



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES-UBA
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**Estudios sobre sulfatación en *Trypanosoma cruzi* y
participación de los motivos sulfatados en la infección e
inmunomodulación del hospedador.**

Lic. Maximiliano R. Ferrero

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires

Directora de Tesis: *Dra. Vilma G. Duschak*

Consejero de Tesis: *Dra. Cristina Nowicki*

Lugar de trabajo: Instituto Nacional de Parasitología “Dr.
Mario FatałaChabén”, ANLIS-Malbrán, Ministerio de Salud
de la Nación

-2014-

A los que me acompañan, a los que se esforzaron por educarme y a los que luchan por la educación pública

AGRADECIMIENTOS

A las Instituciones y personas que durante estos años posibilitaron y contribuyeron a la realización del presente trabajo de tesis:

Al Consejo Nacional de investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Agencia Nacional de Promoción en Ciencia y Tecnología (ANPCYT) por las becas otorgadas para la realización de este trabajo.

Al Instituto “Dr. Mario Fatala-Chaben” donde se realizó el presente trabajo.

A la Dra. Vilma Duschak por la dirección, la comprensión, el apoyo y la dedicación.

A la Dra. Gabriela Garcia por la paciencia, por la paciencia, por la paciencia, por enseñarme, escucharme, aconsejarme, repetirme, recordarme y por la paciencia.

A Mónica por su sus ganas incansables de ayudar y por todo el conocimiento transmitido

A Alicia Couto

A los amigos y compañeros que me alegraron los días en el Fatala y después del Fatala. (Pato, Tebe y la Colo con horas extra)

A Mari por el amor, el aguante y la colaboración en varias secciones.

A Diana y Luciana por hacerme espacio en el labo y la tolerancia

Los grandes colaboradores del instituto. Carlos, Esteban, Bea, Nely, Lety, Elsa.

A la coordinación de seminarios Pato G, Pato B y Ro

A Kari, Carla, Lu, Flor y Juan desde el ciclo inicial

A la familia de amigos fundamentales

A mi Hermana, mi Papá, la abuela Presi, Clau, Los Ferrero y Los Guidi

Índice

1.Introducción	15
Capítulo I:	16
Enfermedad de Chagas.	16
1.I.1. Origen y Epidemiología	17
1.I.2 Ciclo de vida del <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
1.I.3 Estadios Clínicos de la enfermedad de Chagas	21
1.I.3.1. Fase Aguda	21
1.I.3.2. Fase Indeterminada	21
1.I.3.3. Fase Crónica	22
1.I.4.Diagnóstico.....	23
1.I.5. Tratamiento	24
1.I.6 Rol de la respuesta inmune del hospedador	25
Capítulo II: Morfología	27
1.II. Descripción de la morfología	28
Capítulo III: Mecanismos de Infección	32
1.III. Generalidades	33
1.III.1 Participación de carbohidratos en el proceso de infección	33
1.III.2. Participación de proteoglicanosy/o glicosaminoglicanos en el proceso de infección	35
1.III.3. Participación de proteinasas en el proceso de invasión	36
1.III.4. Participación lipídica en el proceso de invasión	37
1.III.5. Modelos de invasión descriptos	37
1.III.6. Invasión de cardiomiocitos por <i>T. cruzi</i>	38
Capítulo IV: Cruzipaína	41
1.IV. Generalidades	42
1.IV.1 Expresión y Estructura.....	42

1.IV.2 Glicosilaciones de la Cz.....	45
1.IV.3 Actividad enzimática	47
1.IV.4 Distribución.....	49
1.IV.5. La Cz como antígeno	50
Capítulo V: Sulfátidos en <i>T. cruzi</i>	54
1.V. Descripción.....	55
Capítulo VI: Espectrometría de Masa	59
1.VI.Generalidades	60
1.VI.1 Ionización	60
1.VI.2 Analizadores.....	61
1.VI.3. Espectrometría de masa MALDI (TOF-TOF) en lípidos y azúcares.	63
Capítulo VII: Sulfatación	65
1.VII. Descripción.....	66
1.VII.1.Biosíntesis de PAPS	67
1.VII.2 Regulación e inhibición	68
1.VII.3 Sulfatación en protistas.....	69
1.VII.4 Sulfatación como blanco terapéutico.....	70
Capítulo VIII: Siglecs	71
1. VIII.Generalidades.....	72
1.VIII.1 Expresión.....	73
1.VIII.2 Reconocimiento.....	74
1.VIII.3 Funcionalidad.....	76
1.VIII. 4 Siglecs y <i>T. cruzi</i>	77
2.Resultados y discusión	79

Parte 1	80
2.1.Mecanismo de sulfatación.....	80
2.1.1.Sulfatación de glicoproteínas. Detección.....	80
2.1.2.EFECTOS DEL CLORATO EN LA SULFATACIÓN DE GLICOPROTEÍNAS	82
2.1.3. EFECTOS DEL CLORATO EN LA SULFATACIÓN DE LÍPIDOS	85
2.1.4. Efectos morfológicos del tratamiento con clorato	88
2.1.5. Sulfatación y actividad enzimática de la Cz	91
2.1.6.Detección de epitopes sulfatados en la superficie del parásito	93
2.1.7. Efecto de la sulfatación en la invasión de cardiomiocitos	95
2.1.8. Modelo de Infección de miocardiocitos del hospedador por trypomastigotes de <i>T. cruzi</i> vía receptor de manosa.....	101
Parte 2:	103
2.2. Siglecs, Sulfatos e Inmunomodulación en <i>T. cruzi</i>	103
2.2.1. Localización de los ligandos de las Siglecs en el parásito y reconocimiento de las proteínas de membrana y de las fracciones subcelulares de Tul 2 por Siglec-E	104
2.2.2 Unión de la Cz de membrana a Siglec-E-Fc.....	106
2.2.3 Participación de los sulfatos de la Cz en la interacción de Siglec-E	108
2.2.4. Participación de los sulfatos presentes en las moléculas de los trypomastigotes en la interacción con Siglec-E.....	115
3.Conclusiones	121
4.Materiales y Métodos	124
Parte I.....	125
Cultivo y cosecha de parásitos.....	125
Purificación de Cruzipaina	125

Obtención y purificación del dominio carboxilo-terminal de la cruzipaína	127
Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	128
Revelado con Nitrato de Plata	128
Ensayos de transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa y reacción con antisueros específicos (Western Blot)	129
Tratamientos de desulfatación	129
Inmunización de los animales y obtención de IgGs específicas	130
Obtención de IgGs-enriquecidos-AS	131
ELISAs de competencia con NAcGlc6S	131
Tratamiento de parásitos con clorato de sodio.....	132
Efecto del clorato sobre la síntesis proteica.	132
Análisis de sulfatación de Cz por western blot	132
Electroforesis Bidimensional (2D).....	133
Aislamiento y purificación de GSLs	133
Espectrometría de masa UV-MALDI-TOF	135
Análisis mediante microscopía electrónica.	136
Determinación de actividad enzimática sobre sustrato sintético	136
Ensayo de actividad enzimática de Cz y Czd.....	137
Detección de epitopes sulfatados en la superficie del parásito por Citometría de flujo	137
Ensayos de infección de la línea celular cardíaca de ratón HL-1.....	138
Inmuno-Fluorescencia Directa	139
Parte II	139
Cepas y células utilizadas.....	139
Localización de los ligandos de las Siglecs en el parásito	140

Obtención de proteínas de membrana.....	140
Obtención de Fracciones sub-celulares de <i>Trypanosoma cruzi</i>	140
Clonado de Siglec-E-Fc	141
Purificación de Siglec-E-Fc.....	143
ELISAs	143
Ensayos competitivos de ELISA.....	143
Acoplamiento de Siglec-E-Fc purificadas a Sefarosa 4B activada conbromocianógeno.....	144
Purificación de Cz por afinidad a Siglec-E-Fc como ligando.	144
La tinciones en citometría de flujo	144
Tratamiento con clorato y evaluación con Siglec-E-Fc.....	145
Cuantificación de proteínas	145
-Método de Bradford	145
-Método de Lowry.....	146
-Equipamiento utilizado	146
5. Referencias.....	149
6. Publicaciones	181

Resumen

Trypanosoma cruzi, agente causal de la enfermedad de Chagas, es un protozoo hemoflagelado que posee una cisteína proteinasa mayoritaria denominada cruzipaina (Cz). Esta enzima además de un dominio catalítico, presenta un dominio C-terminal (C-T) de relevancia inmunológica. Nuestro grupo ha descrito previamente en este dominio, una O-glicosilación constituida por N-acetil glucosamina y una N-glicosilación compuesta por oligosacáridos de alta manosa, y un grupo sulfato constituyendo el primer reporte de glicoproteínas sulfatadas en Trypanosomátidos. Además, encontramos que los sulfatos presentes en la Cz presentan una marcada antigenicidad en pacientes con enfermedad de Chagas y también en modelos de infección murino donde además estarían directamente relacionados con el daño del tejido cardíaco. A pesar de la relevancia que muestran los motivos sulfatados del parásito nada se sabe del mecanismo de sulfatación ni acerca de su rol en el metabolismo del mismo.

La sulfatación, modificación crítica en muchas instancias de reconocimiento biológico, es catalizada por enzimas denominadas sulfotransferasas las cuales dependen para llevar a cabo su función de una molécula denominada PAPS (3'- fosfoadenosina-5' fosfosulfato). En este trabajo, estudiamos el efecto del clorato de sodio, un reconocido inhibidor de la síntesis de PAPS. En epimastigotes tratados con dicho inhibidor, observamos tanto una disminución de la sulfatación de la Cz por western blot como un desplazamiento hacia puntos isoelectricos más altos en electroforesis bi-dimensional. Además vimos un marcado descenso de sulfoglicoesfingolípidos en cromatografía de placa delgada, confirmado mediante el análisis por espectrometría de masa (UV-MALDI-TOF). Estos parásitos mostraron anomalías estructurales en imágenes de microscopía electrónica, y cuando se utilizó el tratamiento sobre trypomastigotes, obtuvimos una disminución marcada en la capacidad infectiva de los mismos. Mediante ensayos de citometría de flujo vimos una fuerte presencia de los epitopes sulfatados de la Cz expuestos en la superficie de trypomastigotes y en ensayos de infección posteriores pudimos demostrar la

participación de estos epitopes presentes en el dominio C-T de la Cz en dicho proceso.

Las siglecs (sialic acid recognizing Ig-superfamily lectins), son un grupo de lectinas de reconocimiento a ácido siálico, expresadas en células del sistema inmune e involucradas en la regulación negativa de la activación de las mismas. Se ha demostrado que la señalización por vía de las Siglecs muchas veces depende del contexto glicosídico en el cual se encuentre el ácido siálico y que *T. cruzi* es reconocido por estas lectinas.

Nuestros resultados con Siglec-E de ratón, ortóloga de la Siglec-9 humana, mostraron que los ligandos de esta lectina en el parásito están específicamente expuestos en proteínas de membrana. Además, existe un reconocimiento de esta lectina a Cz tanto lisosomal de epimastigotes como de Cz liberada al medio por trypomastigotes metacíclicos. La participación de los sulfatos de la Cz promoviendo esta interacción fue demostrada en ensayos de ELISA directo en los cuales Cz y C-T tuvieron un reconocimiento significativamente mayor al de Czd y C-Td. Estos resultados fueron confirmados en ensayos de ELISA de competencia entre Cz y Czd. Por último mediante tratamientos con clorato de sodio, demostramos que la presencia de sulfatos en la superficie del parásito incrementa el reconocimiento de Siglec-E por los mismos utilizando citometría de flujo. En conjunto nuestros resultados sugieren que las glicoproteínas silalidas del parásito, que contienen grupos sulfatos como la Cz, interaccionan con Siglec-E modulando la respuesta inmune del hospedador, favoreciendo la parasitemia y la persistencia del parásito.

Finalmente considerando los antecedentes detallados sobre la relevancia de la sulfatación tanto en el metabolismo del parásito como en el desarrollo de la enfermedad de Chagas; sumado a la ausencia de secuencias genómicas que podamos identificar como posibles sulfotransferasas del parásito, sostenemos firmemente que esta vía es un blanco potencial terapéutico de relevancia.

Abreviaturas

2D	Bidimensional
Abs	absorbancia
AGSLs	Glicoesfingolípidos ácidos
AS	Ácido Siálico
BSA	Seroalbúmina bovina
PBSA	BSA 1% en PBS
Con-A	Concanavalina A
CPs	Cisteína proteinasas
C-T	dominio C-terminal
Cz	Cruzipaína
C-Td	dominio C-terminal desulfatado
Czd	Cruzipaínadesulfatada
CD22	Clúster de diferenciación 22 o Siglec 2
DHB	ácido 2,4-dihidroxibenzoico
DO	Densidad óptica
E-64	Trans-epoxi- succinil L-leucilamido (4-guanidino) butano
ELISA	EnzymeLinkedInmunoSorbentAssay
EM	Espectrometría de masa
Fc	Fragmento cristalizable
NAcGlc	N-acetil D-glucosamina
NAcGlc6S	N-acetil D-glucosamina 6 Sulfato
GSLs	Glicoesfingolípidos
HL-1	Línea celular de cardiomiocitosmurinos
HMR	Receptor de Manosa
IgG	Inmunoglobulina G
IgGs-enriquecidas-AS	IgGs obtenidas contra Cz y enriquecidas en el reconocimiento de los epitopes sulfatados
IgGs-AntiCz-T	IgGs específicas para Cz entera
kDa	kilodalton
MALDI	matriz-assisted laser desorption/ionization (desorción/ionización laser asistida por matriz)
mM	Milimolar
MW	peso molecular
Mal II	Lectina de union a ácido siálico (<i>maackiaamurensis</i>)
NGSLs	Glicoesfingolípidos neutros
OPD	orto-fenilendiamina
PAPS	3'-Fosfoadenosina 5'-Fosfosulfato
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
Rl	ReservosomasElectrolúcidos
Rd	ReservosomasElectrodensos
rpm	Revoluciones por minuto
SD	Desvío estándar
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida

Siglec	en presencia de dodecilsulfato de sodio
Sn	Lectina de la familia de las
STs	inmunoglobulinas de unión a ácido siálico
TBS	Sialoadhesina o Siglec-1
<i>T. cruzi</i>	Sulfotransferasas
<i>Tc.AKR</i>	Buffer Tris salino
Tul 2	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TS	Aldo-CetoReductasa de <i>T. cruzi</i>
Tris	Cepa de <i>T. cruzi</i> Tulahuen 2
UV	Transialidasa
	Tris (hidroximetil) aminometano
	ultravioleta

Sustratos utilizados para la determinación de actividades enzimáticas de peptidasas

Bz-Pro-Phe-Arg- <i>pNA</i>	N-benzoil, prolil, fenilalanil, arginil, para-nitroanilida
FA-Phe-Phe-OH	Furil, acriloil, fenilalanil fenilalanina
Z-FR-OMe- β -NA _m	Z-fenilalanil, arginil, o-metil, betanaftilamida

1.Introducción

Capítulo I: Enfermedad de Chagas.

1.I.1. Origen y Epidemiología

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana es una zoonosis causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*, descrita por el médico infectólogo brasileño Carlos Chagas (1879-1934) en el año 1909. Carlos Chagas, fue el primer investigador que logró describir una enfermedad infecciosa en su totalidad, detallando las características del agente patógeno, su vector y el hospedador, así como también las manifestaciones clínicas y la epidemiología de la parasitosis. Chagas creyó erróneamente que la vía de infección principal era la picadura del insecto, y no a través de las heces del mismo como fuera propuesto por su colega Emile Brumpt en 1915 y demostrado posteriormente por Silveira Días en 1932 y Cardoso en 1938. Luego, Carlos Mazza contribuyó a establecer la relación de esta parasitosis con numerosos casos de enfermedades cardíacas crónicas detectadas en el norte de nuestro país.

La infección de Chagas es endémica en una gran extensión del continente americano, que comprende desde el paralelo 32° de latitud norte en el sur de los Estados Unidos de América hasta el paralelo 45° de latitud sur en la Argentina y Chile (Reisenman *y col.*, 2010). El número estimado de personas infectadas en el mundo pasó de 30 millones en 1990 a 6 a 8 millones en el 2010. En esos 20 años, la incidencia anual decreció de 700.000 a 28.000 en las Américas (OPS, 2014). Actualmente, 65 millones de personas se encuentran en riesgo de infección en 21 países de Latinoamérica. Anualmente se registran cerca de 12.000 muertes a causa de la enfermedad (WHO, 2014; OPS, 2014). Por otra parte, debido a patrones de migración internacional, la enfermedad alcanzó áreas no endémicas como Canadá, Estados Unidos, varios países de Europa y lugares remotos como Japón y Australia (Gascon *y col.*, 2010). Desde 1991, distintas iniciativas regionales han logrado grandes avances en el control domiciliario del vector y de los bancos de sangre (Dias *y col.*, 2002; Schmunis y Cruz, 2005). Uruguay, Chile, Brasil y algunas zonas de Paraguay y Argentina han sido certificadas como libres de transmisión vectorial. Sin embargo, la seroprevalencia de *T. cruzi* en muchos adultos de países de América Latina permanece con valores elevados (Rassi *y col.*,

2010). Esto significa que aunque la transmisión vectorial de la enfermedad se interrumpiese hoy, las mujeres infectadas permanecerían en riesgo de transmitir la infección a sus hijos en el futuro (Carlier y Torrico, 2003). Debido a las características de la patología y el gran número de personas infectadas, la infección por *T. cruzi* es considerada uno de los principales problemas de Salud Pública en América Latina.

En la República Argentina se estima que habría 1,35 millones de personas infectadas, 7,3 millones de personas expuestas, y más de 300.000 afectadas por cardiopatía de origen chagásico (OPS, 2016). Actualmente, las provincias de Jujuy, Río Negro, Neuquén, La Pampa, Entre Ríos, Misiones, Santa Fe y San Luis han logrado la interrupción de la transmisión vectorial (Fig. 1) (OPS, 2014).

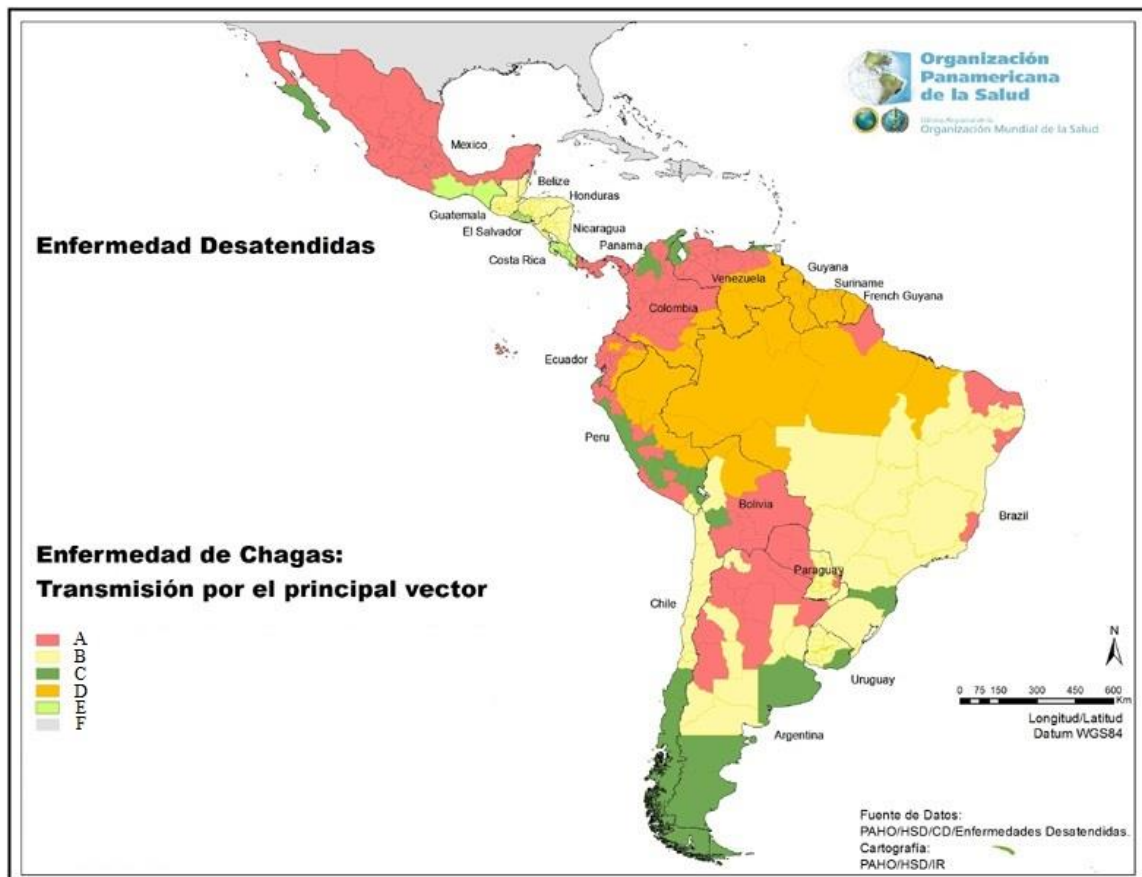


Figura 1. Transmisión Vectorial en América Latina.

Zonas donde la transmisión no ha sido (A) o ha sido (B) interrumpida por el vector principal; Área no endémica, sin evidencia de transmisión vectorial (C). Zonas donde la interrupción de la transmisión vectorial no es una meta (D) donde el vector principal ha sido eliminado (E) o países no incluidos en el estudio (F) (OPS, 2014).

La seroprevalencia en mujeres embarazadas es otro factor alarmante de la infección por *T. cruzi* en nuestro país, alcanzando 6,8 % en el año 2000 y 4,2 % en 2009, estimándose que cada año nacen aproximadamente 1.300 niños infectados con *T. cruzi* vía transmisión congénita. Actualmente, se estima una prevalencia media de infección de 1,5 % en niños menores de 14 años. Cabe consignar que con tratamiento parasiticida adecuado se logra curación parasitológica en 9/10 niños tratados en fase aguda y 7/10 tratados en fase crónica (OMS, 2007).

1.I.2 Ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi*

El *T. cruzi* es un protista unicelular hemoflagelado perteneciente al Orden Kinetoplastida, de la Familia Trypanosomatidae. Es un parásito intracelular obligado cuyo ciclo de vida alterna entre un hospedador intermediario invertebrado, el insecto triatomino hematófago perteneciente a la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae, que cumple el rol de vector en el ciclo de vida del parásito y un hospedador definitivo vertebrado mamífero (Levine *y col.*, 1980).

En áreas endémicas predomina la forma de transmisión vectorial, condicionada por el escenario eco-epidemiológico de las zonas rurales en donde interactúan el agente etiológico, los insectos vectores, los animales reservorios y el hombre (Cohen *y col.*, 2001). También existen otras vías de transmisión como la infección oral, la transmisión congénita, la transfusión sanguínea y el trasplante de órganos.

