2503	25.93	5.15	0	0.3	0.2
2504	28.82	5.16	0	0	0.1
2505	27.69	5.17	0	0	0.2
2506	24.12	5.22	0	0	0.1
2507	27.15	5.23	0	0	0.2
2601	34.03	4.97	0	0	0
2602	35.35	4.99	0	0	0.1
1803	57.15	4.75	0	0	0.4
1804	43.81	4.75	0	0	0
1805	47.08	4.83	0	0	0.3
1806	48.81	4.96	0	0.1	0.7
1901	65.97	4.71	0	0.7	0.5
1902	65.18	4.82	0	0	0
1903	78.84	4.83	0	0	0.1
1904	61.25	4.84	0	0	0.2
1905	65.11	4.89	0	0	0
1906	61.02	4.93	0	0	0.4
2805	43.48	5.23	0	0	0
2806	50.14	5.24	0	0	0
2901	64.86	4.98	0	0	0
2902	72.58	5.02	0	0	0.1
2903	95.1	5.05	0	0	0.1
2904	63.88	5.06	0	0	0.3
2905	80.87	5.07	0	0	0
2906	80.46	5.18	0	0	0.9
3001	8.24	5.26	0	0	0
3002	9.66	5.28	0	0	0
3003	8.55	5.32	0	0	0.1
3004	9.97	5.39	0	0	0.2
3005	8.27	5.47	0	0	0.1
3006	8.73	5.47	0	0	0
3007	9.64	5.49	0	0	0.2
3101	14.87	5.31	0	0	0.1
3102	10.69	5.38	0	0	0.7
3103	12.4	5.42	0	0	0.6
3104	15.22	5.43	0	0	0.1
3105	14.82	5.48	0	0	0.3
3201	16.3	5.34	0	0	0.6
3202	17.45	5.4	0	0	0.1
3203	18.24	5.4	0	0	0.1
3204	16.66	5.47	0	0	0.2
3301	20.31	5.27	0	0.2	0.3
3302	20.12	5.31	0	0	0.1
3303	19.81	5.34	0	0	0.1
3304	19.3	5.43	0	0	0.1
3305	20.79	5.44	0	0	0.1
3306	20	5.47	0	0	0.2
3401	21.4	5.27	0	0	0.1
3402	23.86	5.38	0	0	0.1
3403	22.33	5.39	0	0	0.2
3404	21.67	5.42	0	0	0.3
3405	23.57	5.46	0	0	0.2
3406	22.92	5.48	0	0	0.4
3407	21.36	5.49	0	0	0.1

2603	32.83	5.04	0	0	0.1	3501	25.7	5.3	0	0	0.3
2604	30.78	5.05	0	0	0	3502	27.12	5.31	0	0	0.2
2605	32.53	5.07	0	0	0.1	3503	25.77	5.38	0	0	0.1
2606	29.1	5.11	0	0	0.1	3504	28.46	5.4	0	0	0.1
2607	31.54	5.11	0	0	0.1	3505	26.08	5.43	0	0.6	0.4
2608	33.35	5.21	0	0.1	0.1	3506	28.53	5.43	0	0	0.1
2609	29.29	5.22	0	0	0.1	3507	24.55	5.47	0	0	0.1
2610	31.66	5.22	0	0	0.4	3601	31.57	5.3	0	0	0.1
2701	38.37	5.05	0	0	0.3	3602	33.59	5.33	0	0	0.4
2702	41.95	5.07	0	0	0.7	3603	31.13	5.36	0	0	0.4
2703	36.78	5.14	0	0	0.9	3604	29.77	5.43	0	0	0.3
2704	41.62	5.18	0	0	0.2	3605	33.66	5.44	0	0	0
2705	38.39	5.21	0	0	0	3606	30.33	5.47	0	0	0.1
2801	48.35	5.04	0	0	0.2	3607	33.18	5.49	0	0	0
2802	48.95	5.13	0	0	0.2	3701	41.74	5.31	0	0	0.3
2803	56.59	5.14	0	0	0.3	3702	37.68	5.33	0	0	0
2804	44.18	5.16	0	0	0.1	3703	41.81	5.39	0	0	0.1
3704	37.58	5.41	0	0	0.2	4708	38.65	5.65	0	0	0.2
3705	38.67	5.41	0	0	0.2	4801	50.41	5.54	0	0	0.1
3706	36.96	5.44	0	0.4	0.1	4802	50.81	5.56	0	0	0.1
3707	38.15	5.48	0	0.3	1.1	4803	58.54	5.57	0	0	0.1
