



UNIVERSIDAD NACIONAL **UNAM**
AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y
DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOQUÍMICA

Identificación de proteínas
carboniladas en estrés oxidante
causado por peróxido de hidrógeno
en *Trypanosoma cruzi*

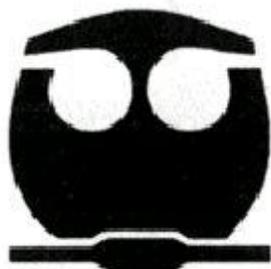
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A:

RODRIGO MARTÍNEZ ESPINOSA

Tutor: DRA. BERTHA ESPINOZA GUTIÉRREZ



MÉXICO, D. F.

AGOSTO 2010.



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.

Reconocimientos

El presente trabajo de Maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez en el laboratorio de Tripanosomiasis, en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. José Pedraza Chaverri	Facultad de Química, UNAM
Dra. Ma. Elena Ibarra Rubio	Facultad de Química, UNAM
Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez	Instituto de Investigaciones Biomédicas,
UNAM	

Se reconoce la colaboración de la Q.A. María Viridiana Olin Sandoval y de la Dra Ema Saavedra, del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, en la determinación de la actividad de la enzima tripanotión reductasa, así como en la determinación de la molécula tripanotión.

Se reconoce la colaboración del Q.F.B. Martín Silva Aguilar y del Dr. Emilio Rojas del Castillo, del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, por la asesoría en los ensayos de detección de especies reactivas de oxígeno por Dihidrorodamina-123.

El proyecto fue apoyado por la DGAPA, UNAM (Proyecto 229209).

Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT (Becario No. 215120).

Índice

Resumen	0
1. Introducción	1
1.1. Ubicación Taxonómica	1
1.2. Morfología	1
1.3. Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	2
1.4. Características genéticas de <i>T. cruzi</i>	4
1.5. La enfermedad de Chagas	5
1.5.1 Epidemiología	5
1.5.2. Transmisión de la enfermedad	6
1.5.3 Manifestaciones clínicas	6
1.6. Respuesta inmune	7
1.7. Tratamiento	8
1.7.1 Mecanismos de acción de Nifurtimox y Benznidazol	9
1.8. Especies Reactivas de Oxígeno	10
1.9. Estrés oxidante	12
1.9.1. Daño en proteínas: Carbonilación oxidativa	13
1.10. Sistemas de defensa biológica contra estrés oxidativo	16
1.10.1. Sistemas de defensa en parásitos	16
1.10.2. Sistema de defensa en <i>T. cruzi</i>	15
2. Antecedentes	18
2.1. Generalidades de cepas mexicanas	21
2.2. Susceptibilidad a fármacos	21
2.3. Efecto del H ₂ O ₂ en cepas mexicanas de <i>T. cruzi</i>	22
2.4. Planteamiento del problema	22
3. Hipótesis	24
4. Objetivo general	24
5. Objetivo	
Particular	24
6. Materiales y Métodos	25
6.1. Cultivo de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> en fase logarítmica	25
6.2. Ensayo de exposición de <i>T. cruzi</i> a H ₂ O ₂	25
6.3. Obtención y cuantificación de proteínas totales de <i>T. cruzi</i>	25
6.4. Derivatización de proteínas	26
6.5. Electroforesis e inmunodetección en una dimensión	27
6.6. Ensayo para detección de HSP70	28
6.7. Ensayo de detección de ROS por Dihidrorodamina 123	28
6.8. Ensayo actividad de tripanotión reductasa	29

6.9. Ensayo de medición de tripanotión reducido.....	29
6.10. Detección de proteínas carboniladas por electroforesis bidimensional.....	30
6.11 Análisis de imágenes y búsqueda de proteínas carboniladas.....	31
6.12 Secuenciación por LC-MS/MS	32
6.12 Análisis estadístico	33
7. Resultados.....	34
7.1. Efecto de la hemina sobre el crecimiento y la carbonilación de proteínas	34
7.2. Ensayos de detección de EROs por dihidrorodamina	37
7.3. Ensayo de actividad de tripanotión reductasa.....	38
7.4. Medición del tripanotión reducido	39
7.5. Estandarización de electroforesis bidimensional	39
7.6. Identificación de proteínas carboniladas	42
8. Discusión	49
9. Conclusiones.....	57
10.Perspectivas	57
11. Bibliografía.....	58
12. Anexo.....	74

Abreviaturas

A: Base nitrogenada adenina.

ANOVA: Análisis de varianza.

BSA: Albumina sérica de bovino.

C: Base nitrogenada citosina.

CAT: Catalasa.

CHAPS: 3-[(3-Colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanesulfonato. Detergente zwitterionico.

DEPC: Dietilpirocarbonato.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

DNP: 2, 4-dinitrofenilhidrazona.

DNPH: 2, 4-dinitrofenilhidrazina.

DOPA: Dihidroxifenilalanina.

DTT: Ditiotreitól.

e⁻: Electrón.

EDTA: Ácido etilendiamino tetraacético.

EF: Factor de elongación.

EROs: Especies reactivas de oxígeno.

FeSODA: Superóxido dismutasa A dependiente de hierro de *T. cruzi*.

FeSODB: Superóxido dismutasa B dependiente de hierro de *T. cruzi*.

G: Base nitrogenada guanina.

GSH: Glutación.

GSH-px: Glutación peroxidasa.

HEPES: Ácido [4-(2-hidroxietil) ácido-1-piperazinetanosulfónico). Amortiguador zwitteriónico.

H-NS: Proteínas de tipo histonas.

HRP: Peroxidasa de rábano.

HPLC: Cromatografía líquida de alta presión.

HSP: Proteína de choque térmico.

ID₅₀: Concentración de H₂O₂ a la cual se inmoviliza el 50% de los parásitos.

IFN- γ : Interferón gama.

iNOS: Sintasa de óxido nítrico.

IPG: Gradiente de pH inmovilizado.

IPTG: Isopropil-b-D-tiogalactopiranosida.

kDa: Kilo daltones.

LIT: Medio de infusión de hígado triptosa.

MCO: Oxidación catalizada por metales.

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad.

Min: Minutos.

MnSOD: Superóxido dismutasa dependiente de manganeso.

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido.

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

NL: No lineal.

PAMP: Patrones moleculares asociados a patógenos.

PBS: Amortiguador de fosfato de sodio.

PI: Punto isoeléctrico.

PM: Peso molecular.

PMSF: Fluoruro fenilmetilsulfonil.

PRR: Receptor de reconocimiento de patrones.

PVDF: Fluoruro de polivinilideno.

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.

sHSP: Proteína de choque térmico pequeña.

SOD: Superóxido dismutasa.

T: Base nitrogenada timina.

TBE: Siglas de amortiguador de boratos.

V: Volts.

Z1, 2 y 3: Zimodemas 1, 2 y 3.

Resumen

El protozoario parásito *Trypanosoma cruzi* es el agente causal de la enfermedad de Chagas. A través de su ciclo de vida *T. cruzi* está constantemente expuesto a especies reactivas de oxígeno (EROs), principalmente radical hidroxilo (OH^\cdot), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Dichas especies pueden causar estrés oxidante en éste organismo; produciendo daños a nivel de ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. Las EROs no sólo provienen del metabolismo oxidante del parásito, también son producidas por algunas células de la respuesta inmune montada por el hospedero. En el caso particular de *T. cruzi* también puede sufrir estrés oxidante por la acción de los fármacos que son utilizados para combatirlo. En general, todos los organismos han desarrollado diversas defensas en contra del estrés oxidante. En los mamíferos los sistemas de defensa se basan en la molécula de glutatión, así como en la enzima catalasa, capaz de disociar el H_2O_2 . El *T. cruzi* tiene un sistema de defensa contra el estrés oxidante que difiere substancialmente del de los mamíferos; no tiene catalasa, pero este parásito presenta una batería de peroxirredoxinas que le permiten metabolizar peróxidos. Todas las vías de las peroxirredoxinas convergen en una molécula clave homóloga al glutatión, el tripanotión. Esta molécula, junto con la enzima tripanotión reductasa, proveen a las peroxirredoxinas de equivalentes reductores. Dentro de las diversas posibilidades de daño oxidante a proteínas uno de los más estudiados es la carbonilación, modificación irreversible que daña la función de las proteínas. Se sabe que existen proteínas más o menos susceptibles a ser carboniladas, sin embargo, en el caso de *T. cruzi* no hay reporte alguno de este fenómeno. En el presente trabajo se utilizó el modelo de estrés oxidante causado por H_2O_2 para analizar el efecto de dicho estrés en una cepa mexicana de *T. cruzi*. Como parte de la estandarización de nuestro modelo de estrés se realizaron estudios del efecto de la hemina en el crecimiento y en la carbonilación de proteínas (proteínas oxidadas) de este parásito. Obteniendo un crecimiento óptimo y una baja carbonilación cuando se cultiva por tres días en medio LIT suplementado con 5 mg de hemina por litro de medio. En nuestro modelo de estrés por H_2O_2 se analizó la producción de EROs en el parásito, las cuales aumentaron después de la exposición a éste. También se midió la actividad de la enzima tripanotión reductasa la cual aumentó significativamente tras una hora de exposición. Del mismo modo

la concentración de tripanotión reducido aumentó tras una hora de exposición. Mediante ensayos de electroforesis bidimensional se identificaron las principales proteínas carboniladas por efecto del estrés oxidante. Las proteínas identificadas tienen un peso molecular y punto isoelectrico (PM (kDa) / PI (pH)) aproximado de: 44.29/5.17, 43.2/5.44, 45/6.33, 57.72/5.35, 34.72/5.63, 45.87/5.85, 44.85/4.58, 31.2/4.94, 30.6/5.59, 19.6/4.99, 35.06/5.27. Algunas de las proteínas fueron secuenciadas por LC/MC/MC, teniendo la identidad de: HSP-85, proteinasa tipo calpaina, old yellow enzyme y tubulina. En conclusión, este trabajo mostró que existe el fenómeno de carbonilación en *T. cruzi*, aun sin la presencia de estrés oxidante, y que al exponer al parásito a H₂O₂ el patrón de carbonilación se ve modificado, carbonilandose un grupo de proteínas en específico.

1. Introducción

1.1. Ubicación taxonómica

Trypanosoma cruzi es un parásito hemoflagelado que se clasifica dentro del reino Protozoa, phylum Euglenozoa, clase Kinetoplastidea, orden Trypanosomatida. La clase Kinetoplastidea se caracteriza por la presencia del cinetoplasto: un arreglo complejo de fibras de DNA en la matriz mitocondrial (Corliss, 2004). Los tripanosomas que tienen una fase reproductiva al interior de las células de su hospedero vertebrado son incluidos dentro del subgénero *Schizotrypanum*, lo que forma el nombre taxonómico completo de *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*.

1.2. Morfología

A lo largo de su ciclo de vida *T. cruzi* presenta diversos estadios morfológicos (Figura 1). Se caracterizan por; su forma celular general, la posición relativa entre el núcleo y el cinetoplasto y la salida del flagelo de la bolsa flagelar. Se reconocen tres formas principales de desarrollo. Dentro del intestino del insecto se presenta la forma de epimastigote, estadio reproductivo que mide entre 35 y 40 μm de largo, el cinetoplasto está antes del núcleo y el flagelo se origina cerca del cinetoplasto. Al pasar a la parte terminal del intestino se da una transformación de epimastigote a tripomastigote metacíclico, el cual es el estadio infeccioso, teniendo éste una forma alargada con el cinetoplasto situado detrás del núcleo, el flagelo se extiende prácticamente a todo lo largo de la célula y, regularmente, presenta forma de “C”, con una longitud, incluido el flagelo, de entre 16.3 y 21.8 μm . Los tripomastigotes, al pasar a la sangre del vertebrado presentan un cinetoplasto particularmente grande, lo que los caracteriza morfológicamente. Una vez en el hospedero mamífero, los tripomastigotes entran a cualquier tipo celular donde pasan al estadio de amastigote, el cual constituye la forma de reproducción intracelular del parásito en el vertebrado, en este estadio poseen un pequeño flagelo junto al cinetoplasto y tienen un diámetro aproximado de entre 2.4 y 6.5 μm . (Prata, 1994).

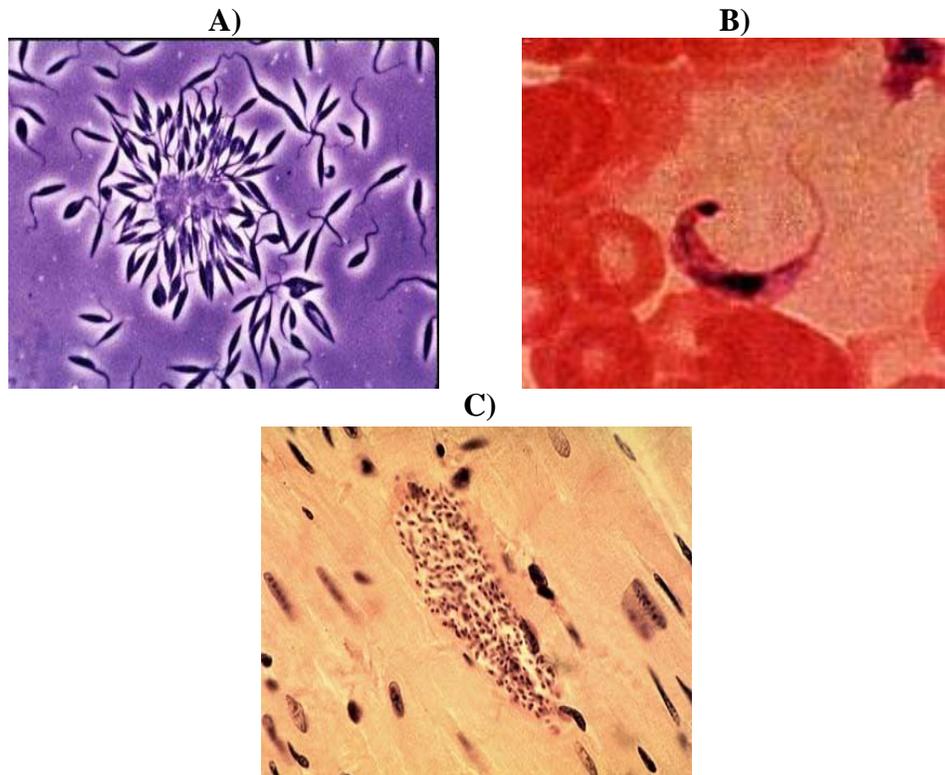


Figura 1. Formas más representativas del desarrollo de *T. cruzi*. A) Epimastigotes formando una roseta. Son la forma reproductiva dentro del insecto. B) Tripomastigote entre eritrocitos. Es la forma infectiva del parásito. C) Amastigotes formando un nido en corazón. Forma reproductiva intracelular en células del hospedero vertebrado. (Tomado de <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/diseaseinfo.htm>; www.tecnovet.uchile.cl/AlasbimnImages/tc-2002)

1.3. Ciclo de vida de *T. cruzi*

T. cruzi es altamente pleomórfico, es decir, presenta diversidad morfológica así como fisiológica a lo largo de su ciclo de vida (Pereira, 1986). El parásito es transmitido por sus vectores (insectos hemípteros) a más de 100 especies de animales diferentes. Estos hemípteros de la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae, conocidos comúnmente como chinches, son hematófagos de hábitos nocturnos, que adquieren el parásito al alimentarse de la sangre de un animal infectado, ingiriendo el estadio de tripomastigote. Dentro de la chinche, y a lo largo de su tracto digestivo, el parásito sufre una serie de transformaciones. En el estómago del insecto los tripomastigotes se transforman en epimastigotes, que entonces migran al intestino medio donde se dividen. Después de entre 15 y 30 días migran al intestino posterior donde se adhieren a las glándulas rectales, aquí es donde los

epimastigotes se diferencian en tripomastigotes metacíclicos, que son las formas infectivas. La infección del mamífero se inicia cuando un insecto infectado defeca mientras se alimenta, liberando tripomastigotes metacíclicos en sus heces y orina. Los tripomastigotes entran en el organismo a través de escoriaciones en la piel o a través de las mucosas; una vez dentro del hospedero, se pueden introducir a cualquier tipo celular, principalmente en células de tejido linfoide. Dentro de las células, los tripomastigotes pierden su flagelo y se redondean para formar amastigotes. Los amastigotes se multiplican intracelularmente por fisión binaria. Al llegar a grandes números lisan la célula hospedera y se transforman en tripomastigotes sanguíneos. Estos últimos son liberados a los espacios intersticiales y al torrente sanguíneo, por medio del cual se propagan por todo el cuerpo. Los tripomastigotes sanguíneos tienen la habilidad de invadir cualquier otra célula, donde se transforman de nuevo en amastigotes, repitiéndose el ciclo de infección. El ciclo de vida se cierra cuando un triatomino se alimenta de un animal con tripomastigotes circulando (Pereira, 1986; Atias, 1991; Prata, 1994) (Figura 2).

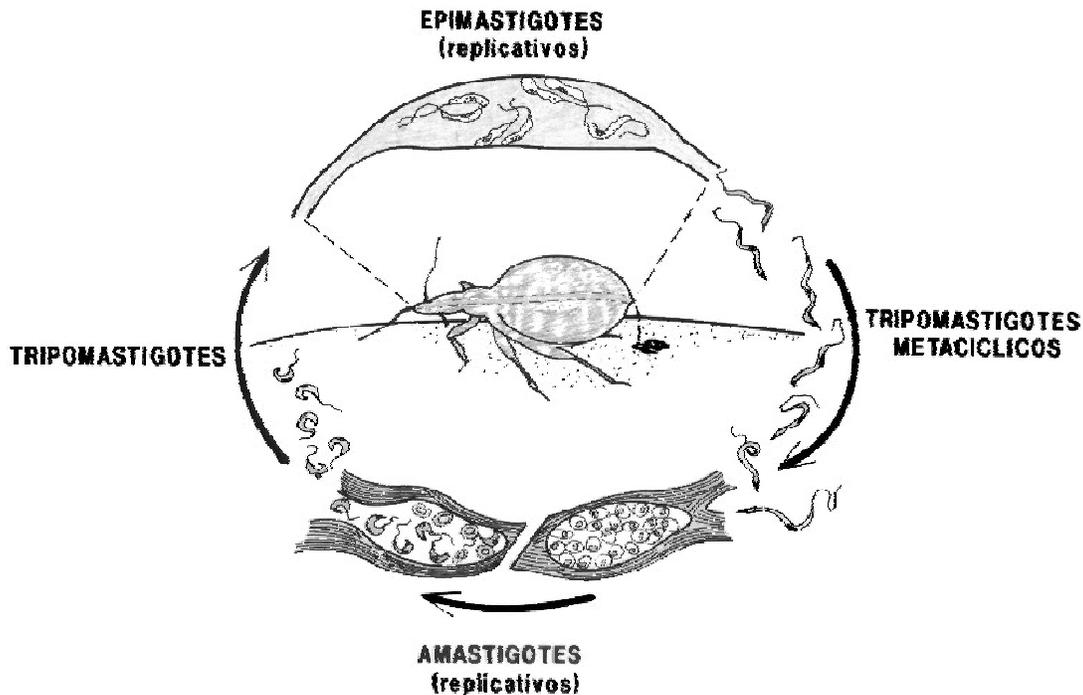


Figura 2. Ciclo de vida de *T. cruzi*. Al alimentarse, los triatominos defecan y orinan. En estas excreciones se encuentran los tripomastigotes metacíclicos, los cuales al entrar al torrente sanguíneo pueden infectar cualquier célula nucleada. Dentro de la célula se transforman a amastigotes. Los amastigotes se dividen intracelularmente hasta lisis la célula hospedera y abandonarla como tripomastigotes. Un insecto al alimentarse de sangre infectada ingiere los parásitos. En el interior del insecto los parásitos se transforman a epimastigotes, estos epimastigotes se dividen en la luz intestinal hasta que pasan a la parte final del tracto digestivo. Finalmente los epimastigotes se transforman en tripomastigotes metacíclicos que son la fase infectiva para los vertebrados. Tomado de <http://www.digitus.com.br/~plinio/chagas.html>.

1.4. Características genéticas de *T. cruzi*

T. cruzi tiene una gran heterogeneidad en sus características tanto biológicas como genéticas, esto se refleja en diferentes tasas de: crecimiento, infectividad, tropismo a tejidos, composición antigénica, virulencia, mortalidad inducida en modelos animales, susceptibilidad a suero inmune y drogas quimioterapéuticas (Martínez-Díaz *et al.*, 2001). Aunque no existe evidencia concluyente, se puede pensar en una relación entre tipos genéticos (cepas) y comportamiento biológico. Algunos análisis también han correlacionado la ubicación geográfica con manifestaciones biológicas (Filardi y Brener,

1987). Además, se sabe que las manifestaciones clínicas en la enfermedad de Chagas son muy variadas y esto se atribuye, principalmente, a la susceptibilidad de cada persona y a la cepa del parásito que causa el padecimiento (Martínez-Díaz *et al.*, 2001).

Gracias a la genotipificación de varios locus, hoy en día se clasifican las diversas cepas de *T. cruzi* en seis distintos DTUs (Discrete Typing Units). Las DTUs se definen como: "grupos de poblaciones que están genéticamente más relacionados entre sí que a cualquier otro grupo, y que son identificables por los marcadores genéticos, moleculares o inmunológicos en común" (Tibayrenc 1998). En *T. cruzi* se reconocen actualmente seis DTUs: Tc I, Tc II, Tc III, Tc IV, Tc V y Tc VI. (Zingales *et al.*, 2009).

1.5. La enfermedad de Chagas

1.5.1 Epidemiología

Inicialmente, *T. cruzi* se mantuvo en un ciclo silvestre, que involucraba a triatomíneos que actúan como vector y a varios mamíferos como reservorios. La migración de poblaciones humanas a las otrora zonas vírgenes hizo inevitable el contacto entre estas poblaciones y los vectores, así como con los reservorios. Haciendo, de esta manera, al hombre susceptible de infectarse, dando lugar a un ciclo peri-doméstico y doméstico. Algunas especies de triatomíneos como; *Triatoma infestans* y *Rhodnius prolixus* en Sudamérica, o *T. longipennis*, *T. pallidipennis* y *T. barbieri* en México (Martínez *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2006), son más propensas a invadir y vivir en las casas. Los materiales de construcción (por ejemplo palma o adobe), así como algunos hábitos de las poblaciones expuestas al vector, incrementan el problema (Schofield, 2000; Tamay-Segovia *et al.*, 2008). En el mundo se estiman aproximadamente 11 millones de personas infectadas por *T. cruzi*, y más de 1.5 millones en México (Guzman-Bracho, 2001). A pesar de esto, la enfermedad de Chagas no es considerada como un problema grave de salud en nuestro país (Miles *et al.*, 2003).