La transmisión vectorial de *T. cruzi* ocurre cuando el insecto, luego de alimentarse con la sangre del hospedador vertebrado o mientras lo hace, libera trypomastigotes metacíclicos con las heces, los cuales son introducidos en forma mecánica con el rascado de la picadura por la irritación que provoca, o penetran activamente a través de una herida en la piel o de las mucosas. En el sitio de entrada al organismo, los trypomastigotes invaden o son fagocitados por las células nucleadas circundantes a la herida y luego se diferencian a amastigotes,

forma replicativa del parásito dentro de las células de mamíferos. Luego de varios ciclos de replicación por fisión binaria dentro del citoplasma celular, los amastigotes se diferencian a trypomastigotes, forma no replicativa, rompen la célula y son liberados a los espacios intersticiales y al torrente sanguíneo, pudiendo así infectar otras células nucleadas alejadas del sitio de entrada al organismo o ser ingeridos por el vector. En la región posterior del intestino del vector, los trypomastigotes se transforman en epimastigotes, forma replicativa responsable del mantenimiento de la infección en el hospedador invertebrado, donde se dividen por fisión binaria. Cuando los epimastigotes llegan al recto del insecto, se convierten en trypomastigotes metacíclicos y son eliminados con las heces, durante o inmediatamente después de la alimentación, reiniciándose nuevamente el ciclo de vida de los parásitos (Santos-Buch *y col.*, 1985; figura 2)

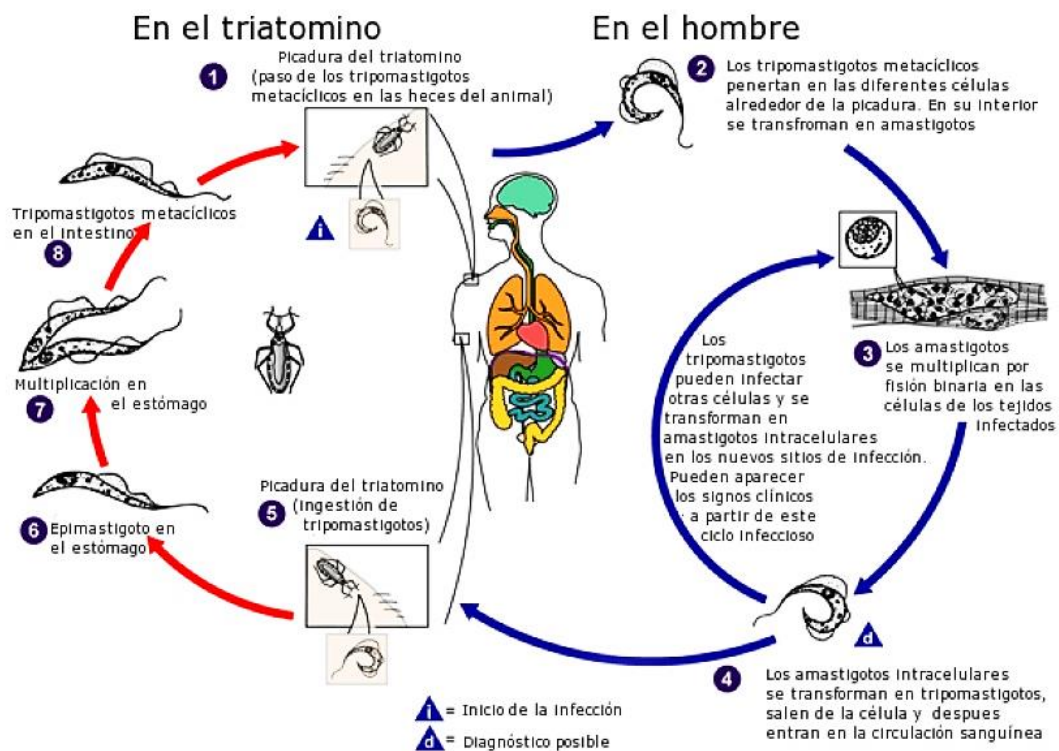


Figura 2. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

Ciclo de vida de *T. cruzi* adaptado de la página web del CDC (Centers for Disease Control and Prevention). <http://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAmerican/>

1.I.3 Estadios Clínicos de la enfermedad de Chagas

La enfermedad presenta tres períodos muy definidos: una fase aguda con un bajo índice de mortalidad, una fase indeterminada o latente que suele ser asintomática y una fase crónica, sintomática, con compromiso miocárdico y/o digestivo progresivo.

1.I.3.1. Fase Aguda

Comienza entre los días 6 a 10 y hasta 2 meses post infección. Solo el 5 % de los pacientes presentan síntomas y/o signos específicos de la Enfermedad de Chagas aguda que facilitan su diagnóstico. La inflamación producida en el sitio de la picadura denominado “chagoma de inoculación”, y el signo de Romana cuando la infección ocurre en el ojo, comprometiendo los párpados superior e inferior son los signos más específicos junto con fiebre y hepato-esplenomegalia.

En los casos más severos puede provocar miocarditis aguda o también meningoencefalitis aguda y desencadenar la muerte del paciente si no es tratado oportunamente, especialmente en niños pequeños y personas inmunosuprimidas (Rassi *y col.*, 2000). Las manifestaciones clínicas no específicas incluyen: fiebre, cefaleas, convulsiones, anorexia, somnolencia, vómitos, escalofríos, diarreas, etc. Esta fase puede durar entre dos y cuatro meses, y se caracteriza por una parasitemia elevada, siendo relativamente sencilla la identificación de *T. cruzi* en muestras de sangre (WHO, 2002).

1.I.3.2. Fase Indeterminada

Es la etapa que sigue a la fase aguda, y se caracteriza por la disminución de la parasitemia, atenuación, o incluso desaparición, de los síntomas clínicos. Constituye la etapa silenciosa de la Enfermedad, que en la mayoría de los casos transcurre en forma inadvertida. El 70-85 % de las personas infectadas continúan en esta etapa durante toda la vida (Barrett *y col.*, 2003). Solo puede evidenciarse

por exámenes de laboratorio que implican principalmente métodos serológicos dada la dificultad de detección del parásito.

1.I.3.3. Fase Crónica

Aproximadamente el 30 % de los individuos infectados con *T. cruzi* derivan a esta fase al cabo de 10 a 20 años post-infección. El daño tisular se hace evidente en el desarrollo de las alteraciones cardíacas y/o digestivas progresivas e irreversibles que caracterizan la fase crónica de la infección (Laranja *y col.*, 1956; Rosenbaum, 1964). El compromiso cardíaco es la manifestación más frecuente e importante en la etapa crónica de la enfermedad de Chagas en la Argentina (Rosenbaum y Cerisola, 1961; Bonet *y col.*, 1968). Las manifestaciones digestivas como el megacolon y megaesófago se han descripto principalmente en pacientes de Brasil, donde la prevalencia de esta patología es tres veces mayor que en otras áreas endémicas (Schmunis, 1994). Los desórdenes de tipo neurológico, que son atribuidos a las alteraciones del sistema nervioso periférico y a la destrucción de células del sistema nervioso autónomo, son otras manifestaciones de la enfermedad de Chagas observadas con menor frecuencia (Sica *y col.*, 1986; Gonzalez Cappa *y col.*, 1987; Losavio *y col.*, 1989). En esta etapa, la parasitemia es transitoria, por lo que la detección del parásito en sangre es totalmente aleatoria y de baja sensibilidad.

Otra clasificación de la evolución de la enfermedad que utiliza como parámetro principalmente el grado de disfunción cardíaca, es frecuentemente utilizada agrupando a los pacientes en cuatro grupos: G0, G1, G2 y G3. De acuerdo a esta clasificación, el grupo G0 presenta reacción positiva al diagnóstico de Chagas, electrocardiogramas normales y características cardíacas normales observadas por placa de rayos X. El grupo G1 presenta reacción positiva al diagnóstico de Chagas, electrocardiogramas anormales y características cardíacas normales observadas por placa de rayos X. El grupo G2 presenta reacción positiva al diagnóstico de Chagas, electrocardiogramas anormales y rayos X de tórax con cardiomegalia, sin signos o síntomas de insuficiencia cardíaca. Mientras

que el grupo G3 presenta reacción positiva al diagnóstico de Chagas, electrocardiogramas anormales y características cardíacas anormales observadas por placa de rayos X que acompañan una disfunción cardíaca crónica severa (Kuschnir *y col.*, 1985).

1.I.4.Diagnóstico

El diagnóstico de laboratorio de la infección por *T. cruzi* se basa en métodos de observación directa que permiten detectar al parásito en sangre periférica o muestras de tejido y/o técnicas que demuestran la existencia de anticuerpos específicos contra antígenos del parásito.

En la fase aguda de la enfermedad, la presencia de trypomastigotes circulantes es fácilmente detectable mediante la examinación de muestras de sangre fresca al microscopio óptico. Cuando los niveles de parasitemia son bajos, se utilizan métodos de concentración como el Strout o el micro-hematocrito. Los parásitos también pueden ser observados en frotis de sangre teñidos mediante la técnica de May-Grunwald Giemsa.

En la fase crónica de la infección disminuyen los niveles de parásitos circulantes en sangre periférica, por lo que la utilidad de los métodos parasitológicos directos se ve limitada. La mayoría de las personas infectadas generan anticuerpos contra el parásito, con predominio de clase IgM durante la fase aguda temprana, siendo reemplazados gradualmente por IgG a medida que progresa la infección. En consecuencia, son más utilizados los métodos indirectos que se basan en la detección de anticuerpos específicos contra el parásito. Las técnicas serológicas más usadas son: hemaglutinación indirecta (HAI), análisis por inmovinabsorción ligado a enzimas (del inglés, *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) e inmovinofluorescencia indirecta (IFI). Estas pruebas han sido ampliamente validadas, por lo que se consideran técnicas convencionales de rutina. En Argentina, el Ministerio de Salud recomienda efectuar al menos dos técnicas serológicas en paralelo para confirmar la infección. En caso de discordancia entre las dos técnicas, se debe realizar una tercer técnica para

definir el diagnóstico (Guía Ministerio de Salud, 2012). Por convención, se considera que una persona está infectada por *T. cruzi* si se obtienen resultados positivos en dos técnicas. Existen otros métodos de diagnóstico (técnicas parasitológicas indirectas) como el hemocultivo y el xenodiagnóstico, que involucran la expansión de la población parasitaria. El hemocultivo (Abramo-Orrego *y col.*, 1980) presenta buena sensibilidad en los casos agudos y congénitos, pero ésta es muy baja en los casos crónicos. La sensibilidad del xenodiagnóstico es del 100 % en los casos agudos y aproximadamente del 50 % en los casos crónicos (Cerisola *y col.*, 1974). Ambas técnicas se encuentran prácticamente en desuso para diagnóstico, porque el xenodiagnóstico involucra el mantenimiento de insectos reducidos y los dos métodos requieren la espera de al menos 30 días para obtener el resultado.

En los años '90 se introdujo como método de diagnóstico parasitológico la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permite amplificar secuencias específicas del ADN de *T. cruzi* a partir de muestras de sangre periférica, tejidos o preparados histológicos (Wincker *y col.*, 1994; Qvarnstrom *y col.*, 2012). Este método permite obtener resultados positivos días e incluso semanas antes que los trypomastigotes circulantes sean detectables por microscopía (Schijman *y col.*, 2000). Aun así, la sensibilidad de la técnica depende del nivel de parasitemia de la persona a diagnosticar, siendo de mayor utilidad para la infección aguda y congénita que para los casos crónicos (WHO, 2002). Actualmente la carga parasitaria puede cuantificarse por PCR en tiempo real, con una sensibilidad de 0.1 parásitos por ml, siendo posible su aplicación en pacientes crónicos, con baja parasitemia (Duffy *y col.*, 2009; Búa *y col.*, 2012). Estas técnicas parasitológicas moleculares son de especial utilidad para determinar la efectividad del tratamiento parasiticida.

1.I.5. Tratamiento

A pesar del tiempo transcurrido desde el descubrimiento de la enfermedad de Chagas, no se dispone aún de una quimioterapia eficaz para el tratamiento de

la misma. Los compuestos Nifurtimox y Benznidazol, constituyen las principales drogas disponibles para el tratamiento de la misma y tienen efecto trypanocida principalmente sobre los parásitos circulantes. El mecanismo de acción de estas drogas no está completamente dilucidado, pero se cree que es mediado por la generación de radicales libres y/o metabolitos electrofílicos o por inhibición directa de las enzimas involucradas en la detoxificación del parásito (Maya *y col.*, 2007), lo que lo hace particularmente susceptible al estrés oxidativo (Moreno *y col.*, 1982). Son bien toleradas por niños y jóvenes, aunque frecuentemente resultan tóxicas en adultos. Además de producir serios efectos secundarios y ser considerados teratogénicas, muestran baja eficacia en la etapa crónica de la Enfermedad (Castro *y col.*, 2006; Barrett *y col.*, 2003). El tratamiento de la etapa aguda con nifurtimox o benznidazol suele lograr la cura parasitológica en el 100 % en niños infectados. Sin embargo, la eficacia del tratamiento en adultos solo alcanza el 56 % (Blanco *y col.*, 2000; De Andrade *y col.*, 1996).

En los pacientes con cardiomiopatía chagásica crónica el tratamiento es fundamentalmente sintomático y tiene como fin contrarrestar las alteraciones del funcionamiento cardíaco, similares en muchos aspectos a las observadas en pacientes con cardiomiopatía dilatada idiopática. En consecuencia, el tratamiento está dirigido a los distintos tipos de arritmias y alteraciones de la conducción que pueden ser controladas con antagonistas β -adrenérgicos, amiodarona, verapamil, ajmalina, etc. (Rosenbaum *y col.*, 1983; Haedo *y col.*, 1986).

1.I.6 Rol de la respuesta inmune del hospedador

La presencia del parásito y restos celulares en el sitio de infección genera una intensa reacción inflamatoria local compuesta por células mononucleares y polimorfonucleares que incluyen linfocitos, macrófagos, mastocitos y eosinófilos, produciendo anticuerpos y mediadores inflamatorios como citoquinas, quimioquinas y enzimas, y liberando radicales libres. Las primeras células invadidas son los macrófagos, los cuales liberando bajas cantidades de IL-12 e IFN- γ activan a otras células del sistema inmune que colaboran incrementando el nivel de citoquinas inflamatorias y activando a los macrófagos, limitando así el

crecimiento de los parásitos en estas células (Brener y Gazzinelli, 1997; Bastos *y col.*, 2007). Durante la etapa aguda la respuesta celular es efectiva y predominante en la infección, los linfocitos T CD8+ ejercen un efecto protector controlando la replicación del parásito debido a su capacidad citotóxica y/o a los altos niveles de IFN- γ (Tarleton, 1990). La respuesta inmune humoral es también efectiva y capaz de destruir rápidamente a los parásitos circulantes mediante anticuerpos específicos producidos principalmente contra las mucinas, glicoproteínas presentes en la superficie del parásito (Almeida *y col.*, 1994). Sin embargo, ambas respuestas parecen ser insuficientes para eliminarlo completamente, estableciéndose la fase indeterminada donde el parásito persiste evadiendo efectivamente el sistema inmune del hospedador. En esta etapa, el parásito persiste en forma intracelular de acuerdo al tropismo de la cepa, pudiendo dar lugar a la fase crónica.

Hay controversia en relación a las causas de la patología generada en la fase crónica de la Enfermedad de Chagas humana y experimental. Independientemente de la contribución eventual de componentes autoinmunes (Leon *y col.*, 2001; Kierszenbaum, 2003; Cunha Neto *y col.*, 2006), la patología ha sido relacionada a la persistencia del parásito en los órganos afectados, donde producen un proceso de inflamación crónica (Tarleton *y col.*, 2001). Más aún, se ha postulado que la persistencia del parásito, sumado a la respuesta inmune dirigida hacia múltiples antígenos de miocardio podrían participar en el daño cardíaco (Girones y Fresno, 2003) pero independientemente de la causa de la patogénesis y la revisión de las teorías existentes para explicar la evolución clínica de la Enfermedad de Chagas (Dutra y Gollob, 2008), la cruzipaina (Cz), cisteína proteasa mayoritaria (Cazzulo *y col.*, 2001) de este protozooario parásito ha sido considerado un factor fundamental en la progresión de la Enfermedad.

Capítulo II: Morfología

1.II. Descripción de la morfología

Como se describió previamente, el parásito presenta tres estadios morfológicamente diferentes. Dos de estos, la forma intracelular replicativa conocida como amastigote y la forma sanguínea trypomastigote, se encuentran en el hospedador final vertebrado. Por otro lado, en el tracto digestivo del hospedador invertebrado puede hallarse la forma replicativa epimastigote (Goldenberg *y col.*, 1984; Soares *y col.*, 1992).

La forma epimastigote se presenta como una célula polarizada de aspecto alargado en donde todo el cuerpo celular está sostenido por un citoesqueleto formado por microtúbulos que tienen la dirección del eje mayor de la célula (Fig. 3).

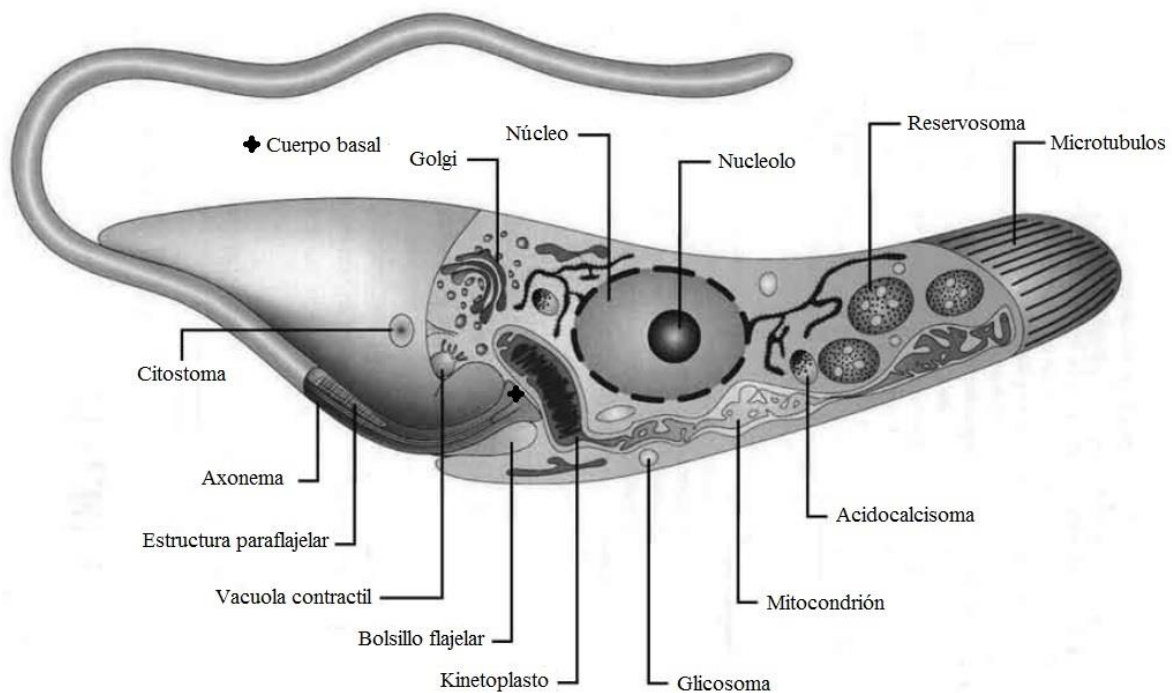


Figura 3. Estructura de un epimastigote de *T. cruzi*

Esquema de la organización de las organelas y estructuras en los epimastigotes de *T. cruzi* a partir de observaciones por microscopía de transmisión electrónica (Tomado de Souza *y col.* 2008).

La membrana plasmática posee un grosor de 8 a 10 nm y se encuentra rodeada por una cobertura superficial que cubre al parásito, conocida como glucocáliz. Esta cobertura aparece como una envoltura delgada en epimastigotes

y amastigotes (espesor de 5 nm) mientras que en trypomastigotes es más gruesa, llegando a medir 15 nm (De Souza *y col.*, 1978a).

En la extremidad anterior, los epimastigotes presentan el aparato de movimiento que está constituido principalmente por el flagelo y el cuerpo basal. El flagelo, que está involucrado en el movimiento de la célula y en la adhesión del protozoo a la superficie celular de los hospedadores (invertebrados y vertebrados) se presenta como una distribución característica de 9 pares de microtúbulos periféricos y uno central. Se encuentra rodeado por una membrana contigua a la membrana plasmática que emerge del bolsillo flagelar, compartimiento especializado formado a partir de la invaginación de la membrana plasmática (De Souza *y col.*, 1978b; Cazzulo y Segura, 1985). Además, está presente en los tres estadios del parásito. El cuerpo basal es una estructura cilíndrica a partir de la cual se proyecta el flagelo. Es totalmente intracitoplasmático, y se encuentra formado por nueve tripletes de microtúbulos en su parte proximal. En su parte distal, se proyecta el flagelo a partir del bolsillo flagelar (De Souza *y col.*, 1978b).

En el centro de la célula se encuentra el núcleo (Fig. 4a). El material genético lineal se dispone contiguo a la membrana nuclear como una cromatina densa y dispersa. La membrana nuclear está conformada por una bicapa típica con poros. El nucléolo, se ubica en el centro de esta organela. Cuando el parásito está en interfase, la cromatina se encuentra principalmente en la periferia nuclear dándole al núcleo la forma típica de rueda de carro (Brack, 1968; Solari, 1980).

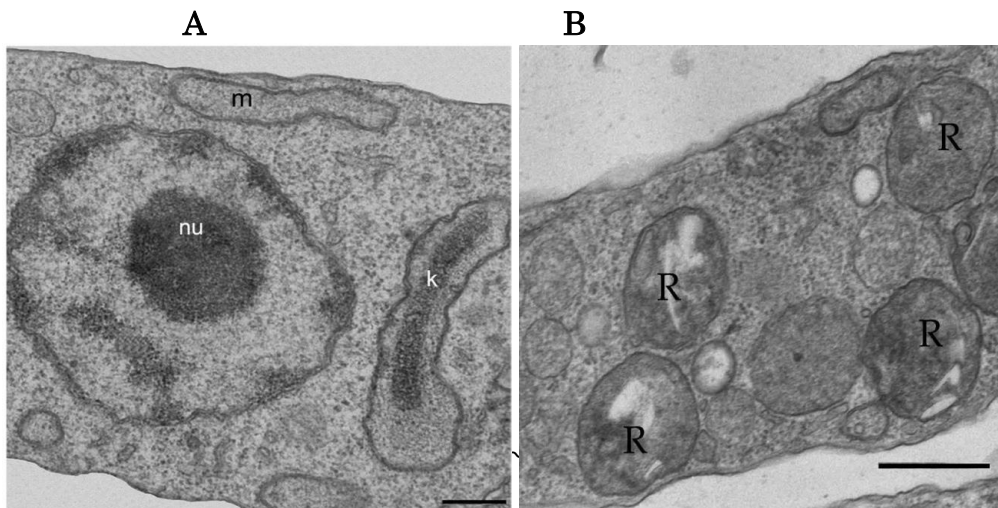


Figura 4. Imágenes de cortes ultrafinos de epimastigotes obtenidos por Microscopía electrónica (Sant'Anna y col., 2009).

a) Corte longitudinal ultrafino de un epimastigote de *T. cruzi* mostrando una organización típica del Núcleo conteniendo al nucleolo (nu), el kinetoplasto (K) rodeado por membrana mitocondrial y parte del mitocondrion (m) ubicado en la periferia del citoplasma. Barra: 2 μ m. (Lacombe y col., 2014) b) Sección ultrafina de un epimastigote mostrando la forma y organización típica de los reservosomas. Barra: 0,3 μ m

La mitocondria es una organela grande y única que se encuentra distribuida a lo largo del cuerpo celular. En la familia Trypanosomatidae, el genoma mitocondrial se encuentra dentro de una región específica de la mitocondria denominada kinetoplasto (Cavalcanti y col., 2009) (Fig. 4a). El kinetoplasto corresponde a una condensación de DNA extranuclear (kDNA) dentro de una región bien definida de la mitocondria, formando una estructura alargada, que puede hallarse próxima a la base del flagelo. Este kDNA representa aproximadamente 30 % del DNA total de la célula y está distribuido en maxi y minicírculos (Hadjuk y Sabastini, 1996). Particularmente en la forma trypomastigote, este kDNA se encuentra desorganizado o más relajado, perdiendo la estructura de bastón y observándose de forma esférica (Cavalcanti y col., 2009; De Souza, 1999).

En la parte posterior de los epimastigotes aparecen estructuras redondeadas, limitadas por una membrana, conocidas como reservosomas y se pueden ver también inclusiones lipídicas y glicosomas (Soares y col., 1992) (Fig. 4b). Estos reservosomas son el resultado de procesos de endocitosis de nutrientes cuyo origen se sitúa en el bolsillo flagelar. La endocitosis de nutrientes en Trypanosomatidos está restringida al bolsillo flagelar (Webster y Russel, 1993; Radek y Hausmann, 1994; Overath y col., 1997); sin embargo los epimastigotes de *T. cruzi* presentan un sitio adicional para llevar a cabo este proceso denominado Citostoma. Dicha estructura está presente también en las otras dos formas del parásito, aunque es menos relevante ya que la endocitosis ocurre casi exclusivamente en epimastigotes siendo nula o escasa en las otras formas del parásito. El citostoma está ubicado próximo al bolsillo flagelar y se presenta como una profunda invaginación de la membrana plasmática. Tanto la endocitosis mediada por receptores como la pinocitosis ocurren principalmente en este sitio

en epimastigotes (Soares y De Souza, 1991; Porto-Carreiro *y col.*, 2000). A partir de la entrada de moléculas a través del citostoma, una red de vesículas se prolonga desde la parte anterior del parásito hasta la posterior donde las mismas se fusionan con los reservosomas. Estas vesículas son morfológicamente similares a los endosomas tempranos encontrados en mamíferos y cumplirían la misma función (Porto-Carreiro *y col.*, 2000). Los reservosomas son considerados como organelas pre-lisosomales y constituyen el sitio principal de reserva de lípidos y proteínas tanto ingeridas como de secreción sintetizadas por el parásito (Soares y De Souza, 1988; Cunha-e-Silva *y col.*, 2006). Poseen pH 6.0, un diámetro entre 400 y 600 nm y están delimitados por una bicapa lipídica. Presentan un núcleo electrodenso rico en proteínas así como también inclusiones lipídicas electrolúcidas (Soares y De Souza, 1988; Sant'Anna *y col.*, 2008). Entre las proteínas presentes en los reservosomas se encuentra la Cz, cisteína proteinasa mayoritaria del parásito, la cual tiene una función principal en el proceso de metaciclogénesis que da lugar al estadio trypomastigote el cual carece de estas organelas. Algunas hipótesis sugieren que el estrés nutricional en los epimastigotes gatilla la acidificación de los reservosomas desencadenando la proteólisis del material almacenado que daría lugar a la metaciclogénesis (Souto-Padron *y col.*, 1990; Cunha-e-Silva NL *y col.*, 2002; Franke de Cazzulo *y col.*, 1994; Figueiredo *y col.*, 1994; Soares *y col.*, 1989; Urbina 1994).