3801	44.43	5.42	0	0	0.2	4804	54.61	5.57	0	0	0
3802	43.97	5.48	0	0.7	0.5	4805	55.46	5.62	0	0	0.2
3901	81.6	5.28	0	0	0.2	4806	48.01	5.63	0	0	0.3
3902	97.2	5.32	0	0	0.1	4807	42.87	5.64	0	0.1	0.3
3903	77.24	5.32	0	0	0.2	4901	87.1	5.55	0	0	0.1
3904	98.65	5.39	0	0	0.1	4902	62.46	5.57	0	0	0.1
3905	82.1	5.4	0.1	0.2	0.4	4903	61.8	5.64	0	0	0.3
3906	95.21	5.42	0	0.4	0.3	5001	8.95	5.77	0	0	0.3
3907	64.33	5.46	0	0	0	5002	10.34	5.84	0	0	0
4001	9.79	5.55	0	0	0.8	5003	9.49	5.85	0	0	0.2
4002	7.97	5.66	0	0	0.2	5101	14.63	5.67	0	0	0.2
4101	11.79	5.5	0	0	0	5102	16.09	5.83	0	0	0
4102	12.22	5.51	0	0	0.1	5201	17.16	5.69	0	0	0.1
4103	11.14	5.55	0	0	0.1	5202	16.51	5.69	0	0	0.1
4104	10.85	5.62	0	0	0.1	5203	18.43	5.73	0	0	0.1
4201	18.29	5.51	0	0	0	5204	16.9	5.74	0	0	0
4202	16.8	5.57	0	0	0.4	5205	16.81	5.79	0	0.4	0.3
4203	17.71	5.57	0	0	0.2	5206	17.35	5.84	0	0	0.2
4204	16.61	5.6	0	0	0.1	5301	20.78	5.67	0	0	0.2
4205	18.26	5.61	0	0	0.3	5302	19.78	5.68	0	0	0
4301	20.73	5.5	0	0	0.1	5303	20.7	5.76	0	0	0
4302	19.95	5.5	0	0.2	0.3	5304	19.66	5.78	0	0	0
4303	19.89	5.6	0	0	0.5	5305	20.6	5.79	0	0	0.1
4304	19.44	5.65	0	0	0.3	5306	19.07	5.8	0	0	0.1
4401	21.86	5.56	0	0	0.8	5307	20.33	5.82	0	0	0
4402	23.82	5.56	0	0	0.2	5401	21.92	5.68	0	0	0

4403	23.69	5.59	0	0.7	0.3	5402	22.48	5.69	0	0	0.2
4404	22.02	5.61	0	0	0.1	5403	22.38	5.73	0	0.3	0.2
4405	22.64	5.62	0	0	0.1	5404	21.88	5.75	0	0	0.1
4406	23.76	5.64	0	0	0	5405	21.72	5.81	0	0	0.1
4407	22.65	5.66	0	0	0.1	5406	22.46	5.82	0	0	0.4
4501	25.9	5.5	0	0	0.4	5501	28.85	5.67	0	0	0.1
4502	27.21	5.51	0	0	0.1	5502	24.43	5.69	0	0	0.5
4503	28.46	5.55	0	0	0	5503	26.72	5.72	0	0	0.1
4504	28.76	5.61	0	0.1	0.5	5504	28.96	5.72	0	0.2	0.2
4505	26.35	5.61	0	0	0.1	5505	24.41	5.74	0	0.2	0.3
4506	25.83	5.65	0	0	0.2	5506	25.68	5.75	0	0	0.1
4601	30.69	5.51	0	0	0.2	5507	26.85	5.83	0	0.2	0.2
4602	29.37	5.52	0	0	0.1	5508	24.32	5.83	0	0.1	0.4
4603	33.14	5.57	0	0	0.1	5601	31.7	5.68	0	0	0.1
4604	30.91	5.58	0	0	0.4	5602	34.44	5.7	0	0	0.5
4605	34.52	5.6	0	0.4	0.3	5603	33.63	5.72	0	0.4	0.4
4606	33.17	5.61	0	0.1	0.1	5604	29.71	5.76	0	0	0.1
4701	36.22	5.55	0	0	0.3	5605	31.52	5.77	0	0	0.5
4702	41.15	5.55	0	0	0	5606	33.4	5.8	0	0	0.1
4703	37.31	5.56	0	0	0.6	5701	36.05	5.66	0	0	0.2
4704	37.6	5.6	0	0	0.2	5702	37.71	5.67	0	0.7	0.2
4705	40.94	5.61	0	0	0	5703	38.66	5.67	0	0	0.1
4706	37.03	5.63	0	0	0.3	5704	39.94	5.71	0	0	0.4