1.5.2. Transmisión de la enfermedad

La forma más común de adquirir la infección en seres humanos es la transmisión por una chinche infectada. Otros mecanismos menos frecuentes son, las transfusiones sanguíneas y los trasplantes. Una madre también puede infectar al feto, por vía transplacentaria, neonatal o por la ingestión de leche materna. Otras formas de infección son los accidentes en laboratorios, la ingestión de alimentos contaminados y la ingesta de las mismas chinches o de sus secreciones (Schenone y Rojas, 1989; Pays, 1998; Pereira *et al.*, 2009).

1.5.3 Manifestaciones clínicas

Fase aguda. Después de la transmisión por una chinche infectada, puede aparecer una lesión focal en el lugar de la picadura. Esta lesión recibe el nombre de chagoma, definido como un nódulo subcutáneo indoloro. Cuando la entrada ha sido por vía conjuntiva, hay un edema no doloroso de los párpados y de los tejidos aledaños que, característicamente, es unilateral y se conoce como el signo de Romaña (Figura 3) (Atias, 1991).



Figura 3. Niño con signo de Romaña. Inflamación del párpado conocida como signo de Romaña, lesión característica de la entrada de *T. cruzi* por vía conjuntiva. (Tomado de <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/diseaseinfo.htm>).

La fase aguda de la enfermedad es generalmente asintomática, aunque 36% de los pacientes muestran síntomas. Ellos se presentan durante una o dos semanas después de adquirir la infección. Las manifestaciones clínicas de la fase aguda incluyen fiebre, anorexia, diarrea, inflamación de los ganglios, inflamación del hígado y del bazo, así como miocarditis. La fase aguda se resuelve espontáneamente en cuatro a ocho semanas (Atias, 1991).

Fase indeterminada o latente. Empieza ocho a diez semanas después de la infección. Durante esta etapa, los enfermos no tienen ningún síntoma, y la infección es detectada por la presencia de anticuerpos específicos. Estos individuos pueden tener evidencia de parásitos en la sangre, y el xenodiagnóstico puede ser positivo (Cortez *et al.*, 1986; Atias, 1991).

Fase crónica. En, aproximadamente, un 30% de los casos se presentan complicaciones en el corazón y en el tracto digestivo, 10 a 30 años después de la infección inicial. Los problemas cardiacos son los más frecuentes, y se manifiestan principalmente como daño al tejido muscular del corazón y con trastornos de la conducción de la señal eléctrica. La afectación gastrointestinal consiste en la dilatación del esófago (megaesófago) y del colon (megacolon). El megaesófago se manifiesta como dificultad para tragar, dolor al tragar y regurgitaciones. El megacolon causa dolor abdominal y estreñimiento crónico, en casos muy severos puede haber obstrucción y perforación (Atias, 1991).

1.6. Respuesta inmune

La respuesta inmune contra este parásito se basa en la producción de IFN- γ , tanto por células asesinas naturales (NK por sus siglas en inglés), como por linfocitos T activados, principalmente por macrófagos. Estos últimos son la primera línea de defensa contra *T. cruzi*. Es a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC por sus siglas en inglés) de clase I que se da la presentación de antígenos a linfocitos, montándose, de esta manera, una respuesta inmune de tipo Th 1. Como primera línea de defensa, los macrófagos tienen un papel preponderante, tanto por su capacidad fagocítica como por la de producir

numerosos mediadores proinflamatorios, al igual que por su función como células presentadoras de antígenos (Muñoz-Fernández *et al.*, 1992; Espinoza y Manning-Cela 2007).

Los parásitos, al ser ingeridos por los fagocitos, se localizan dentro del fagosoma, el cual se fusiona con lisosomas para dar lugar al fagolisosoma, donde se da la muerte y digestión enzimática del parásito (Espinoza y Manning-Cela 2007). Se han identificado varias moléculas tóxicas liberadas por las células del sistema inmune, entre ellas se encuentran metabolitos reactivos del oxígeno como radical hidroxilo (OH^\cdot), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y anión radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), entre otros. Una de las principales moléculas tóxicas formadas es el óxido nítrico y los iones peroxinitrito que se forman a partir del primero (Piacenza *et al.*, 2009; Stafford *et al.*, 2002). Los macrófagos fagocitan parásitos así como células infectadas, sin embargo *T. cruzi* tiene mecanismos por medio de los cuales puede evadir a las moléculas de defensa del macrófago. Esto lo logra escapando de la vacuola que lo contiene, por medio de la secreción de una toxina formadora de poros, llamada Tc-TOX, que, junto con la desialilación (pérdida de ácido siálico) de la membrana por la transialidasa de *T. cruzi*, permite al parásito entrar al citoplasma celular, en donde puede completar su ciclo de vida (Denkers y Butcher, 2005). Por otro lado *T. cruzi* es capaz de contender con el ataque oxidante de los macrófagos con una batería de efectivas moléculas antioxidantes, las cuales se detallarán más adelante (Piacenza *et al.*, 2009).

1.7. Tratamiento

El tratamiento se basa en dos fármacos tripanocidas: el nifurtimox en dosis de 10 a 15 mg/kg/día y el benznidazol con 5 a 7 mg/kg/día, ambos con una eficacia relativa y múltiples efectos secundarios (UNAM-Secretaría de Salud, 2002). Los efectos colaterales más comunes por el uso del nifurtimox son anorexia, pérdida de peso, alteraciones físicas, excitabilidad o sopor y manifestaciones digestivas. En el tratamiento con benznidazol se han reportado: hipersensibilidad, dermatitis, dolor articular y muscular, supresión de médula ósea (baja en la producción de células), polineuritis, etc. Los efectos colaterales son

reversibles cuando la dosis se reduce o el tratamiento es suspendido (Coura y de Castro, 2002).

1.7.1 Mecanismos de acción de nifurtimox y benznidazol

El benznidazol es un 2-nitroimidazol (N-benzyl-2-nitroimidazol acetamida) que se ha comercializado con los nombres de Rochagan y Radanil. Sus mecanismos de acción están lejos de estar completamente identificados, pero se sabe que pueden involucrar uniones covalentes u otras interacciones de intermediarios nitroreductores con componentes del parásito (Polak y Richle, 1978) como DNA, lípidos y proteínas (Díaz de Toranzo *et al.*, 1988). El nifurtimox es un 5-nitrofurano (3-metil-4-(5'-nitrofurfurilideneamina) tetrahydro-4H-1,1-dióxido), se piensa que su modo de acción se basa en la generación del radical nitro anión ($R-NO_2^{\cdot}$) (DoCampo y Moreno, 1986).

De manera general, una de las principales teorías es que, tanto nifurtimox como benznidazol, actúan a través de la formación de radicales libres y/o metabolitos electrofílicos. El grupo nitro de ambas drogas es reducido a un radical nitro anión, por la acción de la nitroreductasa mitocondrial tipo I (NTR) dependiente de NADH de *T. cruzi*, activando a estos fármacos *in vivo*; de hecho, la inhibición de esta enzima confiere resistencia del parásito tanto a nifurtimox como a benznidazol (Wilkinson *et al.*, 2008). El radical nitro anión puede interaccionar con oxígeno molecular y dar lugar a la formación de $O_2^{\cdot-}$. El cual sufre dismutación por la enzima superóxido dismutasa (SOD), dando como producto final O_2 y H_2O_2 (Temperton *et al.*, 1998). El H_2O_2 en presencia de hierro forma el OH^{\cdot} , estos productos, como se mencionó anteriormente, se unen a lípidos, proteínas y DNA, dañándolos (Díaz de Toranzo *et al.*, 1988). Esto último es la base del mecanismo de acción del nifurtimox (ver anexo).

Por otro lado, con benznidazol, la acción tripanocida se da por las uniones de los metabolitos reducidos con macromoléculas del parásito. También se ha visto que pacientes curados, después de ser tratados con benznidazol, tienen una respuesta más alta de IFN- γ contra antígenos del parásito que la que tienen pacientes que no se curaron después del

tratamiento con benznidazol. Esto junto con el hecho de que ratones deficientes (“knockout”) en IFN- γ no responden al tratamiento con benznidazol, da lugar a pensar en que el IFN- γ , y otras citocinas, pueden incrementar la muerte de tripanosomas al interactuar con el benznidazol o con productos secundarios, aunque los mecanismos por los cuales se da lo anterior no están establecidos (Romanha *et al.*, 2002) (ver anexo). También se ha descrito la inhibición de la enzima NADH-fumarato reductasa de *T. cruzi* por acción de estos medicamentos (Turrens *et al.*, 1996). Estos últimos ejemplos han puesto en duda el que los mecanismos de acción de las drogas, como el nifurtimox, sean debidos únicamente a la formación de especies reactivas de oxígeno, y recientemente se ha propuesto que afecta el potencial de la membrana mitocondrial, mediante alguna vía que no implica la formación de dichas especies (Boiani *et al.*, 2010).

Ambos fármacos tienen efectos secundarios negativos, de hecho en los 80's, la comercialización de nifurtimox fue descontinuada, primero en Brasil y luego en Argentina, Chile y Uruguay; en el caso de México estos medicamentos están controlados y solo se consiguen por solicitud expresa a la Secretaría de Salud. Finalmente, la resistencia o sensibilidad a estas drogas (es decir, a sus mecanismos de acción) dependen, en gran medida, de la cepa de parásitos que infecte a los individuos (Coura y Castro, 2002; Martínez-Martínez 2006).

1.8. Especies reactivas de oxígeno

La mayoría de los organismos necesitan del oxígeno para poder sobrevivir; este elemento es utilizado por las células para oxidar compuestos orgánicos. El oxígeno molecular tiene poca capacidad de oxidar otros compuestos químicos. Para hacerlo debe convertirse primero en una forma activa del oxígeno como lo son las especies reactivas de oxígeno (EROs) (Sies, 1991) (Figura 4). Como ya se mencionó, las principales EROs son: el $O_2^{\cdot\cdot}$, el H_2O_2 , el HO^{\cdot} y el óxido nítrico (NO^{\cdot}). Las EROs incluyen a los radicales libres y a las especies no radicales, siendo las primeras, moléculas o fragmentos moleculares que contienen uno o más electrones no apareados en un orbital externo. Por otro lado, las

especies reactivas no radicales no contienen electrones desapareados, pero son capaces de oxidar o reducir un substrato dado (Sies, 1991).

Una molécula puede convertirse en radical libre tanto por ganancia, como por pérdida de un electrón. Al romperse un enlace covalente en forma simétrica (fisión homolítica de enlaces), ambos fragmentos retienen un e^- y por tanto, se convierten en radicales libres. Esta condición, químicamente inestable, lo vuelve muy activo, puesto que el electrón impar busca otro electrón para salir del desequilibrio atómico. Para lograr esto, quita un electrón a cualquier molécula vecina, es decir, que oxida la molécula, alterando su estructura y convirtiéndola a su vez en otro radical libre capaz de captar un electrón, generándose así una reacción en cadena (Cadenas, 1995; Sies, 1991) (ver anexo).

El estudio de las EROs se ha enfocado desde el punto de vista médico y biológico. Ello debido a que las interacciones de estos compuestos con moléculas orgánicas, han sido implicadas en un gran número de estados patológicos, así como de fenómenos biológicos de muy diversa índole, como son el metabolismo celular, la respuesta inmune y la comunicación celular.

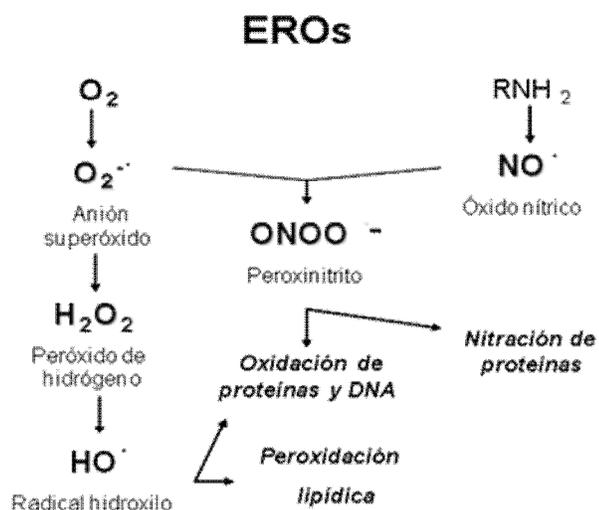


Figura 4. Especies reactivas de oxígeno (EROs). A partir de la reducción secuencial de oxígeno molecular se da la formación de las diversas EROs. Por otro lado, algo similar acontece cuando se reduce un grupo amino, lo que lleva a la formación de otros productos reactivos que, al igual que los derivados del oxígeno, pueden dañar a biomoléculas importantes.

1.9. Estrés oxidante

En determinadas circunstancias, la producción de EROs puede aumentar en forma descontrolada, situación conocida con el nombre de *estrés oxidante*. El concepto expresa la existencia de un desequilibrio entre, las velocidades de producción y de destrucción de las moléculas tóxicas, que da lugar a un aumento en la concentración celular de las EROs (Sies, 1991; Ahmad, 1995; Ozawa y Tatsum, 1998). Es en esta situación de estrés oxidante, en la que se manifiestan las lesiones producidas por los radicales libres y demás moléculas reactivas, que reaccionan químicamente con diversas biomoléculas como:

- **Lípidos.** La peroxidación de lípidos, es decir, la formación de peróxidos derivados de ácidos grasos, es la principal forma de daño que sufren esta clase de moléculas. Ésta se da cuando una molécula radical interacciona con una cadena de ácido graso, formando un peroxiradical, el cual puede dar lugar, bien a un hidroperóxido, o bien a un peróxido cíclico; cualquiera de estos dos puede reaccionar con otro ácido graso, empezando la propagación de la peroxidación lipídica. En este proceso los enlaces C=C son los más susceptibles a reaccionar con radicales libres, por ello es que los ácidos grasos poliinsaturados son los principales lípidos afectados durante el estrés oxidante (Halliwell y Gutteridge 1999).
- **Carbohidratos.** La formación de peroxirradicales de azúcares puede llevar a multitud de reacciones, incluyendo pérdida de las proporciones moleculares, rearrreglo, eliminación de agua y fragmentación de enlaces C-C, lo que lleva a la formación de diversos productos carbonilos. Estas alteraciones pueden influir en el correcto funcionamiento de las glicoproteínas, así como en la estructura de los ácidos nucleicos, al dañar los azúcares que los conforman (ribosa y desoxirribosa) (Halliwell y Gutteridge 1999).
- **DNA.** En esta molécula se pueden producir sitios apurínicos (pérdida de purinas), desaminación de la citosina (lo que la transforma en uracilo), así como gran variedad de cambios en ésta y otras bases nitrogenadas. Esto muchas veces lleva a la ruptura de la

molécula de DNA. Otro tipo de daño es la formación de mutaciones tanto transicionales (AT-GC) como de transversión (GC-TA) (Halliwell y Gutteridge 1999).

- Proteínas. Las proteínas pueden ser dañadas de diversas formas, una de las más significativas a nivel biológico es el daño directo a residuos de aminoácidos, como la formación de radicales a partir del grupo tiol en cisteína y metionina y la formación de 2-oxohistidina en la oxidación de histidina. También se sabe que a partir de prolina y arginina se puede formar glutamato semialdehído. La interacción de radicales libres con el triptófano eventualmente formará N-formilcinurenina y cinurenina; asimismo se sabe que el triptófano puede ser nitrado por NO_2^\cdot o peroxinitrito. La tirosina al reaccionar con OH^\cdot forma dihidroxifenilalanina (DOPA), la cual es indispensable para el funcionamiento de algunas enzimas; otro caso es el ataque de radicales a la fenilalanina, que la puede convertir en *orto*-, *meta*- o *para*-tirosina; este aminoácido también puede ser objeto de nitración, dando lugar a nitrofenilalanina. Finalmente, los hidroperóxidos de valina formados por estrés oxidante pueden dar lugar al hidróxido de valina. Es de resaltar, con respecto al daño oxidante en proteínas, la formación de grupos carbonilos (carbonilación), cuya importancia recae en las implicaciones biológicas y médicas que se ha visto tienen estos grupos, así como a la posibilidad de utilizarlos como un marcador de daño oxidante en proteínas. Estos aspectos se analizarán con mayor amplitud más adelante (Halliwell y Gutteridge 1999).

Las alteraciones anteriores pueden tener lugar al interior de las células, así como en componentes de la matriz extracelular, por lo que logran desencadenar un daño irreversible que, si es muy extenso, podría llevar a la muerte celular (Ahmad, 1995; Ozawa y Tatsum, 1998).

1.9.1. Daño en proteínas: Carbonilación oxidativa

Uno de los procesos de oxidación más importantes es el de carbonilación de proteínas, esto debido a su carácter irreversible y a su asociación con procesos de: control de la calidad de proteínas, envejecimiento, diferenciación y procesos patológicos (como el mal de Parkinson, Alzheimer y cáncer, entre otras) (Sohal 2002; Dalle-Donne *et al.*, 2003;

Aguilaniu y Gustafsson 2003; Job *et al.*, 2005; Curtis *et al.*, 2010; Jamel *et al.*, 2010). Los derivados carbonilos se forman, directamente, por ataques oxidantes catalizados por un metal (MCO por sus siglas en inglés) a las cadenas laterales de residuos de aminoácidos de prolina, arginina, lisina y treonina (P, R, K, T). Derivados carbonilos en lisina, cisteína e histidina (K, C, H), se pueden formar al reaccionar con compuestos carbonilo producidos a partir de carbohidratos (productos de glicoxidación), lípidos y productos finales de glicación/lipoxidación avanzada (Requena *et al.*, 2003). De manera biológica la carbonilación de proteínas se puede dar por uno o varios de los siguientes procesos: deficiencia en la traducción o deficiencia en la actividad de las chaperonas, por aumento de la susceptibilidad de enzimas libres de sustrato a ser carboniladas (en comparación de las mismas enzimas cuando tienes sustrato) y, finalmente, como efecto de algún tipo de estrés. Las proteínas carboniladas son marcadas por los proteosomas y sujetas a proteólisis, sin embargo, algunas de estas proteínas marcadas no son degradadas y al acumularse, forman cúmulos citotóxicos, los que se cree, pueden inhibir la acción proteolítica (Fig. 5) (Szweda y Stadtman, 1992; Nyström, 2005), y con el tiempo causar fallas graves en el metabolismo e incluso la muerte celular (Madian y Regnier, 2010).

No existe información sobre procesos de carbonilación de proteínas en ningún grupo de protozoarios; su estudio se ha enfocado a organismos como bacterias (*Escherichia coli*), levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) y plantas (*Arabidopsis thaliana*), así como diferentes tejidos de mamíferos (Nyström, 2005; Madian y Regnier, 2010; Curtis *et al.*, 2010; Jamel *et al.*, 2010). En estos organismos se ha visto una carbonilación diferencial entre las proteínas totales, siendo algunas en particular muy sensibles a ser carboniladas, aunque no se sabe qué es lo que las hace más o menos susceptibles. En el caso de *E. coli* las proteínas blanco incluyen las chaperonas HSP70 y HSP60, las proteínas tipo histonas, H-NS, factores de elongación, EF-Tu y EF-G, glutamino sintetasa, glutamato sintasa, aconitasa, malato deshidrogenasa y piruvato cinasa (Dukan y Nyström, 1998, 1999; Tamarit y Cabisco, 1998). Se ha demostrado que algunas de estas proteínas también son específicamente carboniladas durante estrés oxidante en levaduras (Cabisco *et al.*, 2000), moscas envejecidas (Yan *et al.*, 1997; Sohal, 2002), plantas (Johansson *et al.*, 2004; Kristensen *et al.*, 2004) y en cerebro con enfermedad de Alzheimer (Castegna *et al.*, 2002;

Sultana y Butterfield, 2009). De manera importante la carbonilación de proteínas se ha visto relacionada a algunos tipos de cáncer, así como a algunos compuestos quimioterapéuticos (Singh *et al.*, 2009; Joshi *et al.*, 2010).

El proceso de carbonilación y su intensidad en diferentes proteínas parece estar regulado y regular algunos procesos como el envejecimiento. El cual se cree que es producido, en parte, por la acumulación de daño oxidante, ya que se ha visto que existe una relación directamente proporcional entre la edad de cultivos y la acumulación de proteínas dañadas (Friguet *et al.*, 2000; Sitte *et al.*, 2000; Shringarpure y Davies, 2002). En otros modelos se ha demostrado su relevancia en procesos como la diferenciación celular. Por ejemplo, en la planta *A. thaliana* se da un caso particular: la carbonilación al principio aumenta con el incremento de la edad de la planta, pero baja drásticamente cuando se da la transición al estado reproductivo, dejando así a sus descendientes libres de proteínas carboniladas; no se sabe si la baja en la carbonilación es causa o efecto del paso a la etapa reproductiva en la planta (Johansson *et al.*, 2004). Otro caso que llama la atención es el de la levadura *S. cerevisiae*, la cual mantiene a su descendencia libre de proteínas carboniladas. Esto lo logra durante la citocinesis, segregando las proteínas carboniladas a los componentes de la célula progenitora y dejando así a las células hijas libres de proteínas dañadas; este proceso se conoce como división asimétrica (Jazwinski, 2004).

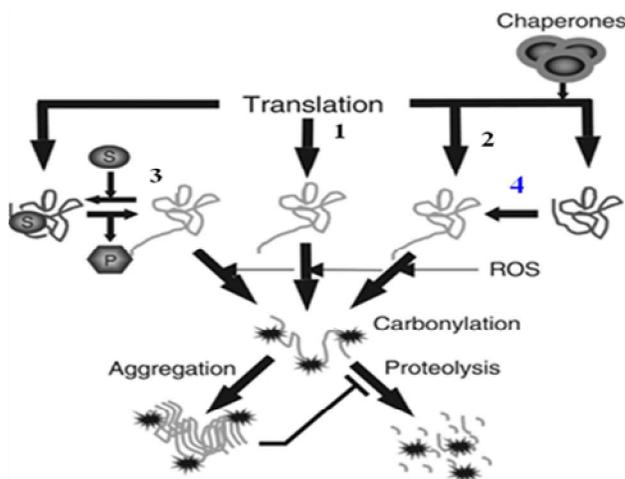


Figura 5. La carbonilación de proteínas se puede dar como consecuencia de varios fenómenos biológicos. 1) Por procesos de traducción deficiente. 2) Por deficiencias en la actividad de chaperonas. 3) Cuando alguna enzima que no es utilizada, es decir no está unida a su sustrato, puede ser más susceptible a ser carbonilada. 4) Como efecto de algún estrés específico, principalmente estrés oxidante. Tomado de Nyström 2005.