La presencia de glicosomas, constituye una de las características únicas de los Trypanosomátidos. Estas estructuras de aspecto redondeado contienen las enzimas de la vía glicolítica. Esta compartimentalización ha incrementado la eficiencia del proceso de glicólisis (Giacometti *y col.*, 2010).

Capítulo III: Mecanismos de Infección

1.III. Generalidades

T. cruzi se adhiere e invade una gran variedad de células de mamífero. La vasta cantidad de mecanismos de unión descritos hasta el momento, así como de moléculas que intervienen en ellos reflejan la complejidad de este proceso.

1.III.1 Participación de carbohidratos en el proceso de infección

El reconocimiento de carbohidratos en la unión del parásito a la célula hospedadora ha sido extensamente estudiado, mostrando resultados que resaltan la importancia de estas moléculas en el proceso de infección. Varios de estos estudios, realizados en macrófagos, mostraron que residuos de galactosa y N-acetil-D-galactosamina en la superficie de los parásitos son reconocidos por macrófagos y su presencia promueve la infección, mientras que los residuos de ácido siálico no la favorecerían. Mediante el bloqueo con lectinas específicas sobre la superficie de los macrófagos se observó que alfa-D-mannosa, beta-D-galactosa y N-acetil-D-galactosamina también participarían en la interacción con trypomastigotes de *T. cruzi* junto con residuos de fucosa y ácido N-acetilneuramínico (Araújo-Jorge y de Souza, 1986, 1988). Posteriormente, se describió que el receptor de manosa (MR) en macrófagos, el cual tiene la capacidad de reconocer tanto residuos de manosa como de fucosa o N-acetilglucosamina, está involucrado en la unión de los trypomastigotes a estas células fagocíticas. El MR es una proteína con múltiples dominios, uno de los cuales, rico en cisteínas (CR), posee actividad lectina y une azúcares sulfatados (Liu *y col.*, 2000). Otro de ellos es un dominio de Fibronectina tipo II (Fn II) el cual media la unión a colágeno; y además presenta ocho dominios de reconocimiento de carbohidratos (CDR) los cuales dependiendo de la presencia de calcio reconocen azúcares cuyo residuo terminal sea manosa o fucosa (Fig. 5) (Taylor *y col.*, 1992; Taylor y Drickamer, 1993; Martínez-Pomares *y col.*, 2006). El dominio C-terminal (C-T) de la Cz, proteasa, antígeno y glicoproteína característica del parásito (Duschak y Couto, 2009), es el principal candidato para justificar esta interacción, ya que está altamente manosilada y la

interacción de esta proteína con el MR fue demostrada. Además, también sería producto de esta interacción con Cz, el incremento del reciclado de este receptor y la inducción de macrófagos con fenotipo arginasa positivo, lo cual favorece la replicación del parásito dentro de estas células, (Garrido *y col.*, 2011).

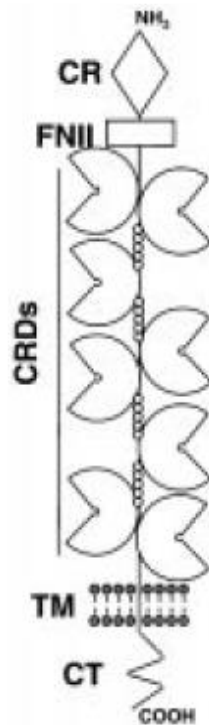


Figura 5. Representación esquemática del receptor de manosa (MR). (NH₂) Dominio amino terminal, (CR) dominio rico en cisteína de unión a azúcares sulfatados, (FNII) dominio de fibronectina tipo II, (CRDs) dominios de reconocimiento de carbohidratos, (TM) dominio transmembrana, (CT) dominio C-terminal (Martínez-Pomares *y col.*, 2001).

La participación de este receptor en el proceso de infección de células no fagocíticas como los cardiomiocitos también fue evidenciada. Se demostró que la invasión de estas células disminuye drásticamente mediante el tratamiento de las mismas con D-manosa en solución, y que el reconocimiento de los ligandos vía este receptor da lugar a eventos de endocitosis. Además, se observó que los ligandos de este receptor acoplados a partículas de oro, colocalizan con los sitios de unión del Trypanosoma a los cardiomiocitos mediante microscopía electrónica. Paralelamente, la infección de los cardiomiocitos por parte del el parásito implica

un cese de expresión del receptor de manosa y un fuerte incremento del Ca^{2+} intracelular. La expresión del receptor es restablecida luego del tratamiento de las células infectadas con el agente tripanocida Nifurtimox (Soeiro *y col.*, 1999; 2002; Meirelles *y col.*, 1999). Junto con manosa, otros azúcares como galactosa y ácido siálico fueron relacionados también con la invasión de los cardiomiocitos presentes en la membrana plasmática de los mismos, siendo internalizados junto con el parásito (Barbosa *y col.*, 1992).

1.III.2. Participación de proteoglicanosy/o glicosaminoglicanos en el proceso de infección

Los proteoglicanos son un grupo de proteínas altamente glicosiladas por grupos de heteropolisacáridos denominados glicosaminglicanos. Los glicosaminglicanos están generalmente compuestos por unidades repetitivas de dos azúcares, uno de ellos es ácido hexurónico (D-glucurónico o L-idurónico) que le aporta la característica carga negativa a la molécula, y el otro puede ser alternativamente N-acetil D-Glucosamina o N-acetil D-galactosamina que a su vez pueden estar sulfatadas. Cuando los glicosaminglicanos que componen un proteoglicano son fundamentalmente heparán sulfato, se los denomina Proteoglicanos de Heparán Sulfato (HSPGs) (Bernfield *y col.*, 1999; Dietrich *y col.*, 1998). Los HSPGs ampliamente distribuidos en los tejidos de mamíferos, participando en varios procesos biológicos (Ori *y col.*, 2008; Yung y Chan, 2007), fueron implicados también en la adhesión e invasión por *T. cruzi* a cardiomiocitos. Mediante el tratamiento de las formas infectivas del parásito (trypomastigotes y amastigotes) con heparán sulfato (HS) soluble, o el tratamiento de cardiomiocitos con heparitinasa II se logró una inhibición significativa de la invasión parasitaria. El reconocimiento de *T. cruzi* a HSPG se debe a proteínas de unión a heparina presentes en la superficie del parásito que reconocen específicamente los dominios N-acetilados/N-sulfatados de la molécula (Calvet *y col.*, 2003; Oliveira Jr. *y col.*, 2008; Bambino-Medeiros *y col.*, 2011). Es importante mencionar que estas no son las únicas moléculas implicadas en el reconocimiento del parásito por la célula hospedadora, también se ha demostrado

que la fibronectina así como los receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y factor de crecimiento transformante β (TGF- β) en la superficie de los cardiomiocitos participan en la adhesión del parásito a estas células (Calvet *y col.*, 2012).

1.III.3. Participación de proteinasas en el proceso de invasión

T. cruzi emplea múltiples estrategias y diferentes moléculas para invadir un amplio rango de células blanco no fagocíticas. La unión a las células blanco esta mediada por miembros de la familia de *Tc85*, glicoproteínas de superficie, miembros de familia transialidasa (TS) y también de las mucinas (Fig. 6). Se han descrito dos mecanismos dependientes de peptidasas en *T. cruzi* que inducen la señalización por Ca^{2+} en células de mamífero. Uno involucra la serina endopeptidasa oligopeptidasa B (Burleigh y Andrews, 1995, 1998; Calery *col.*, 1998) y el otro requiere la participación de la Cz secretada/lisosomal (Scharfstein *y col.*, 2000). Los trypomastigotes tienen que atravesar la matriz extracelular para llegar a las células del hospedador. El paso 1 representa la unión de los trypomastigotes a la matriz extracelular usando moléculas tales como la glicoproteína *gp85* y la penetrina. El paso 2 representa el mecanismo de translocación a través de la matriz mediante el uso de la prolil-oligopeptidasa (POP) *Tc80* capaz de hidrolizar colágeno y fibronectina. El paso 3 involucra la adhesión e invasión a las células blanco, mediada por *gp85*, TS y/o mucinas. Finalmente, el paso 4 muestra la unión de los trypomastigotes a las células blanco induciendo la activación de la oligopeptidasa B que genera agonistas de Ca^{2+} . En este paso la secreción de Cz tiene lugar y gatilla indirectamente la respuesta de Ca^{2+} en las células del hospedador (Fig. 6) (Yoshida, 2006). Los trypomastigotes unidos secretan Cz en la zona de yuxtaposición entre parásito-célula blanco. La participación de esta cisteína proteasa principal del parásito en este proceso mostró estar asociada con su actividad quininogenasa generando bradiquinina, la cual también induce respuesta Ca^{2+} al interactuar con su receptor (Scharfstein *y col.*, 2000; Todorov *y col.*, 2003).

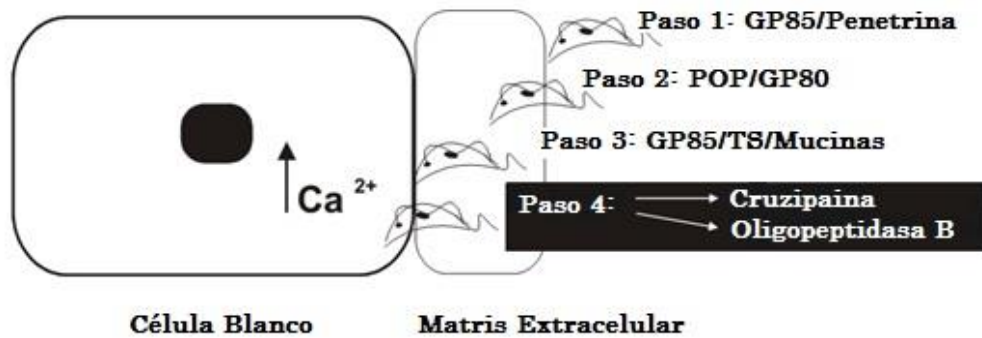


Figura 6. Participación de la Cz en la interacción de los trypomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* con las células blanco.

Los trypomastigotes tienen que atravesar la barrera de la matriz extracelular para llegar a la célula hospedador. Paso 1: unión a la matriz extracelular mediante el uso de gp85 y penetrina, capaces de interactuar con laminina, fibronectina, colágeno, heparina. Paso 2: Translocación a través de la matriz por la actividad proteolítica de POP Tc80 sobre colágeno o fibronectina. Paso 3: Adhesión a e invasión de las células blanco mediadas por gp85, TS y/o mucinas. Paso 4: La unión de los trypomastigotes a las células blanco induce, en adición a la activación de la oligopeptidasa B que genera agonistas de Ca^{2+} , la secreción de Cz que gatilla indirectamente la respuesta de Ca^{2+} en las células del hospedador [Basado en Yoshida, 2006].

1.III.4. Participación lipídica en el proceso de invasión

Más recientemente, la reparación de la membrana plasmática mediada por las esfingomielinasas como consecuencia del daño infringido por el parásito y las vías autofágicas de la células hospedadoras fueron propuestas como mecanismos que participan en el proceso de invasión (Fernández *y col.*, 2011; Fernández y Andrews, 2012).

1.III.5. Modelos de invasión descriptos

A partir del reconocimiento de las moléculas mencionadas anteriormente, al menos cinco modelos de invasión fueron descriptos hasta el momento. Uno de ellos dependiente de actina, implica una redistribución de los microfilamentos debajo de la membrana plasmática de la célula hospedadora, la cual envuelve al parásito promoviendo su endocitosis (Barbosa y Meirelles, 1995; Procópio *y col.*, 1999; Rosestolato *y col.*, 2002; Ferreira *y col.*, 2006). Otro modelo demanda el aumento transitorio del nivel de cationes Ca^{2+} a nivel citosólico inducido por el

parásito, generando una despolimerización de la actina y reclutando lisosomas en el sitio de unión del parásito a la célula afectada (Rodríguez *y col.*, 1999; Hissay *col.*, 2012). Por otro lado, podemos mencionar los mecanismos de activación de señalización celular a partir de la interacción con receptores celulares específicos. Entre estos se encuentran, los receptores de tirosina quinasa (Trka y TrKC) (de Melo-Jorge y Pereira Perrin, 2007; Weinkauff *y col.*, 2011) y de Fosfatidil inositol 3-Quinasa (PI3K) (Todorov *y col.*, 2000; Chuenkova *y col.*, 2001, Wilkowsky *y col.*, 2001; Vieira *y col.*, 2002; Woolsey *y col.*, 2003), los receptores de bradiquinina (Scharfstein *y col.* 2000; Todorov *y col.*, 2003) y de TGF- β (Ming *y col.*, 1995; Waghbi *y col.*, 2007).

1.III.6. Invasión de cardiomiocitos por *T. cruzi*

Consecuentemente, la coordinación de todos estos mecanismos de invasión combinados sería responsable del éxito del proceso mencionado (Butler y Tyler, 2012). Varios de estos modelos de infección fueron descritos también en cardiomiocitos (Fig. 7). Así como en las células fagocíticas no profesionales (Rosestolato *y col.*, 2002; Ferreira *y col.*, 2006), la invasión de los trypomastigotes de *T. cruzi* a cardiomiocitos es también mediada por procesos endocíticos que implican una reorganización del citoesqueleto. Fundamentalmente, los microfilamentos de actina son los que al proyectarse desde el sarcolema, envuelven al parásito y provocan su ingreso (Barbosa y Meirelles, 1995). De igual modo, el modelo de infección que involucra el reclutamiento de lisosomas en el sitio de interacción del parásito con la célula blanco a partir de un incremento del Ca^{+2} citoplasmático, fue descrito en cardiomiocitos (Hissa *y col.*, 2012).

La capacidad de *T. cruzi* de activar TGF- β latente promoviendo la invasión, se ha probado también en cardiomiocitos. El factor TGF- β es una citoquina expresada como un precursor inactivo, el cual es activado proteolíticamente para dar lugar, luego de unirse a su receptor, a una cascada de señalización, que está implicada en la modulación de eventos de proliferación celular y diferenciación (Moustakasy *col.*, 2002). Se demostró que los trypomastigotes de *T. cruzi* tienen

la capacidad de activar el factor TGF- β mediante su proteólisis favoreciendo así la invasión de los cardiomiocitos. Este efecto es inhibido en gran parte mediante el tratamiento con anticuerpos específicos contra esta citoquina (Waghbi *y col.*, 2005), confirmando su participación en este proceso.

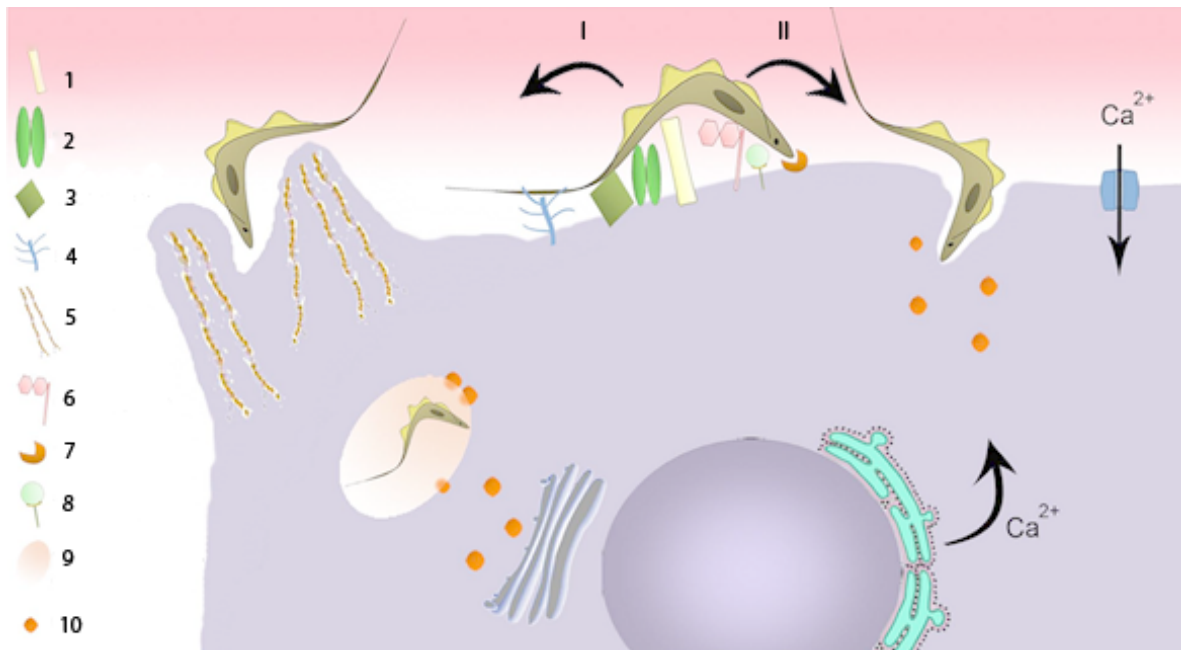


Figura 7. Modelado de la infección en cardiomiocitos por *T. cruzi*

Modelo esquemático representando las moléculas de superficie involucradas en el reconocimiento de *T. cruzi* durante el proceso de invasión de cardiomiocitos. Se representan dos modelos de invasión. El dependiente de Actina (I), y el dependiente de lisosomas (II). (1) Colesterol, (2) Fibronectina, (3) Receptor de LDL (Lipoproteína de baja densidad), (4) Proteoglicano Heparán sulfato, (5) Microfilamentos de actina, (6) Glicoconjugado, (7) Receptor de Bradiquinina, (8) Receptor de TGF β , (9) Vacuola parasitófora, (10) Lisosomas (Calvet *y col.*, 2012).

Los receptores de bradiquinina (Br2-R/Br1-R) fueron relacionados también con la infección de *T. cruzi* a cardiomiocitos. El mecanismo se encuentra regulado por la presencia de HSPG en la superficie de las células del hospedador. La notoria carga negativa de este proteoglicano sulfatado, determina el anclaje de moléculas de quinínogeno de alto peso molecular (HK), Las cuales son degradadas por la Cz, liberando Lisil-Bradiquinina (LBK). Esta kinina además de ser ligando del receptor Br2, induce la expresión del receptor Br1 luego de ser degradada por la carboxipeptidasa M, con alta expresión en células del endotelio

y menor en células dendríticas y monocitos. La activación de ambos Br2-R/Br1-R libera iones de Ca^{2+} al citosol de los cardiomiocitos, fomentando la invasión de las mismas (Todorov *y col.*, 2003; Scharfstein *y col.*, 2000). El rol de la Cz en este proceso es fundamental, requiriendo un primer reconocimiento del parásito vía receptores de tipo Toll (TLR-2) como inicio de proceso inflamatorio para dar lugar a la extravasación de moléculas de HK al tejido (Monteiro *y col.*, 2006; Scharfstein *y col.*, 2013). La actividad proteolítica de la Cz fue implicada también en la promoción de la invasión y replicación de los parásitos en los cardiomiocitos (Meirelles *y col.*, 1992; Scharfstein *y col.*, 2000), en la degradación de quimioquinas pro-inflamatorias (Benítez-Hernández *y col.*, 2010) y en la supresión de respuestas trypanocidas en macrófagos parasitados mediante la interferencia de la activación del factor de señalización nuclear NF κ B (Doyle *y col.*, 2011). Es importante destacar que estos modelos consideran solamente el rol de la Cz como proteasa y no como antígeno ni como glicoproteína que contiene oligosacáridos de tipo alta manosa con/sin motivos sulfatados. Los trabajos relacionados con el receptor de manosa evaluaron la participación de ésta como glicoproteína implicando a las manosas presentes en los oligosacáridos de la molécula (Garrido *y col.*, 2011; Soeiro *y col.*, 2002). Por otro lado, pocos trabajos relacionan la actividad de la Cz con la invasión de células de músculo liso, algunos sostienen que la Cz actuaría a través del receptor de bradiquininas y otros que lo haría independientemente de estos (Aparicio *y col.*, 2004; Andrade. *y col.*, 2012).

Capítulo IV: Cruzipaína

1.IV. Generalidades

Además de su rol en los mecanismos de infección el estudio de esta proteína, cuyo descubrimiento se remonta a la década del ochenta (Scharfstein *y col.*, 1986; Cazzulo *y col.*, 1990), ha aportado numerosas evidencias que la relacionan con la nutrición, crecimiento, diferenciación y evasión del sistema inmune del parásito. Esto ameritó una descripción detallada tanto de su expresión como de su estructura

La Cz, perteneciente a la familia de la papaína, presenta una extensión o dominio C-terminal (C-T) característico de las Cisteína proteinasas (CPs) de Tipo I, según la definición de Coombs y Mottram, 1997. Este dominio inusual contiene un número de modificaciones post-traduccionales y es responsable del carácter inmuno-dominante de la molécula tanto en la infección experimental como en la natural (Scharfstein *y col.*, 1986; Martinez *y col.*, 1991, 1993). La Cz es la CP mayoritaria de *T. cruzi*, particularmente en el estadio epimastigote, en el cual su localización es principalmente lisosomal (Cazzulo *y col.*, 1997). Esta proteinasa, se denominó también antígeno Gp57/51 (Murta *y col.*, 1990) o Ag163B6 (Malchiodi *y col.*, 1993), y se encuentra en todos los estadios del parásito (Cazzulo *y col.*, 2001).

1.IV.1 Expresión y Estructura

Algunas cepas de *T. cruzi* contienen al menos 130 genes que codifican para esta proteasa, que a su vez, están ubicados de 2-4 “clusters” distribuidos en 1 ó 2 pares de cromosomas homólogos (Campetella *y col.*, 1992). A partir de la secuencia del genoma completo en el clon CL Brener, se sabe que en realidad no hay tantos genes y que además se encuentran codificadas en el genoma del parásito 70 cisteína peptidasas, 40 serina peptidasas, 250 metalopeptidasas, 25 treonina peptidasas y 2 aspartil peptidasas (El Sayed *y col.*, 2005). Si bien la Cz esta codificada por varios genes y el cariotipo de *T. cruzi* varía considerablemente de una cepa a otra, los genes que codifican para esta glicoproteína se encuentran altamente conservados.

La transcripción de los genes que codifican para la Cz generan fragmentos de ARNm carentes de intrones de 1,8 Kb, los cuales están presentes en todas las formas de desarrollo del parásito en niveles similares; sin embargo, la expresión de la proteína no es la misma en todos los estadios de su ciclo de vida y su nivel de expresión se encuentra diferencialmente regulado (Campetella *y col.*, 1990; Thomas y Kelly, 1996). Esto implica que la expresión de esta proteína no es regulada a nivel transcripcional sino traduccional y/o post-traduccional. En el estadio epimastigote por ejemplo, alcanza su mayor nivel de expresión, siendo incluso de 4-5 veces mayor que en la forma trypomastigote y amastigote (Franke de Cazzulo *y col.*, 1994). Además, varios grupos de investigación han demostrado que inhibidores capaces de anular la actividad enzimática de la Cz previenen el crecimiento y la diferenciación del parásito en múltiples etapas: de epimastigotes a trypomastigotes, de trypomastigotes metacíclicos a amastigotes, y de amastigotes a trypomastigotes sanguíneos, bloqueando en particular los eventos de diferenciación (Meirelles *y col.*, 1992; Harth *y col.*, 1993; Franke de Cazzulo *y col.*, 1994), indicando que la misma participa en el ciclo de vida del parásito.

El ARNm codificante para la Cz es traducido para dar lugar a un precursor de la enzima conteniendo dominios PRE y PRO-enzima de 18 y 104 aminoácidos, respectivamente. La secuencia PRE de 18 residuos constituye el péptido señal que la dirige a retículo endoplasmático. El dominio PRO de 104 residuos contiene la señal a lisosoma, mantiene a la enzima en forma inactiva y se ha demostrado su participación en el proceso de plegamiento de la proteína. El proceso de maduración de la Cz ocurre en el Golgi (Huete-Pérez *y col.*, 1999; Wiederanders *y col.*, 2000; Pietschmann *y col.*, 2002). El dominio catalítico está constituido por 215 residuos con dos posibles sitios de N-glicosilación, mientras el C-T de la proteína contiene 130 residuos y posee solo uno. Hasta la fecha, se desconoce la función de este dominio. Se ha propuesto que la función de este dominio C-terminal, el cual es altamente antigénico y acompaña al dominio catalítico formando una molécula de tipo quimera, es desviar la respuesta inmune del

hospedador (Cazzulo y Frasch, 1992). Esto concuerda con el hecho de que la enzima es activa en ausencia del C-T (Stoka *y col.*, 1998).