4707	40.29	5.64	0	0	0	5705	38.57	5.75	0	0	0.4
5706	37.4	5.76	0	0	0.6	6504	24.7	5.98	0	0	0.1
5707	39.81	5.8	0	2.2	0.7	6505	27.96	6.09	0	0	0
5708	38.64	5.83	0	0	0.6	6506	25.49	6.11	0	0	0.1
5801	55.71	5.69	0	0	0.1	6601	31.45	5.87	0	0	0.1
5802	48.37	5.69	0	0	0.3	6602	33.1	5.91	0	0	0.4
5803	46.57	5.7	0	0.1	0.2	6603	31.4	6.02	0	0	0
5804	43.47	5.74	0	0	0.1	6604	35	6.03	0	0	0
5805	46.11	5.75	0	0.1	0.3	6605	29.59	6.04	0	0	0
5806	48.13	5.75	0	0	0.1	6606	34.77	6.08	0	0	0
5807	55.14	5.78	0	0	0	6607	33.59	6.1	0	0	0.1
5808	46.17	5.78	0	0	0.2	6608	31.4	6.16	0	0.7	0.3
5809	46.21	5.84	0	0.8	0.2	6609	35.1	6.17	0	0	0.2
5901	77.77	5.67	0	0	0.3	6701	36.88	5.89	0	0	0
5902	64.6	5.72	0	0	0	6702	41.76	6.03	0	0	0.1
5903	63.83	5.81	0	0.2	0.4	6703	36.81	6.08	0	0	0.1
6001	8.34	5.86	0	0	0	6801	46.01	5.88	0	0.5	0.7
6002	10.26	5.99	0	0	0.3	6802	48.81	6.02	0	0.1	0.3
6003	8.63	6	0	0	0.2	6803	44.46	6.05	0	0	0.1
6004	10.33	6.03	0	0	0.2	7001	8.61	6.25	0	0	0.3
6005	9.22	6.06	0	0.2	0.7	7002	9	6.32	0	0	0.1
6006	8.4	6.14	0	0	0	7003	8.34	6.35	0	0	0.2
6007	9.3	6.16	0	0	0	7004	9.9	6.46	0	0	0.1
6101	16.01	5.99	0	0	0.5	7005	8.32	6.63	0	0	0.1

6102	11.3	6.01	0	0	0.1
6103	13.49	6.02	0	0	0
6104	13.37	6.07	0	0	0.1
6105	12.16	6.09	0	0	0.1
6201	18.89	5.87	0	0	0.1
6202	16.17	5.89	0	0	0
6203	16.78	5.99	0	0	0.9
6204	17.68	6.03	0	0	0.2
6205	16.47	6.08	0	0.1	0.3
6206	17.12	6.1	0	0	0.1
6207	18.78	6.12	0	0	0
6301	19.97	5.89	0	0	0
6302	20.45	5.95	0	0	0.2
6303	19.57	5.99	0	0	0.2
6304	21.22	5.99	0	0.1	0.4
6305	19.23	6.02	0	0	0
6306	19.42	6.07	0	0.3	0.2
6307	20.55	6.09	0	0	0
6308	20.74	6.15	0	0	0.1
6401	21.81	5.86	0	0.4	0.6
6402	23.83	5.88	0	0	0.1
6403	23.54	5.97	0	0	0
6404	22	6	0.6	1.3	0.5
6405	23.41	6.02	0	0	0
6406	21.91	6.06	0	0	0.6
6407	23.21	6.07	0	0	0.1
6408	23.79	6.11	0	0	0.1
6409	22.05	6.14	0	0	0.2
6501	28.28	5.87	0	0	0.1
6502	27.76	5.88	0	0	0
6503	25.97	5.89	0	0	0
7504	27.44	6.65	0	0	0
7601	35.83	6.24	0	0.4	0.2
7602	33.62	6.26	0	0	0
7603	33.64	6.5	0	0	0
7701	41.49	6.24	0	0	0.3
7702	39.02	6.41	0	0	0.1
7703	41.88	6.49	0	0.1	0.1
7704	40.67	6.55	0	0	0.1
7705	42.46	6.65	0	0	0
7706	38.32	6.66	0	0.1	0.1
7801	43.92	6.3	0	0	0
7802	50.48	6.42	0	0.1	0.1
7803	56.52	6.55	0	0	0.1
7804	43.69	6.65	0	0.1	0.1
7805	51.8	6.66	0	0	0
7901	97.86	6.38	0	0	0.1
7101	13.11	6.2	0	0	0.1
7102	11.25	6.22	0	0	0.4