La presencia de grupos carbonilo es una medida relativa del grado de oxidación de las proteínas (Levine *et al.*, 1994). Los grupos carbonilo en las proteínas se pueden

cuantificar mediante la reacción entre estos y el 2, 4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), dando lugar a la formación de 2,4-dinitrofenilhidrazona (DNP), la cual se puede evidenciar fácilmente por espectrofotometría o bien detectarse con anticuerpos anti-DNP (Figura 6). Estos procedimientos permiten hacer estimaciones del grado de oxidación celular y, con el empleo de diversas técnicas, es posible identificar las proteínas afectadas con este proceso.

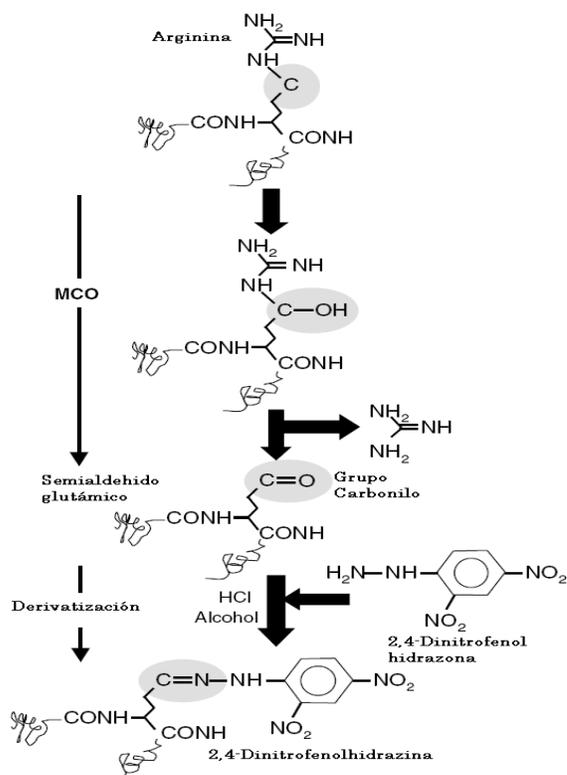


Figura 6. Formación de grupos carbonilo. Por acción de la oxidación catalizada por metales (MCO) algunos aminoácidos pueden sufrir cambios moleculares como la adición de un grupo OH cerca del extremo amino; lo que subsecuentemente y debido a su inestabilidad, da lugar a un grupo carbonilo en el extremo terminal del residuo. El grupo carbonilo formado puede reaccionar con el compuesto 2,4-dinitrofenilhidrazona (DNPH) y dar lugar a la 2,4-dinitrofenilhidrazona (DNP), la cual se puede detectar con la ayuda de anticuerpos específicos. Tomado de Nyström 2005.

1.10. Sistemas de defensa biológica contra estrés oxidante

Todos los sistemas biológicos tienen mecanismos de defensa contra el estrés oxidante, algunos de ellos muy conservados a lo largo de la escala filogenética. En general, los sistemas de defensa se pueden dividir en enzimáticos y no enzimáticos, dependiendo de las moléculas que intervienen en ellos (Ahmad, 1995; Ozawa y Tatsum, 1998).

1.10.1. Sistemas de defensa en parásitos

Los parásitos poseen una amplia gama de mecanismos de defensa contra EROs. En algunos grupos de helmintos, como *Trichinella spiralis* y en el cisticerco de *T. taeniaeformis*, se ha descrito la presencia de SOD (Callahan *et al.*, 1991), familia de proteínas cuya función es eliminar el $O_2^{\cdot-}$, catalizando su dismutación a H_2O_2 y O_2 . También se ha aislado y caracterizado la glutatión peroxidasa (GSH-px), que es la responsable de la descomposición del H_2O_2 , y de otros peróxidos, utilizando glutatión reducido (GSH) como donador de electrones. Esta enzima se ha encontrado en *Dirofilaria immitis*, *Brugia pahangi* y *Taenia solium* entre muchos otros (Selkirk *et al.*, 1998). Otras enzimas comúnmente presentes en protozoarios y helmintos parásitos son las catalasas (CAT), capaces de reducir H_2O_2 y las peroxirredoxinas (Tsuji *et al.*, 2000), las cuales descomponen H_2O_2 , así como peróxidos orgánicos. Los anteriores son componentes enzimáticos de la respuesta contra estrés oxidante y, aunque no son los únicos, sí son los principales y los más ampliamente distribuidos, no sólo entre parásitos sino a lo largo de toda la escala filogenética.

Las proteínas de choque térmico (HSPs por sus siglas en inglés) son componentes importantes en la defensa contra EROs. Como lo indica su nombre, se expresan después de un choque de calor sufrido por un organismo. Las principales familias de HSPs son HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 y las de bajo peso molecular (sHSP por sus siglas en inglés), entre otras. La función protectora de estas proteínas no se restringe sólo a casos de estrés calórico sino al estrés en general. En el caso del estrés oxidante la familia de HSP70 se ha correlacionado con protección, tanto por su capacidad de chaperona, como de atrapadoras de radicales libres (“scavengers”). De esta manera ayudan, no sólo al correcto plegamiento y replegamiento de las proteínas, sino también actuando para evitar la interacción entre proteínas y EROs (Polla, 1991; Kim *et al.*, 1997; Papp *et al.*, 2003). Un ejemplo de esta protección cruzada es el del tripanosomátido *Leishmania chagasi*, donde se ha visto un aumento en la producción de HSP70 tras un choque oxidante, en particular tras la incubación con H_2O_2 (Wilson *et al.*, 1994).

Las sHSP se han relacionado a una multitud de fenómenos biológicos incluyendo varios tipos de estrés como el ocasionado por calor, etanol, metales de transición, mutágenos e importantemente estrés oxidante, entre otros (Lindquist y Craig, 1988; Callahan *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2008; Laskowska *et al.*, 2010). En otros modelos biológicos, como *E. coli*, la actividad de chaperona de algunas sHSPs puede estar regulada por cambios en el estado redox de la célula (sHSP33) (Raman *et al.*, 2001), o bien pueden colaborar en el mejor funcionamiento de los sistemas de defensa contra estrés oxidante, en particular de los basados en glutatión (sHSP25, SHSP27) (Preville *et al.*, 1999; Baek *et al.*, 2000).

1.10.2. Sistema de defensa en *T. cruzi*

Como cualquier otro organismo, *T. cruzi* tiene un sistema molecular en contra del estrés oxidante y los daños que éste pudiera causar, sin embargo, estos sistemas difieren notablemente de los de otros organismos, incluidos los de su hospedero mamífero (Ariyanayagam y Fairlamb, 2001; Turrens, 2004; Irigoín *et al.*, 2008; Piacenza *et al.*, 2009) (Figura 7). *T. cruzi* cuenta con dos SOD dependientes de hierro, las cuales están bien caracterizadas (FeSODA y FeSODB). Sin embargo se han encontrado cuatro genes que codifican para esta clase de SOD. No encontrándose ninguna enzima del tipo de la SOD dependiente de manganeso, como la MnSOD de mamíferos (Ismail *et al.*, 1997; Dufernez *et al.*, 2006). Al igual que otros tripanosomátidos, *T. cruzi* no tiene CAT, enzima que se encuentra desde bacterias hasta mamíferos, ni GSH-px dependiente de selenio, la que, junto con GSH, es la base del metabolismo de peróxidos en los mamíferos. En su lugar posee un conjunto de mecanismos los cuales tienen como punto convergente al tripanotión (N1, N8 bis glutationil espermidina, TS(H)₂), un tiol específico de tripanosomátidos (Muller *et al.*, 2003; Krauth-Siegel y Comini, 2008). Este tripanotión, en conjunto con la enzima dependiente de NADPH tripanotión reductasa (TryR), sirve como donador de electrones a todas las diversas peroxidasas, manteniendo de este modo el ambiente reductor intracelular (Fairlamb y Cerami, 1992; Mielniczki-Pereira *et al.*, 2007; Piacenza *et al.*, 2009). El parásito cuenta con varias peroxidasas que se encargan de catalizar la reducción de peróxidos: una triparredoxina peroxidasa citoplásmica (cTXNPx) y otra mitocondrial

(mTXNPx); las cuales tienen un papel en la degradación de H_2O_2 , hidroperóxidos t-butil y peroxinitrito (Wilkinson *et al.*, 2000). Cuenta además con dos glutatión peroxidasas similares (GPx-I y GPx-II) no dependientes de selenio (Wilkinson *et al.*, 2002a; Wilkinson y Kelly, 2003) y, una hemoperoxidasa dependiente de ascorbato (APx), la cual es específica en la reducción de H_2O_2 (Wilkinson *et al.*, 2002b).

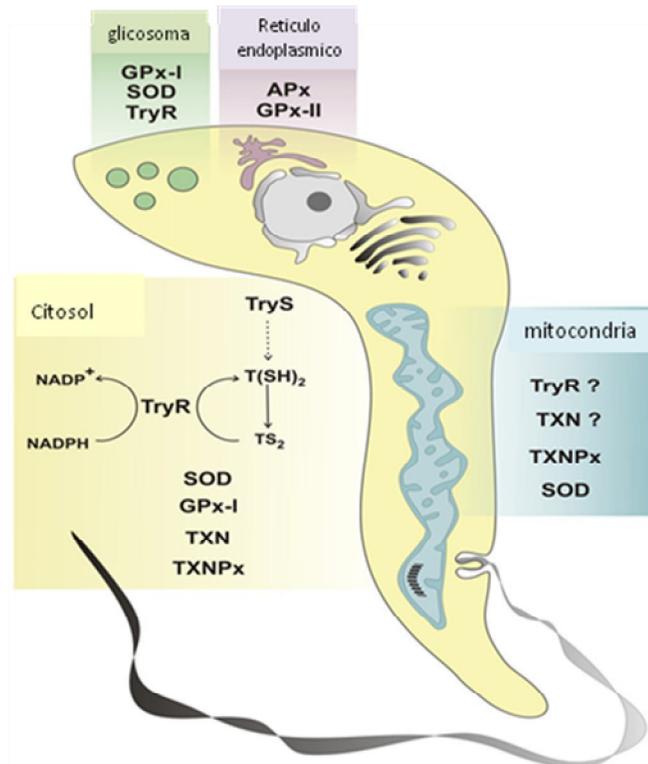


Figura 7. Moléculas antioxidantes en *T. cruzi*. Las moléculas con las que este parásito combate a las EROs difieren de las del hospedero mamífero, en general tiene dos super oxidodismutasas (SOD) y cinco peroxidasas las cuales dependen de tripanotión (TS) y de la tripanotión reductasa (TryR): Glutatión peroxidasa-I y -II (GPx-I y -II), peroxidasa dependiente de ascorbato (APx), triparedoxin peroxidasa (TXNPx) mitocondrial y citoplasmica. Tomado de Irigoín *et al.*, 2008.

Otra enzima que se ha relacionado al estrés oxidante es la arginina cinasa, análogo a la creatina cinasa de los vertebrados. Se ha visto que tras la exposición a H_2O_2 , el parásito aumenta la expresión de la arginina cinasa y adquiere mayor resistencia al estrés oxidante, aunque no se sabe cuáles son las vías por las cuales se adquiere la protección (Miranda *et al.*, 2006). Otro mecanismo de protección es el que se basa en la producción de poliaminas, en particular espermina y espermidina, moléculas que confieren protección tanto contra

H₂O₂ como contra nifurtimox, aunque también los mecanismos de ésta protección siguen sin ser establecidos (Hernández *et al.*, 2006).

Al igual que otros organismos, *T. cruzi* presenta HSPs. En particular la HSP70, la cual ha sido bien estudiada en este organismo y se sabe que se sobre expresa bajo choque térmico, así como durante la fase de crecimiento exponencial (Requena *et al.*, 1992). En otros organismos se conoce la capacidad protectora de la HSP70 durante un choque oxidante, aunque en el caso de *T. cruzi* éste efecto protector no es claro. Se sabe que las sHSPs tienen relación con la protección a estrés oxidante en otros modelos. *T. cruzi* tiene la proteína sHSP16, que fue descrita y caracterizada en nuestro grupo de trabajo (Pérez-Morales *et al.*, 2009), aunque el papel de ésta proteína en estrés oxidante está por determinarse.

2. Antecedentes

2.1. Generalidades de cepas mexicanas

Aunque falta mucho por averiguar en el campo de la variabilidad y relaciones genéticas-biológicas-patológicas en cepas mexicanas de *T. cruzi*, sí existe información que nos permite tener una visión general de cada uno de estos puntos y de sus interrelaciones. Cuatro son los principales estudios que se han realizado en relación a esto: Galván y colaboradores en 1983, basándose en el análisis de isoenzimas, encontraron una relativa homogeneidad en los aislados analizados. Zavala-Castro y colaboradores en 1992 realizaron una caracterización molecular de 17 aislados mexicanos; el estudio reveló heterogeneidad a nivel del DNA total y del cinetoplasto, encontrando una relación de esta heterogeneidad con el origen geográfico de los aislados. Posteriormente, López-Olmos *et al.* en 1998 reportaron características generales y biológicas *in vitro* de 17 aislados de *T. cruzi* del centro y sur del país. El trabajo reveló un alto grado de heterogeneidad en varias características biológicas *in vitro* así como en los perfiles isoenzimáticos, pero sin relación evidente entre las propiedades biológicas y estos últimos. También encontró que las cepas mexicanas se agrupan genéticamente junto con la cepa brasileña Silvio del zimodema 1 (Z1). En el año 2002 se confirmó que la mayoría de las cepas mexicanas pertenecen al genotipo I (Bosseno *et al.*, 2002). Además, las características de infectividad y de la respuesta inmune que se presentan en la infección con algunas cepas mexicanas son variables (Espinoza *et al.*, 1998; Espinoza *et al.*, 2010). Como conclusión, la evidencia hasta la fecha, nos indica que los comportamientos a nivel biológico así como bioquímico son altamente variables entre diferentes cepas. Por lo anterior, resulta de gran importancia el realizar estudios en cepas de origen mexicano, particularmente con las de características biológicas como virulencia, patogenicidad o resistencia a fármacos.

2.2. Susceptibilidad a fármacos

Los dos principales fármacos tripanocidas, nifurtimox y benznidazol presentan rangos variables de efectividad. En algunos estudios se ha encontrado de 0% a 100% de

efectividad (Filardi y Brener, 1987), esto debido, en gran medida, a las enormes diferencias de susceptibilidad y resistencia de cada cepa a los fármacos. Aunque los modos de acción de las dos drogas son diferentes, existe una correlación directa en el grado de resistencia entre una y otra droga, por lo que algunos sugieren un mecanismo común de resistencia a nifurtimox y benznidazol (Filardi y Brener, 1987). En algunas cepas mexicanas, que pertenecen a diferentes subtipos genéticos, se han visto diferencias significativas en la resistencia a estos fármacos. Por ejemplo, la cepa MHOM/MX/94 es marcadamente más resistente a nifurtimox que la cepa ITRI/MX/-. Ambas pertenecen al grupo genético I, sin embargo, la primera cepa se caracteriza por ser no virulenta y la segunda por ser virulenta (Martínez-Martínez, 2006).

2.3. Efecto del H₂O₂ en cepas mexicanas de *T. cruzi*

En nuestro laboratorio se ha estudiado el efecto del H₂O₂ sobre la movilidad y el crecimiento de *T. cruzi*. A partir de estos estudios se encontró que, 84 µM de H₂O₂ inmoviliza al 50% de los parásitos después de 30 min de exposición, y que, 160 µM de H₂O₂ inmoviliza a cerca del 80% de los parásitos en también 30 min. Mediante ensayos de electroforesis unidimensional, nuestro grupo detectó proteínas carboniladas por efecto del estrés oxidante generado por H₂O₂ en cepas mexicanas de *T. cruzi*. En dichos ensayos se observó que existen diferentes proteínas carboniladas en el parásito. El aumento en la carbonilación de proteínas se logró apreciar en la concentración de 160 µM de H₂O₂ y con 30 min de exposición. Las proteínas encontradas no fueron caracterizadas más allá de su peso molecular (Martínez-Espinosa, 2007).

2.4. Planteamiento del problema

T. cruzi está constantemente expuesto a EROs, no sólo a las producidas por el propio metabolismo oxidante, sino también a las EROs provenientes del metabolismo de los fármacos con las que se combate a este parásito y de manera muy importante, a las producidas por las células de la respuesta inmune del hospedero. El fenómeno de estrés oxidante tiene, entre otros efectos, la carbonilación de proteínas. Se sabe que existen

diferencias entre distintas proteínas a ser carboniladas, sin embargo, no se conocen con detalle cuales son las principales proteínas blanco de daño oxidante en el parásito.

3. Hipótesis

El estrés oxidante causará la carbonilación diferencial y específica entre las proteínas de *T. cruzi*.

4. Objetivo general

Caracterizar las proteínas carboniladas por efecto del estrés oxidante en *T. cruzi*.

5. Objetivos particulares

- Encontrar las condiciones óptimas de cultivo de *T. cruzi*, evitando particularmente generar estrés oxidante durante el cultivo.
- Validar el modelo de inducción de estrés oxidante con H₂O₂ en *T. cruzi*.
- Analizar por electroforesis bidimensional el perfil de proteínas carboniladas en *T. cruzi* sujeto a estrés oxidante causado por H₂O₂.
- Identificar la posible identidad de las proteínas carboniladas en *T. cruzi* por efecto del H₂O₂.

6. Metodología

6.1. Cultivo de epimastigotes de *T. cruzi* en fase logarítmica.

En el presente trabajo se utilizó la cepa Querétaro (ITRI/MX/-) de *T. cruzi*, perteneciente al grupo genético I y caracterizada en nuestro laboratorio como una cepa virulenta (Bosseno *et al.*, 2002; Espinoza *et al.*, 2010). Se cultivaron epimastigotes de *T. cruzi* en medio LIT suplementado con hemina (5, 10, 15 o 25 mg/l) y suero fetal bovino al 10% (Chiari y Camargo, 1984). Para los ensayos posteriores a la optimización del cultivo, únicamente se utilizó el medio LIT suplementado con 5 mg de hemina por litro de medio. Se sembraron 2.5×10^6 parásitos por ml de medio y se cultivaron durante tres días a 28°C en cajas de cultivo, obteniendo un cultivo en fase exponencial temprana.

6.2. Ensayo de exposición de *T. cruzi* a H_2O_2 .

Diez ml de cultivo de parásitos (30×10^6 por ml de medio) se centrifugaron a 6000 rpm 10 min y lavaron tres veces con PBS estéril, se resuspendieron en 10 ml de amortiguador estéril para incubación (KCl 5 mM, NaCl 80 mM, $MgCl_2$ 2 mM, Na_2HPO_4 16.2 mM, NaH_2PO_4 3.8 mM, BSA 0.15%) (Carnieri *et al.*, 1993), se agregó H_2O_2 a partir de una alícuota al 30% para una concentración final de 160 μ M y se incubaron durante 30 min a 28°C en obscuridad. Pasado este tiempo se centrifugó a 6000 rpm 10 min y se lavó con PBS (amortiguador de fosfato de sodio) estéril, este último paso se repitió dos veces (Martínez-Espinosa, 2007). Los parásitos controles se sometieron al mismo protocolo con la sola diferencia de que no se les agregó H_2O_2 .

6.3. Obtención y cuantificación de proteínas totales de *T. cruzi*

Los epimastigotes expuestos a 160 μ M de H_2O_2 y sin exponer (según se detalla en el apartado anterior) se centrifugaron a 6000 rpm por 10 min y los botones se pesaron (peso húmedo), según su peso se añadió amortiguador de lisis (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4% y tris 10 mM), adicionalmente se agregaron inhibidores de proteasas: EDTA 12 mM,

PMSF 1 mM, leupeptin 0.1 mM y pepstatin 0.001 mM en una proporción 1:3 (peso:volumen) y se agitaron en vortex por 3 min. Después se dejaron en hielo por 10 min y se centrifugaron por 15 min a 15,000 rpm. Finalmente se recuperó el sobrenadante, el cual contenía el extracto total de proteínas. Se cuantificó la proteína con el estuche 2D-Quant (Cat: 80-6483-56, Amersham G.E.) según las instrucciones del proveedor. De manera breve, se preparó una curva estándar de BSA (albumina sérica de bovino) (0-50 mg/ml) además de las muestras a evaluar por duplicado (2 µl por muestra), se separó la proteína con los reactivos de precipitación, se agregó solución de cobre y reactivo de color a cada muestra; se incubaron 20 min a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 480 nm en un lector de placas de ELISA. A partir de la curva de BSA se extrapoló la concentración de las muestras evaluadas, con una relación inversamente proporcional entre la concentración de proteína y la medición de absorbancia. Los extractos se congelaron a -20°C hasta su uso.

6.4. Derivatización de proteínas

La derivatización es la transformación química de un compuesto a otro de similar estructura, resultando en un compuesto con ciertas propiedades útiles. En nuestro caso se derivatiza un grupo carbonilo con DNPH, para formar un grupo DNP. Mismo que se puede detectar mediante anticuerpos específicos (Nyström 2005) (Figura 6). Para las muestras que serían corridas en electroforesis unidimensional, el proceso de derivatización se llevó a cabo con el estuche comercial OxyBlot (Chemicon S7150), según las recomendaciones del proveedor. En resumen, se tomaron para cada ensayo independiente 2 µg de proteína a partir de extracto de proteínas totales de cada muestra y se combinó en proporción 1:1 (volumen:volumen) con 2,4 DNPH 1X. Después de 15 min de incubación a temperatura ambiente se adicionó la solución neutralizadora en proporción 1:0.7. En el caso de la derivatización en 2D se siguió el protocolo de derivatización en tira que se detalla más adelante.

6.5. Electroforesis e inmunodetección en una dimensión

Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). Las muestras derivatizadas se corrieron en SDS-PAGE en condiciones reductoras, en geles de 5 X 6 cm y 0.75 mm de grosor con un gel concentrador de acrilamida al 4% y gel separador al 12%. Se cargaron 2 µg de proteína para el ensayo de detección de proteínas carboniladas y 5 µg en el caso de la detección de HSP70, se adicionó en cada caso amortiguador de muestra (tris base 3%, glicerol 40%, SDS 4%, β-mercaptoetanol 4%, azul de bromofenol 2%) en proporción 3:1 (volumen:volumen) y se corrió en amortiguador de electroforesis (tris base 3.02%, glicina 14.4%, SDS 1%) durante 45 min a 200 V en una cámara Mini-Protean II Dual Slab Cell (Bio-Rad) (Laemmli, 1970). Los geles control se tiñeron con colorante azul de Coomassie (azul de Coomassie R-250 Bio-Rad 0.05%, metanol 50%, ácido acético 10%) durante 30 min a temperatura ambiente.