El peso molecular estimado de la enzima, a partir de su secuencia primaria, es de 36,6 kDa; sin embargo, el análisis electroforético en geles de poliacrilamida (PAGE) muestra un rango de pesos moleculares aparentes entre 35 y 60 kDa, dependiendo de las condiciones experimentales utilizadas (Martínez y Cazzulo, 1992). En la forma madura, el 10 % del peso de esta glicoproteína lisosomal está compuesto por carbohidratos (Cazzulo *y col.*, 1990). La estructura tridimensional de la Cz se estabiliza por la presencia de cuatro puentes disulfuro en el dominio catalítico y otros cuatro en el C-T (Cazzulo *y col.*, 1997). La Cz nativa purificada a partir de epimastigotes es una mezcla compleja de isoformas. La heterogeneidad encontrada en la Cz se debe esencialmente a la variación de los aminoácidos en la secuencia peptídica (polimorfismo existente en los genes), a la estructura de los motivos de glicosilación y probablemente también a la presencia de otras modificaciones post-traduccionales presentes en el C-T (Cazzulo *y col.*, 1995; Martínez *y col.*, 1995, 1998; Duschak *y col.*, 2003; Parodi *y col.*, 1995; Barboza *y col.*, 2005; Duschak y Couto, 2009). La mayoría de las modificaciones no conservativas de la proteína madura, se encuentran en el C-T. Algunos de estos cambios se producen a nivel de los residuos cargados, modificando los puntos isoelectrónicos de estos péptidos, mientras que otros determinan la pérdida de cisteínas y por consiguiente de los puentes disulfuros que éstas formaban. Sin embargo, a pesar de la variedad presente en este dominio, se observó que en ningún caso se produce la pérdida de la Asn-255 (residuos numerados a partir de la enzima madura), único sitio de *N*-glicosilación del C-T, ni tampoco se produce la pérdida de los residuos de Thr (220 y 224 al 229). Mediante ensayos de piridiletilación se descartó la posibilidad de que estos últimos residuos estuvieran ocupados por *O*-glicosilación (Cazzulo *y col.*, 1992). En el dominio catalítico, se producen reemplazos de aminoácidos conservativos (el pI no varía). Este dominio fue clonado y expresado de manera recombinante producto al cual se lo denominó, Cruzaína (Eakin *y col.*, 1992). La Cz completa

fue clonada en baculovirus en el año 2002 (Alvarez *y col.*, 2002) sin embargo no se ha podido cristalizar hasta la fecha. (Fig. 8)

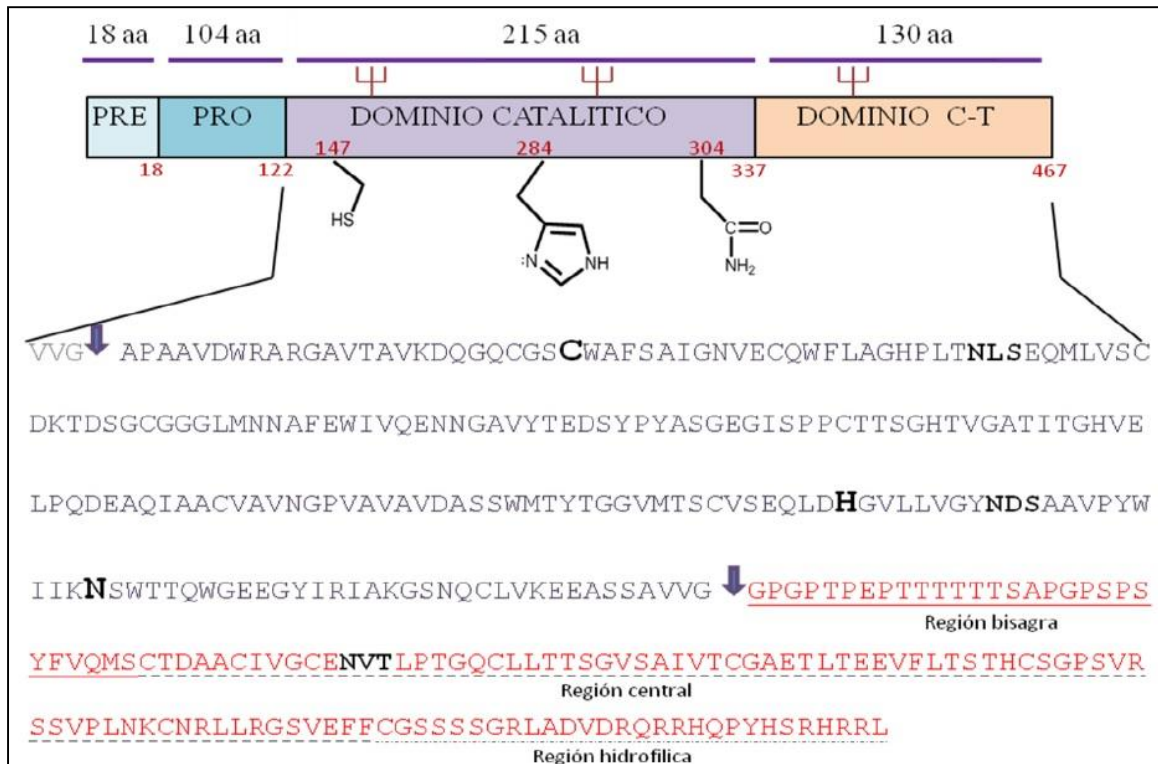


Figura 8. Esquema del precursor de la Cruzipaina.

Los dominios que se traducen de la secuencia genética de la cruzipaina están representados como rectángulos coloreados. En cada uno se detalla en número de aminoácidos que lo componen y su punto de inicio. Sobre los dominios catalítico y C-T se señalan los tres posibles sitios de N-glicosilación presentes en la proteína (U). Unidos por debajo del dominio catalítico se representan las cadenas laterales y la posición aproximada de los aminoácidos que constitutivos de la triada catalítica de la enzima (Cisteína 147, Histidina 284 y Asparagina 304). En la parte inferior del esquema se detalla la secuencia peptídica de la enzima madura compuesta por los dominios catalítico y C-T, donde se destacan los aminoácidos de la triada catalítica en negrita y tamaño aumentado, los tres sitios de glicosilación en negrita y los aminoácidos que componen el dominio C-T en rojo (Campetella *y col.*, 1992). Con flechas se indican los sitios de clivaje entre el dominio pro y el dominio catalítico y entre este último y el dominio C-T (Cazzulo *y col.*, 1997)

1.IV.2 Glicosilaciones de la Cz

La Cz es una glicoproteína, que presenta en su secuencia primaria tres sitios posibles de N-glicosilación y varios de O-glicosilación (Cazzulo *y col.*, 1989; Cazzulo *y col.*, 1990b; Parodi *y col.*, 1995). Los 3 sitios potenciales de N-glicosilación son: 33NLS35, 169NDS171 y 255NVT257. Se sabe que el primero y

el último están ocupados “*in vivo*”, el primer y segundo sitio se localizan en el dominio catalítico de la enzima, mientras que el tercer sitio se encuentra en el dominio C-T (Fig. 8) (Cazzulo *y col.*, 1992; Metzner *y col.*, 1996). La presencia de oligosacáridos de tipo alta manosa se identificó en ambos dominios (Parodi *y col.*, 1995). Particularmente se determinó la presencia de cadenas híbridas monoantennarias y/o complejas biantennarias en el C-T, las cuales contenían además diferentes grupos cargados unidos a ellas, como ácido siálico (Barboza *y col.*, 2003) y grupos sulfato (Barboza *y col.*, 2005) (Fig. 9). Para los estadios epimastigote y amastigote el oligoprecursor utilizado para dar origen al proceso de glicosilación es únicamente $\text{Man}_9\text{NAcGlc}_2$, pero en el estadio trypomastigote también se encuentra el oligoprecursor $\text{Man}_7\text{NAcGlc}_2$. Además la presencia de diversas glicosidasas y glicosiltransferasas en el complejo de Golgi del parásito permiten la obtención de diversos tipos de glicosilaciones para la misma proteína fomentando aún más la variabilidad de estas modificaciones (Dell y Morris, 2001; Engel y Parodi, 1985; Doyle *y col.*, 1986). La única O-glicosilación encontrada en la Cz hasta la fecha se encuentra en una de las treoninas del dominio C-T conteniendo una unidad de NAcGlc (Barboza *y col.*, 2003). La presencia de la enzima uridina-difosfo-NAcGlc polipéptido transferasa, encargada de este tipo de glicosilaciones fue reportada (Previato *y col.*, 1998). Inicialmente, las moléculas presentes en las glicosilaciones de la Cz nomostraban grupos aniónicos negativos que justifiquen su carácter ácido, el cual se observa por el rango de puntos isoeléctricos (pI) que va desde 3.7 hasta 5.1 para esta proteína (Stoka *y col.*, 1995). Particularmente, este rango va de 4.5 a 5 para el C-T (Cazzulo *y col.*, 1995), en contraste con el pI teórico que se obtiene a partir del cálculo según su secuencia aminoacídica que lo ubica entre 7.05 y 8.12 (Martínez *y col.*, 1998). La presencia de ácido siálico demostrada en la Cz (Barboza *y col.*, 2003) en bajas proporciones, no era componente aniónico suficiente para justificar estas diferencias entre puntos isoeléctricos teóricos y calculados. Por otro lado, la presencia de grupos fosfato en la molécula madura había sido descartada mediante la marcación de parásitos con ^{32}P (Cazzulo *y col.*, 1992).

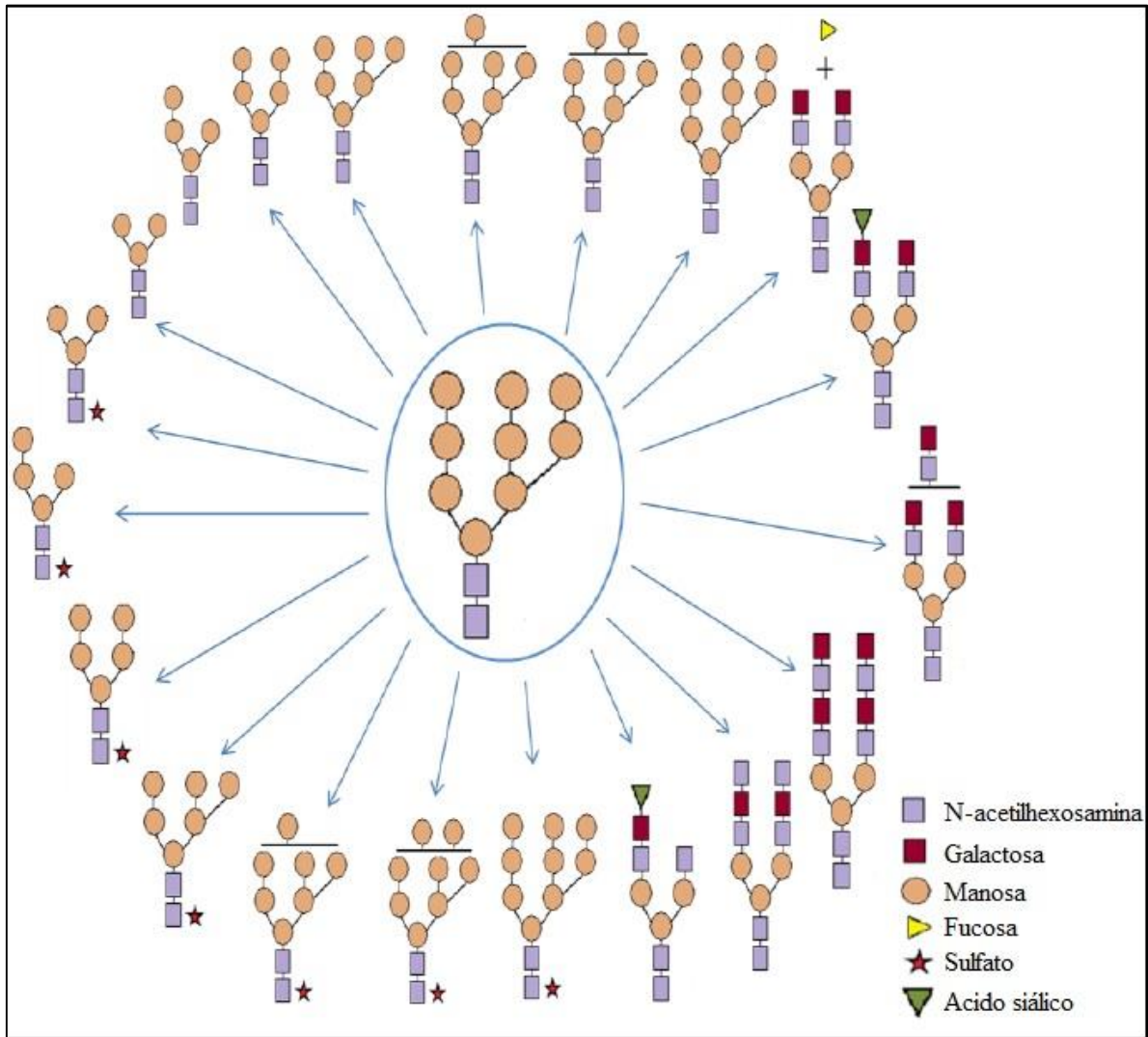


Figura 9. Representación esquemática de la variabilidad de oligosacáridos encontrados en la N-glicosilación del dominio C-T de la Cz.(Barbosa *y col.*, 2005; Esquema tomado de Tesis Acosta DM, 2012)

1.IV.3 Actividad enzimática

Las diferentes CPs han sido agrupadas en 6 familias diferentes de acuerdo a la tríada catalítica. La familia de la papaína, la de las calpaínas, la de las clostripaínas, la de CP de streptococcus, la de CP virales y las caspasas (conocidas también como apopaínas). En el caso de las proteinasas pertenecientes a la familia de la papaína como la Cz, esta tríada está constituida por los residuos de Cys, His y Asn localizados en el dominio catalítico de la enzima (Fig. 8) (Rawlings y Barrett, 1993 y 1994)

La Cz es una endoproteinasa con una amplia especificidad de sustratos, capaz de hidrolizar tanto proteínas nativas como desnaturalizadas, a pH óptimos entre 3 y 5 (Bontempi *y col.*, 1989; Cazzulo *y col.*, 1990a). Es capaz de digerir péptidos sintéticos, cromo y fluorogénicos, a pHs neutros y/o alcalinos entre 7 y 9. Proteoliza polipéptidos que contengan la secuencia VVGPG o VVGAPA, las cuales están presentes en la unión de su dominio PRO y el dominio catalítico, y entre éste y el dominio C-T, respectivamente (Campetella *y col.*, 1992). Esto explica porque la enzima madura es capaz de autoproteolizarse para dar una mezcla compleja de péptidos pequeños y el fragmento característico de peso molecular aparente de 25 kDa, correspondiente al C-T (Hellman *y col.*, 1991). Utilizando péptidos cromogénicos pequeños se estudió la naturaleza y la posición de los residuos con respecto al sitio de corte, determinando que si bien es capaz de aceptar un amplio rango de aminoácidos en la posición P1, muestra una clara preferencia por residuos arginina y lisina (Arg y Lys). En la posición P2, requiere la presencia de aminoácidos hidrofóbicos o cargados positivamente; los aminoácidos arginina, leucina, fenilalanina o valina fueron los más efectivos, y su especificidad aumenta si se encuentra prolina en esta posición (Cazzulo *y col.*, 1990a; Del Nery *y col.*, 1997). En la posición P3 muestra una menor especificidad, con ligera preferencia por residuos cargados positivamente (Serveau *y col.*, 1996; Del Nery *y col.*, 1997). Contrariamente a lo observado en la posición P2, en la posición P4 fueron aceptados numerosos aminoácidos con excepción de los residuos hidrofóbicos más voluminosos (Harris *y col.*, 2000). La Cz mostró los valores máximos de v/K_m con los sustratos sintéticos Z-VVR-*p*NA, Z-RR-OMe- β -NAm, β z-Pro-Phe-Arg-*p*NA, y Z-FR-OMe- β -NAm (Cazzulo *y col.*, 1990a). La especificidad de la enzimas recombinantes cruzaña (Dos Reis *y col.*, 2006) también ha sido estudiada; los resultados experimentales mostraron una preferencia diferencial de sustratos entre ambas moléculas, nativa y recombinante, también entre diferentes grupos de isoformas llamados Cz1 y Cz 2 (Del Nery *y col.*, 1997; Lima *y col.*, 2001). En nuestro grupo se identificó un grupo minoritario de isoformas de Cz que no se adsorben a ConA y llamamos NACrI)

que podrían ser equivalentes a las formas llamadas Cz 2 por compartir el uso de los mismos sustratos (Duschak *y col.*, 2003).

1.IV.4 Distribución

Tanto los ensayos bioquímicos (Bontempi *y col.*, 1989) como los de inmunomicroscopía electrónica mediante anticuerpos policlonales contra Cz, señalan la presencia de esta CP principalmente dentro de compartimientos lisosomales en los estadios epimastigote, amastigote y trypomastigote (Souto Padron *y col.*, 1990). El mismo ensayo de inmunomicroscopía electrónica, reveló la presencia de material crosreactivo con Cz tanto en toda la superficie de amastigotes y epimastigotes, y puntualmente en el bolsillo flagelar de los trypomastigotes. El hecho de que los procesos de exocitosis y endocitosis en este estadio ocurren solo a través del bolsillo flagelar, sugiere que la Cz podría ser liberada al entorno a través de este compartimiento (Souto Padron *y col.*, 1990). Asimismo, CPs tipo Cz se han encontrado en sobrenadante de trypomastigotes metacíclicos en forma libre y activa (Yokoyama Yasunaka *y col.*, 1994), en los cuales también se describió otra CP denominada TcCPmet (Duschak *y col.*, 2006). Si bien en la forma amastigote se encontró marca en la superficie del parásito, ensayos posteriores utilizando anticuerpos monoclonales específicos para el dominio C-T de la Cz no presentó reacción contra este material (Thomas *y col.*, 1996) lo que sugiere una expresión diferencial de isoformas entre lisosoma y membrana plasmática en este estadio de *T. cruzi*. La forma epimastigote, en la cual se visualizó una inmunoreactividad intensa en toda la membrana que rodea al parásito y al flagelo, así como dentro del bolsillo flagelar, en vesículas intracelulares localizadas cerca del bolsillo flagelar y entre el núcleo y el kinetoplasto (Souto-Padrón *y col.*, 1990), contiene mayor cantidad de Cz que las otras formas de desarrollo (Franke de Cazzulo *y col.*, 1994). Ensayos preliminares utilizando digitonina sugieren que la Cz no solo se localiza en compartimientos lisosomales en el estadio epimastigote si no que entre un 20 y un 40% se estaría localizando en otros compartimientos (Cazzulo *y col.*, 1995).

1.IV.5. La Cz como antígeno

Las características bioquímicas intrínsecas de la Cz o alternativamente, los factores regulatorios liberados como parte de la respuesta inmune tanto como el “background genético” de la cepa de ratón utilizada en inmunización puede influenciar en el patrón isotópico de los Ac específicos dirigidos contra la Cz. Teniendo en cuenta que la producción de IL-4 e IL-5 están asociadas a IgG1 (Fiorentino *y col.*, 1989), la distribución isotópica descrita a favor de IgG1 (Giordanengo *y col.*, 2000; Acosta *y col.*, 2008) está de acuerdo con la noción que la Cz pueda dirigir la respuesta inmune hacia un perfil Th2 (Schnapp *y col.*, 2002). Teniendo en cuenta que la susceptibilidad a la infección a *T. cruzi* y que las cepas murinas susceptibles han sido relacionadas con un perfil Th2 (Schnapp *y col.*, 2002) y que las cepas susceptibles despliegan una aumentada producción de IL-4 (Hoft *y col.*, 1993), la Cz podría jugar un rol para la supervivencia del parásito en el hospedador durante la infección por *T. cruzi* (Jankovic *y col.*, 2001).

La Cz utilizada como inmunógeno en modelos murinos es capaz de direccionar la respuesta inmune hacia un perfil de tipo Th2 cuando se inocula en presencia de adyuvante de Freund completo, además de la inducción de la vía de Arginasa en macrófagos lo cual favorecería la infección de estas células por parte del parásito (Stempin *y col.*, 1994). Otros ensayos con Cz inoculada con adyuvante de Freund o con Al(OH)₃ mostraron una mezcla entre los perfiles de Th1-Th2 o Th2 pero incapaz de regular o controlar una infección con *T. cruzi* en ratones además de lesiones en músculo cardíaco y esquelético (Cazorla *y col.*, 2009; Frank *y col.*, 2008). Esta situación cambió al utilizar Cz administrada con ODN (CpG-oligodeoxynucleotido) como adyuvante, dado que esta combinación resultó capaz de rescatar de la muerte a los ratones en el 100 % de los casos, inclinando la respuesta inmunológica hacia un perfil Th1 y en ausencia de daño muscular, indicando que la respuesta inmune dirigida hacia la Cz puede ser redireccionada según el adyuvante utilizado (Frank *y col.*, 2008; Cazorla *y col.*, 2009).

Por otro lado, se sabe que los sueros específicos contra Cz presentan una marcada tendencia a desarrollar una reactividad cruzada contra la cadena pesada de la miosina. Un análisis mediante alineamiento de secuencias proteicas de Cz junto con miosina de ratón reveló que ambas proteínas comparten al menos 3 secuencias lineales cortas (Giordanengo *y col.*, 2000). En trabajos publicados previamente por este grupo se demostró que la Cz como glicoproteína, se encuentra tanto *O* como *N*-glicosilada (Barboza *y col.*, 2003, 2005). La *N*-glicosilación, presenta una alta variabilidad en cuanto a su estructura y composición producto de la modificaciones generadas a partir del “*core*” típico de los Trypanosomátidos (Barboza *y col.*, 2005), mientras que en la *O*-glicosilación se determinó la presencia del azúcar GlcNAc dentro del dominio C-T de la molécula (Barboza *y col.*, 2003). Esta modificación no es común en las glicoproteínas de este parásito. Paralelamente se describió que la miosina al igual que otras proteínas cardíacas se encuentran *O*-glicosiladas con el mismo residuo (Cieniewski-Bernard *y col.*, 2004; Hu *y col.*, 2009). Nuestro grupo de trabajo demostró también la participación de estos epitopes en la inmunogenicidad de la Cz. Además, ensayos de inmunomicroscopía electrónica con partículas de oro y de inhibición por ELISA, indicaron que esta *O*-glicosilación presente en ambas proteínas constituye un epitope común entre ambas y la reacción cruzada resultante se encuentra localizada principalmente en el dominio C-T de la Cz (Acosta *y col.*, 2011).

Con respecto a las modificaciones pos-traduccionales que involucran hidratos de carbono en la Cz, dos han sido descritas por nuestro grupo: un oligosacárido *N*-glicosídico complejo que contiene ácido siálico y un único residuo unido de NAcGln en *O*-glicosilación, ambos presentes en el dominio C-T de la proteína (Barboza *y col.*, 2003). Por otro lado, utilizando espectrometría de masa (UV-MALDI-TOF) en conjunto con digestiones enzimáticas y cromatografía de intercambio aniónico de pH alto (HPAEC-Dionex) se llevó a cabo un análisis estructural completo de los oligosacáridos unidos a Asn (Asparagina) en la Cz. Como resultado de este análisis nuestro grupo reportó la presencia de

oligosacáridos de alta manosa sulfatados ubicados en la *N*-glicosilación de la Arn 255 dentro del dominio C-T de la Cz. Particularmente, la sulfatación ocurre en una de las dos N-acetil hexosaminas presentes en el oligosacárido de alta manosa (Fig. 8).

Para evaluar la respuesta inmune del hospedador hacia este epítipo sulfatado del C-T, se llevaron a cabo ensayos de inmunización en ratones BALB/c tanto con Cz y con C-T sometidos (Czd, C-Td) o no a tratamientos de desulfatación tanto química como enzimática. A partir de este experimento, se logró determinar la existencia de una respuesta inmune humoral dirigida contra los epítopos sulfatados de esta proteína compuesta principalmente por anticuerpos de tipo IgG2b en este modelo. La ausencia de este subconjunto de anticuerpos cuando se utilizó como antígeno la Cz desulfatada, confirmó la que la respuesta IgG2b contra la Cz, estaba dirigida únicamente hacia los epítopos sulfatados. Paralelamente, cuando se utilizaron los antígenos C-T y Cz (no sometidos a tratamiento de desulfatación) como inmunógeno se observó un aumento de la hipersensibilidad retardada y una marcada desorganización del tejido cardíaco. Las alteraciones estructurales encontradas en el tejido cardíaco de ratones inmunizados con C-T en ausencia de infección no se observaron en los ratones inmunizados con las proteínas desulfatadas. Este resultado sugiere que los sulfatos presentes en el dominio C-T de la Cz estarían implicados directamente en el daño tisular reportado (Acosta *y col.*, 2008). Posteriormente se determinó que tanto los sueros de ratón obtenidos a partir de inmunizaciones con Cz o su dominio C-T como los sueros de pacientes con enfermedad de Chagas reconocen con mayor afinidad a la estructura de la N-acetil d-glucosamina-6-sulfato entre otros azúcares sulfatados sugiriendo que este epítipo presente en la Cz natural, es el responsable de la respuesta humoral dirigida hacia los sulfatos de la Cz (Couto *y col.*, 2012).