7103	11.4	6.3	0	0	0.2
7104	14.28	6.36	0	0	0.1
7105	12.32	6.48	0	0	0.1
7106	14.22	6.62	0	0	0
7107	12.6	6.62	0	0	0.1
7201	17.04	6.18	0	0	0.1
7202	17.53	6.28	0	0	0.4
7203	16.97	6.41	0	0.1	0.3
7204	17.31	6.47	0	0	0
7205	17.09	6.51	0	0	0.2
7206	18.75	6.57	0	0	0.1
7301	19.19	6.23	0	0	1
7302	20.74	6.33	0	0.1	0.1
7303	19.4	6.36	0	0	0.1
7304	20.13	6.37	0	0	0.1
7305	19.13	6.52	0	0.2	0.3
7306	21.01	6.54	0	0	0
7307	20.36	6.67	0	0	0.8
7401	21.71	6.2	0	0	0.1
7402	22.79	6.24	0	0	0.1
7403	21.94	6.28	0	0	0
7404	21.32	6.33	0	0	0.1
7405	21.69	6.44	0	0	0.2
7406	22.16	6.49	0	0	0.1
7407	21.89	6.6	0	0	0.1
7408	22.51	6.63	0	0	0.1
7501	25.01	6.28	0	0	0.3
7502	24.3	6.43	0	0	0
7503	28.79	6.5	0	0	0
8605	35.07	-1	0	0	0.3
8701	39.61	-1	0	0	0
8702	42.54	-1	0	0.1	0.1
8703	40.97	-1	0	0	0.1
8704	37.63	-1	0	0	0
8705	42.25	-1	0	0	0.1
8706	41.14	-1	0	0.3	0.1
8707	41.3	-1	0	0	0.2
8708	41.42	-1	0	0	0.1
8801	53.25	-1	0	0	0
8802	43.66	-1	0	0	0
8803	45.2	-1	0	0	0
8804	45.76	-1	0	0	0
8805	48.65	-1	0	0	0.1
8806	48.5	-1	0	0	0.1
8901	61.81	-1	0	0	0

8001	10.52	-1	0	0	0.2
8002	10.46	-1	0	0.8	0.8
8003	10.45	-1	0	0	0.7
8101	10.74	-1	0	0	0.3
8201	17	6.7	0.5	0.9	0.9
8202	17.89	-1	0	0	0
8203	18.24	-1	0	0	0.3
8204	16.93	-1	0	0	0.1
8205	17.88	-1	0	0	0.3
8206	17.43	-1	0	0	0.1
8301	20.06	-1	0	0	0.1
8302	20.87	-1	0	0	0.1
8303	18.97	-1	0	0	0.1
8304	21.16	-1	0	0	0.1
8305	20.29	-1	0	0	0
8306	20.38	-1	0	0	0.1
8307	20.41	-1	0	0	0.2
8308	19.64	-1	0	0	0.1
8401	22.42	-1	0	0.6	0.7
8402	23.57	-1	0	0	0.3
8403	23.78	-1	0	0	0.5
8404	22.7	-1	0	0	0.1
8405	22.7	-1	0	0	0
8406	23.84	-1	0	0	0.2
8407	22.63	-1	0	0	0.1
8408	23.82	-1	0	0	0.1
8501	24	-1	0	0	0.1
8502	25.21	-1	0	0	0
8503	25.13	-1	0	0	0
8504	24	-1	0	0	0.1
8505	26.51	-1	0	0	0
8506	26.34	-1	0	0	0
8507	26.68	-1	0	0	0
8508	26.86	-1	0	0	0.1
8601	31.35	6.69	0	0.2	0.1
8602	31.7	-1	0	0	0
8603	34.97	-1	0	0	0.1
8604	34.48	-1	0	0	0.1

8902	109.27	-1	0	0	0
9001	10.49	-1	0	0.1	0.2
9002	8.58	-1	0	0	0.2
9003	8.84	-1	0	0	0.1
9004	8.36	-1	0	0.1	0.3
9101	10.68	-1	0	0	0.2
9102	15.54	-1	0	0	0.1
9201	17.95	-1	0	0	0
9202	17.93	-1	0	0	0
9203	17.77	-1	0	0	0
9301	21.03	-1	0	0	0
9302	20.88	-1	0	0	0.1
9303	19.32	-1	0	0	0.1
9304	21.05	-1	0	0	0
9501	25.78	-1	0	0	0.1
9601	34.84	-1	0	0	0.3
9602	34.55	-1	0	0.2	0.4
9701	40.63	-1	0	0	0.1
9801	48.16	-1	0	0	0
9802	50.79	-1	0	0	0.1
9803	47.96	-1	0	0.2	0.3