Transferencia. Después de realizar la SDS-PAGE los geles se colocaron en casetes y se sumergieron en amortiguador de transferencia (tris base 0.03%, glicina 0.144%, metanol 20%), colocándolos frente a una membrana de nitrocelulosa de 6 X 9 cm en una cámara MiniTrans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) y se transfirió en frío, corriendo a 200 V constantes durante 70 min. Al terminar, se verificó la correcta transferencia de las proteínas con colorante rojo Ponceau (rojo Ponceau 0.1%, ácido acético 0.5%) tiñendo unos segundos la membrana. Finalmente se lavó la membrana de nitrocelulosa con PBS hasta desteñir (Towbin *et al.*, 1979).

Western blot. La membrana se trató con solución de bloqueo toda la noche (10% leche descremada en PBS) a 4°C en agitación constante. Posteriormente la membrana se incubó 1 h con el anticuerpo de conejo anti-DNP 1:150 (OxyBlot) en PBS-Tween 20 y después se dieron 4 lavados con PBS-Tween 20. La membrana se incubó 1 h con el anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo asociado a peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés) (OxyBlot) disuelto 1:300 en PBS-Tween 20. La membrana se reveló por quimioluminiscencia basada en la reacción de un sustrato lumigen acridan PS-3, que se convierte en un éster de acridina cuando se cataliza por la HRP, el éster reacciona con el

peróxido en medio alcalino y emite luz que se puede detectar por autorradiografía (película) (ECL Plus Western Blotting Detection System, GE Healthcare cat:RPN2132). El ensayo se realizó según las indicaciones del proveedor. De manera breve, se agregaron las soluciones de quimioluminiscencia en proporción 1:40 (solución A -sustrato que contiene amortiguador de tris- : solución B –sustrato de acridan en dioxano y etanol) para 2 ml finales por membrana, se dejó incubar por 5 min y se retiró el exceso de las soluciones, se expuso la membrana a una película auto radiográfica (Kodak X-Omat, Sigma cat:F1274) por 3 min en un casete de exposición. Finalmente, la película se sumergió en solución reveladora un minuto, se enjuagó en agua y se pasó a solución fijadora (SIGMA-ALDRICH Kodak 1901859) por 30 seg. (Conrad *et al.*, 2001).

6.6. Ensayo para detección de HSP70

Las proteínas totales de las muestras control y expuesta a 160 μM de H_2O_2 (5 μg) se corrieron en SDS-PAGE, después se realizó la transferencia en las condiciones antes descritas. En seguida se hizo un western blot, como se describió previamente, pero incubando 2 h con el anticuerpo anti-HSP70 humana, que presenta reactividad con HSP70 de distintos grupos de vertebrados e invertebrados (BD-Biosciences cat:610607), en una dilución 1:4000 en PBS-10% leche descremada; después de lo cual se lavó tres veces con PBS-Tween 20 (0.05%). Posteriormente, la membrana se incubó 2 h con el anticuerpo IgG-anti-ratón asociado a HRP (Zymed 61-60 20); pasado este tiempo de incubación, se lavó tres veces con PBS-Tween 20 (0.05%) y finalmente se reveló con 0.5 mg/ml de 3, 3-diaminobenzidina en PBS con 0.02% de H_2O_2 (Sambrook *et al.*, 1989).

6.7. Ensayo de detección de ROS por dihidrorodamina 123

Se expusieron un millón de epimastigotes de *T. cruzi* a 160 μM de H_2O_2 , o sólo con medio como control. Los parásitos se lavaron con PBS estéril con inhibidores de proteasas (EDTA 12 mM, PMSF 1 mM, leupeptin 0.1 mM y pepstatin 0.001 mM), posteriormente las células integras se resuspendieron en 360 μl de buffer A (NaCl 140 mM, KCl 5 mM,

MgSO₄ 0.8 mM, CaCl₂ 1.8 mM, glucosa 5 mM y HEPES 15 mM a pH 7.4) y 40 µl de dihidrorhodamina-123 10 µM (Calbiochem cat. 309825). De cada muestra se tomaron 200 µl por duplicado, se incubó 5 min a 37°C y se leyó la aparición de rodamina, por oxidación de dihidrorodamina, mediante la absorbancia a 490 nm en un lector de placas de ELISA.

6.8. Ensayo actividad de tripanotión reductasa

A partir de cultivos con aproximadamente 200 millones de epimastigotes se obtuvo proteína por congelación y descongelación (tres rondas de congelación con nitrógeno líquido y de descongelación a baño maría a 37°C) en amortiguador HEPES-EDTA (HEPES 40 mM, EDTA 1 mM, pH 7.4). A partir del precipitado se analizó la actividad de la tripanotión reductasa a 37°C, pH 7.4. Se agregaron tripanotión (Bachem H-7510) y NADPH (Sigma N1630) midió en condiciones de velocidad máxima, quedando una mezcla de reacción con el tripanotión a 0.24 mM y el NADPH 0.2 mM. Se calculó el consumo de NADPH por absorbancia a 340 nm (Piacenza *et al.* 2007). La actividad se obtuvo al multiplicar la absorbancia por el volumen final de la cubeta en ml, se multiplicó por 60 para obtener el dato por minuto, se dividió entre 6.22 (coeficiente de extinción molar del NADPH) y finalmente se dividió entre la cantidad de proteína en mg.

6.9. Ensayo de medición de tripanotión reducido

Los extractos totales de epimastigotes expuestos 30 min o una hora con 160 µM de H₂O₂ fueron lisados en amortiguador HEPES-EDTA por congelación y descongelación, como se describió anteriormente, se incubaron con DTT (Sigma 43817) 1 mM y borohidruro de sodio (NaBH₄) (Sigma S9125) (la punta de una espátula) en hielo por 10 min. Posteriormente se agregó ácido perclórico a una concentración final de 3% para detener la reacción y precipitar todas las proteínas. Se centrifugó a 14000 rpm por 5 min. El sobrenadante se pasó a través de filtros con poro de 0.22 µm y se inyectaron 50 µl en el equipo para cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con columna de fase reversa C-

18 (4.6 x 150 mm, Alltech, Deerfield, Ill, USA) (Piacenza *et al.* 2007). La columna se equilibró con amortiguador con de ácido trifluoroacético 99% (concentración 0.1%) y acetonitrilo 1%. Los tioles se eluyeron en este mismo amortiguador en los primeros 10 min. Los tiempos de retención son los siguientes: Cys: 2.5 min, GSH: 4.5 min, g-EC: 5 min, T(SH) 2:7.2 min.

Los tioles se derivatizaron post columna con DTNB (5,5'- dithio-bis(2- ácido nitrobenzoico)) 0.1 mM y se detectaron espectrofotométricamente a 412 nm. Para obtener las concentraciones se consideró que 1.62 nmol de tioles dan un área bajo la curva de 17.6 mm² y se utilizó como estándar una muestra de tripanotión con concentraciones conocidas.

6.10. Detección de proteínas carboniladas por electroforesis bidimensional

Electroforesis en 2D. A 200 µg de proteína de cada muestra (control y expuesta a H₂O₂) se les adicionó solución de rehidratación (urea 7 M, tiourea 2 M y CHAPS 4%) para un volumen final de 125 µl, se adicionaron 2% de amortiguador IPG (gradiente de pH inmovilizado) pH 3-10 y 2.6 µl de una solución de DTT (0.01 g/ 75 µl H₂O, 0.018 M final). Las Tiras IPG de 7 cm de pH 3-10 NL (no lineal) (BioRad 163-2002) o pH 3-6 (BioRad 163-2003) se incubaron con la solución anterior por 45 min; posteriormente se adicionó aceite mineral y se dejó rehidratar a las tiras durante 16 h. Las muestras se corrieron por isoelectroenfoque en tres pasos: paso 1; voltaje final de 250 V por 20 min en modo lineal, en el paso 2 el voltaje final fue de 10 000 V por 2.5 h en modo lineal, finalmente en el paso 3 el voltaje final fue de 40,000 V/H por 5 h; en todos los pasos se mantuvo una temperatura de 20°C. Las tiras se derivatizaron con HCl 2N y DNPH 10 mM a temperatura ambiente por 20 min con agitación suave, después se lavaron con Tris-Base 2 M y glicerol 30% por 15 min en agitación suave. Cada tira se incubó en solución de equilibrio (50 mM tris-Cl pH 8.8, urea 6M, glicerol 30%, SDS 2% y DTT 10 mg/ ml o iodoacetamida 25 mg/ ml); primero en esta solución con DTT por 15 min y después en la solución de equilibrio con iodoacetamida en vez de DTT por otros 15 min (Conrad *et al.*, 2001). Las tiras se colocaron en la parte superior de un gel de acrilamida al 12%, fijándolas con agarosa al 0.5% y se corrieron a 200 V por aproximadamente 45 min.

Transferencia. Las proteínas se transfirieron del mismo modo al descrito anteriormente, con la diferencia de que en este caso se utilizaron membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF).

Western blot. Las membranas se bloquearon toda la noche en PBS con leche descremada al 10% en frío y agitación constante. Las condiciones fueron estandarizadas a las membranas de PVDF, que se incubaron con los anticuerpos de conejo anti-DNP (Chemicon S7150) diluidos 1:1000 en PBS con leche descremada al 10% por 2 h. Posteriormente con el anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo asociado a HRP (Chemicon S7150), diluido 1:2000 en PBS Tween 20 al 0.1%, durante 2 h en agitación y temperatura ambiente. Las membranas se revelaron por quimioluminiscencia como se describió previamente.

6.11. Análisis de imágenes y búsqueda de proteínas carboniladas

Todas las imágenes se manejaron en el programa ImageJ 1.38X (Wayne Rasband, NIH, USA) donde fueron pasadas a 8 bits y se sustrajo el ruido de fondo (Subtract Background; Rolling ball radius: 50). La densitometría se realizó con la herramienta de “histograma” para la misma área en las diferentes muestras y restando el valor de fondo en cada película; las unidades reportadas son arbitrarias. Posteriormente las imágenes se analizaron con ayuda del programa PDQuest (BioRad cat: 1708603). Los datos obtenidos en este programa se corroboraron manualmente y, a partir de los pesos moleculares y puntos isoeléctricos encontrados, se realizó una búsqueda con el programa Tagident (<http://ca.expasy.org/tools/tagident.htm/>), en la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot, para obtener la posible identidad de las principales proteínas carboniladas. Los parámetros utilizados en la búsqueda fueron, con rangos de $PI \pm 0.25$ y $PM \pm 10\%$, con respecto a los valores encontrados en proteínas de *T. cruzi*.

6.12. Secuenciación por LC-MS/MS

Geles de 2D con gradiente de pH 3 a 6 cargados con 200 µg de proteína total de epimastigotes de *T. cruzi* fueron teñidos con azul Coomassie G-250 o R-250 ya que detectamos diferencias cualitativas y cuantitativas entre la tinción con ambos compuestos. Las proteínas correspondientes en punto isoelectrico y peso molecular a las encontradas en los ensayos de detección de proteínas carboniladas en electroforesis bidimensional fueron localizadas, cortadas del gel y mandadas a secuenciar al Instituto de Biotecnología, de la Universidad Nacional Autónoma de México, con la técnica de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC/MS/MS, por sus siglas en inglés). En el caso de la proteína numero 23 se decidió secuenciar otra proteína muy cercana que parecía ser una isoforma de la primera. La metodología de secuenciación de manera breve fue: las muestras se redujeron con DTT y se alquilaron con iodoacetamida, se digirieron usando tripsina (Promega; part no. 9PIV5113). Los péptidos fueron desalados y analizados por LC-MS/MS. La cromatografía se realizó con un equipo de HPLC Accela (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) con un flujo de 300 nL/min. La columna fue una PicoFrit Proteopep 2 C18 75 µM ID × 50 mm. Los péptidos eluidos se introdujeron al electrospray a 2.0-kV en un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA). Los datos de la fragmentación fueron introducidos al programa Sequest Discoverer 1.0 (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) y se compararon con una base de datos no redundantes. Los datos también fueron introducidos al programa Peaks Online (Bioinformatics Solutions, Canadá) y comparados con diferentes bases de datos. En los parámetros de búsqueda se utilizó un error máximo de 15 ppm (partículas por millón) para la masa del ion precursor y una tolerancia de 0.6 Da para la masa del fragmento del ion.

6.13. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con ayuda del programa GraphPad InStat 3.05 (GraphPad Software Inc.), para al menos tres ensayos independientes en pruebas de ANOVA (mediciones repetidas) así como post test de Tukey, tomando valores de $p < 0.05$ como significativos (Zar 1999).

7. Resultados

7.1. Efecto de la hemina sobre el crecimiento y la carbonilación de proteínas

Con el propósito de ajustar las condiciones de cultivo de manera que fueran óptimas para el crecimiento de los parásitos sin producir estrés oxidante, se estudió el efecto de la concentración de hemina en relación a la carbonilación de proteínas y al crecimiento de los parásitos. En ensayos de SDS-PAGE fue posible observar las diferentes proteínas carboniladas (Figura 8A). Al comparar los promedios de densitometría en ensayos de carbonilación se observó un aumento en la intensidad de la carbonilación por efecto de la concentración de hemina; esto en los días 3 y 7 de cultivo. Sin embargo, el fenómeno desaparece a los 14 días. Las muestras de 3 días de cultivo con 5 mg/L de hemina presentaron significativamente menos proteína carbonilada comparada con las muestras con 25 mg/L. En las muestras de 7 días de cultivo sólo las de 5 y 10 mg/L de hemina tienen significativamente menor carbonilación que la muestra de 25 mg/L de hemina de ese mismo día (Figura 8B). Al comparar la carbonilación de proteínas en las muestras con la misma concentración de hemina pero diferentes días de cultivo no encontramos diferencias significativas. Al mismo tiempo se determinó la expresión de la proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70), misma que se sabe se incrementa por efecto de estrés oxidante en otros tripanosomátidos, no apreciándose diferencias significativas.

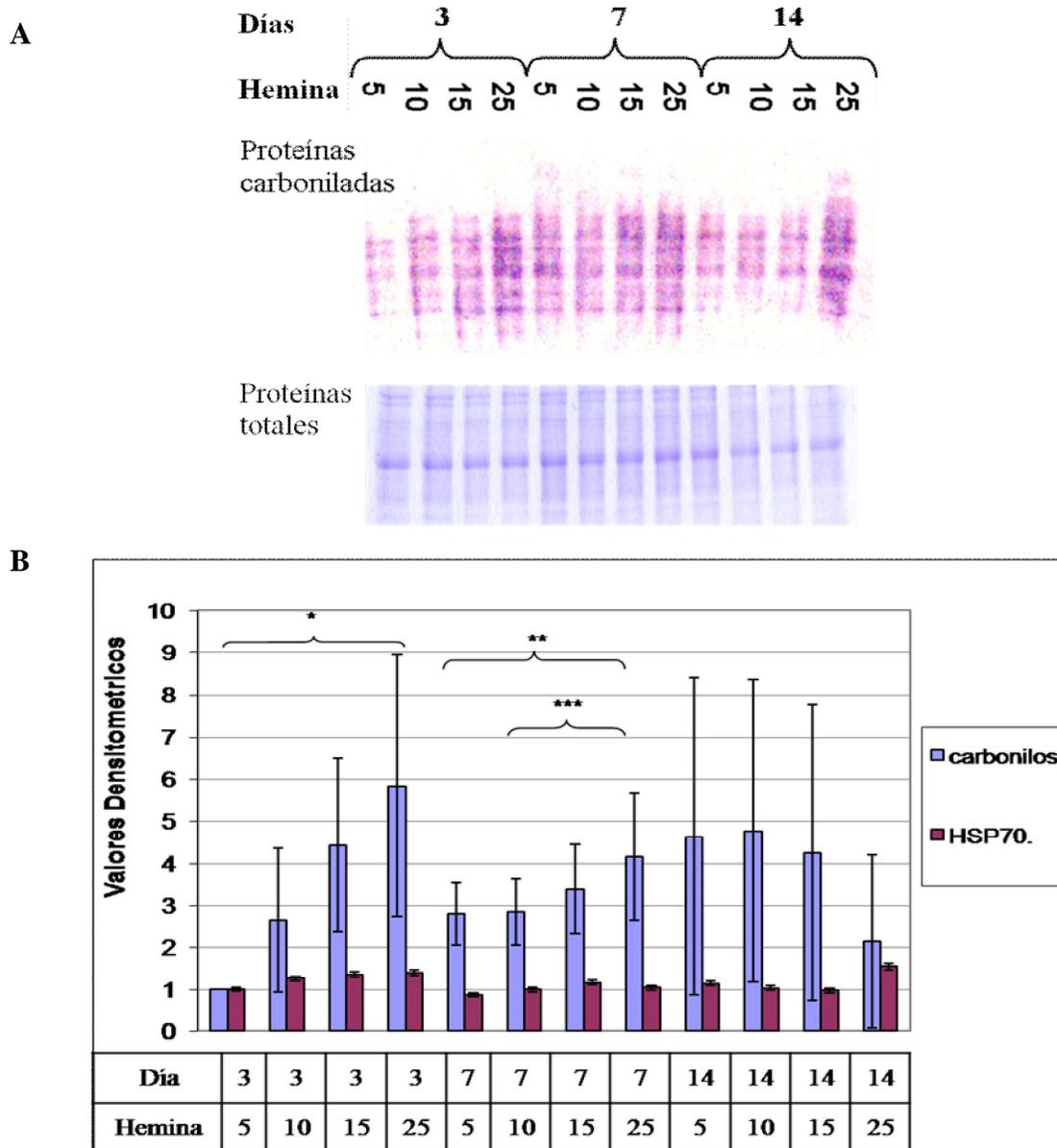


Figura 8. Carbonilación de proteínas en epimastigotes de *T. cruzi* cultivados en medio suplementado con diferentes concentraciones de hemina por diferentes días. Dos millones de parásitos fueron sembrados en medio LIT suplementado con diferentes concentraciones de hemina (5, 10, 15 y 25 mg/L), extractos de parásitos se prepararon 3, 7 o 14 días después. Los experimentos de carbonilación en una dimensión y detección de HSP70 se realizaron como se describe en materiales y métodos. A) Western blot de proteínas carboniladas y SDS-PAGE de las proteínas totales teñidas con azul de Coomassie de los diferentes días y concentraciones de hemina ya mencionadas. B) Gráfica de los promedios de los valores densitométricos de western blot para proteínas carboniladas y HSP70 de tres ensayos independientes \pm desviación estándar. * $P < 0.05$ entre 5 y 25 mg/L de hemina a los 3 días, ** $P < 0.05$ entre 5 y 25 mg/L de hemina a los 7 días, *** $P < 0.05$ entre 10 y 25 mg/L de hemina a los 7 días, en todos los casos por prueba de ANOVA.

Para investigar si la hemina tiene algún efecto en el crecimiento de los epimastigotes se realizaron conteos celulares en el hemocitómetro al tercer día de crecimiento (72 hrs) a partir de cultivos con una densidad inicial de dos millones de parásitos por ml. El resultado fue una disminución del crecimiento probablemente debido a la concentración de hemina. Los promedios de seis ensayos fueron de 27.167 millones de parásitos en 5 mg/L hemina, 26.667 millones con 10 mg/L hemina, 25.375 millones con 15 mg/L hemina y 15.792 millones con 25 mg/L; siendo el decremento estadísticamente significativo únicamente en esta última condición con respecto a los otros tres valores (Figura 9). Con estos resultados y los descritos anteriormente se decidió trabajar con cultivos de 3 días de crecimiento y con 5 mg/L de hemina.

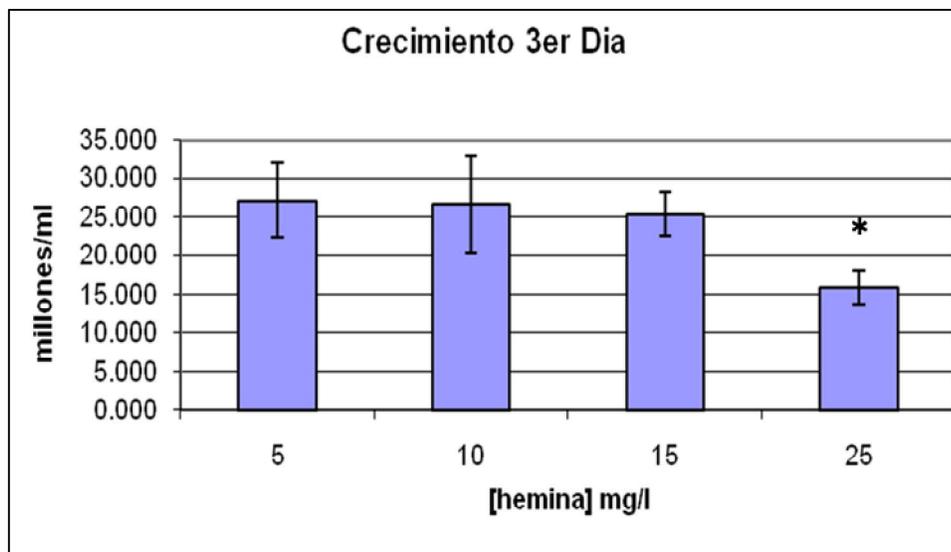


Figura 9. Crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* en medio suplementado con diferentes concentraciones de hemina. Dos millones de parásitos fueron sembrados en medio LIT suplementado con diferentes concentraciones de hemina (5, 10, 15 y 25 mg/L), los parásitos fueron contados en hemocitómetro tres días después. La gráfica representa los promedios de seis ensayos independientes \pm desviación estándar, * $P < 0.05$ ANOVA con respecto a los demás valores.

En mi trabajo previo de licenciatura se identificó la concentración de 160 μM de H_2O_2 como una concentración en la que, después de 30 min de exposición, se observó una inhibición de la movilidad de más del 80% de los parásitos. Fue esta misma concentración la que provocó un aumento significativo en la carbonilación detectada por análisis densitométricos de proteínas carboniladas detectadas en SDS-PAGE-western blot (Martínez-Espinosa, 2007). Por esta razón decidimos trabajar con dichas condiciones en el presente estudio.

7.2. Ensayos de detección de EROs por dihidrorodamina

Con el objetivo de validar nuestro modelo como un ensayo en donde se diera la producción de EROs, y subsecuente estrés oxidante en el parásito, se utilizó el ensayo de detección de EROs por el método de oxidación de la dihidrorodamina. Este ensayo nos permitió saber si existía formación de EROs intracelulares por efecto del H_2O_2 . Los epimastigotes se sometieron a 160 μM de H_2O_2 durante 30 min o una hora, como control se utilizaron células de mamífero en las cuales se sabe hay formación de EROs por efecto del cadmio. La formación de rodamina se cuantificó midiendo la absorbancia a 490 nm. En los parásitos sin estrés encontramos valores promedio de 0.024 mg de rodamina/mg de proteína. Este se incrementó a 0.043 cuando se le adicionó el H_2O_2 por 30 min y a 0.049 mg de rodamina /mg de proteína con el H_2O_2 por 1 h, siendo ambos valores estadísticamente mayores con respecto al control (Figura 10).