La antigenicidad de los epítopos sulfatados de la Cz también fue evidenciada en pacientes con enfermedad de Chagas en los cuales se observó que los individuos con disfunción cardíaca crónica severa (grupo G3), tenían niveles

significativamente menores de anticuerpos IgG2 específicos contra los sulfatos de la Cz en comparación con los pacientes en estadios de infección con menor severidad (grupos G0 y G1), lo cual implica que este subconjunto de anticuerpos podría ser eventualmente utilizado como marcador de progresión de la enfermedad (Acosta *y col.*, 2012). Sorprendentemente, en el mismo trabajo, se observó que la Cz presenta una reactividad cruzada con sulfoglicoesfingolípidos lípidos del parásito denominados comúnmente sulfátidos, localizada en el C-T de la Cz y es atribuida a la presencia de los epitopes sulfatados en ambas biomoléculas. Los sulfátidos no son solo reconocidos por sueros policlonales específicos contra la Cz o su C-T, sino que además son también reconocidos por los sueros de pacientes con enfermedad de Chagas (Acosta *y col.*, 2012).

En resumen, la Cz ha sido relacionada con el metabolismo de *T. cruzi* (Klemba *y col.*, 2002), representa un factor de virulencia del parásito (Scharfstein *y col.*, 2000; Doyle *y col.*, 2011), ha sido identificada como candidato importante para el desarrollo de vacunas (Schnapp *y col.*, 2002; Cazorla *y col.*, 2009) y considerada como blanco promisorio para la quimioterapia de la Enfermedad de Chagas (Engel *y col.*, 1998, Cazzulo, 2002; Duschak y Couto 2009; Duschak, 2011). Esta relevante molécula del *T. cruzi* ha sido extensamente estudiada como proteasa y como antígeno y en particular, nuestro grupo, la ha estudiado especialmente como glicoproteína (Duschak y Couto, 2009).

Capítulo V: Sulfátidos en *T. cruzi*

1.V. Descripción

Los esfingolípidos surgen de la unión entre la esfingosina y un ácido graso. Entre ellos, se encuentran las ceramidas, componentes fundamentales de las bicapas lipídicas celulares. A partir de los esfingolípidos tienen lugar diversas moléculas de importancia biológica que difieren fundamentalmente en el grupo que se une a estos lípidos a través del hidroxilo del carbono primario de la esfingosina. Entre los grupos de unión a esfingolípidos podemos mencionar a los mono o polisacáridos, que dan lugar a la síntesis de los glicosfingolípidos (GSLs) como los cerebrósidos o los gangliósidos. Según el tipo de azúcar que se una al esfingolípidos, este puede adquirir carga o no. En base a esta carga se pueden clasificar en ácidos (GSLAs), de carga negativa a pH fisiológico entre los cuales se encuentran por ejemplo los gangliósidos que contienen residuos de ácido neuramínico (ácido siálico), o neutros (GSLNs), carentes de carga a pH fisiológico con dos o más residuos de azúcar (Fig. 10).

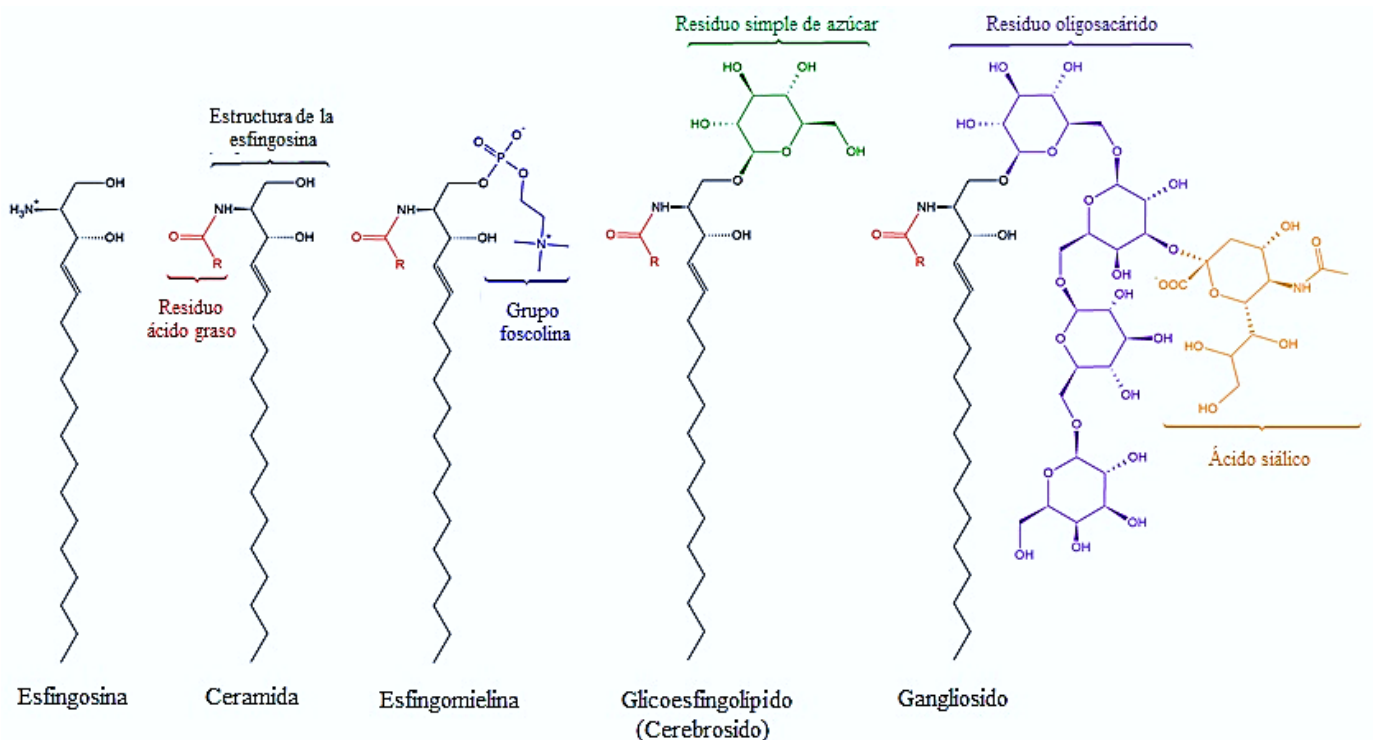


Figura 10. Esquema de los glicosfingolípidos a partir de modificaciones en la molécula de esfingomielina.

Entre los hidratos de carbono encontrados con mayor frecuencia en estos compuestos podemos mencionar: glucosa, galactosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, fucosa, ácido siálico y ácido glucurónico (Morales-Serna *y col.*, 2007).

La presencia de GSLs en *T. cruzi* fue descrita por primera vez en 1985. En el parásito, estas moléculas están compuestas principalmente por manosa y glucosa y las cadenas de ácidos grasos son de 16, 18 y 24 carbonos (Barreto-Bergter *y col.*, 1985). Luego de la purificación, el análisis de dos fracciones de GSLs neutros de *T. cruzi* denominadas hexosilceramidas (solo un residuo de azúcar unido a la ceramida) y dihexasilceramidas (dos residuos de azúcar unidos a la ceramida), mostró que la primera de ellas estaba compuesta por ácidos grasos principalmente saturados y el azúcar unido era frecuentemente glucosa y en menor medida galactosa. El análisis de la segunda fracción (dihexasilceramidas) mostró que estaban compuestas por ácidos grasos de C16:0, C18:0, C24:0, C24:4 y la base nitrogenada de esfingosina unidas a un dímero de galactosa y glucosa por lo que en consecuencia se las denominó: lactosilceramidas (Barreto-Bergter *y col.*, 1992).

Los sulfátidos o sulfoglicoesfingolípidos, son un grupo de glicoesfingolípidos que presentan una modificación acídica en alguno de los azúcares que los componen. Esta, es la adición de un grupo sulfato en unión monoéster a alguno de los hidroxilos libres del hidrato de carbono. Los sulfoglicoesfingolípidos o sulfátidos son estructuras que se encuentran en altas concentraciones en el cerebro, en la mielina de los nervios periféricos, también están presentes en los riñones, el bazo, los granulocitos, los eritrocitos, las plaquetas, el estómago y el intestino. Hace varias décadas, se obtuvo la primera evidencia de compuestos sulfatados en *T. cruzi*. La misma fue obtenida mediante una reacción química que mide la cantidad de azufre presente en muestras de glicoesfingolípidos de epimastigotes parcialmente purificadas (De Lederkremer *y col.*, 1985). Posteriormente, el análisis de una fracción de lípidos ácidos purificados del parásito permitió detectar, entre otros compuestos, galactocerebrósido sulfato

(Petry *y col.*, 1988). La presencia de estructuras sulfatadas en trypomastigotes fue descriptas en *T. cruzi* como parte de los glicolípidos (Uhrig *y col.*, 1992). Estos lípidos sulfatados representan epitopes comunes entre la superficie del parásito y tejido cerebral murino (Petry *y col.*, 1988).

Recientemente, nuestro grupo llevó a cabo la caracterización completa de la estructura de un sulfátido de *T. cruzi* por primera vez utilizando espectrometría de masa UV-MALDI-TOF. Los resultados obtenidos reportan la presencia de dihexosil ceramidas sulfatadas, compuestas principalmente por esfingosina en epimastigotes de *T. cruzi* (Fig. 11) (Acosta *y col.*, 2012).

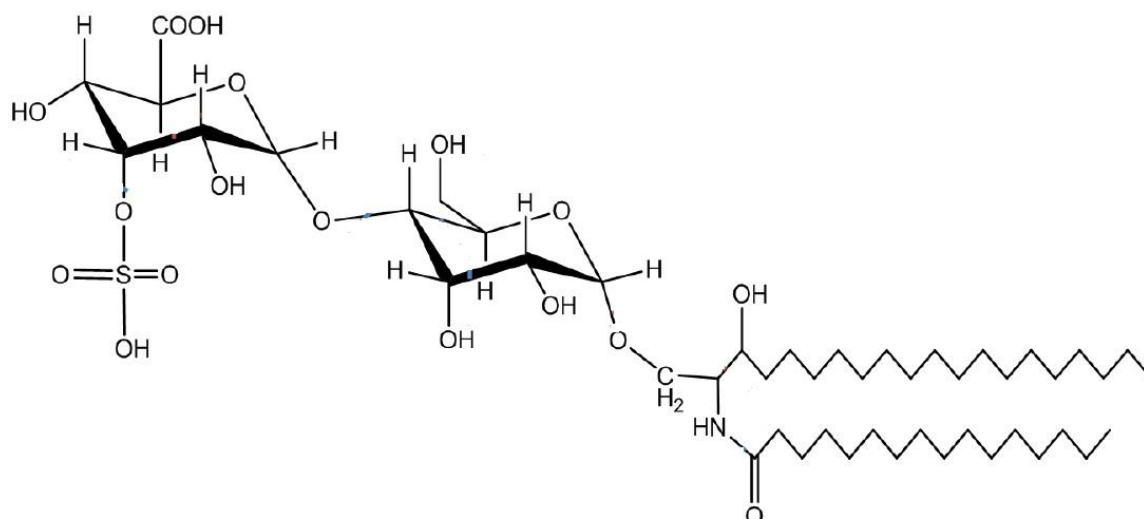


Figura 11. Esquema correspondiente a la caracterización del sulfoglicoesfingolípido por EM-UV-MALDI-TOF.

Estructura correspondiente a un glicoesfingolípido compuesto por dos hexosas probablemente galactosa y glucosa (lactosilceramida), con una esfingosina de 20 carbónos y un ácido graso de 16 (Adaptado de Acosta *y col.*, 2012).

Además de la reacción cruzada de los epitopes sulfatados de la Cz con los sulfátidos y la asociación inversa entre los niveles de anticuerpos IgG2 dirigidos contra estos epitopes y el grado de severidad del paciente con Enfermedad de Chagas crónica (Acosta *y col.*, 2012), estos compuestos han sido implicados en la generación de inmuno-patologías en el hospedador. En individuos sanos existen

títulos bajos de anticuerpos anti-sulfátidos circulantes. Se observó que estos títulos aumentaron considerablemente en todos los pacientes con enfermedad de Chagas crónicos y con cardiomiopatía dilatada analizados. Cabe destacar que sólo se observaron niveles aumentados en el caso de infecciones por *T. cruzi* y no producidas por otros Trypanosomátidos estudiados (Avila *y col.*, 1993). Dado que varias enfermedades que afectan a los nervios periféricos tienen aumentado el nivel de estos anticuerpos, se postula que la presencia de los mismos es una de las posibles causas responsables de los daños neuronales observados en los pacientes con enfermedad de Chagas. La destrucción de la mielina por la inoculación de estos anticuerpos se ha descrito en células nerviosas. La inoculación de sulfátidos purificados en conejos ha producido disfunciones a nivel nervioso con el desarrollo de niveles altos de anticuerpos específicos por sulfátidos (Avila *y col.*, 1993).

Estos hallazgos sugieren que la presencia de estructuras sulfatadas en el parásito estaría provocando graves daños en el tejido nervioso del paciente por reacciones cruzadas con algunos antígenos propios del mismo. Se han documentado respuestas similares en modelos animales (Feldman *y col.*, 1999).

Capítulo VI: Espectrometría de Masa

1.VI.Generalidades

Se denomina Espectrometría de Masa a un conjunto de técnicas utilizadas para caracterizar una muestra o analito mediante la determinación de masas. El proceso consta de tres pasos fundamentales. El primero es la ionización del analito sometiéndolo a un fuerte campo eléctrico y/o magnético. Una vez que la muestra adquiere carga se separa en un analizador según la relación masa/carga (m/z) que este obtenga. Finalmente la muestra llega al detector según esta relación generando información acerca de su peso molecular y la pureza de la misma. Es posible además obtener información relevante como los grupos funcionales o bloques estructurales presentes en el analito, así como la secuencia que los mismos tienen en la molécula a través de estudios de fragmentación (Mc Lafferty y Turecek, 1993). La fragmentación del ion molecular da lugar a la generación de fragmentos hijos que serán detectados según su propio valor de m/z . El conjunto de fragmentos hijos generados es característico de cada analito y depende de su estructura química.

1.VI.1 Ionización

Lograr una ionización de muestras lo suficientemente potente y que a su vez garantice la integridad de la muestra representó un gran desafío para la técnica. En principio, las moléculas de alto peso molecular, termosensibles o de difícil volatilización, fueron las principales limitaciones. El avance de las técnicas de ionización generado por el desarrollo de las tecnologías de desorción-ionización laser asistida por una matriz (MALDI) (Karas y Hillenkamp, 1988) y la ionización por electrospray (ESI) (Fig. 12) (Fenn *y col.*, 1989) fueron las tecnologías que rompieron las barreras permitiendo analizar todo tipo de tamaño de muestras entre las cuales se incluyen proteínas de hasta 100 kDa, hidratos de carbono, lípidos, ácidos nucleicos y hasta polímeros sintéticos. Particularmente en la espectrometría de masa MALDI, método que compete a este trabajo, el analito en estado sólido se deposita junto con una matriz fotosensible sobre un electrodo. La naturaleza de la matriz depende del tipo de muestra a analizar. Luego, la

mezcla compuesta por la muestra y la matriz se irradia con un láser ultravioleta. La matriz absorbe la energía recibida y provoca tanto su desorción como la desorción e ionización del analito incluido entre las moléculas de matriz (Karas y Hillenkamp, 1988). Se sabe que la ionización de las moléculas tiene lugar o bien por un intercambio de protones (protonación/desprotonación), o por interacción con unidades que poseen carga neta durante la volatilización como sucede con los iones metálicos (Na^+ , K^+) (Siuzdack, 1996).

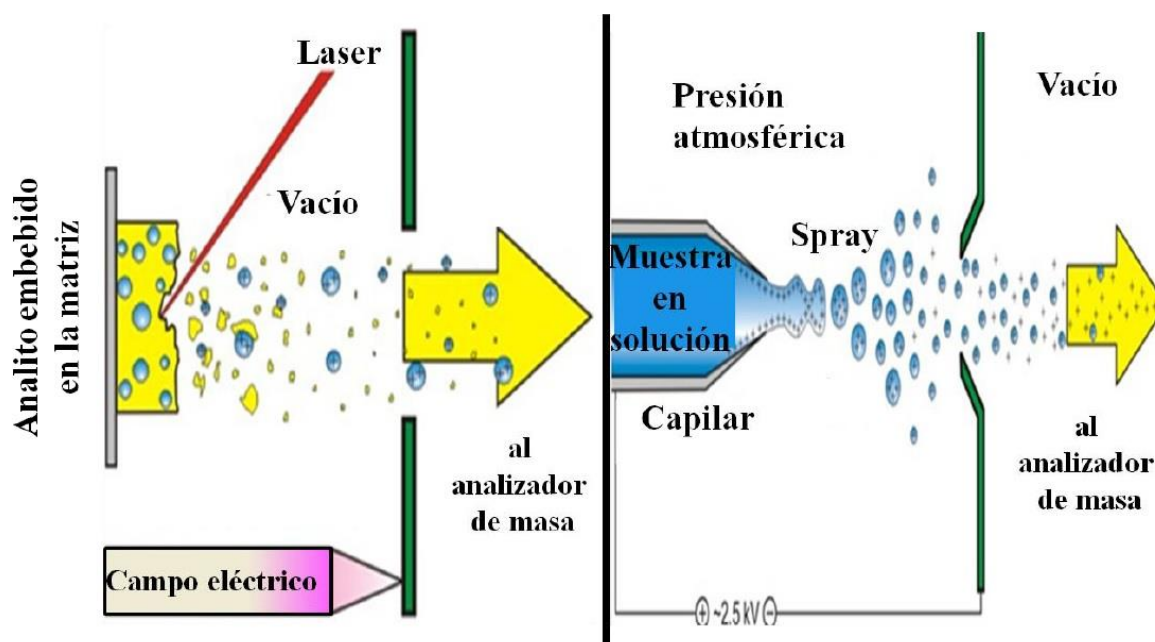


Figura 12. Métodos de ionización de muestra en espectrometría de masa.

En la espectrometría de masa MALDI (esquema izquierdo), el analito se encuentra rodeado por moléculas de matriz formando un cristal, el cual será impactado por el pulso láser. En la espectrometría de masa ESI (esquema derecho), el analito se encuentra formando parte de una solución, la cual pasa por un capilar sometido a la aplicación de una diferencia de voltaje (Adaptado de Erra-Balsells, 2004).

1.VI.2 Analizadores

Debido al avance de las técnicas para la ionización de los analitos, los analizadores debieron perfeccionarse con el fin de satisfacer las necesidades que generaban el incremento del rango de masas y tipos de muestra, logrando mayor exactitud y sensibilidad. Uno de los analizadores acoplados a la desorción por láser con mayor frecuencia es el analizador de Tiempo de Vuelo (TOF). Este tipo de analizadores posee grandes ventajas entre las cuales se destacan su bajo costo,

un rango de masas teóricamente ilimitado, alta velocidad de análisis y fácil intercambio entre el modo de análisis de iones (+) o (-). A pesar de que la resolución de estos equipos, en comparación con la de los analizadores de mayor costo, no es la mayor, resulta ser lo suficientemente aceptable en la mayoría de sus aplicaciones. Sin duda, la mayor desventaja es la poca capacidad para adaptarlo a un ionizador por Electrospray.

Luego de la ionización por MALDI, las moléculas que fueron bombardeadas por los fotones del láser y luego desprendidas de la matriz pasando a la fase gaseosa, son aceleradas por un campo eléctrico. Se asume que el campo eléctrico que se produce a la entrada del analizador deja a todas las moléculas cargadas con la misma energía cinética. Las partículas aceleradas entran en el analizador, tubo de longitud variable según el modelo, en el cual no actúa ningún tipo de campo. El hecho de que todos los iones (ya sea partículas de matriz o analito) que entren tengan la misma energía, indica que sus velocidades dentro del tubo variarán de forma inversa a sus respectivas masas. Por lo tanto, la separación se producirá de acuerdo a la masa de cada compuesto, llegando primero los iones más livianos al detector. Esto implica que el analizador de tiempo de vuelo TOF (*“time of flight”*), determina el tiempo que tardan los iones acelerados en llegar al detector. Los tiempos que tarden las moléculas dependerán entonces de la masa del analito (Gomis Yagües, 2008). En la práctica, este tipo de analizadores no lograba una alta resolución. Por lo tanto, surgió la incorporación de un reflector de iones para aumentar el recorrido de las partículas. Este re-enfoque compensa las diferencias de tiempo de vuelo de los iones con el mismo m/z y energías cinéticas levemente distintas aumentando la resolución del equipo. A este desarrollo se lo denominó “Reflectrón”.

Posteriormente, la implementación de espectrometría de masa en tándem fue lo que permitió analizar los fragmentos del analito generados a partir del ion molecular original o “Padre”, que se descompone en iones hijos o incluso nietos. Básicamente, este desarrollo consiste en ubicar dos o más analizadores en serie extendiendo el rango de separación de los iones. El uso de dos analizadores TOF

en serie es comúnmente acoplado a la espectrometría de masa por MALDI, sin embargo, también se utilizan con frecuencia la combinación de otros analizadores como ser: cuadrupolo y TOF, o cuadrupolo y trampa iónica (Morris *y col.*, 1996; Medzihradszky *y col.*, 2000).

1.VI.3. Espectrometría de masa MALDI (TOF-TOF) en lípidos y azúcares.

La fragmentación de los carbohidratos puede ser estudiada mediante métodos de ionización tales como FAB (de sus siglas en inglés Fast Atom Bombardment), electrospray y MALDI. Siempre en espectrometría de masa, la combinación tipo muestra y tipo de matriz determina el éxito de la técnica y los lípidos no son una excepción. La ionización de lípidos produce tanto iones positivos como negativos. En uno de los primeros trabajos publicados sobre el análisis de gangliósidos realizado por EM-UV-MALDI, se observó que los iones negativos se fragmentaban menos que sus contrapartes positivos (Juhász y Costello, 1992; Harvey, 1999). Por otro lado, la capacidad de utilizar el láser a diferentes potencias produce una variabilidad de fragmentación considerable en estas estructuras facilitando así su caracterización.

El análisis de los glicolípidos mediante espectrometría de masa no resulta una tarea sencilla dada la complejidad de los hidratos de carbono que contienen. Este tipo de moléculas puede fragmentarse tanto en las uniones glicosídicas como dentro de los anillos correspondientes a los monosacáridos. En general, los carbohidratos neutros no producen iones negativos con matrices comunes como las compuestas por ácido 2,4-dihidroxibenzoico (DHB). Sin embargo, se pueden obtener aductos mediante el agregado de cloruro de amonio a matrices tales como *nor*-harmano (Suzuki *y col.*, 2006; Harvey, 2011). La presencia de azúcares sulfatados es particularmente difícil de demostrar por EM-UV-MALDI, debido a la labilidad del grupo sulfato. Sin embargo, teniendo en cuenta que las β -carbolinas son compuestos que favorecen la formación de iones negativos (Nonami *y col.*, 1997; Erra-Balsells y Nonami 2002), nuestro grupo de trabajo, mediante el uso de la β -carbolina *nor*-harmano como matriz, logró la

identificación de los oligosacáridos sulfatados presentes en los *N*-glicanos de la molécula de Cz (Barboza *y col*, 2005). Por otro lado, la descripción completa de los sulfoglicoesfingolípidos de *T. cruzi* fue determinada también por nuestro grupo utilizando una matriz compuesta por ácido 2,4- dihidroxibenzoico (DHB).

Capítulo VII: Sulfatación

1.VII. Descripción

En biología, se denomina sulfatación a la adición mediante un enlace covalente de un grupo sulfato (SO_4^{2-}) inorgánico a una molécula orgánica. Esta reacción tiene una infinidad de implicancias biológicas y está presente en los seres vivos desde las bacterias hasta los seres humanos. Entre los diversos roles de la sulfatación podemos mencionar algunos como: la detoxificación, función que en el ser humano se encuentra principalmente localizada en el hígado y se traduce como un aumento de la solubilidad de la molécula sulfatada, lo cual facilita su eliminación a través de la orina; la proliferación celular mediante la oligomerización de factores de crecimiento; la modulación de la angiogénesis en tumores; la localización proteica y el reclutamiento o “*homing*” linfocitario.