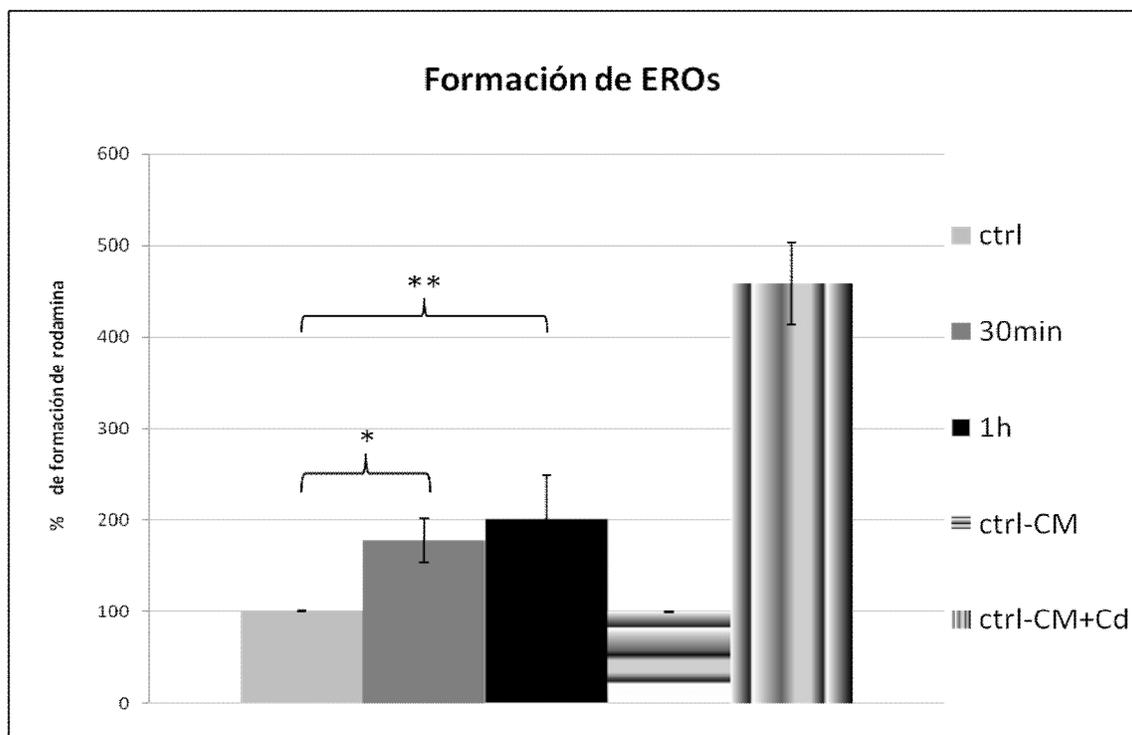


Figura 10. Gráfica de detección de especies reactivas de oxígeno (EROs) por reacción de dihidrorodamina. Dos millones de parásitos fueron expuestos a 160 μM de H_2O_2 durante 30 min o una hora, se agregó dihidrorodamina 123 y se leyó la absorbancia. Se utilizaron controles de células de mamífero sin tratar (ctrl.-CM) y expuestas por 30 min a cadmio (ctrl.-CM+Cd). Las unidades son porcentaje respecto al control de tres ensayos independientes.* $P < 0.05$ 30 min con respecto al control, ** $P < 0.05$ 1h con respecto al control.

7.3. Ensayo de actividad de tripanotión reductasa

Como parte de la caracterización de la respuesta a estrés oxidante se midió la actividad de la enzima tripanotión reductasa, principal enzima de defensa contra el estrés oxidante en el parásito. Se encontró que la actividad de la enzima disminuye no significativamente cuando el parásito es expuesto durante 30 min a 160 μM H_2O_2 respecto al control ($59.8 \pm 4 \mu\text{M NADPH}/\text{min}$ por mg de proteína y $62.54 \pm 5.64 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$, respectivamente, $n=3$). En el caso de las muestras tratadas por una hora con la misma concentración de H_2O_2 se nota un aumento significativo de casi el doble respecto al control ($112 \pm 32.2 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$, $n=3$) en el intervalo lineal de la reacción (Figura 11).

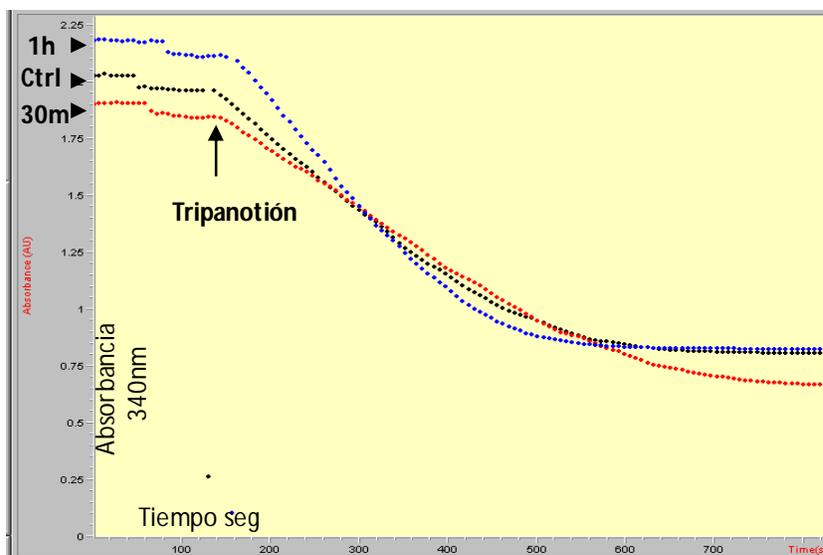


Figura 11. Ensayo de actividad de tripanotión reductasa en parásitos expuestos a 160 μM de H_2O_2 . De arriba a abajo: expuesto a H_2O_2 durante una hora, control sin exponer y expuesto a H_2O_2 durante 30 minutos. Absorbancia de NADPH a 340nm a lo largo del tiempo, desde la adición de tripanotión y a lo largo del intervalo lineal de la reacción. Resultados representativos de uno de tres experimentos.

7.4. Medición del tripanotión reducido

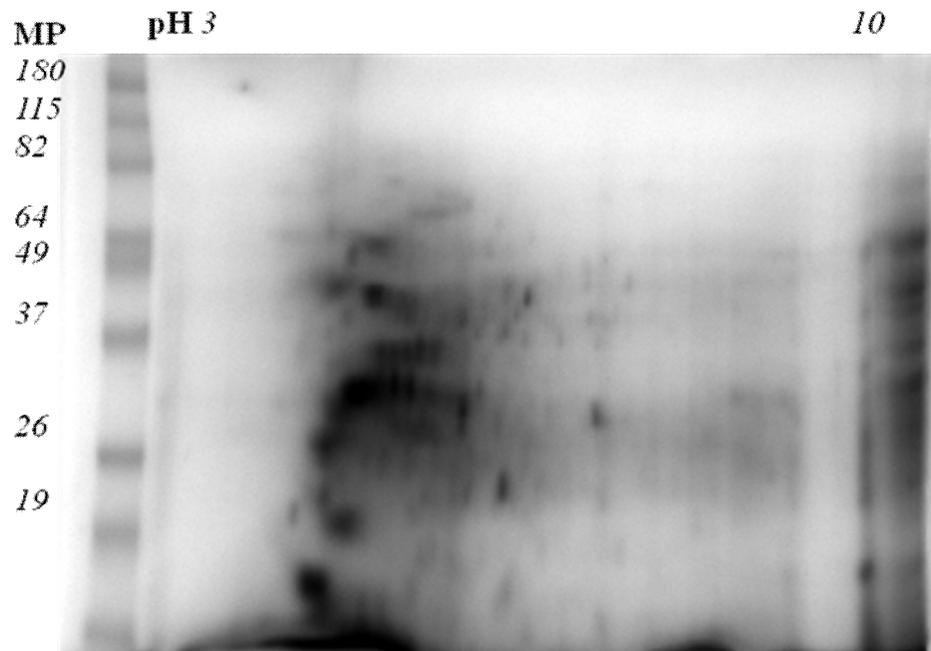
Por ensayos de HPLC se midió la cantidad de tripanotión en parásitos control y expuestos a 160 μM de H_2O_2 por 30 min y 1 h. En los resultados obtenidos en tres experimentos independientes la muestra control tuvo un promedio de 0.877 ± 0.32 mM (n=3) de tripanotión reducido. Cuando se expuso a los parásitos a 30 min con H_2O_2 la concentración aumentó a 1.077 ± 0.056 mM (n=3) (siendo una diferencia no significativa) y, tras una hora con H_2O_2 , la concentración de tripanotión fue de 1.322 ± 0.07 mM (n=3), (significativamente mayor al control).

7.5. Estandarización de la electroforesis bidimensional

Se realizaron geles de 2D de proteína utilizando 200 μg de proteína de epimastigotes que fueron corridos en tiras con un gradiente de pH de 3 a 10 NL (gradiente amplio) o de 3 a 6 (gradiente cerrado). Este último es el intervalo de pH más rico en proteínas del parásito. Las proteínas fueron separadas por punto isoelectrico (PI) en tiras de

7 cm. Para su separación por peso molecular (PM), se corrieron en geles de acrilamida al 12%. Finalmente, se tiñeron los geles con azul Coomassie G250 (Figura 12). Bajo las condiciones antes descritas, se logró obtener un patrón de 278 proteínas en el rango de pH 3 a 10 NL y de 268 en el rango de 3 a 6. Para ambos tipos de geles la mayoría de las proteínas se localizan en la zona de pH entre 4 a 6 y en pesos moleculares de entre 15 y 82 kDa. Esto es consistente con lo previamente visto en nuestro grupo para extractos proteicos similares del parásito.

A



B

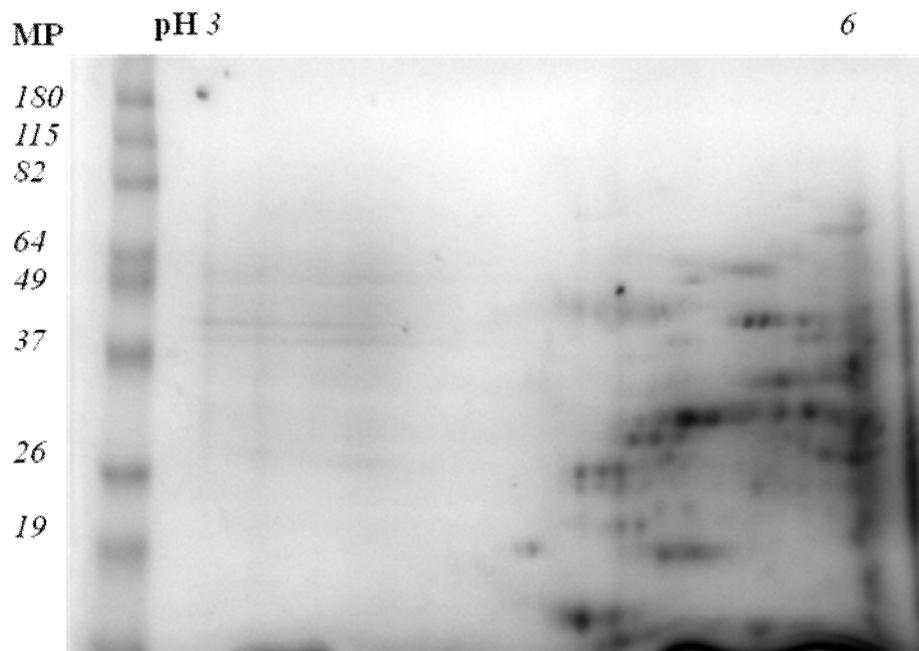
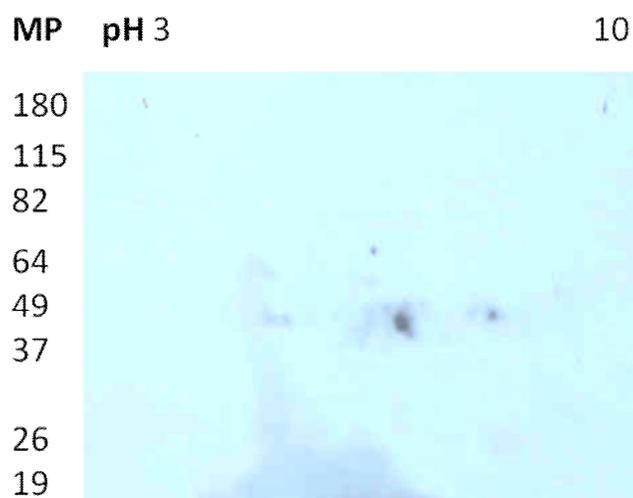


Figura 12. Geles de electroforesis bidimensional. Geles cargados con 200 μ g de extracto de proteínas totales de epimastigotes de *T. cruzi* corrido en rango de pH de 3 a 10 NL (no lineal) (A) y pH 3 a 6 (B), las proteínas se tiñeron con azul Coomassie G250.

7.6. Identificación de proteínas carboniladas

Las proteínas se separaron por PI, se derivatizaron y separaron por PM como se indicó en la sección anterior, posteriormente se transfirieron a membranas de PVDF, mismas que fueron utilizadas para hacer un western blot con anticuerpos contra DNPs. Los western blots se revelaron con reactivos quimioluminiscentes en películas autoradiográficas. En el caso de las tiras de amplio rango de pH (3-10 NL) se observó que la mayor cantidad de señal estaba en la zona de pH 3 a 6, así como en pesos moleculares de entre 82 y 39 kDa. Al comparar las muestras control con las muestras expuestas a 160 μM de H_2O_2 por 30 min, las segundas presentaron, 2.42 veces mayor intensidad por ensayos densitométricos en la señal de proteínas carboniladas, así como la aparición de proteínas carboniladas no observadas en el control (Figura 13, A y B). Con el afán de distinguir con mayor claridad a las proteínas carboniladas, se decidió correr las muestras en un gradiente de pH de 3-6, esto nos permitió tener una señal más clara de la mayoría de las proteínas carboniladas. De la misma manera que en el gradiente de pH amplio, cuando se utilizó pH de 3-6, la intensidad de la señal fue mayor (1.83 veces) en las muestras tratadas con H_2O_2 y se notó la aparición de más proteínas carboniladas (Figura 14, A y B).

A

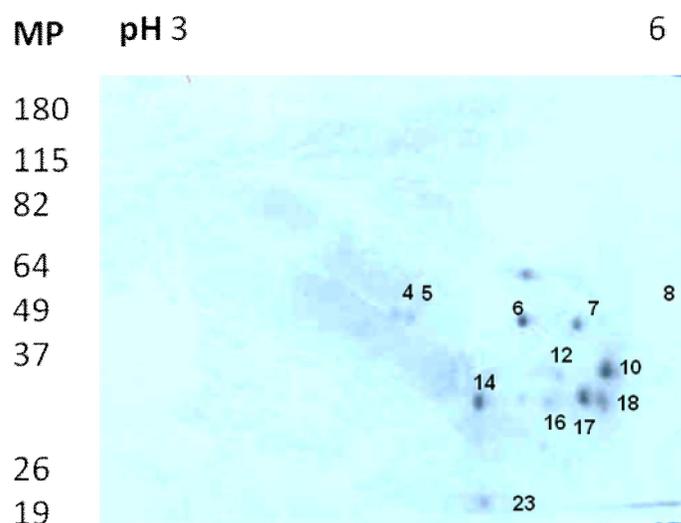


B



Figura 13. Proteínas carboniladas pH 3-10 NL. 200 μg de proteína de muestra control (A) y expuesta a 160 μM de H₂O₂ por 30 min (B) se corrieron en tiras IPG con pH de 3-10 NL, se derivatizaron y fueron corridas en geles de acrilamida al 12%. Se transfirieron a membranas de PVDF y se realizaron ensayos de western blot con anticuerpos anti-DNP's los cuales se revelaron por quimioluminiscencia. Se muestran películas representativas de cuatro ensayos.

A



B

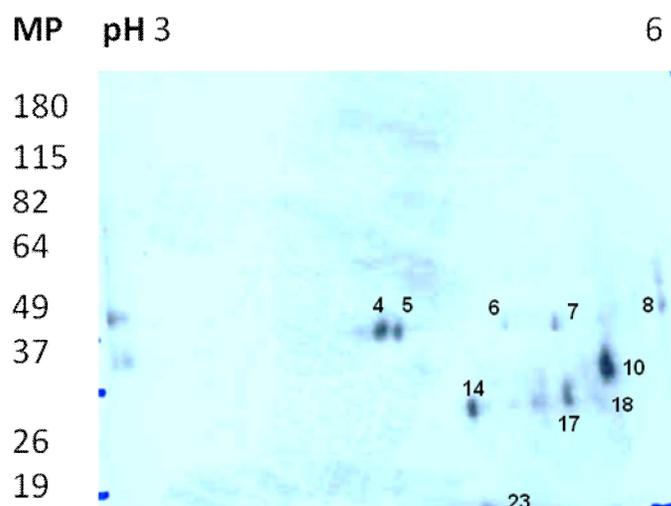


Figura 14. Proteínas carboniladas pH 3-6. 200 μ g de proteína, de muestra control (A) y expuesta a 160 μ M de H_2O_2 por 30 min (B) se corrieron en tiras IPG con pH de 3-6, se derivatizaron y fueron corridas en geles de acrilamida al 12%. Se transfirieron a membranas de PVDF y se realizaron ensayos de western blot con anticuerpos anti-DNP's los cuales se revelaron por quimioluminiscencia. Los números muestran las proteínas constantes en al menos 3 de 4 ensayos independientes.

Tras analizar cuatro experimentos independientes se distinguieron en los blots a proteínas que se carbonilaron en la mayoría de los experimentos realizados (al menos en tres de cuatro experimentos) y que fueran claramente visibles. A cada proteína se le

identificó con un número (figura 14). El PI y PM de todas las proteínas fue determinado manualmente y corroborado con el programa PDQuests de BioRad, del mismo modo este paquete computacional confirmó la elección de las proteínas presentes en al menos tres de los cuatro experimentos independientes. En dichos análisis se identificaron 12 “puntos” reproducibles con puntos isoelectricos de entre pH 6.33 y 4.45, así como PM de entre 66.5 y 21.56 kDa.

Con base en la información de PI y PM de cada proteína se realizó una búsqueda de posible identidad mediante el programa en línea TagIdent y la base de datos de Swissprot (ver metodología). Las proteínas que se obtuvieron a partir de estos datos se enlistan en la tabla I. En la misma tabla se presenta el análisis de intensidad en la señal de carbonilación en ensayos de western blot para cada proteína en presencia de H₂O₂ y en los experimentos control sin H₂O₂. Los números de las proteínas mostrados en la tabla corresponden a los mostrados en la figura 14. Como se puede apreciar, las proteínas 6, 7, 28 y 16 ven disminuida la intensidad de la señal de carbonilación tras exponer al parásito a H₂O₂. De manera contraria, las proteínas 2, 10 y 14 aumentan su carbonilación después de la exposición a H₂O₂. En el caso de la proteína 12, no se pudo realizar el análisis densitométrico por razones metodológicas. En esta misma proteína se encontraron dos probables identidades en swissprot que cumplieran con los requisitos previamente descritos para la búsqueda.

A partir de geles de 2D se obtuvieron proteínas carboniladas que se secuenciaron por LC/MS/MS, en los resultados obtenidos se identificaron exitosamente a cuatro proteínas carboniladas. En la tabla II se muestran los PM y PI encontrados experimentalmente y los teóricos así como los valores densitométricos de las proteínas carboniladas en los parásitos sometidos a estrés y en los controles. La identidad de las proteínas carboniladas es: proteína de choque térmico 85 (HSP85), sintasa de prostaglandina F2 alfa, cadena beta de la tubulina y peptidasa de cisteína tipo calpaina. Al realizar los ensayos densitométricos se observa que la HSP86 disminuye en la intensidad de carbonilación, en este mismo caso es de llamar la atención la considerable diferencia entre el PM y PI encontrados y los reportados para esta proteína, esta diferencia nos puede llevar

a pensar que estamos observando un fragmento de la proteína y no a la proteína completa. La sintasa de prostaglandina F2 alfa aumenta su carbonilación tras el estrés oxidante, ello al igual que la beta tubulina que es la única proteína presente en el análisis tanto por TagIdent como en la secuenciación. Otro caso particular es el de la proteasa tipo calpaina ya que esta enzima se vio carbonilada en una isoforma pero no en otra, es decir, se demuestra que las isoformas de una misma proteína pueden tener diferentes susceptibilidades a la carbonilación. La isoforma susceptible a la carbonilación parece no presentar diferencias importantes entre las muestras con y sin exponer a H₂O₂. Es evidente que la dinámica de carbonilación en las proteínas del parásito es complicada y particular para cada proteína ya que las diferencias de carbonilación entre las proteínas no son sólo cualitativas (se carbonilan o no tras exponer al parásito a estrés oxidante) sino también cuantitativas (la carbonilación aumenta o disminuye en diferentes grados tras exponer al parásito a estrés oxidante). Finalmente se presentan los resultados de la secuenciación con los peptidos encontrados en las bases de datos (Figura 15), subrayando a los peptidos que fueron secuenciados y que se encontraron en las bases de datos (ver metodología).

Tabla I; Probables proteínas carboniladas según el programa TagIdent.

No. Proteína en blot	PM (kDa) / PI (pH) Encontrados	Densitometria Ctrl / H ₂ O ₂ (Unidades arbitrarias)	Proteína según TagIdent * Número en Swissprot	PM (kDa) / PI (pH) Teóricos (TagIdent)
6	44.28 / 5.17	33.17 / 5.22	Glicoproteína variante de superficie Fosfolipasa C. PHLC TRYCR (O15886)	42.73 / 5.30
7	43.2 / 5.44	29.06 / 19.40	Actina. ACT TRYCR (P53477)	41.90 / 5.38
28	45.01/ 6.3	51.18 / 0	Racemasa de prolina A. PRCMA TRYCR (Q4DA80)	43.16 / 6.51
2	57.72/ 5.35	0 / 15.251	Chaperona mitocondrial HSP60. CH60 TRYCR (Q95046)	58.44 / 5.25
10	34.72 / 5.63	115.13 / 144.62	Racemasa de prolina B. PRCMB TRYCR (Q868H8)	38.46 / 5.45
14	31.19 / 4.94	49.78 / 52.84	Cadena alfa de s-adenosilmetionina dascarboxilasa. DCAM TRYCR (O76240)	32.71 / 4.95
16	30.6 / 5.59	50.60 / 26.33	Subunidad alfa tipo uno del proteosoma. PSA1 TRYCR (P92188)	29.33 / 5.45
12	35.06/5.27	ND	Cruzipaina CYSP TRYCR (P25779) Proteína acida P0 del ribosoma 60S. RLA0 TRYCR (P26796)	36.45 / 5.05 34.95 / 4.91

Se utilizó el peso molecular (PM) y punto isoeléctrico (PI) de cada proteína para la predicción. *Únicamente se presentan los resultados con rangos de PI \pm 0.25 y PM \pm 10% con respecto a los valores encontrados.