Los grupos funcionales comúnmente sulfatados son los hidroxilos (R-OH) presentes en alcoholes, fenoles o hidroxil amins, oxidándose mediante el agregado de un grupo sulfúrico (SO_3^-). Entre los compuestos más susceptibles a esta transformación, se encuentran aminoácidos como la tirosina, formando parte de receptores asociados a proteína G, así como los lípidos presentes en hormonas, o los esteroides. Los oligosacáridos son frecuentemente sulfatados y han sido implicados en varios procesos de reconocimiento molecular específicos, (Honke y Taniguchi, 2002), jugando una variedad de roles durante el desarrollo, diferenciación y homeostasis. Entre ellos, los glicosaminoglicanos (GAG), como el heparán-sulfato o glicanos relacionados, son la familia de azúcares sulfatados más importante y variada y están involucrados en la unión de los factores de crecimiento a sus receptores y en la adhesión de algunos virus a la superficie celular (Fukuda *y col.*, 2001). Estos GAGs se encuentran formando parte de proteoglicanos uniéndose a través de un trisacárido específico al grupo hidroxilo de los aminoácidos Serinas o Treoninas (O-Glicosilación) en la cadena proteica. La presencia de sulfatos en oligosacáridos unidos a asparagina (N-Glicosilación) ubicados en residuos como galactosa, manosa, N-Acetil galactosamina, N-Acetil glucosamina o ácido glucurónico ha sido reportada en diversos organismos e incluso en virus (Bernstein *y col.*, 1992, Van Rooijen *y col.*, 1998, Green *y col.*,

1985, Noguchi *y col.*, 1992). Las Sulfotransferasas (STs) son las enzimas que llevan a cabo esta reacción (Klaasen and Boles, 1997) utilizando para ello un co-factor dador del grupo sulfato denominado 3'- fosfoadenosina-5' fosfosulfato (PAPS). La sulfatación en organismos superiores requiere estrictamente la presencia de este dador. Esta necesidad se debe a que: 1) La sulfatación no ocurre en ausencia de PAPS o en condiciones que limiten su síntesis, 2) El sitio de unión a PAPS está presente y es conservado entre las diferentes STs, (Komatsu *y col.*, 1994, Chiba *col.*, 1995) y 3) Los análogos estructurales de PAPS se unen e inhiben a las STs (Rens *y col.*, 1987).

Los sitios de unión a PAPS se encuentran uno en la región amino-terminal y otro en la zona central de la enzima, y corresponden a las zonas de interacción con el extremo 5' y 3' del PAPS, respectivamente, denominados 5'PBS y 3'PB (Kakuta *y col.*, 1998). Si bien los motivos de unión al dador presentan cierto grado de conservación, las STs comparten poca similitud con respecto a su secuencia aminoacídica.

1.VII.1.Biosíntesis de PAPS

La síntesis de PAPS sucede en dos pasos de reacciones acopladas. El primero de ellos combina ATP y sulfato inorgánico para formar Adenosin-5'-Fosfosulfato (APS) y pirofosfato (PPi). Esta reacción es catalizada por la ATP-sulfurilasa en presencia de Mg^{2+} . En el paso subsecuente sucede la combinación del recién formado APS con una molécula adicional de ATP para dar lugar a la formación de PAPS y ADP. Esta reacción es catalizada por la enzima APS-kinasa también en presencia de Mg^{2+} (Fig. 13). En lo que concierne al reino "Metazoa" ambas actividades están comprendidas en una misma enzima o complejo denominado PAPS sintasa (Van den Boom *y col.*, 2012). La ATP sulfurilasa contiene dos sitios conservados para la unión de ATP y Mg^{2+} y poco se sabe de su regulación en organismos superiores. Solo el ATP es útil como sustrato para esta enzima. Concentraciones altas de GTP, UTP y CTP así como de Mg^{2+} inhiben su actividad (Brion *y col.*, 1987; Klaassen y Boles, 1997).

1.VII.2 Regulación e inhibición

Si bien la regulación de la tasa de sulfatación está estrictamente supeditada a la concentración de sulfato inorgánico, la concentración de PAPS y la regulación de la expresión dependen tanto de STs como de sulfatasas; la utilización de inhibidores específicos de las enzimas responsables de la síntesis de este co-factor para inhibir el proceso de sulfatación es muy habitual. Los inhibidores utilizados con más frecuencia afectan a la formación de APS, función de la ATP-sulfurilasa implicada en el primer paso de síntesis, compitiendo con los iones sulfato por la enzima. Existen dos tipos de competidores clasificados según su carga. Los oxianiones divalentes y los monovalentes. Los divalentes no solo compiten por la enzima bloqueando el ingreso del sulfato sino que además dan lugar a la formación de complejos de adenosínfosfato (APX) inestables, que se hidrolizan espontáneamente al salir de la enzima formando AMP. Entre los oxianiones divalentes se encuentran: $(\text{MoO}_4)^{2-}$, $(\text{SeO}_4)^{2-}$, $(\text{WO}_4)^{2-}$, $(\text{CrO}_4)^{2-}$ y $(\text{AsHO}_4)^{2-}$. Los oxianiones monovalentes también compiten con el sulfato por la ATP-sulfurilasa pero difieren respecto de los divalentes en el hecho de que no dan lugar a la formación de complejos APX. Entre los monovalentes se encuentran los iones perclorato (ClO_4^-), nitrato (NO_3^-), clorato (ClO_3^-) y fluorosulfonato (FSO_3^-) (Klaassen y Boles, 1997).

Entre este diverso grupo de inhibidores de la ATP-sulfurilasa, sin duda el clorato es el más utilizado en el área de investigación para determinar la presencia o rol de la sulfatación en diversos modelos de estudio *in-vtro*. Uno de los motivos principales es que no se ha descrito efecto colateral alguno entre los ensayos ni en la síntesis proteica ni en la viabilidad de las células tratadas (Baeuerle y Huttner, 1986; Sasaki *y col.*, 2010; Tan *y col.*, 2013) (Fig.13).

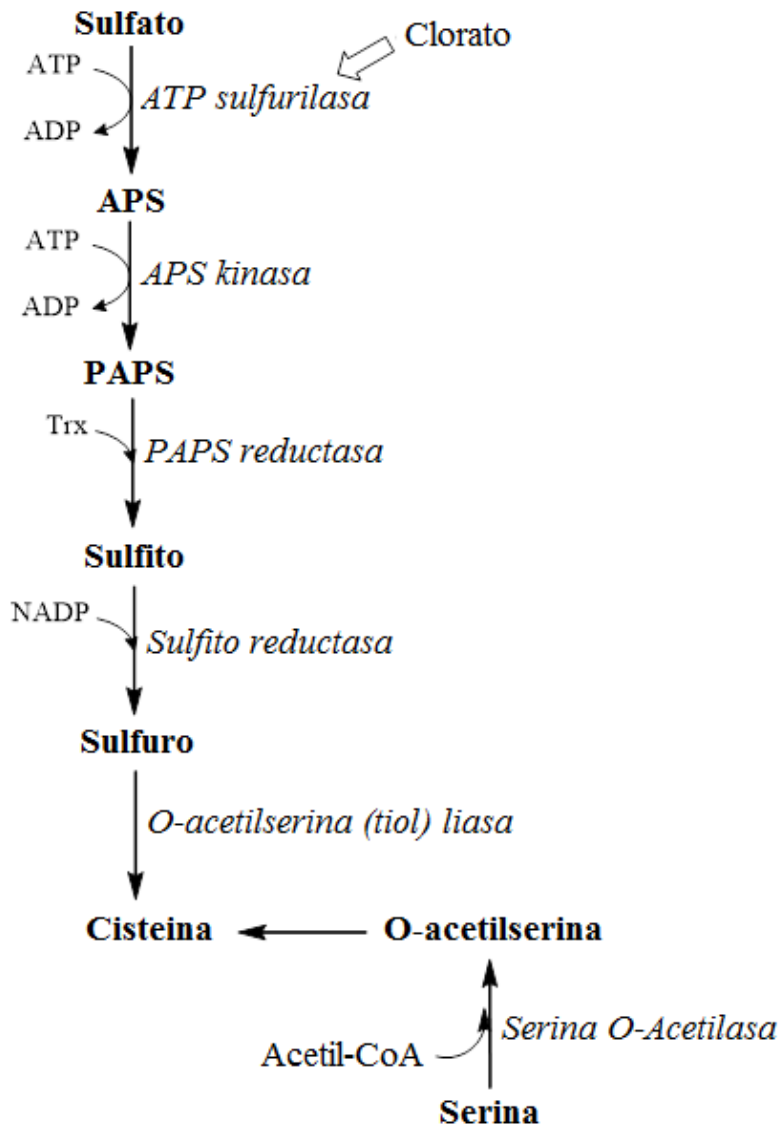


Figura 13. Ruta metabólica del PAPS.

El PAPS es el dador de grupos sulfatos necesario para llevar a cabo el proceso de sulfatación por parte de las STs. Se destaca el sitio de la ruta metabólica donde interviene el clorato como inhibidor.

1.VII.3 Sulfatación en protistas

En *T. cruzi*, se han descrito estructuras sulfatadas como parte de glicolípidos (Petry *y col.*, 1988) y también nuestro grupo reportó por primera vez la presencia de oligosacáridos de alta manosa sulfatados en el único sitio de N-glicosilación del dominio C-T de la Cz (Barboza *y col.*, 2005). Sin embargo, este no es el único antecedente de sulfatación de oligosacáridos en protistas. Los oligosacáridos de alta manosa sulfatados también fueron descritos como parte

de glicoproteínas de *Dictyostelium discoideum*. Al igual que en *T. cruzi*, estas glicoproteínas están localizadas en lisosoma, aunque en este caso, gran parte de los sulfatos se encuentran unidos a residuos de manosa (Manosa 6-SO₄) (Freeze *y col.*, 1986) en lugar de a residuos de N-acetilhexosamina como es el caso de *T. cruzi*. En el caso de *D. discoideum* fue identificada una ST responsable de la sulfatación de las proteínas lisosomales (Benghezal *y col.*, 2006), sin embargo, a pesar de que *T. cruzi* genera estructuras sulfatadas aún en cultivos axénicos, lo cual hace indispensable la presencia de la actividad ST codificada por el parásito, hasta el momento no se ha descrito tal enzima en este organismo. Cabe destacar que las búsquedas por homología en el genoma de *T. cruzi*, tampoco arrojaron resultados.

1.VII.4 Sulfatación como blanco terapéutico

En la actualidad, la sulfatación y lo que la misma implica en el metabolismo de los organismos ha dado lugar al desarrollo de tratamientos que tienen a esta vía como blanco terapéutico en diversas patologías. Las L-selectinas, proteínas de adhesión expresadas por los linfocitos, tienen un rol fundamental en la extravasación de células del sistema inmune a través del reconocimiento de sialomucinas desplegadas en las vénulas del endotelio alto de los nodos linfáticos. El reconocimiento del oligosacárido 6-sulfo sialil Lewis en las sialomucinas por medio de las L-selectinas es interrumpido utilizando un anticuerpo monoclonal (MECA-79) específico contra los residuos de N-acetilglucosamina 6 sulfato, y se está estudiando su aplicación en el tratamiento de inflamaciones crónicas como el asma y la artritis reumatoidea (Uchimura *y col.*, 2006). Por otro lado, el impacto de la sulfatación en la proliferación celular hizo de esta vía un blanco terapéutico muy estudiado en cáncer, donde técnicas como RNA de interferencia contra STs o la sobre expresión de sulfatasas han dado lugar al desarrollo de nuevas estrategias contra el crecimiento de células tumorales (He y Falany 2007, Peterson *y col.*, 2010).

Capítulo VIII: Siglecs

1. VIII.Generalidades

La superfamilia de las inmunoglobulinas (Igs) está comprendida por un grupo de proteínas muy antiguo que ha evolucionado hacia una gran diversidad y a partir del cual emergen los anticuerpos (inmunoglobulinas). Las proteínas incluidas en este grupo median varias funciones biológicas a través de interacciones específicas. Hasta la década del 90' se creía que las mismas eran exclusivamente de carácter proteico. Las primeras evidencias de lo que más tarde se conocerían como Siglecs (“sialic acid recognizing Ig-super family lectins”), se obtuvieron a partir de investigaciones en sialoadhesinas (“Sn”), expresadas en macrófagos y CD22 (Clúster de diferenciación 22) expresada en células B maduras (“Naive”). Mientras la depleción del ácido siálico de la superficie celular mediante el uso de sialidasas era usado con frecuencia para favorecer las interacciones entre células, por disminuir la repulsión asociada a las cargas negativas, las interacciones celulares mediadas tanto por Sn o CD22 eran inhibidas por el mismo tratamiento. Esto sugería una dependencia de ácido siálico como ligando de ambas proteínas (Crocker y Gordon 1989; Stamenkovic *y col.*, 1991). Posteriormente, el clonado de estas lectinas develó en su estructura la presencia de dominios extracelulares tipo Inmunoglobulina (Ig) los cuales estaban dirigidos exclusivamente al reconocimiento del ácido siálico, dando lugar al surgimiento de un nuevo grupo de proteínas dentro de esta superfamilia (Engel *y col.*, 1993; Crocker *y col.*, 1994). Este nuevo conjunto se denominó “Lectinas de tipo I” y a diferencia de los anticuerpos y los receptores de las células T, reconocen específicamente azúcares (Powell y Varki, 1995). A medida que se fueron encontrando más integrantes de esta familia, los mismos fueron categorizados en dos subgrupos teniendo en cuenta la homología de sus secuencias y su conservación evolutiva. Un subgrupo está caracterizado por un bajo nivel de homología de secuencia y una fuerte presencia de genes ortólogos entre todos los mamíferos; el otro está relacionado con CD33 y a pesar de presentar un alto nivel de homología de secuencia, dio lugar a una variabilidad entre las especies de mamíferos mucho más alta que el primer subgrupo. Hay

cuatro representantes del subgrupo de Siglecs comunes a todos los mamíferos: la sialoadhesina (Siglec-1), CD22 (Siglec 2), la glicoproteína asociada a mielina (MAG o Siglec-4) y la Siglec-15. Todas ellas están presentes en el ser humano. Por otra parte, varias son integrantes del subgrupo de Siglecs relacionadas a CD33, de las cuales 9 están presentes en el ser humano y son denominadas numéricamente mientras en ratón solo hay 5 y son denominadas alfabéticamente (Crocker *y col.*, 2007).

1.VIII.1 Expresión

La expresión de todas las Siglecs, excepto las Siglec-4 y 6, está particularmente restringida a las células del sistema hematopoyético e inmune. Algunas Siglecs como la Sialoadhesina (Siglec-1) y CD22 se encuentran expresadas exclusivamente en ciertos tipos celulares como macrófagos y linfocitos B, respectivamente, siendo la primera un factor de adhesión mientras que la segunda es un receptor regulador inhibitorio. Por lo general, las relacionadas con CD33 presentan un patrón de expresión más complejo, y a excepción de los linfocitos T inactivos, todas las células del sistema inmune tanto humano como murino expresan al menos un tipo de Siglec (Crocker *y col.*, 2007).

Cada Siglec tiene una especificidad única en su reconocimiento por estructuras sializadas, y tanto CD22 como la mayoría de las Siglecs relacionadas con CD33 presentan en su región citosólica uno o varios inmunoreceptores con motivos inhibitorios basados en Tirosina (ITIMs) los cuales estarían involucrados en la supresión de la activación de células fagocíticas y presentadoras de antígeno (APCs), que expresan este tipo de moléculas (Ravetch y Lanier, 2000). Sin embargo algunas Siglecs de ratón y otras del ser humano no poseen motivos ITIMs y dos de ellas (Siglec-H murina y Siglec 14 humana) se encontraron relacionadas a DAP12 (Proteína de activación de DNAX 12 kDa) (Blasius *y col.*, 2006). DAP12 es una proteína adaptadora que contiene motivos activadores basados en Tirosina (ITAM) que gatilla tanto señales inhibitorias como activadoras (Hamerman y Lanier, 2006) (Fig. 14).

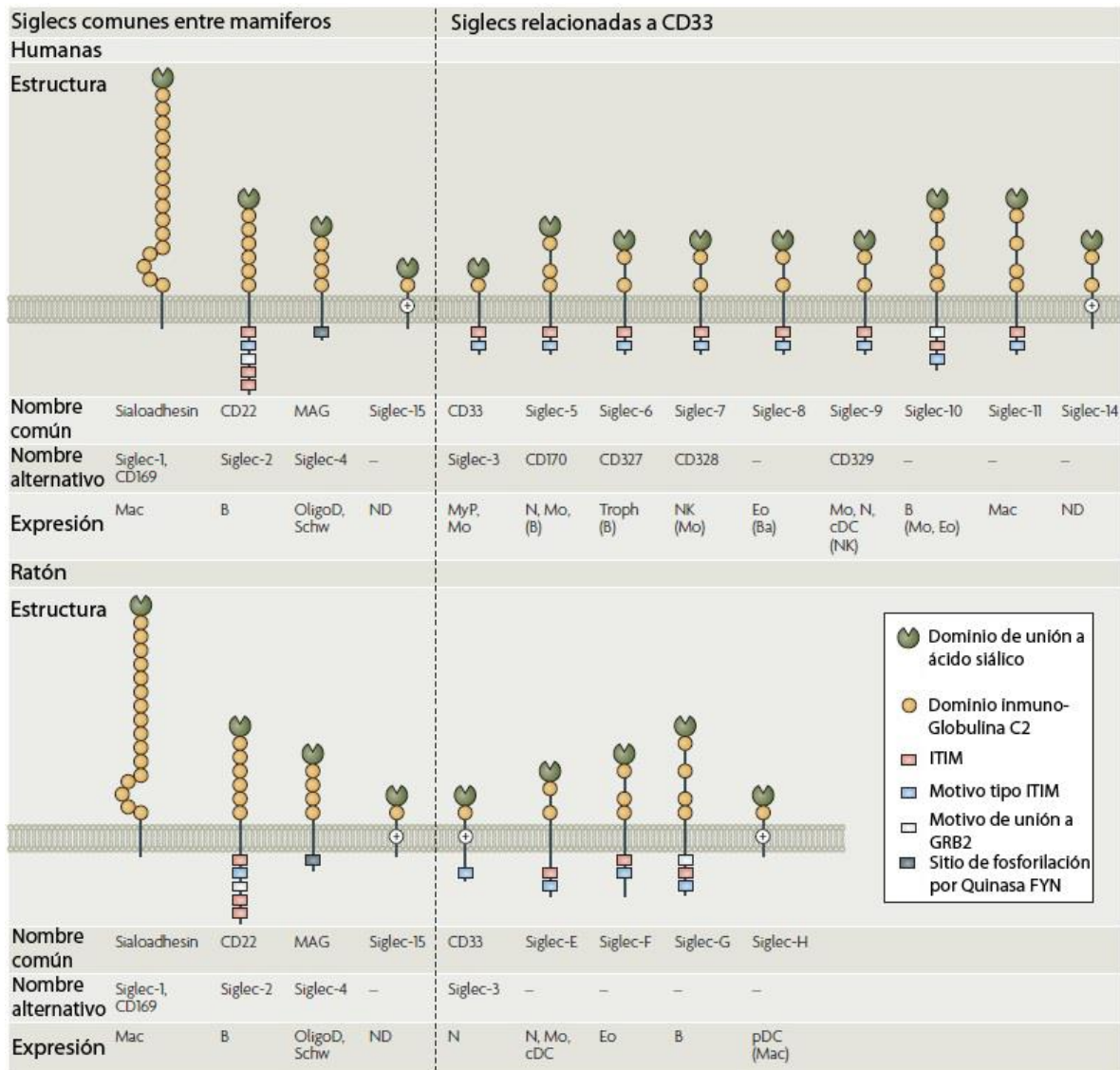


Figura 14. Estructura y expresión de Siglecs en humanos y roedores

El patrón de expresión está indicado en base a marcaciones con anticuerpos específicos. Los paréntesis indican bajo nivel de expresión. (B) linfocitos B; (Ba) Basófilos; (cDCs) células dendríticas convencionales; (Eo) Eosinófilos; (Mac) Macrófagos; (Mo) Monocitos; (MyP) Progenitores mieloides; (N) Neutrófilos; (ND) No determinado; (NK) células Natural Killer; (Oligo D) Oigodendrocitos; (pDCs) células Dendríticas plasmáticas; (Schw) células de Schwann; (Troph) trofoblastos (adaptado de Crocker *y col.*, 2007).

1.VIII.2 Reconocimiento

Los mamíferos contienen una gran diversidad de glicanos sialidados, los cuales podrían ser potencialmente reconocidos por las Siglecs. Generalmente, se asume que este reconocimiento es importante para modular la función de estas

lectinas como reguladoras de adhesión, señalización celular y endocitosis (Crocker y Varki, 2001; Varki y Angata 2006). En general, las Siglecs presentan baja afinidad (Kd 0.1-3 mM) por los oligosacáridos sializados comúnmente más expuestos entre las células de los mamíferos y además, existe un reconocimiento solapado entre las diferentes lectinas de esta familia. Sin embargo, presentan una afinidad y especificidad mayor con respecto a algunos oligosacáridos más específicos, representados en los mamíferos y también en otros organismos (Crocker *y col.*, 2007). En relación a esto, es importante destacar que las Siglecs 8 y 9 humanas presentan una preferencia diferencial por ligandos que contienen tanto ácido siálico como sulfatos (Bochner 2005; Rapoport *y col.*, 2006). En particular, se observó un fuerte reconocimiento de la Siglec-9 por oligosacáridos de tipo 6-Sulfo-Sialil Lewis, los cuales además de ácido siálico presentan una sulfatación en el carbono 6 de un residuo de N-acetilglucosamina presente en dicha estructura (Campanero-Rhodes *y col.*, 2006).

La enorme presencia de los oligosacáridos sializados en las células de mamífero involucra especialmente a las células del sistema inmune, donde por ejemplo los linfocitos B, llegan a exponer concentraciones superiores a 100 mM. Producto de esta situación es el fenómeno conocido como “*Enmascarado*” de las Siglec, ya que la existencia de interacciones en *cis* entre las Siglec expresadas por una célula y los ligandos expresados también en la superficie de la misma, mantienen silentes las vías de señalización dependientes de estas lectinas. Incluso las mismas Siglecs al ser glicoproteínas favorecen las interacciones en *cis* al interactuar entre ellas (Collins *y col.*, 2002). Tanto este tipo de interacciones como las interacciones en *trans*, compiten según la afinidad de los ligandos expuestos ya que, en algunos casos, los ligandos presentados en *trans* por diversos tejidos muestran mayor afinidad que los presentados en *cis*. El intercambio de interacciones de tipo *cis* y *trans* entre la siglec y sus ligandos es determinante en el rol de regulación que ejercen estas lectinas. Se sabe que CD22 regula a las células B inhibiendo su activación en situaciones en las cuales el antígeno presentado y el ligando de esta Siglec corresponden a la misma célula,

evitando así la producción de autoanticuerpos (Lanoue *y col.*, 2002). Por otro lado, los resultados obtenidos en varias investigaciones describieron que ciertos tejidos expresan altas concentraciones de ligandos de Siglecs, sugiriendo que las interacciones en *trans* tienen que ver con la protección ante un ataque autoinmune al competir con las interacciones en *cis* (Crocker *y col.*, 2007). La sialoadhesina parece ser una excepción a esta regulación ya que su larga estructura extracelular dificulta las interacciones en *cis*.

1.VIII.3 Funcionalidad

A partir de homologías de secuencia, tropismo, estructura genética y relación filogenética, se han creado una serie de correspondencias entre Siglecs de diferentes especies de mamíferos las cuales estarían relacionadas como genes ortólogos (Varki y Angata, 2006). Entre varias de las relaciones descritas, hacemos énfasis para este trabajo en el hecho de que las Siglec-9 y 7 humanas, han sido muy relacionadas con la Siglec-E murina. Asimismo, las siglecs-E y 9 coinciden con respecto al tipo de células que las expresan (monocitos, células dendríticas y neutrófilos) y las tres reconocen estructuras sulfatadas. Más aún, estas tres lectinas tienen en común la capacidad de desencadenar señales inhibitorias sobre la activación celular de las células del sistema inmune (Crocker *y col.*, 2007). Recientemente, se asoció a la Siglec-E con la regulación negativa de la activación y reclutamiento de neutrófilos involucrados en un modelo de inflamación pulmonar (McMillan *y col.*, 2013). También se describió que la interacción en *trans* a través de Siglec-E suprime la activación de las células del sistema inmune innato que expresan esta lectina. Esto sucede cuando interaccionan con linfocitos-T activados a través de la interacción con estas células. El mismo trabajo sugiere que el cambio de interacción de *cis* a *trans* por parte de la Siglec-E está directamente relacionado con la exposición de los ligandos sulfatados en las células T correspondientes ya que solo el incremento de ácido siálico en la superficie de las células T, no sería suficiente para justificar un cambio de interacción por parte de las lectinas (Redelinghuys *y col.*, 2011). Esta capacidad de las Siglecs de deprimir la activación inmunológica es

particularmente aprovechada por varios patógenos, los cuales exponen oligosacáridos imitando ligandos endógenos de Siglecs, manipulando así la modulación de la respuesta inmune innata.