ND; No determinado.

Tabla II; *Proteínas carboniladas. Proteínas carboniladas según secuenciación por LC/MS/MS*

No. Proteína Blot	PM (kDa) / PI (pH) Encontrados	Densitometria Ctrl / H₂O₂ (Unidades arbitrarias)	Proteína según LC/MS/MS secuencia NCBI	PM (kDa) / PI (pH) Teóricos (LC/MS/MS)
6	44.28 / 5.17	33.17 / 5.22	Proteína de choque termico de 85kDa. <u>gi/71403337</u>	80.75 / 5.07
8	45.87 / 5.85	56.60 / 72.71	Sintasa F2 alfa de prostaglandina. <u>gi/71659766</u>	42.23 / 6.03
5	44.9 / 4.59	21.34 / 49.11	Cadena beta de la tubulina. <u>gi/71656281</u>	49.57 / 4.70
23	19.6 / 4.99	26.41 / 23.98	Peptidasa de cisteina tipo calpaina <u>gi/71411006</u>	12.9 / 5.08

[gi71403337](#) 96.17% heat shock protein 85 [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]

1 MTETF AFOAE I NQLM SLI I N TFYSN KEI FL RELI S NSSDA CDKI R YQSLT
51 NOAVL GDESH LRI RV I PDKA NKTLT VEDTG I GMTK **AELVN NLGTI ARSGT**
101 KAFME ALEAG GDMSM I GQFG VGFYS AYLVA DRVTV VSKNN DDEAY TWESS
151 AGGTF TVTPT PDCDL KRGTR **IVLHL KEDQQ** EYLEE RRLKD LI KKH SEFI G
201 YDI EL MVEKA TEKEV TDEDE DEAAA AKNEE GEEP K VEEVK DDAEE GEKKK
251 KTKKV KEVTQ EFVVQ NKHKP LWTRD PKDVT KEEYA AFYKA I SNDW EEPLS
301 TKHFS VEGQL EFR **AI LFPVK** RAPFD MFEPS KKRNN I KLYV RRVFI MDNCE
351 DLCPE WLAFV RGVVD SEDLP LNI SR ENLQQ NKI LK VI RKN I VKKA LELFE
401 EI AEN KEDYK KFYEQ FGKNV KLG I H EDSAN RKKLM ELLRF HSSSES GEDMT
451 TLKDY VTRMK EGQKC I YVVT GDSKK KLETS PFI EQ ARRRG FEVLF MTEPI
501 DEYVM QQVKD FEDKK FACLT KEGVH FEETE EEKQ REEEK TAYER LCKAM
551 KDVLG DKVEK VVSE RLATS PCI LV TSEFG WSAHM EQI MR NOALR DSSMS
601 AYMMS KKTME I NPAH PI VKE LKRRV EADEN DKAVK DLVYL LFDTA LLTSG
651 FTLDD PTSYA ERI HR MI KLG LSLDD EDNGN EEAEP AAAPV AEPVA GTSSM
701 ELVD

[gi25006239](#) 99.71% prostaglandin F2a synthase [Trypanosoma cruzi]

1 MATFP ELLRP LKLGR YTLRN **RI IMA PLTRC QATED DHVPR** TESML KYEED
51 RASAG LI I AE ATMVQ PNYTG FLTEP GI YSD AQI EE WRKIV DAVHK KGGLI
101 FLQI HAGRA GI PEK I LOQS KSDQD PLAGR LLAAS AI PI K **DHRIP AYFAA**
151 **SGEKE** TYGVP EELTD DEVRD GI I PL FVEGA KNAI F KAGFD GVEI H GANGY
201 LLDFA FRESS NKROS GPYAG TTI DT RCQLI YDVTK SVCDA VGSDR VGLRI
251 SPLNG VHGM I DSNPE ALTKH LCKKI EPLSL AYLHY LRGDM VNQOI GDVVA
301 WVRGS YSGVK I SNLR **YDFEE ADQOI REGKV DAVAF GAKFI ANPDL VERAQ**
351 QNWPL NEPRP ETYYT RTAVG YNDYP TYNK

[gi71656281](#) 99.31% beta tubulin [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]

1 MREI V CVQAG QCGNQ I GSKF WEVI S DEHGV DPTGT YQGDS DLQLE RI NVY
51 FDEAT GGRYV PRAVL I DLEP GTMDS VRAGP YGQI F RPDNF I FGQS GAGNN
101 WAQGH YTEGA ELI DS VLDVC RKEAE SCDCL QGFQI CHSLG GGTGS GMGTL
151 LI SKL REEYP DRI MM TFSI I PSPKV SDTVV EPYNT TLSVH QLVEN SDESM
201 CI DNE ALYDI CFRTL KLTPP TFGDL NHLVS AVVSG VTCC L RFPQG LNSDL
251 RKLAV NLVPF PRLHF FMMGF APLTS RGSQQ YRGLS VPELT QOMFD AKNMM
301 QAADP RHGRY LTASA LFRGR MSTKE VDEQM LNVQN **KNSSY FIEWI PNNIK**
351 SSI CD I PPKG LK **MAV TFGVN NTCI Q EMFR VGEQF TAMFR** RKAFL HWYTG
401 EGMDE MEFT E AESNM NDLVS EYQQY QDATI EEEGE FDEEE QY

Isoforma carbonilada: [gi71411006](#) 69.58% calpain-like cysteine peptidase [Trypanosomacruzi strain CL Brener]

1 MTDI K YENGQ PTFEG PTVVK CFK **DN GNGLL FRI VN** EEKQ WAFYN DT **KEY**
51 **NMTVK** AAFGK DSK **VE PLGST KMEKD** EATGE FKCEA QI PPL ATVLF VEGEP
101 NGYKL NFEAN PVAK

Isoforma no carbonilada: [gi71411006](#) 95.4% calpain-like cysteine peptidase [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]

1 MTDI K YENGQ PTFEG PTVVK CFKDN GNGLL FRI VN EEKQ WAFYN DT **KEY**
51 **NMTVK** AAFGK DSK **VE PLGST KMEKD** EATGE FKCEA QI PPL ATVLF VEGEP
101 NGYKL **L NFEAN PVAK**

Figura 15. Secuenciación de proteínas por LC/MS/MS. A partir de muestras separadas en geles de 2D se secuenciaron las proteínas con la técnica LC/MS/MS. Se muestran las secuencias con su porcentaje de identidad y número de proteína en la base de datos del NCBI. Subrayados están los fragmentos secuenciados.

8. Discusión

Reportes previos señalaban que la hemina, uno de los principales componentes del medio de cultivo de los epimastigotes de *T. cruzi*, produce estrés en el parásito afectando el crecimiento y estado redox de los parásitos (Cicarelli *et al.*, 2007). Por lo tanto y para definir las condiciones óptimas de experimentación decidimos evaluar el efecto de la hemina en la carbonilación de proteínas. La carbonilación de proteínas de parásitos mantenidos en cultivos con diferentes concentraciones de hemina hizo evidente un incremento en la carbonilación cuando se acrecienta la concentración de hemina. El aumento es significativo solo cuando se comparan los valores de parásitos cultivados en medio con 5 mg/L de hemina contra los de 25 mg/L; esto al tercer día. Al séptimo día hay diferencias entre los parásitos cultivados en medio con 5 mg/L y 10 mg/L de hemina comparados con los de 25 mg/L en el medio, teniendo mayor carbonilación de proteínas en esta última condición. Lo anterior demuestra que el aumento de la concentración de hemina además de producir estrés oxidante, induce un incremento en el fenómeno de carbonilación, que correlaciona con menor crecimiento de los parásitos. Estos datos corroboran lo visto por Ciccarelli y colaboradores (2007), quienes recomiendan el uso de medio adicionado con 5 mg/L de hemina como suplemento para cultivar epimastigotes de *T. cruzi*. Esta concentración permite una mayor producción proteínica y también presenta una menor actividad de la enzima hemoxigenasa. Esta enzima está fuertemente ligada a varios mecanismos de defensa contra el estrés en organismos superiores. Esta concentración de hemina (5 mg/L) fue en la que se cultivaron los parásitos utilizados en todos los ensayos subsecuentes en el presente trabajo.

El modelo de inducción de estrés oxidante utilizado en este trabajo fue estandarizado durante mis estudios de licenciatura. En experimentos de movilidad de epimastigotes de *T. cruzi* se observó un decremento en la movilidad proporcional a la concentración de H₂O₂, teniendo al 50 % de los parásitos inmóviles con una exposición a 86 μM de H₂O₂ por 30 min. Sin embargo, dicha concentración no causó aumento en la carbonilación de proteínas, fue con la concentración de 160 μM de H₂O₂ por 30 min cuando se pudo apreciar aumento significativo de carbonilación de proteínas y una disminución de la movilidad mayor del

80%. Esta última concentración es cercana a la IC50 (concentración que inhibe el crecimiento en 50%) reportada en varios trabajos previos con *T. cruzi*, siendo de 155 ± 25 μM de H_2O_2 el reportado por Kelly y colaboradores en 1993 o 140 ± 9 μM de H_2O_2 reportado por Wilkinson en 2002, en ambos casos utilizando la cepa CL-Brener. En el trabajo de Finzi y colaboradores del 2004 se utilizó una concentración de hasta 200 μM de H_2O_2 por 30 min, una y dos horas, tiempos en los que se observó un aumento en la expresión de TcCPX de cepa Silvio.

Para comprobar que nuestro modelo de inducción de estrés oxidante realmente daba lugar a la formación de EROs en el parásito, se estandarizó el ensayo de reducción de la dihidrorodamina, el cual nos permitió ver la formación de EROs por efecto de la incubación con H_2O_2 . En estos ensayos, la dihidrorodamina entra al interior de las células y es oxidada a rodamina, pudiendo detectar esta oxidación por absorbancia a 490 nm (Crow 1997). En estos experimentos se encontró que después de 30 min de exposición a H_2O_2 se incrementan significativamente las EROs en el parásito y que dicho incremento continúa tras una hora de exposición. Este fenómeno se puede dar por reacciones en cadena, así como por la ruptura, al menos momentánea, del equilibrio redox dentro del parásito, por ejemplo daños en la mitocondria pueden afectar la generación *in vivo* de EROs. Un hecho a destacar es que la producción de EROs *de novo* podría dar lugar a la producción de gran variedad de dichas especies, lo anterior con repercusiones biológicas importantes. Por ejemplo, se puede formar el $\text{O}_2^{\cdot-}$, que difícilmente atraviesa las membranas celulares. Otro caso sería la formación del OH^{\cdot} el cual es mucho más reactivo que el propio H_2O_2 y que puede llevar a fenómenos tan relevantes como la carbonilación de proteínas (Crow 1997; Nyström 2005; Wilhelm *et al.*, 2009).

Con la finalidad de caracterizar algunas de las principales respuestas del parásito a nuestro modelo de estrés se decidió medir la concentración del principal metabolito antioxidante de este parásito, el tripanotión, así como de la actividad de la enzima encargada de reducirlo, la tripanotión reductasa (Irigoin *et al.*, 2008; Krauth-Siegel y Comini 2008; Piacenza *et al.*, 2009). Los resultados mostraron que existe un aumento del tripanotión reducido tras incubar a los parásitos con H_2O_2 por 30 min y 1 h, aunque sólo a

una hora este aumento es significativo. Esto nos indica que la formación de tripanotión reducido es parte de la respuesta de este organismo al H_2O_2 , mostrando la capacidad del parásito para contender con el estrés a estos tiempos. De manera similar se ve que la actividad de la tripanotión reductasa aumenta sólo después de 1 h de exposición a H_2O_2 , es decir que son necesario más de 30 min de exposición al agente estresante para que el parásito pueda responder a éste. De manera similar Finzi y colaboradores muestran que con 30 min de exposición a H_2O_2 el aumento de la TcCPX es bajo (24% de aumento tras 30 min con 200 μM de H_2O_2) y se dio un aumento significativo tras mayor tiempo de exposición (43% de aumento tras 2 hrs con 200 μM de H_2O_2). Estos ensayos nos muestran que el parásito es capaz de montar una respuesta que le permite conservar su estado redox. Dicha capacidad depende en gran parte de la actividad de la tripanotión reductasa. El parásito es capaz de mantener una concentración constante e incluso elevada de tripanotión reducido, el cual es el principal donador de electrones para las peroxidasas del parásito; esto aunado a su actividad antioxidante intrínseca. Si el estrés excediera las defensas de el parásito, el H_2O_2 y las otras EROs formadas oxidarían al tripanotión, ya sea directamente o a través de la utilización de equivalentes reductores que pasan del tripanotión a las diferentes peroxidasas y de éstas a las EROs. Una posible explicación de lo que está pasando en nuestro modelo sería que al exponer a los parásitos a H_2O_2 , éste oxida al tripanotión y es capaz de alterar algunas funciones celulares, lo que tiene como consecuencia una serie de reacciones en cadena que dan lugar a la formación de más EROs, sin embargo, el parásito es capaz de montar una respuesta en contra de este estrés oxidante, siendo el aumento en la actividad de tripanotión reductasa una parte esencial de esta respuesta. El daño causado por el estrés oxidante se ve reflejado como generación *de novo* de EROs, proteínas carboniladas y pérdida de la movilidad, entre muchos otros fenómenos. Estos resultados también explicarían porqué la cantidad de EROs en el parásito después de una hora es apenas un poco mayor a la encontrada a los 30 min, dado que el parásito es capaz de montar una respuesta que previene el aumento de las EROs.

Por otro lado, se estandarizó la técnica de electroforesis bidimensional (Paba *et al*, 2004), logrando obtener un patrón constante, con 278 ± 16 y 268 ± 7 proteínas definidas en promedio (para geles de pH 3-10 NL y 3-6 respectivamente). La mayoría de las proteínas se

encontraron en un rango de pH que va de 3.5 hasta 6.5, y con pesos moleculares entre 82 y 15 kDa, este patrón proteico es muy similar al que se encontró en extractos similares en nuestro mismo laboratorio (Pérez-Morales 2007).

Con la metodología de electroforesis en doble dimensión se procedió a identificar las proteínas susceptibles a ser carboniladas. En los experimentos de detección de proteínas carboniladas en el rango de pH de 3 a 10 NL vimos un aumento general en la intensidad y número de proteínas que están siendo carboniladas por el efecto del H₂O₂. La mayoría de las proteínas se encontraron en pHs ácidos (pH 4-5) y en pesos moleculares entre 20-50 kDa. Por ello se decidió ampliar el rango de pH analizado, utilizando el rango de pH 3 a 6, el cual nos permitió separar a la mayoría de las proteínas carboniladas. Las proteínas carboniladas que se distinguieron de forma nítida y reproducible en al menos tres ensayos independientes. Son 9 proteínas para los geles de pH 3-10 NL y 21 proteínas para los blots de pH 3 a 6 con diferentes grados de intensidad en la señal entre ellas. La diferencia en el número de proteínas observadas entre los geles de proteínas y los western blots nos hablan de que sólo un número restringido de proteínas del parásito están sufriendo el fenómeno de carbonilación. Aún después del estrés oxidante el rango de proteínas susceptibles a ser carboniladas es relativamente bajo.

Es de llamar la atención que al abrir el rango de pH (3-6 pH) el efecto de aumento de carbonilación debido al H₂O₂ observado en WB de pH 3-10 NL parece disminuir considerablemente, aunque existen algunas proteínas que aumentan su carbonilación con respecto al control hay varias otras que no lo hacen. Dicho fenómeno puede deberse al hecho de que las condiciones del rango de pH 3 a 6 disminuyeran el “ruido de fondo” provocado por fragmentos de proteínas carboniladas o por uniones inespecíficas de los anticuerpos.

Otro aspecto importante es la presencia de proteínas carboniladas en muestras control sin exponer a H₂O₂, esto a pesar de que las condiciones experimentales fueron estandarizadas para presentar la menor cantidad de proteínas carboniladas, como se mencionó al inicio de esta sección. La presencia de carbonilación en muestras sin

tratamiento con H₂O₂, es un fenómeno conocido en otros organismos (por ejemplo bacterias y plantas (Dukan y Nystöm 1999; Job *et al.*, 2005)); aunque nunca antes descrito para protozoarios. La explicación a este hecho es que existe una constante producción de EROs en los organismos aerobios. Las EROs producidas pueden interactuar de manera natural con prácticamente cualquier proteína, sin embargo, sólo algunas son susceptibles de ser carboniladas por éstas interacciones. Se desconoce qué hace a una proteína susceptible de ser carbonilada; aunque se sabe que algunos elementos como la localización subcelular o su interacción con metales favorecen la posible carbonilación de éstas (Nyström 2005). También se ha reportado que la carbonilación puede servir como un mecanismo de regulación en condiciones naturales, por ejemplo, de la degradación de enzimas que no están siendo utilizadas, o en la degradación de enzimas para bloquear vías metabólicas que no son requeridas en una situación fisiológica determinada (Grimsrud *et al.*, 2008). Últimamente se ha propuesto que la carbonilación de proteínas puede intervenir en la transducción de señales celulares (Wong *et al.*, 2010).

La carbonilación de proteínas tiene un gran número de repercusiones a nivel biológico (Nyström 2005), en particular las proteínas dañadas pierden su función. Por lo tanto al reconocer qué proteínas se carbonilan se podrá decir que las vías metabólicas en las que estas proteínas intervienen también están siendo afectadas. También pueden ser afectadas proteínas relacionadas con la señalización (receptores) o con la estructura de ciertos componentes celulares. Por ejemplo, se sabe que la tubulina es una de las proteínas carboniladas en la enfermedad de Alzheimer y se ha atribuido a este daño, por lo menos en parte, la pérdida de la función de las neuronas en cerebros de pacientes con esta enfermedad (Sultana y Butterfield, 2009).

En este trabajo se utilizó de manera preliminar para la identificación de proteínas carboniladas el programa TagIdent debido a que no fue posible observar a algunas de las proteínas en los geles de proteína. Este programa es útil en predecir la identidad de algunas proteínas con base en su peso molecular, punto isoelectrico y el organismo del que proviene la muestra (Kanitz *et al.*, 2004; Le Bihan *et al.*, 2006) (Tabla I). Habrá que precisar que de ningún modo esta herramienta substituye la secuenciación de las proteínas y que todos los

datos obtenidos de este programa deberán ser tomados como una primera aproximación y tendrán que ser corroborados para cada proteína. Algunas de las proteínas encontradas en la detección de proteínas carboniladas en los western blot con pudieron ser identificadas en geles de proteínas teñidos con azul de Coomassie, en estos casos las proteínas fueron mandadas a secuenciar junto con algunas otras que parecían ser isoformas de ellas (dado sus similares pesos moleculares y puntos isoeléctricos). Debido a la poca cantidad de proteína en algunos casos y la contaminación en otros, únicamente se pudieron obtener secuencias de cuatro proteínas (Tabla II).

En el caso de las proteínas carboniladas identificadas en blots de pH 3-6, la mayoría se identificaron tanto en condiciones control como en estrés oxidante, siendo éstas las siguientes proteínas: tubulina beta, HSP85, sintasa de prostaglandina F2 alfa, peptidasa tipo calpaina, así como las proteínas No. 7, 14, 16, 12 y 10 (actina, cadena alfa de s-adenosilmetionindeacarboxilasa, subunidad alfa del proteosoma tipo 1, cruzipaina o proteína ribosomal 60S y prolina racemasa B, respectivamente, según el TagIdent). De las proteínas anteriormente mencionadas, algunas tuvieron un mayor nivel de carbonilación en los controles sin H₂O₂ en comparación con los estresados (HSP85 y proteínas No. 7, 8 y 16 o actina, prolin racemasa A y subunidad alfa del proteosoma, respectivamente, según el TagIdent). El hecho de que exista una mayor señal de algunas proteínas en el control con respecto a las expuestas a estrés oxidante, pudiese ser explicado por un fenómeno de degradación de proteínas, en donde al estresar a la célula estas proteínas carboniladas son, de manera específica, rápidamente degradadas. Una posibilidad más es que dichas proteínas sean más propensas a formar cúmulos citotóxicos (Nyström, 2005). Bien por su degradación, bien por la formación de cúmulos pudiésemos estar viendo disminuida la señal de estas proteínas. Por último podemos identificar proteínas que aumentaron su carbonilación después de haber sido expuestas a estrés por H₂O₂ (sintasa de prostaglandina F2 alfa, beta tubulina, proteínas No. 2 y 10 o HSP60 y prolin racemasa B, respectivamente, según TagIdent). Las proteínas que aumentan su carbonilación después del estrés oxidante son proteínas susceptibles a la carbonilación, pero probablemente no tanto como para degradarse, ni son propensas para formar cúmulos citotóxicos. La variabilidad en el

fenómeno de carbonilación nos habla de que probablemente se trate de un proceso dinámico, y de gran complejidad *in vivo*.

El caso de la cistein peptidasa tipo calpaina resalta, ya que se mandó secuenciar tanto a la proteína identificada como carbonilada (PM 19.6 / PI 4.99), como a una aparente isoforma sin carbonilar (PM 19.6 / PI 4.86). La secuenciación corrobora que se trata de isoformas de la misma proteína, que de manera interesante se carbonila una isoforma, y otra no. Lo anterior podría deberse a diferencias en la secuencia primaria, terciaria o posibles diferencias en interacciones con otros elementos celulares (por ejemplo algún cofactor).

Tubulina (Tubulin beta chain)

La tubulina es el principal componente del citoesqueleto de este parásito y una de las proteínas más abundantes en él. Ello pudiese estar influyendo en que sea una de las proteínas detectada como más carbonilada; lo que tal vez no se debe a su susceptibilidad a la oxidación, sino a su abundante presencia en el parásito. Esta proteína de manera similar a la actina interviene en los movimientos del parásito y esta conservada entre los eucariontes (Maingon *et al.*, 1988). El daño en tubulina podría reflejarse en una pérdida de la capacidad de locomoción. Del mismo modo se sabe que el rearrreglo del citoesqueleto de tubulina es un factor de gran relevancia en la infección activa de células por parte del parásito, por lo cual posiblemente el parásito verá reducida su capacidad de infección. La pérdida en la función de la tubulina, debida a la intensa carbonilación, puede afectar a este parásito en gran número de actividades biológicas, tales como movilidad, crecimiento e infectividad.