1.VIII. 4 Siglecs y *T. cruzi*

T. cruzi posee una enzima denominada Trans-sialidasa (TS), objeto de muchísimas investigaciones que la relacionan con la infectividad y patogenicidad de este protozoario. Dado que el parásito no puede sintetizar el ácido siálico, la actividad de la TS consiste en transferir moléculas de ácido siálico desde glicoconjugados del hospedador a estructuras tipo mucinas que el parásito expresa en superficie (Colli *y col.*, 1993; Buscaglia *y col.*, 2006). La importancia de esta enzima se evidencia en los múltiples genes codificantes que el organismo posee para la TS y en la importancia que tiene en el proceso de infección, por ejemplo, confiriendo resistencia hacia proteínas del complemento humano (Tomlinson *y col.*, 1994). Además, se sabe que al igual que el dominio C-T de la Cz, la TS contiene un dominio carente de actividad enzimática, el cual es altamente inmunogénico. La característica bifuncional de ambas moléculas ha dado lugar a hipótesis que sugieren que estas son el resultado de una estrategia del parásito cuyo fin es orientar la respuesta inmune hacia este dominio antigénico, protegiendo así al dominio catalítico y por ende, la actividad enzimática (Cazzulo y Frasch 1992). Las interacciones que existen entre este parásito y las Siglecs ocurren como producto de esta actividad enzimática de *T. cruzi*. La primera interacción descrita fue la que mantiene con la Sialoadhesina expresada en macrófagos, la cual no posee dominio intracelular y por tal motivo se le atribuye la función de mediar en las interacciones célula-célula (Monteiro *y col.*, 2005). Posteriormente, se demostró que la capacidad de trans-sialidación está involucrada en la inhibición de la activación de células presentadoras de antígeno vía Siglec-E. La entrada del parásito en las células del hospedador inicia una respuesta inmune potente, capaz de controlar la infección pero no de eliminar al parásito por completo. La producción de interleucina 12 (IL-12) por parte de las células presentadoras de antígeno, como las dendríticas, es crucial

para establecer una respuesta de células T CD8⁺ y Th1 que mediante la producción de INF γ producen la activación de células fagocíticas idóneas para atacar parásitos intracelulares (Aliberti *y col.*, 1996; Kumar y Tarleton, 2001). La inhibición de la activación de las células presentadoras de antígeno vía Siglec-E conlleva una supresión de la respuesta Th1 en el proceso de infección, favoreciendo la persistencia del parásito. Sorprendentemente, la interacción de *T. cruzi* con Siglec-E parece estar relacionada con la patogenicidad de cada cepa ya que fue bien definida para la cepa patogénica Tulahuen (Tul), mientras la interacción disminuyó notablemente para la cepa menos patogénica Tehuantepec (Teh) (Erdmann *y col.*, 2009; Jacobs *y col.*, 2010).

2.Resultados y discusión

Parte 1

2.1.Mecanismo de sulfatación

Con el objetivo de probar que la sulfatación en *Trypanosomacruzi* ocurre a través de la vía que involucra a la molécula PAPS como dador del grupo sulfato, se realizaron diversos ensayos utilizando clorato de sodio como inhibidor de este mecanismo. Los ensayos permitieron evaluar el impacto de esta sal tanto en la sulfatación de proteínas como en la sulfatación de lípidos.

2.1.1.Sulfatación de glicoproteínas. Detección

Como modelo de sulfatación proteica se utilizó a la cruzipaína (Cz), teniendo en cuenta que se demostró por primera vez la presencia de sulfatos en los oligosacáridos unidos a la Asn255 de la molécula, situados en el único sitio de N-glicosilación del dominio C-terminal (C-T) de la misma (Barboza *y col.*, 2005). Una de las estrategias para evidenciar un descenso en la tasa de sulfatación fue obtener una fracción de anticuerpos contra Cz enriquecida en aquellos anticuerpos específicos para el epítipo sulfatado. Para lograr este enriquecimiento, los anticuerpos anti-Cz obtenidos a partir de conejos inmunizados con la molécula fueron purificados, y se adsorbieron dos veces de manera consecutiva, con Cz desulfatada (Czd) químicamente. Dado que la única diferencia entre Cz y Czd es la presencia y ausencia del grupo sulfato, respectivamente, la fracción de anticuerpos anti-Cz que queda sin adsorber debería reconocer específicamente al epítipo sulfatado y es por eso que la denominamos IgGs-enriquecidas-Anti-Sulfato (IgGs-enriquecidas-AS). Esta fracción, por estar enriquecida en anticuerpos específicos anti-sulfatos resultó ser mucho más sensible a los cambios en el nivel de sulfatación de la proteína que el total de anticuerpos obtenidos contra la Cz entera (IgGs-Anti-Cz T).

La calidad de estos anticuerpos fue evaluada mediante Ensayos de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) usando como antígenos Cz y Czd (Fig. 15 a y b). De acuerdo a lo esperado, debido a la ausencia del epítipo

sulfatado en la Cz, el reconocimiento de la Cz tanto por las IgGs-Anti-Cz-T como por las IgGs-enriquecidas-AS fue más intenso. Asimismo, la relación o cociente entre el reconocimiento de la Cz y el de la Czd (Cz/Czd) aumentó de 1,21 a 3,51 cuando se utilizaron las IgGs-enriquecidas-AS demostrando la especificidad de esta última fracción. Además, para confirmar que esta diferencia se debía exclusivamente al epítopo sulfatado se realizaron ELISAs de inhibición utilizando un azúcar sintético, N-Acetil Glucosamina 6 Sulfato (NAcGlc6S) como inhibidor mimetizando al mencionado epítopo estableciendo así una competencia por los anticuerpos específicos (Barboza *y col.*, 2005; Couto *y col.*, 2012). Como consecuencia del agregado de concentraciones crecientes de este inhibidor se observó una disminución significativa en la relación de reconocimiento Cz/Czd solamente cuando se utilizaron las IgGs-enriquecidas-AS. Este resultado expresado como porcentaje de inhibición del reconocimiento de la Cz tanto por las IgGs-Anti-Cz-T como por las IgGs-enriquecidas-AS se muestra en la (Fig. 15 C).

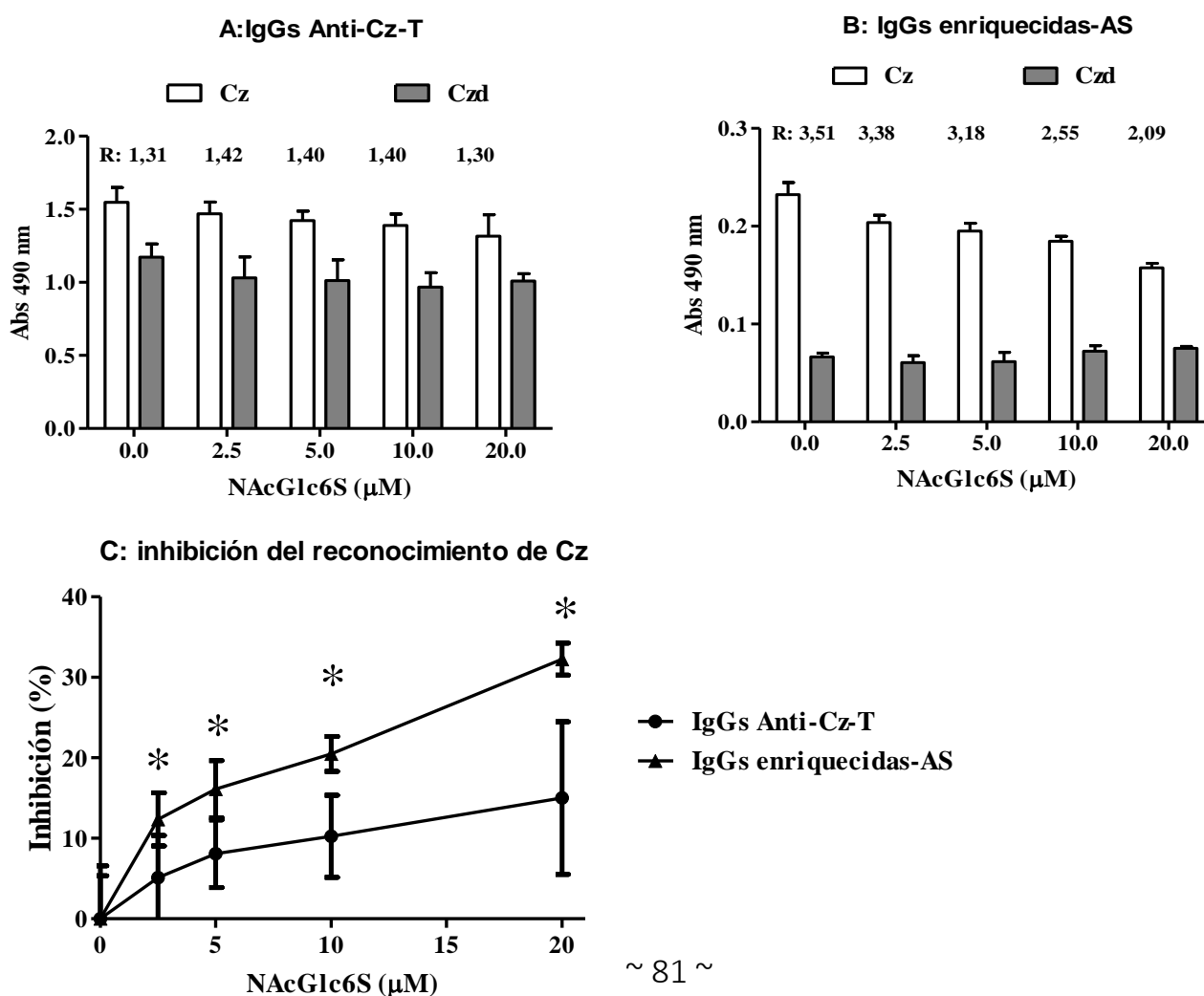


Figura 15. Enriquecimiento de IgGs específicas por sulfatos purificadas a partir de suero policlonal específico anti-Cz de conejo mediante adsorción con Czd.

Los resultados de ELISA muestran el reconocimiento de los antígenos Cz y Czd por la fracción de IgGs-Anti-Cz-T (A) e IgG-enriquecidas-AS (B) mediante competencia con cantidades crecientes de NAcGlc6S. R es la relación de inmunoreconocimiento calculada como el valor de Abs 490nm obtenido con Cz /el valor de Abs 490nm obtenido con Czd para cada concentración de inhibidor utilizada C- Porcentaje de inhibición de reconocimiento de Cz por la fracción de IgGs-Anti-Cz-T y por la fracción IgGs-enriquecidas-AS calculado a partir de los datos de los gráficos A y B. El valor de inhibición 0% se considera en ausencia de NAcGlc6S. Análisis estadístico Test de Student * $p < 0,05$. Gráficos en Graphpad Prism.

2.1.2. EFECTOS DEL CLORATO EN LA SULFATACIÓN DE GLICOPROTEÍNAS

Una vez obtenidos y caracterizados los anticuerpos de detección de los grupos sulfato (IgGs-enriquecidos-AS) procedimos a evaluar la capacidad inhibitoria del clorato sobre la sulfatación de Cz. Para tal fin, se crecieron epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Tul 2 con concentraciones crecientes de clorato (10, 25 y 50 mM) en medio de cultivo axénico. El efecto del tratamiento fue analizado por la técnica de western blot utilizando como primer anticuerpo las IgGs-enriquecidas-AS. Es importante mencionar que se evaluó el impacto del tratamiento sobre el crecimiento de los parásitos y la síntesis proteica y no se obtuvieron alteraciones significativas para ninguno de estos parámetros (Fig. 16 A y B).

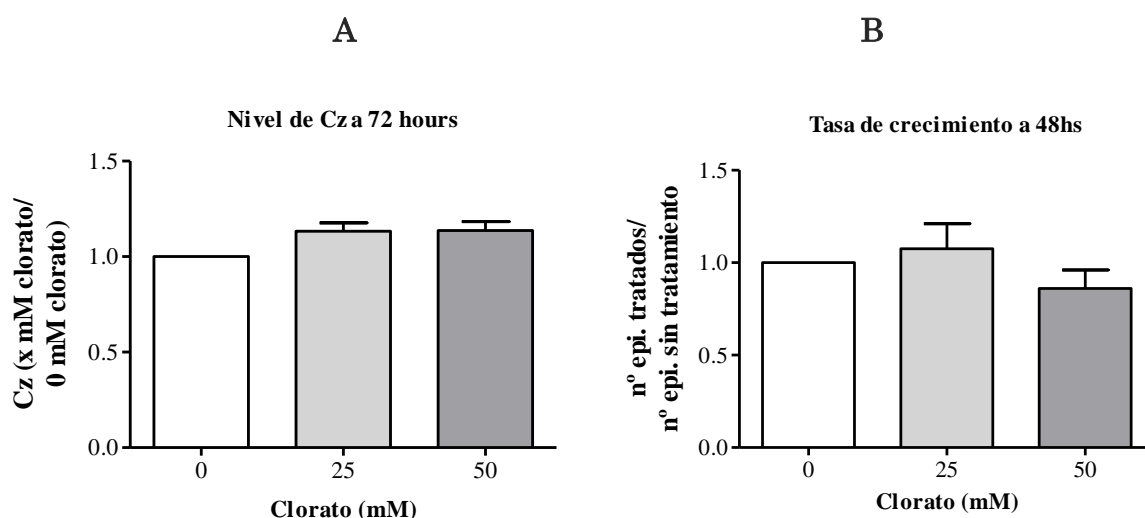


Figure 16. Efectos del tratamiento con clorato sobre la síntesis de proteínas y sobre el crecimiento de los parásitos

A. Efectos del clorato sobre la síntesis proteica. A partir de tres alícuotas de 50000 parásitos crecidos en diferentes concentraciones de clorato de sodio (0, 25 y 50mM). Se realizó una electroforesis desnaturalizante en gel seguido por tinción de plata y un wb con anticuerpos específicos para Cz. Las bandas resultantes fueron analizadas mediante el Image J software. B. El crecimiento de los epimastigotes no se vio alterado significativamente con concentraciones de clorato por debajo de 75 mM (no se muestra) luego de 48 hs de tratamiento. El eje Y representa el crecimiento de los epimastigotes. Se definió el valor de la tasa de crecimiento obtenido en el control de tratamiento (0 mM de clorato) con valor 1. A partir de este valor se relativizó el crecimiento obtenido en presencia de 25 y 50 mM de clorato. Los datos obtenidos por duplicado de tres experimentos diferentes fueron analizados mediante el test de ANOVA de un factor en el software Graphpad Prism.

Como resultado del ensayo, el reconocimiento de las IgGs-enriquecidas-AS por la Cz disminuyó a medida que aumentó la concentración de clorato luego de las 48h de tratamiento (Fig. 17 A y B). Como control de siembra se procesó en paralelo la Aldo-ceto-reductasa de *T. cruzi* (*TcAKR*), una proteína citosólica del parásito que no presenta epitopes sulfatados (Garavaglia *y col.*, 2010). La inhibición de la sulfatación de la Cz fue significativa en los tratamientos con 25 y 50 mM de clorato. Esta inhibición se manifestó como una pérdida en la intensidad de la señal de reconocimiento, obtenida mediante western blot, superior al 50 % respecto de los controles sin tratar. En este ensayo el reconocimiento de la Cz fue relativizado según el reconocimiento de la *TcAKR*, proteína control, para cada tratamiento por separado.

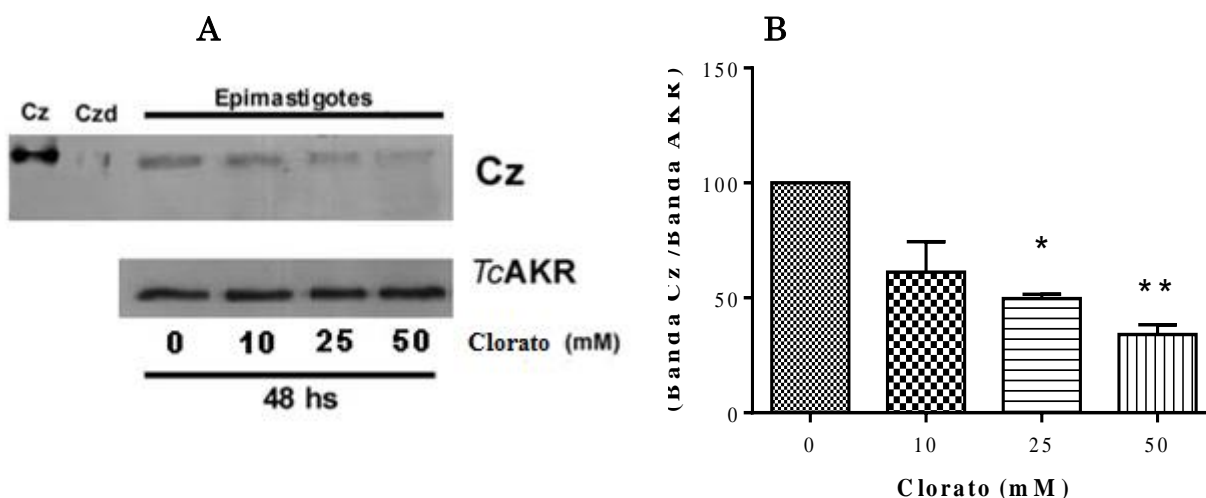


Figura 17. Inmunoreconocimiento de Cz en epimastigotes tratados con clorato.

A. Western blot de epimastigotes tratados con clorato. Como controles en las primeras dos calles se sembró Cz y Czd ambas puras y el revelado de las restantes calles sembradas con epimastigotes se reveló con IgGs-enriquecidas-AS y con anti-Tc. AKR como control de siembra (en la línea superior e inferior, respectivamente). B. Se obtuvieron las relaciones entre la intensidad de señal de Cz / la intensidad de señal de TcAKR para cada calle y se las relativizó con respecto al control (0mM de clorato), el cual se consideró 100% de intensidad de señal. El análisis de las intensidades de las bandas se realizó con image J software. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (Test de ANOVA de un factor) Gráficos en software Graphpad Prism.

Por otro lado, se realizaron electroforesis bidimensionales (2D) de los parásitos tratados con 25 mM de clorato y se analizaron las bandas correspondientes a Cz por western blot usando para el revelado las IgGs-Anti-Cz-T. El resultado mostró un claro desplazamiento de las bandas de Cz hacia puntos isoeléctricos más altos. Esto concuerda con la pérdida de los grupos sulfatos en esta glicoproteína. Como controles de este ensayo se utilizaron Cz y Czd purificadas y parásitos sin tratar (Fig. 18).

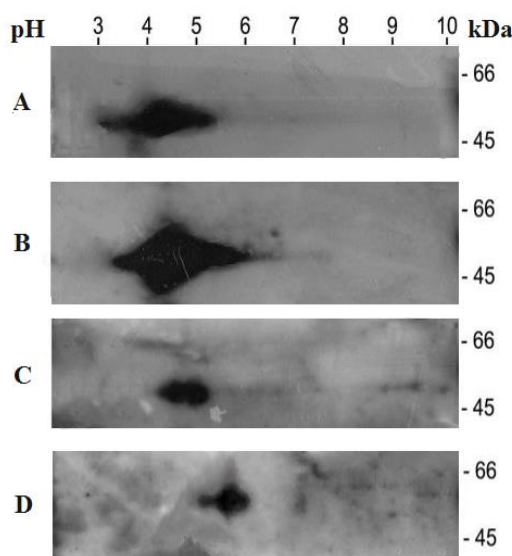


Figure 18: Movilidad en electroforesis 2-D.

A. Cz (1 μ g) B. Cz (1 μ g) más Czd (1 μ g) C. 2×10^5 parásitos sin tratar. D. 2×10^5 parásitos tratados con clorato (25mM) durante 48 h. Arriba de izquierda a derecha figura el rango de puntos isoeléctricos (pI: 3 a 10) utilizado para la primera dimensión. La segunda dimensión se realizó en gel de poliacrilamida 10% con SDS. EL western blot fue revelado con IgGs-Anti-Cz-T

2.1.3. EFECTOS DEL CLORATO EN LA SULFATACIÓN DE LÍPIDOS

La presencia de sulfatos en los lípidos de *T. cruzi* y el hecho de que estos epitopes presenten reactividad cruzada con los encontrados en el extremo C-T de la Cz, les da una reconocida relevancia antigénica (Acosta *y col.*, 2012). Por tal motivo, investigar la posible existencia de un mecanismo común de sulfatación fue uno de los objetivos de este trabajo.

A partir de epimastigotes de la cepa Tul2 tratados con diferentes concentraciones de clorato (10, 25 y 50 mM) se realizó una extracción y purificación de glicoesfingolípidos ácidos (AGSLs), para luego analizarlos mediante cromatografía en capa delgada (Fig. 19). Los glicoesfingolípidos fueron el grupo de elección dado que dentro de ese conjunto de lípidos fue descripta y luego caracterizada la presencia de sulfatos (Glicoesfingolípidos sulfatados o sulfátidos) (Uhrig *y col.*, 1992; Acosta *y col.*, 2012).

Del revelado de la cromatografía se desprenden dos resultados. El primero consiste en una disminución en la señal o mancha del sulfátido que presenta migración semejante al sulfátido control (SM4s). Esta disminución coincide con el aumento en la concentración de clorato en las muestras. El análisis posterior por espectrometría de masa (UV-MALDI-TOF) confirmó que esta mancha (“spot B”) correspondía a la estructura sulfatídica previamente descripta en *T. cruzi* (Fig. 20) (Acosta *y col.*, 2012). Por otro lado, junto con el descenso de la mancha B, se observó un aumento en una segunda mancha, denominada “spot A”, presente en la parte superior de la placa cromatográfica. Esto implica que es de menor polaridad que mancha B ubicada en la mitad inferior (Fig. 18 A). El análisis de ambas manchas A y B mediante el image J software confirmó que tanto el aumento como el descenso de las mismas fue significativo (Fig. 19 B y C).

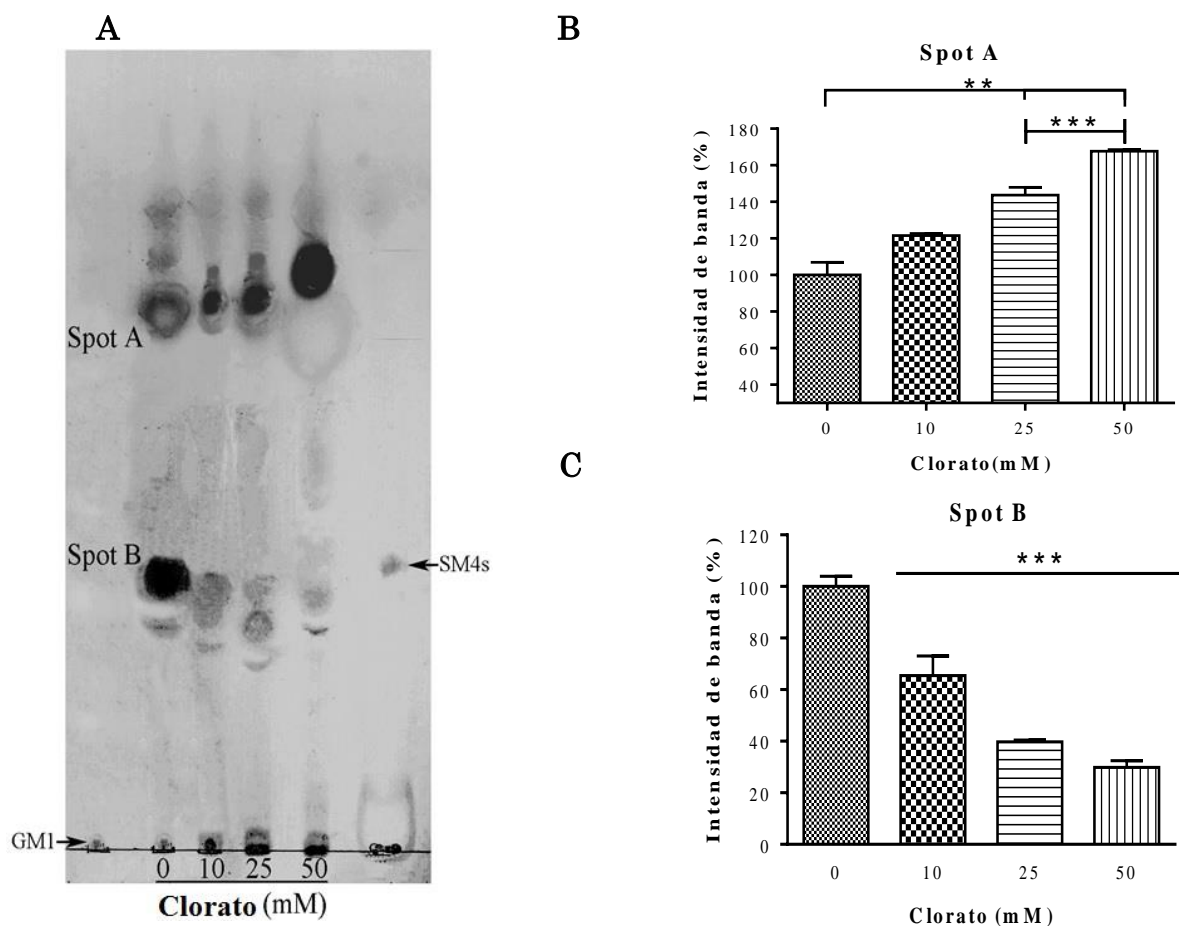


Figura 19. Análisis deAGSLs en epimastigotes tratados con clorato.