HSP85

Se sabe que la función de las HSPs en plegamiento y transporte de proteínas es vital para la célula. Esta familia de proteínas son un grupo altamente conservado a lo largo de toda la escala filogenética, incluyendo a los tripanosomatidos. Se ha propuesto que las chaperonas moleculares actúan como “escudos” para proteger a otras proteínas contra el daño por radicales libres, esta forma de protección lleva a un alto grado de carbonilación. (Cabisco *et al.*, 2000). En *T. cruzi* esta proteína se encuentra como homóloga de la HSP90 de humanos, y se sabe tiene funciones similares (Folgueira y Requena, 2007). La pérdida de

función de la HSP85 conllevaría graves problemas en el plegamiento de las proteínas, lo cual, afectaría prácticamente todas las vías metabólicas del parásito.

Peptidasa de cisteína tipo calpaina

Las calpainas son cisteín-proteinasas dependientes de calcio. Se encuentran en todos los organismos vivos y se relacionan a diversos procesos celulares, como la apoptosis, la transducción de señales, la diferenciación y la remodelación del citoesqueleto. Las proteínas tipo calpaína (“calpain-like proteins”, CALP, por sus siglas en inglés) son calpainas atípicas, que se encuentran sumamente extendidas en eucariotas inferiores, aunque la mayoría carecen de actividad catalítica. Las cisteín-peptidasas, en los trypanosomatidos, son una gran familia de proteasas que incluye a las CALP. Hay CALP que son específicas de estado, como la TcCALPx11, que es específica de epimastigotes, y que se ha sugerido le sirve al parásito en la adaptación al medio ambiente en el insecto vector (Giese *et al.*, 2008). Existe evidencia de que las CALP pudieran tener un papel en la respuesta general al estrés en *T. cruzi*. Las CALP se han relacionado a la resistencia de algunas cepas de *T. cruzi* al benznidazol (Andrade *et al.*, 2008). Tal vez al intervenir en procesos de estrés están constantemente expuestas a daño y por ello se les ve carboniladas en nuestros ensayos.

Prostaglandin F2a synthase ó old yellow enzyme (OYE)

Otra proteína carbonilada fue la sintetasa de prostaglandina F2 alfa. Las prostaglandinas (PG) 1 de la serie 2 son sintetizadas por la oxigenación de ácido araquidónico (AA). En esta vía, se convierte el AA a PGH2 por ciclooxigenasas (COX-1 y -2). Posteriormente, la PGH2 resultante se convierte en varios metabolitos de araquidonato por la acción de sus respectivos sintasas. PGs son producidas activamente y se distribuyen en varios tejidos de los mamíferos, donde son potentes mediadores de una gran variedad de respuestas fisiológicas y patológicas, como la regulación del tono vascular, somnolencia, inflamación, broncoconstricción, dolor, fiebre, inmunosupresión y otros síntomas. Sin embargo, la producción de PG no se limita a los mamíferos. PGF2 y PGD2 también se encuentran persistentemente elevados en el plasma de los animales

experimentalmente infectados con *Trypanosoma congolense*, y en el líquido cefalorraquídeo de las personas con infección crónica de *T. brucei gambiense*. Estos resultados sugieren una regulación al alza de la producción de PG en diversas tripanosomiasis. La “enzima antigua amarilla” (“Old Yellow Enzyme”, OYE por sus siglas en inglés) es una NAD(P)H flavina oxidoreductasa, que en *T. cruzi* (TcOYE) cataliza la síntesis de prostaglandinas PGF₂α y la reducción de algunas drogas tripanocidas (Dost *et al.*, 2004). En comparaciones de cepas resistentes y susceptibles a benznidazol, la sintasa de PGF-2 alfa se encontró en mayor cantidad en las cepas susceptibles. Estos estudios se corroboraron con ensayos de supresión de copias del gen TcOYE (Murta *et al.*, 2006; Andrade *et al.*, 2008). Esta enzima frecuentemente se relaciona en procesos de oxidoreducción, su capacidad como donadora y aceptora de electrones podrían explicar en parte su susceptibilidad a ser carbonilada. El daño y pérdida de función podrían causar resistencia del parásito a fármacos como el benznidazol.

El conocimiento de la susceptibilidad de ciertas proteínas del parásito a ser carboniladas puede ser una herramienta útil. Por ejemplo para identificar cambios metabólicos que sufre este organismo cuando se enfrenta a estrés oxidante. Dichos cambios pudieran estar relacionadas a movilidad, crecimiento, diferenciación sobrevivencia, etc. Por otro lado, puede resultar útil el conocimiento de dichas proteínas con la finalidad de diseñar fármacos específicos, o tratamientos que aumenten la carbonilación en proteínas sólo presentes en el parásito, y que se pudieran combinar con menores cantidades de los fármacos que actualmente se utilizan para combatir a esta enfermedad. Ya que estos últimos, causan una gran cantidad de efectos secundarios en el paciente y no garantizan la eliminación del parásito.

9. Conclusión

- Se estandarizó el medio de cultivo apropiado para los ensayos de estrés oxidante, en particular para obtener una menor señal de proteínas carboniladas. La concentración óptima fue la de 5 mg/l de hemina, cosechando a los parásitos al tercer día de cultivo.
- Se presenta un incremento en las EROs cuando los parásitos son expuestos a H₂O₂ tanto por 30 min como por una hora.
- Se presenta un decremento en la actividad de la tripanotión reductasa cuando los parásitos son expuestos a H₂O₂ durante 30 min, la cual se recupera después de una hora de tratamiento estresante.
- Se estandarizó la electroforesis bidimensional para detectar proteínas carboniladas, en donde la mayor parte de las proteínas carboniladas están en pHs de entre 3.5 y 6, así como en pesos moleculares de entre 15 y 82 kDa.
- Existen proteínas carboniladas en las condiciones de cultivo sin estrés *in vitro*.
- El estrés oxidante aumenta la carbonilación en un grupo específico de proteínas.
- Se encontraron 14 proteínas susceptibles de ser carboniladas.
- Se identificaron 4 proteínas que se carbonilan: la proteasa tipo calpaina, la HSP85, la prostaglandín F2a synthase de *T. cruzi* y la tubulina.

10. Perspectivas

- Encontrar la identidad de las restantes proteínas carboniladas
- Estudiar el fenómeno de carbonilación en los demás estadios del parásito (amastigotes y tripomastigotes).
- Estudiar la relevancia de la carbonilación en fenómenos biológicos como la infección y la diferenciación celular.

11. Bibliografía

- Aguilaniu. H., Gustafsson. L., Rigoulet M., Nyström T., (2003). Asymmetric inheritance of oxidatively damaged proteins during cytokinesis. *Science*, **299**: 1751-1753.
- Ahmad S., (1995). Oxidative stress from environmental pollutants. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, **29**: 135-157.
- Ajioka J., Swindle J., (1993). The calmodulin-ubiquitin associated genes of *Trypanosoma cruzi*: Their identification and transcription. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **57**: 127-136.
- Andrade H.M., Murta S.M.F., Chapeaurouge A., Perales J., Nirdé P., Romanha A.J., (2008). Proteomic Analysis of *Trypanosoma cruzi* Resistance to Benznidazole. *J. Proteome Res.*, **7**: 2357–2367.
- Ariyanayagam M.R., Fairlamb A.H., (2001). Ovoidiol and trypanothione as antioxidants in trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **115**: 189-198.
- Atias A., (1991). Parasitología clínica. Mediterráneo. México. 618pp.
- Baek S.H., Min J.N., Park E.M., Han M.Y., Lee Y.S., Lee Y.J., Park Y.M., (2000). Role of small heat shock protein HSP25 in radioresistance and glutathione-redox cycle. *J. Cell Physiol.*, **183**: 100-107.
- Bartholomeu D.C., Batista J.A.N., Lima B.D., Vainstein M.H., Sa Martins C. (1997). The 29 kDa subunit genomic sequence of *Trypanosoma cruzi* proteasome. Submitted (MAR-1997) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
- Blankenfeldt W., Nowicki C., Montemartini-Kalisz M., Kalisz H.M., Hecht H.J., (1999). Crystal structure of *Trypanosoma cruzi* tyrosine aminotransferase: substrate specificity is influenced by cofactor binding mode. *Protein Sci.*, **8**: 2406-2417.
- Boiani M., Piacenza L., Hernández P., Boiani L., Cerecetto H., González M., Denicola A., (2010). Mode of action of Nifurtimox and N-oxide-containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*: Is oxidative stress involved?. *Biochem. Pharmacol.*, **79**: 1736-1745.
- Bontempi E.J., Bua J., Aaslund L., Porcel B., Segura E.L., Henriksson J., Oern A., Pettersson U., Ruiz A.M., (1993). Isolation and characterization of a gene from

Trypanosoma cruzi encoding a 46-kilodalton protein with homology to human and rat tyrosine aminotransferase. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **59**: 253-262.

- Bosseno M.F., Barnabé C., Magallón Gastélum E., Lozano Kasten F., Ramsey J., Espinoza B., Brenière S.F., (2002). Predominance of *Trypanosoma cruzi* lineage I in México. *J. Clin. Microbiol.*, **40**: 627-32.
- Buschiazzo A., Goytia M., Schaeffer F., Degrave W., Shepard W., Gregoire C., Chamond N., Cosson A., Berneman A., Coatnoan N., Alzari P.M., Minoprio P., (2006). Crystal structure, catalytic mechanism, and mitogenic properties of *Trypanosoma cruzi* proline racemase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**: 1705-1710.
- Butterfield D. A., Perluigi M., Sultana R., (2006). Oxidative stress in Alzheimer's disease brain: New insights from redox proteomics. *Eur. J. Pharmacol.*, **545**: 39-50.
- Cadenas E. (1995). Mechanisms of oxygen activation and reactive oxygen species detoxification. En: Oxidative stress and antioxidant defenses in biology. Ahmad S. (Ed). Chapman and Hall. New York. Pp. 363-382.
- Cabisco E., Piulats E., Echave P., Herrero E., Ros J., (2000). Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **275**: 27393-27398.
- Callahan M.K., Chaillot D., Jacquin C., Clark P.R., Menoret A., (2002). Differential acquisition of antigenic peptides by HSP70 and HSC70 under oxidative conditions. *J. Biol. Chem.*, **277**: 33604-33609.
- Callahan H.L., Crouch R.K., James E.R., (1991). *Dirofilaria immitis* superoxide dismutase: purification and Characterization. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **49**: 245-251.
- Carnieri E.G., Moreno S.N., Docampo R., (1993). Trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi* different stages. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **61**: 79-86.
- Castegna A., Aksenov M., Aksenova M., Thongboonkerd V., Klein J.B., Pierce W.M., Booze R., Markesbery W.R., Butterfield D.A., (2002). Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part I: creatine kinase BB, glutamine synthase, and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L-1. *Free Radic. Biol. Med.*, **33**: 562-571.

- Chamond N., Gregoire C., Coatnoan N., Rougeot C., Freitas-Junior L.H., da Silveira J.F., Degraive W.M., Minoprio., (2003). Biochemical characterization of proline racemases from the human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* and definition of putative protein signatures. *J. Biol. Chem.*, **278**: 15484-15494.
- Chamond N., Goytia M., Coatnoan N., Barale J.C., Cosson A., Degraive W.M., Minoprio P., (2005). *Trypanosoma cruzi* proline racemases are involved in parasite differentiation and infectivity. *Mol. Microbiol.*, **58**: 46-60.
- Chiari E., Camargo E.P., (1984). Culturing and cloning of *Trypanosoma cruzi*,. En: Genes and Antigens of Parasite. Morel. M. (Ed.). *Institute Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Pp. 23-26.
- Choi, J., Levey A.I., Weintraub S.T., Rees H.D. Gearing M., Chin L.S., Li L., (2004). Oxidative modifications and down-regulation of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 associated with idiopathic Parkinson`s and Alzheimer`s diseases. *J. Biol. Chem.*, **279**: 13256-13254.
- Ciccarelli A., Araujo L., Batlle A., Lombardo E., (2007). Effect of haemin on growth, protein content and the antioxidant defense system in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*, **134**: 959-965.
- Conrad C.C., Choi J., Malakowsky C.A., Talent J.M., Dai R., Marshall P., Gracy R.W., (2001). Identification of protein carbonyls after two-dimensional electrophoresis. *Proteomics*, **1**: 829-834.
- Corliss J.O., (2004). Why the world needs protist!. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **51**: 8-22
- Cortez J.M., Gonzáles H.J., Reyes P.A., Martínez R.M., Velasco C.O., De la Torre R., (1986). Chagasic cardiomyopathy in México. *Rev. Latinoam. de Microbiol.* **28**: 275-283.
- Coura R.J. y de Castro S., (2002). A critical review on Chagas Disease chemotherapy. *Med. Inst. Oswaldo Cruz de Janeiro*, **97**: 3-24.
- Crow J.P., (1997). Dichlorodihydrofluorescein and Dihydrorhodamine 123 Are Sensitive Indicators of Peroxynitrite *in Vitro*: Implications for Intracellular Measurement of Reactive Nitrogen and Oxygen Species1. *NITRIC OXIDE: Chem. Biol.* **1**: 145–157.

- Curtis J.M., Grimsrud P.A., Wright W.S., Xu X., Foncea R.E., Graham D.W., Brestoff J.R., Wiczer B.M., Ilkayeva O., Cianflone K., Muoio D.E., Arriaga E.A., Bernlohr D.A., (2010). Down Regulation of Adipose Glutathione S-Transferase Leads to Increased Protein Carbonylation, Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction. *Diabetes*. **59**: 1132-1142.
- Dalle-Donne I., Giustarini D., Colombo R., Rossi R., Milzani A., (2003). Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol. Med.*, **9**:169–176.
- Denkers E.Y., Butcher B.A., (2005). Sabotage and exploitation in macrophages parasitized by intracellular protozoans. *Trends Parasitol.*, **21**: 35-41.
- Díaz de Toranzo E.G., Castro J.A., Franke de Cazzulo B.M., Cazzulo J.J., (1988). Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplasmic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. *Experientia*, **44**: 880-881.
- DoCampo R., Moreno S.N.J., (1986). Free radical metabolism of antiparasitic agents. *Fed. Proc.*, **45**: 2471-2476.
- Dost C.K., Saraiva J., Monesi N., Zentgraf U., Engels W., Albuquerque S., (2004). Six *Trypanosoma cruzi* strains characterized by specific gene expression patterns. *Parasitol Res.*, **94**: 134-140.
- Dufernez F., Yernaux C., Gerbod D., Noël C., Chauvenet M., Wintjens R, Edgcomb V.P., Capron M., Opperdoes F.R., Viscogliosi E., (2006). The presence of four iron-containing superoxide dismutase isozymes in trypanosomatidae: characterization, subcellular localization, and phylogenetic origin in *Trypanosoma brucei*. *Free Radic. Biol. Med.*, **15**: 210-225.
- Dukan S., Nyström T., (1998). Bacterial senescence: stasis results in increased and differential oxidation of cytoplasmic proteins leading to developmental induction of the heat shock regulon. *Genes Dev.*, **12**: 3431-3441.
- Dukan S., Nyström T., (1999). Oxidative stress defense and deterioration of growth-arrested *Escherichia coli* cells. *J. Biol. Chem.*, **274**: 26027-26032.
- Eakin A.E., Mills A.A., Harth G., McKerrow J.H., Craik C.S., (1992). The sequence, organization, and expression of the major cysteine protease (cruzain) from *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.*, **267**:7411-7420.

- El-Sayed N.M.A., Myler P.J., Bartholomeu D.C., Nilsson D., Aggarwal G., Tran A.-N., Ghedin E., Worthey E.A., Delcher A.L., Blandin G., Westenberger S.J., Caler E., Cerqueira G.C., Branche C., Haas B., Anupama A., Arner E., Aslund L., Attipoe P., Bontempi E., Bringaud F., Burton P., Cadag E., Campbell D.A., Carrington M., Crabtree J., Darban H., da Silveira J.F., de Jong P., Edwards K., Englund P.T., Fazelina G., Feldblyum T., Ferella M., Frasch A.C., Gull K., Horn D., Hou L., Huang Y., Kindlund E., Klingbeil M., Kluge S., Koo H., Lacerda D., Levin M.J., Lorenzi H., Louie T., Machado C.R., McCulloch R., McKenna A., Mizuno Y., Mottram J.C., Nelson S., Ochaya S., Osoegawa K., Pai G., Parsons M., Pentony M., Pettersson U., Pop M., Ramirez J.L., Rinta J., Robertson L., Salzberg S.L., Sanchez D.O., Seyler A., Sharma R., Shetty J., Simpson A.J., Sisk E., Tammi M.T., Tarleton R., Teixeira S., Van Aken S., Vogt C., Ward P.N., Wickstead B., Wortman J., White O., Fraser C.M., Stuart K.D., Andersson B., (2005). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*, **309**: 409-415.
- Espinoza B., Vera-Cruz J.M., González H., Ortega E., Hernández R., (1998). Genotype and virulence correlation within Mexican stocks of *Trypanosoma cruzi* isolated from patients. *Acta Trop.*, **15**: 63-72.
- Espinoza B., Manning-Cela R., (2007). An overview of mammalian cell infection by *Trypanosoma cruzi*: Cellular and molecular basis. *Advances in the Immunobiology of Parasitic Diseases*. **2007**: 291-311.
- Espinoza B., Rico T., Sosa S., Oaxaca E., Vizcaino A., Caballero M.L., Martínez I., (2010). Mexican *Trypanosoma cruzi* TC1 strains with different virulence induce dissimilar humoral and celular immune response in murine experimental infection. *J. Biomed. and Biotech.*, Epub 2010 Apr 11.
- Fairlamb A.H., Cerami A., (1992). Metabolism and functions of trypanothione in the kinetoplastida. *Annu. Rev. Microbiol.*, **46**: 695-729.
- Filardi L.S., Brener Z., (1987). Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **81**: 755-759.

- Finzi J.K., Chiavegatto C.W., Corat K.F., Lopez J.A., Cabrera O.G., Mielniczki-Pereira A.A., Colli W., Alves M.J., Gadelha F.R., (2004). *Trypanosoma cruzi* response to the oxidative stress generated by hydrogen peroxide. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **133**: 37-43.
- Folgueira C., Requena J.M., (2007). A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. *FEMS Microbiol. Rev.*, **131**: 359-377.
- Friguet B., Bulteau A.L., Chondrogianni N., Conconi M. Petropoulos I., (2000). Protein degradation by the proteasome and its implications in aging. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **908**: 143-154.
- Giese V., Dallagiovanna B., Marchini F. K., Pavoni D. P., Krieger M. A., Goldenberg S., (2008). *Trypanosoma cruzi*: a stage-specific calpain-like protein is induced after various kinds of stress. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* **103**: 598-601.
- Gillmor S.A., Craik C.S., Fletterick R.J., (1997). Structural determinants of specificity in the cysteine protease cruzain. *Protein Sci.*, **6**: 1603-1611.
- Grimsrud P.A., Xie H., Griffin T.J., Bernlohr D.A., (2008). Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes. *J. Biol. Chem.* **8**: 21837-21841.
- Guzman-Bracho C., (2001). Epidemiology of Chagas disease in Mexico: an update. *Trends parasitol.*, **17**: 372-376.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C., (1999). Oxidative stress: adaptation, damage, repair and death. En: *Free Radicals in Biology and Medicine*. Halliwell B. (Ed.). Oxford University Press New York. Pp. 133-161.
- Han M.J., Yun H., Lee S.Y., (2008). Microbial small heat shock proteins and their use in biotechnology. *Biotechnol. Adv.*, **26**: 591-609.
- Hernández S.M., Sánchez M.S., Schwarcz de Tarlovsky M.N., (2006). Polyamines as a defense mechanism against lipoperoxidation in *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* **98**: 94-102.
- Hyun D.H., Gray D.A., Halliwell B., Jenner P., (2004). Interference with ubiquitination causes oxidative damage and increased protein nitration: implications for neurodegenerative diseases. *J. Neurochem.*, **90**: 422-430.
- Irigoín F., Cibils L., Comini M.A., Wilkinson S.R., Flohé L., Radi R., (2008). Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. *Free Radic. Biol. Med.*, **45**: 733-742.

- Ismail S.O., Paramchuk W., Skeiky Y.A., Reed S.G., Bhatia A., Gedamu L., (1997). Molecular cloning and characterization of two iron superoxide dismutase cDNA from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **86**: 187-197.
- Jamel M.J., Pereira L. de P., Mello N.B., Eleuthério E.C., Schanaider A., (2010). Blood carbonyl protein measurement as a specific oxidative stress biomarker after intestinal reperfusion in rats. *Acta Cir. Bras.* **25**: 59-62.
- Jazwinski S.M., (2004). Yeast replicative life span-the mitochondrial connection. *FEMS Yeast Res.*, **5**: 119-125.
- Job C., Rajjou L., Lovigny Y., Belghazi M., Job D., (2005). Patterns of protein oxidation in Arabidopsis seeds and during germination. *Plant Physiol.*, **133**: 790-802.
- Johansson E.C., Olsson O., Nyström T., (2004). Progression and specificity of protein oxidation in the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.*, **279**: 22204-22208.
- Joshi G., Aluise C.D., Cole M.P., Sultana R., Pierce W.M., Vore M., Clair D.K., Butterfield D.A., (2010). Alterations in brain antioxidant enzymes and redox proteomic identification of oxidized brain proteins induced by the anti-cancer drug adriamycin: implications for oxidative stress-mediated chemobrain. *Neuroscience*. **166**: 796-807
- Kanitza M.H., Swaminathanb S., Savage Jr. R.E., (2004). Two-dimensional electrophoretic protein profile analysis following exposure of human uroepithelial cells to occupational bladder carcinogens. *Cancer Lett.*, **205**: 121–131.
- Kim Y.M., de Vera M.E., Watkins S.C., Billiar T.R., (1997). Nitric oxide protects cultured rat hepatocytes from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression. *J. Biol. Chem.*, **272**: 1402-1411.
- Kinch L.N., Scott J.R., Ullman B., Phillips M.A., (1999). Cloning and kinetic characterization of the *Trypanosoma cruzi* S-adenosylmethionine decarboxylase. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **101**: 1-11.
- Krauth-Siegel R.L., Comini M.A., (2008). Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Acta Biochim. Biophys.*, **1780**: 1236-1248.
- Kristensen B.K., Askerlund P., Bykova N.V., Egsgaard H., Moller I.M., (2004). Identification of oxidized proteins in the matrix of rice leaf mitochondria by

immunoprecipitation and two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Phytochem.*, **65**: 1839-1851.

- Laemmli. U.K., (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- Laskowska E., Matuszewska E., Kuczyńska-Wiśnik D., (2010). Small Heat Shock Proteins and Protein-Misfolding Diseases. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **11**: 146-157.
- Le Bihan M.C., Hou Y., Harris N., Tarelli E., Coulton G. R., (2006). Proteomic analysis of fast and slow muscles from normal and kyphoscoliotic mice using protein arrays, 2-DE and MS. *Proteomics*, **6**: 4646–4661.
- Levine R.L., Williams, J.A., Stadman, E.R., Shacter, E., (1994). Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Meth. Enzymol.*, **233**: 346-57.
- Lindquist S., Craig E.A., (1988). The heat shock proteins. *Annu. Rev. Genet.*, **22**: 631-677.
- Madian A.G., Regnier F.E., (2010). Profiling carbonylated proteins in human plasma. *J. Proteome Res.*, **5**: 1330-1343.
- Maingon R., Gerke R., Rodriguez M., Urbina J., Hoenicka J., Negri S., Aguirre T., Nehlin J., Knapp T., Crampton J. (1988). The tubulin genes of *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Biochem.*, **171**: 285-291.
- Martínez F., Alejandre-Aguilar R., Moncada Y.H., Espinoza B., (2005). Molecular taxonomic study of Chagas disease vectors from the phyllosoma, lecticularia, and rubrofasciata complexes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **73**: 321-325.
- Martínez F.H., Villalobos G.C., Cevallos A.M., De la Torre P., Lacleste J.P., Alejandre-Aguilar R. Espinoza B., (2006). Taxonomic study of the *Phyllosoma* complex and other triatomine (Insecta: Hemiptera: Reduviidae) species of epidemiological importance in the transmission of Chagas disease: Using ITS-2 and mtCytB sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, **41**: 279-287
- Martínez-Díaz R.A., Escario J.A., Nogal-Ruiz J.J., Gómez-Barrio A., (2001). Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **96**: 53-59.

- Martínez-Espinosa R., (2007). Identificación de proteínas carboniladas durante el estrés oxidativo causado por peróxido de hidrógeno en tres cepas de *Trypanosoma cruzi*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Martínez-Martínez I., (2006). Caracterización molecular de cepas mexicanas de *T. cruzi* aisladas de humano y susceptibilidad de las mismas a Nifurtimox y Benznidazol. Tesis de Maestría. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, México.
- Mielniczki-Pereira A.A., Chiavegatto C.M., López J.A., Colli W., Alves M.J.M., Gadelha F.R., (2007). *Trypanosoma cruzi*, Tulahuen 2 and Y, besides the difference in resistance to oxidative stress, display differential glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases activities. *Acta Trop.*, **101**: 54-60.
- Miles M.A., Feliciangeli M.D., de Arias A.R., (2003). American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *BMJ.* **28**: 1444-1448.
- Miranda M.R., Canepa G.E., Bouvier L.A., Pereira C.A., (2006). *Trypanosoma cruzi*: Oxidative stress induces arginine kinase expression. *Exp. Parasitol.*, **114**: 341-344.
- Muller S., Liebau E., Walter R.D., Krauth-Siegel R.L., (2003). Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites. *Trends Parasitol.*, **19**: 320-328.
- Muñoz-Fernández M.A., Fernández M.A., Fresno M., (1992). Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF-alpha and IFN-gamma through a nitric oxide-dependent mechanism. *Immunol. Lett.*, **33**: 35-40.
- Murta S.M., Krieger M.A., Montenegro L.R., Campos F.F., Probst C.M., Avila A.R., Muto N.H., de Oliveira R.C., Nunes L.R., Nirdé P., Bruna-Romero O., Goldenberg S., Romanha A.J., (2006). Deletion of copies of the gene encoding old yellow enzyme (TcOYE), a NAD(P)H flavin oxidoreductase, associates with *in vitro*-induced benznidazole resistance in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **146**: 151-162.
- Nyström. T., (2005). Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO*, **24**: 1311-1317.
- Orlandi I., Bettiga M., Alberghina L., Nyström T., Vai M., (2010). Sir2-dependent asymmetric segregation of damaged proteins in ubp10 null mutants is independent of genomic silencing. *Acta Biochim. Biophys.*, En Prensa. PMID: 20211662.

- Ozawa T., Tatsum K., (1998). Biodefence against active oxigens and free radicals induced by oxidative stress. En: Biodefence mechanisms against environmental stress. Kuwabara M., Inanami O., (Ed.). Springer-Verlag, Heidelberg y Kodansha, Japon. Pp. 24-39.
- Paba J., Santana J.M., Teixeira A.R.L., Fontes W., Sousa M.V. Ricart C.A.O., (2004). Proteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Proteomics*, **4**: 1052-1059.
- Papp E., Nardai G., Söti C., Csermely P., (2003). Molecular chaperones, stress proteins and redox homeostasis. *Biofactors*, **17**: 249-257.
- Pays J.F., (1998). American human trypanosomiasis 90 years after its discovery by Carlos Chagas. I. epidemiology and control. *Med. Trop.*, **58**: 391-402.
- Paixao J.C., Silva R., Rondinelli E. Submitted (MAR-1995) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
- Pereira M.E.A., (1986). Cell biology of *Trypanosoma cruzi*, En: Modern parasite biology, cellular, immunological, and molecular aspects. Wyler J.D. (Ed). Freeman and Company, New York. Pp. 64-78.
- Pereira K.S., Schmidt F.L., Guaraldo A.M., Franco R.M., Dias V.L., Passos L.A., (2009). Chagas' disease as a foodborne illness. *J. Food Prot.*, **72**: 441-446.
- Pérez-Morales D., (2007). Estrés calórico en *Trypanosoma cruzi*: análisis protómico y caracterización del gen sHSP16. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM.
- Pérez-Morales D., Ostoa-Saloma P., Espinoza B., (2009). *Trypanosoma cruzi* SHSP16: Characterization of an alpha-crystallin small heat shock protein. *Exp. Parasitol.*, **123**: 182-189.
- Piacenza L., Irigoín F., Alvarez M.N., Peluffo G., Taylor M.C., Kelly J.M., Wilkinson S. R., Radi R., (2007). Mitochondrial superoxide radicals mediate programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: cytoprotective action of mitochondrial iron superoxide dismutase overexpression. *Biochem. J.*, **403**: 323-334.
- Piacenza L., Alvarez M. N., Peluffo G., Radi R., (2009). Fighting the oxidative assault: the *Trypanosoma cruzi* journey to Infection. *Cur.t Opin. Microbiol.*, **12**: 415-421.
- Polak A., Richle R., (1978). Mode of action of 2-nitroimidazole derivative benznidazole. *Ann Trop Med Parasitol*, **72**: 228-232.

- Polla B., (1991). Heat shock proteins in host-parasite interactions. *Parasitol. Today*, **12**: 38-41.
- Prata A.M., (1994). Chagas disease. *Infect. Des. Clin. N. Am.*, **8**: 61-76.
- Preville X., Salvemini F., Giraud S., Chaufour S., Paul C., Stepien G., Ursini M.V., Arrigo A.P., (1999). Mammalian small stress proteins protect against oxidative stress through their ability to increase glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and by maintaining optimal cellular detoxifying machinery. *Exp. Cell Res.*, **247**: 61-78.
- Raman B., Kumar S.L.V., Ramakrishna T., Rao M. Ch., (2001). Redox-regulated chaperone function and conformational changes of *Escherichia coli* Hsp33. *FEBS Letters*, **489**: 19-24.
- Redpath M.B., Carnall N., Webb H., Courel M., Amorim A., Guther M.L.S., Cardoso de Almeida M.L., Carrington M., (1998). Conservation of genetic linkage between heat shock protein 100 and glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase C in *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **94**: 113-121
- Requena J.M., Jimenez-Ruiz A., Soto M., Assiego R., Santarén J.F., Lopez M.C., Patarroyo M.E., Alonso C., (1992). Regulation of hsp70 expression in *Trypanosoma cruzi* by temperature and growth phase. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **53**: 201-212.
- Requena J.R., Levine R.L., Stadtman E.R., (2003). Recent advances in the analysis of oxidized proteins. *Amino Acids*, **25**: 221-226.
- Romanha A.J., Alves R.O., Murta S.M., Silva J.S., Ropert C., Gazzinelli R.T., (2002). Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection: essential role of endogenous interferon-gamma in mediating parasitologic cure. *J. Infect. Dis.*, **186**: 823–828.
- Sambrook J., Maniatis T., Fritsch E., (1989). *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. Pp. 9.36, 9.45, 9.46.
- Schenone H., Rojas A., (1989). Algunos datos y observaciones pragmáticas en relación a la epidemiología de la enfermedad de Chagas. *Bol. Chil. Parasitol.*, **44**: 66-86.
- Schofield C.J., (2000). Challenges of Chagas disease vector control in Central America. WHO/ WHOPES/GCDPPH/2000.1. WHO. Geneva. Pp: 36.
- Selkirk M.E., Smith V.P., Thomas G.R., Gounaris K., (1998). Resistance of filarial nematode parasites to oxidative stress. *Int. J. Parasitol.*, **28**: 1315-1332.

- Shringarpure R., Davies K.J., (2002). Protein turnover by the proteasome in aging and disease. *Free Radic. Biol. Med.*, **32**: 1084-1089.
- Sies H., (1991). Oxidative stress: introduction. En: oxidative stress: oxidants and antioxidants. Sies, H. (Ed.). Academic Press, London. Pp: XV-XXIII.
- Singh R.K., Tripathi A.K., Tripathi P., Singh S., Singh R., Ahmad R., (2009). Studies on biomarkers for oxidative stress in patients with chronic myeloid leukemia. *Hematol Oncol Stem Cell Ther.*, **2**: 285-288.
- Sitte N., Merker K., von Zglinick T., Grune T., Davies K.J.A., (2000). Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part I-effects of proliferative senescence. *FASEB J.*, **14**: 2495-2502.
- Sohal R.S., (2002). Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radic. Biol. Med.*, **33**: 37-44.
- Stadtman E.R., Oliver C.N., (1991). Protein Carbonylation. *J. Biol. Chem.*, **266**: 2005-2008.
- Stafford J.L., Neumann N.F., Belosevic M., (2002). Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. *Crit. Rev. Microbiol.*, **28**: 187-248.
- Sullivan M.A., Olson C.L., Winqvist A.G., Engman D.M., (1994). Expression and localization of *Trypanosoma cruzi* hsp60. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **68**: 197-208.
- Sultana R., Butterfield D.A., (2009). Proteomics identification of carbonylated and HNE-bound brain proteins in Alzheimer's disease. *Methods Mol. Biol.*, **566**: 123-135.
- Szweda I.I., Stadtman E.R., (1992). Iron-catalyzed oxidative modification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*. Structural and functional changes. *J. Biol. Chem.*, **267**: 3096-3100.
- Tamarit J. y Cabisco E., (1998). Identification of the major oxidatively damaged proteins in *Escherichia coli* cells exposed to oxidative stress. *J. Biol. Chem.*, **273**: 3027-3032.
- Tamay-Segovia P., Alejandre-Aguilar R., Martínez F., Villalobos G., de la Serna F.J., de la Torre P., Laclette J.P., Blum-Domínguez S., Espinoza B., (2008). Two *Triatoma dimidiata* clades (Chagas disease vector) associated with different habitats in southern Mexico and Central America. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **78**: 472-478.

- Temperton N.J., Wilkinson S.R., Meyer D.J., Kelly J.M., (1998). Over expression of superoxide dismutase in *Trypanosoma cruzi* results in increased sensitivity to the trypanocidal agents gentian violet and benznidazole. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **96**: 167–176.
- Tibayrenc M., Ayala F.J., (1988). Isoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance. *Evolution*, **42**: 277-292.
- Tibayrenc M., Ward P., Moya A., Ayala F.J., (1986). Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease, have a multiclonal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**: 115-119.
- Tibayrenc M., (1998). Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *Int. J. Parasitol.*, **28**: 85-104.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J., (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**: 4350-4354.
- Tsuji N., Morales T.H., Ozols V.V., Carmody A.B., Chandrashekar R., (2000). Cloning and preliminary characterization of a novel cuticular antigen from the filarial parasite *Dirofilaria immitis*. *Parasitol. Int.*, **49**: 321-325
- Turrens J.F., Watts Jr. B.P., Zhong L., Docampo R., (1996). Inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei* NADH fumarate reductase by benznidazole and anthelmintic imidazole derivatives. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **82**: 125–129.
- Turrens J.F., (2004). Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. *Mol. Aspects Med.*, **25**: 211–220.
- UNAM, Secretaria de Salud., (2002). Manual de laboratorio para el diagnostico de la infección por *Trypanosoma cruzi*. UNAM. México. Pp: 16-17.
- Urbina J.A., (2003). New chemotherapeutic approaches for the treatment of Chagas disease (American Trypanosomiasis). *Expert Opin. Ther Pat.* **13**: 661-669.
- Vargas Parada L., (1995). Fierro y estrés oxidante en *Trypanosoma cruzi*. Maestría. Colegio de ciencias y humanidades.

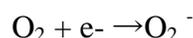
- Veloso V.M., Carneiro C.M., Toledo M.J.O., Lana M., Chiari E., Tafuri W.L., Bahia M.T., (2001). Variation in susceptibility to benznidazole in isolates derived from *Trypanosoma cruzi* parental strains. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **96**: 1005-1011.
- Villareal D., Barnabe C., Sereno D., Tibayrenc M., (2004). Lack of correlation between *in vitro* susceptibility to Benznidazole and phylogenetic diversity of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. *Exp. Parasitol.*, **108**: 24-31.
- Wilhelm J., Vytasek R., Ostadalova I., Vajner L., (2009). Evaluation of different methods detecting intracellular generation of free radicals. *Mol. Cell. Biochem.*, **328**:167–176.
- Wilkinson S.R., Taylor M.C., Horn D., Kelly J.M., Cheeseman I., (2008). A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **105**: 5022-5027.
- Wilkinson S.R., Kelly J.M., (2003). The role of glutathione peroxidases in trypanosomatids. *J. Biol. Chem.*, **384**: 517–525.
- Wilkinson S.R., Meyer D.J., Taylor M.C., Bromley E.V., Miles M.A., Kelly J.M., (2002a). The *Trypanosoma cruzi* enzyme TcGPXI is a glycosomal peroxidase and can be linked to trypanothione reduction by glutathione or tryparedoxin. *J. Biol. Chem.*, **277**: 17062–17071.
- Wilkinson S.R., Obado S.O., Mauricio I.L., Kelly J.M., (2002b). *Trypanosoma cruzi* expresses a plant-like ascorbate-dependent hemoperoxidase localized to the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**: 13453–13458.
- Wilkinson S.R., Temperton N.J., Mondragon A., Kelly J.M., (2000). Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.*, **275**: 8220–8225.
- Wilson M.E., Andersen K.A., Britigan B.E., (1994). Response of *Leishmania chagasi* promastigotes to oxidant stress. *Infect. Immun.*, **62**: 5133-5141.
- Wong C.M., Marcocci L., Liu L., Suzuki Y.J., (2010). Cell signaling by protein carbonylation and decarbonylation. *Antioxid. Redox Signal*, **12**: 393-404.
- Yan L.J., Levine R.L., Sohal R.S., (1997). Oxidative damage during aging targets mitochondrial aconitase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**: 11168–11172.
- Zar J.H., (1999). Biostatistical analysis. Prentice-Hall. Inc. New York.

- Zingales B., Andrade S.G., Briones M.R.S., Campbell D.A., Chiari E., Fernandes O., Guhl F., Lages-Silva E., Macedo A.M., Machado C.R., Miles M.A., Romanha A.J., Sturm N.R., Tibayrenc M., Schijman A.G., (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **104**: 1051-1054.
- <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/diseaseinfo.htm>.
- <http://www.tecnovet.uchile.cl/AlasbimnImages/tc-2000>.
- <http://www.digitus.com.br/~plinio/chagas.html>.

12. Anexo

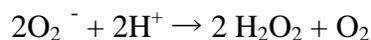
12.1. Formación de especies reactivas de oxígeno

Anión Superóxido (O_2^-): El anión superóxido es el producto de la reducción univalente del oxígeno molecular:



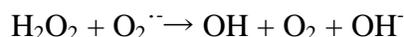
El O_2^- es producido por células fagocíticas y ayuda a inactivar virus y bacterias. Es mucho menos reactivo que los otros radicales, como el radical hidroxilo, pero un número importante de blancos biológicos son sensibles a él (Ozawa, 1998; Sies, 1991).

Peróxido de Hidrógeno(H_2O_2): El peróxido de hidrógeno es generado *in vivo* a partir de la reacción de dismutación, catalizada por la enzima SOD, o a partir de la reducción divalente del oxígeno molecular:



Esto genera H_2O_2 , una molécula no radical que se asemeja al agua en su estructura molecular, y que se puede difundir con gran facilidad dentro de la célula. Algunas funciones metabólicas se le han asignado al H_2O_2 , como por ejemplo, la unión de yodo en hormonas de la glándula tiroides (Cadenas, 1995; Sies, 1991).

Radicales Hidroxilo (OH^\cdot): La reducción secuencial trivalente del O_2 (en combinación con un catalizador en presencia de hierro) da lugar a la producción de intermediarios oxigenados muy reactivos. La enzima superóxido dismutasa (SOD) cataliza la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a partir del anión superóxido (Sies, 1991; Cadenas, 1995). Ahora bien, una acumulación de H_2O_2 conduce a un incremento en la producción de radicales OH^\cdot a través de la reacción de Haber-Weiss:



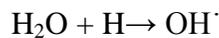
Pero esta reacción es muy lenta, y no puede realizarse sin catálisis. Son los iones férricos los que desempeñan el papel de catalizador:



o bien, a través de la reacción de Fenton:



La acción de las radiaciones ionizantes puede causar la fisión de enlaces O-H en el agua, dando origen a radicales OH^{\cdot} :

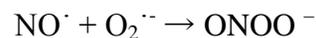


Estos radicales OH^{\cdot} generados son muy reactivos con las proteínas, carbohidratos, lípidos y moléculas de DNA (Sies, 1991).

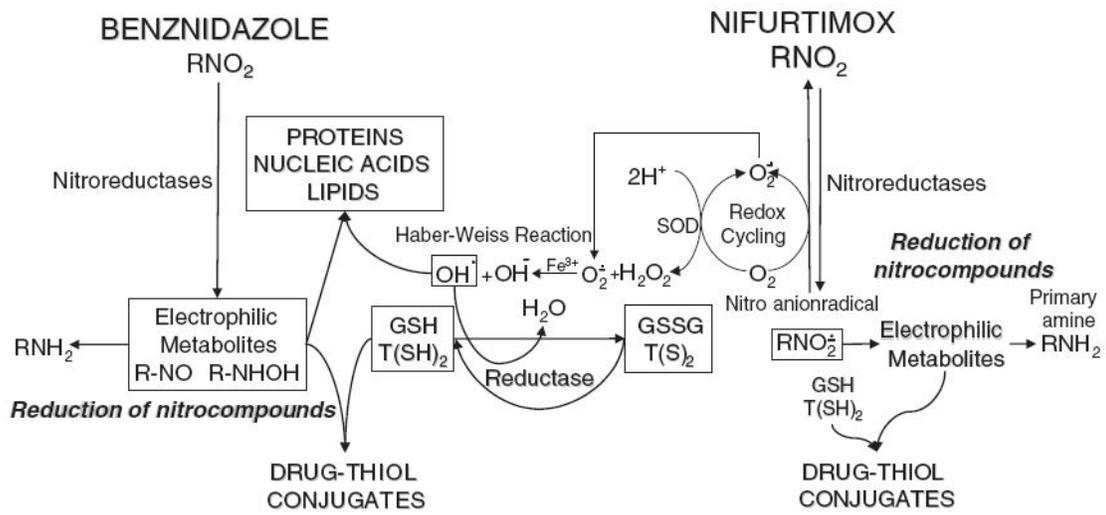
Óxido Nítrico (NO^{\cdot}): A muy pocas especies de radicales libres se les conoce una función *in vivo*. Este es el caso del óxido nítrico, que es sintetizado a partir del aminoácido L-arginina por las células del endotelio vascular, fagocitos, algunos tipos de neuronas, y otros tipos de células:



Esta sustancia es un potente agente vasodilatador y probablemente un neurotransmisor. Se produce por la acción de la óxido nítrico sintetasa (iNOS), enzima que tiene tres isoformas. En todo caso, el NO tiene una gran capacidad de reaccionar con el radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$), sobre todo si está en exceso en los tejidos . El exceso de NO puede ser tóxico, al dañar por ejemplo, proteínas con centro azufre-hierro u otros elementos constituyentes de la membrana celular, formando peroxinitritos.



12.2. Modo de acción de los fármacos



Modo de acción de nifurtimox y benswürdazole. Tomado de Maya *et al* 2007.

12.3. Formación de Proteínas carboniladas por MCO

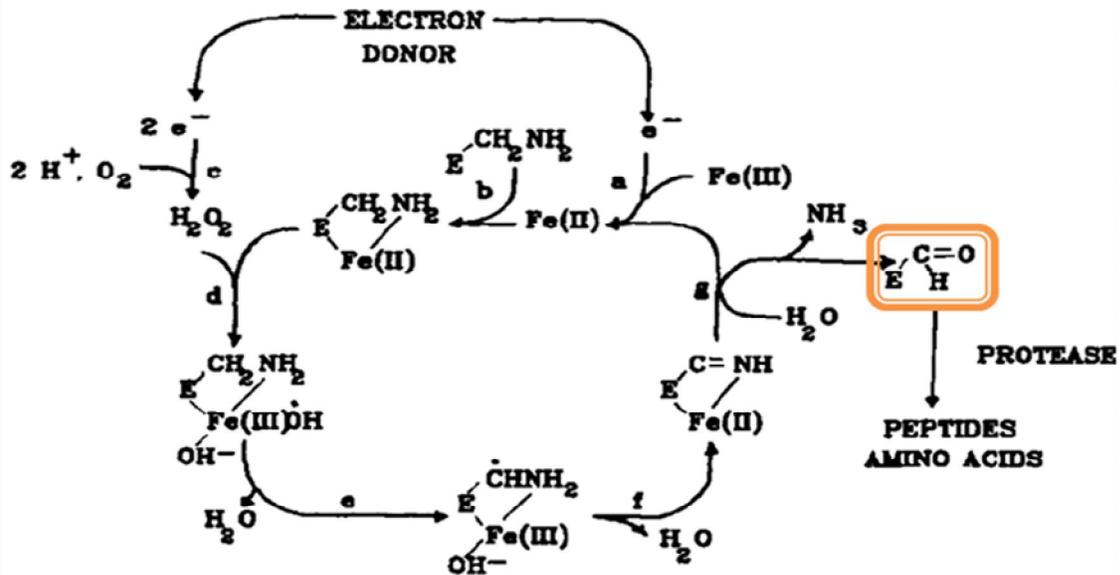


FIG. 2. Site-specific metal ion-catalyzed protein oxidation. (Stadtman y Oliver, 1991).