A. Epimastigotes de la cepa Tul 2 fueron tratados durante 24 horas con diferentes concentraciones de clorato (0, 10, 25 y 50 mM). La fracción de AGSLs obtenida a partir de 5×10^9 parásitos con y sin tratamiento fue analizada por cromatografía en capa delgada. Los controles de gangliósido (GM1) y sulfátido (SM4s) están señalados con flechas. Los gráficos de barra corresponden al análisis densitométrico de la intensidad de las manchas obtenidas. B Gráfico correspondiente a la mancha A (“Spot A”). C gráfico correspondiente a la mancha B (“Spot B”). El Test estadístico utilizado fue el ANOVA de un factor $*p < 0,05$ 25 mM Vs 0 mM de clorato. Gráfico obtenido con software Graphpad prism.

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta sección “Mecanismo de sulfatación” podemos confirmar la existencia de una vía de sulfatación no solo glicoproteica, sino también lipídica que involucra a la molécula de PAPS como parte necesaria de la misma. El hecho de que los resultados hayan derivado del uso de clorato de sodio como inhibidor, implica además la expresión necesaria de ATP-sulfurilasas dado que la capacidad inhibitoria de esta sal se demostró sobre estas enzimas (Baeuerle y Huttner, 1986).

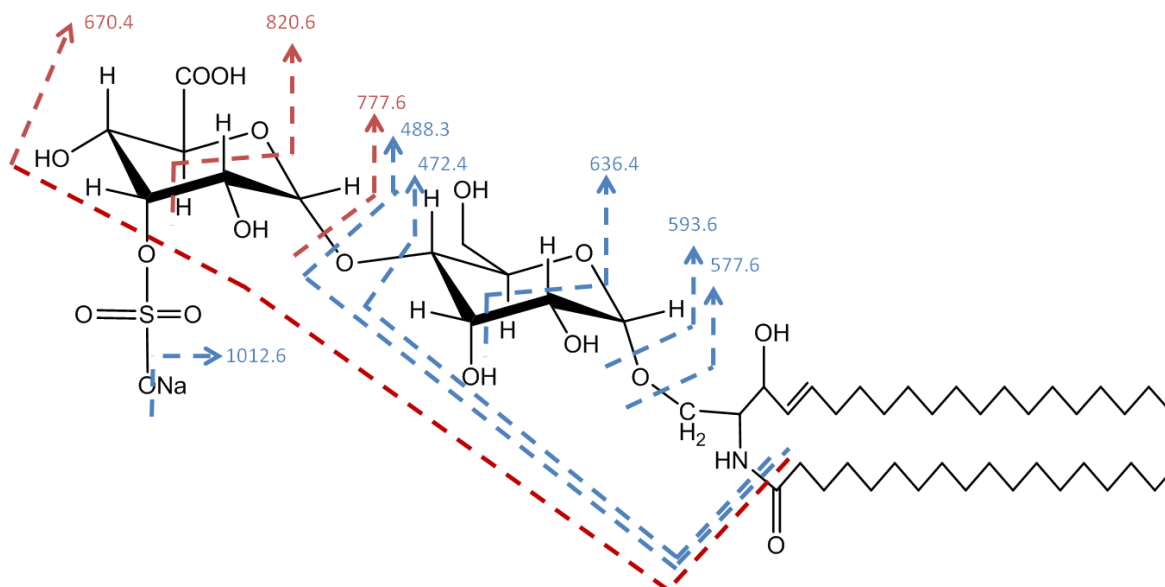


Figura 20. Estructura obtenida mediante análisis por espectrometría de masa UV-MALDI-ToF

Mediante el empleo del equipo Ultraflex II TOF/TOF, se analizó el “Spot B” obtenido en la TLC (Fig. 5). EL espectro de masas obtenido presentó un conjunto de picos con valores de masas que permitieron confirmar que se trataba de una estructura Glicosfingolípídica (GSL) acetilada y sulfatada. Los picos sobre los cuales se consideró la presencia de una molécula de sodio asociada al ion generado se marcaron en rojo. En azul figuran los picos de iones asociados a un protón.

La sulfatación es una modificación post-traduccional crítica de la cual dependen varios procesos biológicos. En *T. cruzi* se sabe que tanto los lípidos como las proteínas sufren esta particular modificación (Acosta *y col.*, 2012; Barboza *y col.*, 2005). Previo a los resultados expuestos en este trabajo, nada se sabía acerca de las rutas metabólicas utilizadas por este patógeno para llevar a cabo en este proceso. A partir de los resultados obtenidos mediante el tratamiento con clorato de sodio sobre epimastigotes de *T. cruzi* crecidos en cultivo axénico, evidenciamos la necesidad del parásito de sintetizar PAPS para sulfatar tanto proteínas como lípidos. La reducción de la sulfatación de la Cz se observó tanto en western blot como en electroforesis bidimensional. Mientras en ausencia de tratamiento, el pI de la Cz se ubicó en valores de entre 4.5 y 5 de acuerdo a lo reportado previamente (Stoka *y col.*, 1995; Cazzulo *y col.*, 1995) y con un patrón similar al descrito utilizando la misma técnica (Scharfstein *y col.*, 1986), en los epimastigotes tratados, la Cz mostró un claro desplazamiento hacia valores de pI entre 5.5 y 6 lo cual se condice con la pérdida de cargas negativas en la molécula.

Por otro lado, con respecto a la sulfatación de los lípidos, el análisis de los parásitos tratados mostró una reducción significativa de los niveles de sulfátidos (GSLsA) (“Spot B”) cuyas estructuras fueron confirmadas mediante caracterización por espectrometría de masa. Concomitantemente, el aumento de lípidos neutros (GSLsN) (“spot A”) también fue significativo. Esta situación sugiere una acumulación de los glicosfingolípidos neutros, también confirmados mediante caracterización estructural por espectrometría de masa, teniendo en cuenta la interrupción de la vía de sulfatación y dado que estos últimos representan el precursor de los GSLsA. En conjunto, los resultados obtenidos mediante el tratamiento de los epimastigotes tanto con la Cz como modelo proteico, como con los glicosfingolípidos, reflejan la existencia de un mecanismo de sulfatación dependiente de PAPS en el parásito.

2.1.4. Efectos morfológicos del tratamiento con clorato

Estudiamos el efecto de este tratamiento sobre el parásito a nivel estructural y morfológico, lo cual podría permitirnos inferir el/ los posibles roles de la sulfatación en *T. cruzi*. Luego de 24 h de tratamiento en epimastigotes de la cepa Tul 2 con diferentes concentraciones de clorato de sodio (0, 10, 25 y 50 mM) se buscaron indicios de alteraciones morfológicas en el parásito por medio del uso de microscopía electrónica.

Mientras en los epimastigotes tratados con 10 y 25mM de clorato no se encontraron diferencias estructurales significativas respecto del control (0 mM), varias anomalías se observaron a partir del tratamiento con 50mM de clorato (Fig. 21). Entre las alteraciones encontradas, los parásitos tratados mostraron: hinchazón de la mitocondria; alteraciones en reservosomas, ubicados entre núcleo y bolsillo flagelar; así como también en membranas y complejo de Golgi. Además se encontró desorganización de kinetoplasto y núcleo (Fig. 21 b-f). El aumento de los GSLs neutros en los parásitos tratados es probablemente la causa de las desorganizaciones de membrana encontradas. Una de las más llamativas fue la presencia de compartimentos que contienen estructuras mielínicas y de material

electrodensos formadas por acumulación de membrana (Menna-Barreto *y col.*, 2009).

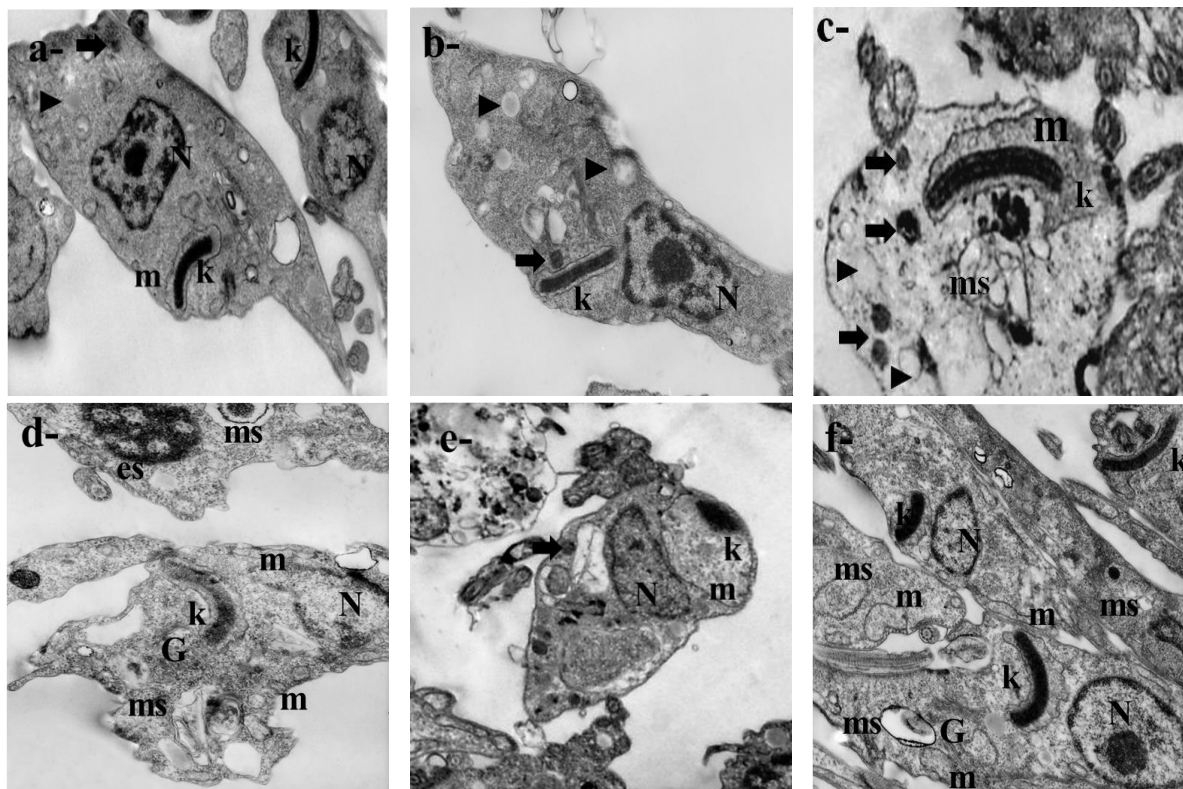


Figura 21. Efectos del clorato a nivel estructural. Microscopia electrónica de epimastigotes tratados con clorato.

A) Epimastigotes sin tratar mostrando una estructura típica del núcleo (N) y membrana nuclear, Kinetoplasto (K) el cual está contenido dentro del mitocondrion (m) y los reservosomas electrodensos (Rd, →) o electrolúcidos (Rl, ▲). (b-f) Epimastigotes tratados con 50 mM de clorato durante 24 h. Los parásitos tratados evidenciaron alargamiento e hinchazón de la mitocondria (c, d, e, f), alteraciones en la membrana del núcleo y su contenido genético (d, e, f), Kinetoplasto anormal (b-f), Rl y Rd (b, c), desorganización del Golgi (d, f), arreglos de membrana conteniendo estructuras electrodensas (es) (d) y estructuras mielínicas (ms) (c, d, f). a- Escala 1cm: 1.4 μ m. b- Escala 1cm: 0.5 μ m. c- Escala 1cm: 0.83 μ m. d- Escala 1cm: 2.2 μ m. e- Escala 1cm: 2.2 μ m. f- Escala 1cm: 0.83 μ m. Los epimastigotes tratados con 10 mm clorato de sodio resultaron morfológicamente idénticos a los no tratados (no se muestra)

Los reservosomas se caracterizan por ser organelas circulares (diámetro promedio de 400 a 600 nm) delimitadas por membrana simple, normalmente ubicadas en la parte posterior de los epimastigotes y compuestas principalmente por proteínas y/o lípidos. De acuerdo a la proporción y características del

contenido se pueden clasificar en dos tipos: los electrodensos (Rd) que contienen mayormente proteínas aunque no exclusivamente y los electrolúcidos (RI), los cuales contienen principalmente lípidos (Cunha e Silva, 2006; De Souza *y col.*, 1978; Soares *y col.*, 1987). Se llevó a cabo el recuento de este tipo de organelas tanto en los parásitos sin tratar como en los tratados, encontrando que había una disminución significativa de los Rd en los epimastigotes tratados. Puntualmente, se sabe que este tipo de reservosomas son organelas de formación reciente, lo que explica la carencia de una gran masa lipídica. Asimismo se caracterizan por contener un medio ácido lo que les otorga un aspecto electrodenso (Santana *y col.*, 2009). La disminución de AGSLs observada tras el tratamiento podría estar asociada a la disminución de los Rd. De igual manera, la posible presencia de glicoproteínas sulfatadas en estas organelas, se vería afectada ya que la sulfatación de proteínas esta disminuida tras el tratamiento con clorato, contribuyendo también a la disminución de los Rd (Fig. 22 A). Por otro lado, el aumento notorio de los RI concomitante con el aumento de la dosis de clorato utilizada sugiere fuertemente estar relacionado con la acumulación de los GSLs neutros previamente descrita (Fig. 22 B).

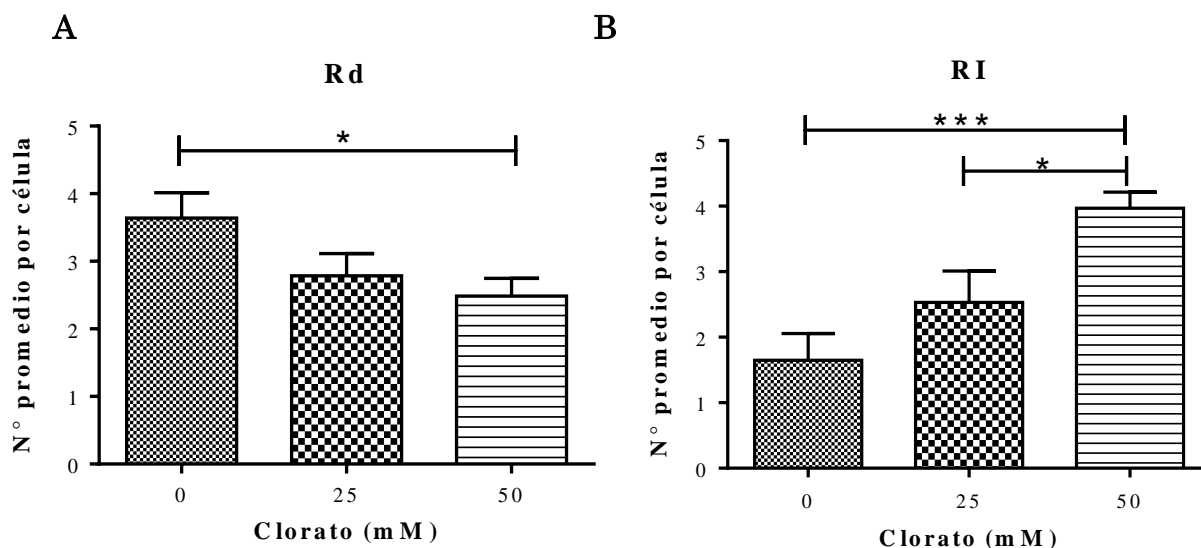


Figura. 22. Cuantificación de reservosomas

Cuantificación de reservosomas electrodensos (Rd) (A) y electrolúcidos (RI) (B) de epimastigotes de la cepa Tul 2, a diferentes concentraciones de clorato (0, 25 y 50 mM) tratados durante 24 h. Los valores correspondientes a 10 mM resultaron no significativos con respecto al control (no se muestra). El Test estadístico utilizado fue el ANOVA de un factor * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$. Gráfico obtenido con software Graphpad prism.

Finalmente, cabe destacar que no se observaron alteraciones estructurales en los parásitos tratados con 25 mM de clorato de sodio. Esto indica que las concentraciones de este inhibidor, necesarias para producir este tipo de alteraciones, son más elevadas que aquellas necesarias para producir efectos sobre la sulfatación de glicoconjugados a nivel molecular. Tanto los resultados obtenidos en proteínas, lípidos y estructura del parásito al ser sometido a este tratamiento sugieren fuertemente la presencia de un mecanismo de sulfatación dependiente de PAPS en *T. cruzi*.

2.1.5. Sulfatación y actividad enzimática de la Cz

Puesto que la Cz es la cisteína proteínasa mayoritaria de *T. cruzi* (Cazzulo y col., 2001) y que de esta actividad enzimática depende el desarrollo del ciclo de vida del parásito, resultó trascendente determinar la influencia de la sulfatación sobre dicha actividad. Para tal fin, se llevaron a cabo dos ensayos. El primero, una desulfatación enzimática de la Cz mediante el uso de una Sulfatasa comercial (*A. Entrailis* VII Sigma Aldrich), la cual a diferencia de la sulfatación química no implica condiciones desnaturalizantes para la proteasa, aunque requiere una incubación durante toda la noche a 37 °C que se tuvo en cuenta al momento de comparar actividades. Para tener un control de este tratamiento, se dividió la Cz en dos fracciones. A ambas fracciones se las sometió al protocolo de desulfatación enzimática pero solo a una fracción se le agregó la sulfatasa comercial. Sobre las especies de Cz obtenidas a partir de este primer ensayo, Cz tratada (sin sulfatasa) y Czd (con sulfatasa), se realizó el segundo ensayo. En este estudio se pretendía saber si el reconocimiento o bloqueo de los anticuerpos anti-sulfato generaba algún tipo de impedimento sobre la actividad catalítica de la Cz. Para esto, tanto a la Cz tratada como a la Czd se las incubó con IgGs específicas para Cz total y para Czd purificadas a partir de sueros policlonales de conejos inmunizados con ambas proteínas por separado. Es útil mencionar que los anticuerpos anti-Czd fueron obtenidos a partir de Cz desulfatada químicamente, lo que asegura un 99% de desulfatación. Si los anticuerpos dirigidos hacia el epítipo sulfatado generasen una alteración de la actividad de la Cz esto se

reflejaría como una diferencia entre el tratamiento con los anticuerpos anti-Cz total y anti-Czd. Una incubación de Czd con anticuerpos provenientes del suero pre-inmune de los conejos inmunizados se utilizó como control. Se eligió utilizar Czd para estudiar de manera indirecta la posible participación o no de los sulfatos en la actividad enzimática de la Cz (Fig. 23).

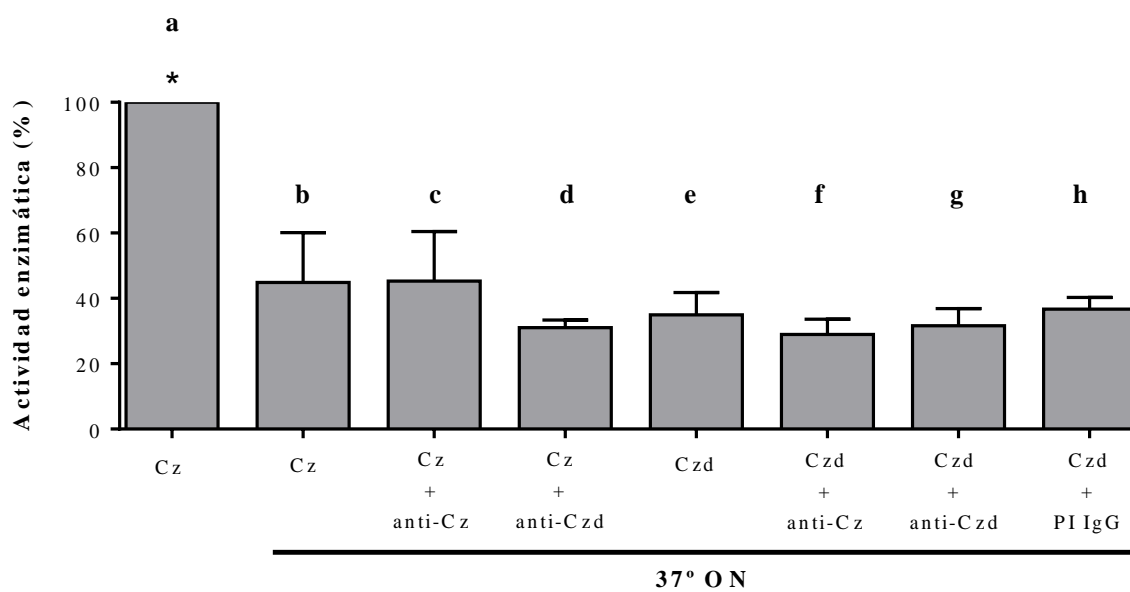


Figura 23. Actividad enzimática de la Cz frente a la desulfatación o bloqueo del epítipo sulfatado.

La actividad enzimática de la Cz se midió antes (a) y después de la incubación durante toda la noche a 37°C (b-f). Las muestras de Cz con (e-h) o sin (b-f) tratamiento de desulfatación fueron luego incubadas durante 1h y 30 min a 4°C con 8 µg de IgGs purificadas anti-Cz (c y f) o anti-Czd (d y g). La actividad de la Czd fue evaluada también tras la incubación con IgGs purificadas del suero pre-inmune (PI) como control. El Test estadístico utilizado fue el ANOVA de un factor* $p < 0.05$ a vs b-f, actividad de Cz sin incubación vs actividad de Cz con incubación a 37°C.

De los resultados obtenidos se desprende que ni la desulfatación ni el bloqueo de los epítipes sulfatados mediante anticuerpos específicos afectan significativamente a la actividad de la Cz. Con lo cual esta modificación post-traduccional de la molécula, lejos de atribuirle una capacidad catalítica a la enzima, estaría especialmente dirigida a establecer interacciones o ser blanco de una respuesta inmunológica. Si bien estos datos fueron obtenidos *in-vitro* utilizando un sustrato sintético pequeño, y teniendo en cuenta que no hay evidencias de epítipes sulfatados en el dominio catalítico de la enzima, los

resultados se condicen fuertemente con la información previa acerca la función del dominio C-T de la Cz. Sobre este dominio, varios trabajos sugieren que está implicado en desviar la respuesta humoral del hospedador a fin de que esta no afecte al dominio catalítico de la enzima y en consecuencia su actividad enzimática (Martinez *y col.*, 1993; Stoka *y col.*, 1998; Cazorla *y col.*, 2010). La confirmación de que estos epitopes no afectan la actividad biológica *in vivo* de la molécula deberían incluir como sustratos a moléculas más grandes como kininógeno de alto peso molecular que se sabe es degradado a kininas por acción de la Cz (Scharfstein *y col.*, 2000).

2.1.6. Detección de epitopes sulfatados en la superficie del parásito

Si bien hay múltiples indicios a favor de que la Cz se encuentra también unida a membrana plasmática en diferentes formas de desarrollo del parásito (Souto-Padron *y col.*, 1990; Tomas *y col.*, 1997; Parussini *y col.*, 1998) y que además se secreta al medio (Yokoyama-Yasunaka *y col.*, 1994; Duschak *y col.*, 2006), resultó esencial para la continuidad de este trabajo, determinar si los epitopes sulfatados se encontraban expuestos en la superficie.

Uno de los ensayos llevados a cabo para demostrar la exposición de los epitopes sulfatados en la membrana del parásito, fue realizado mediante citometría de flujo sobre trypomastigotes de las cepas Tulahuen 2 (Tul 2), Brazil, Y, y Tehuantepec de *T. cruzi*. Con esta técnica se determinó la capacidad de unión a los parásitos de dos “pooles” diferentes de IgGs purificadas a partir de sueros de conejo inmunizados con Cz y Czd. Uno de los “pooles”, específico contra Cz, contenía anticuerpos dirigidos a los epitopes sulfatados de la Cz y el otro obtenido a partir de la inmunización con Czd, carecía de anticuerpos contra los epitopes sulfatados. De los resultados obtenidos a través del uso de estos anticuerpos contra los trypomastigotes, pudimos observar que solo una parte de la población de los parásitos expresa Cz en membrana y que en todos los casos una población mayor de parásitos fue reconocida por los anticuerpos anti-Cz (Fig.

24 I A, C, E y G) en comparación a los anticuerpos reconocidos por los anticuerpos anti-Czd (Fig. 24 I B, D, F y H) (Fig. 23 II).

Estos resultados, en conjunto, con los publicados previamente por nuestro grupo (Ferrero *y col.*, 2014), coinciden en que los epitopes sulfatados de la Cz se encuentran expuestos en la superficie de los parásitos. Además, también explicarían resultados obtenidos previamente por nuestro grupo indicando que los pacientes con enfermedad de Chagas tienen una marcada respuesta humoral hacia estos epitopes a lo largo del desarrollo de la misma (Acosta *y col.*, 2011) y nos permitiría estudiar su rol en otros aspectos tales como la invasión y la interacción con el sistema inmune del hospedador.

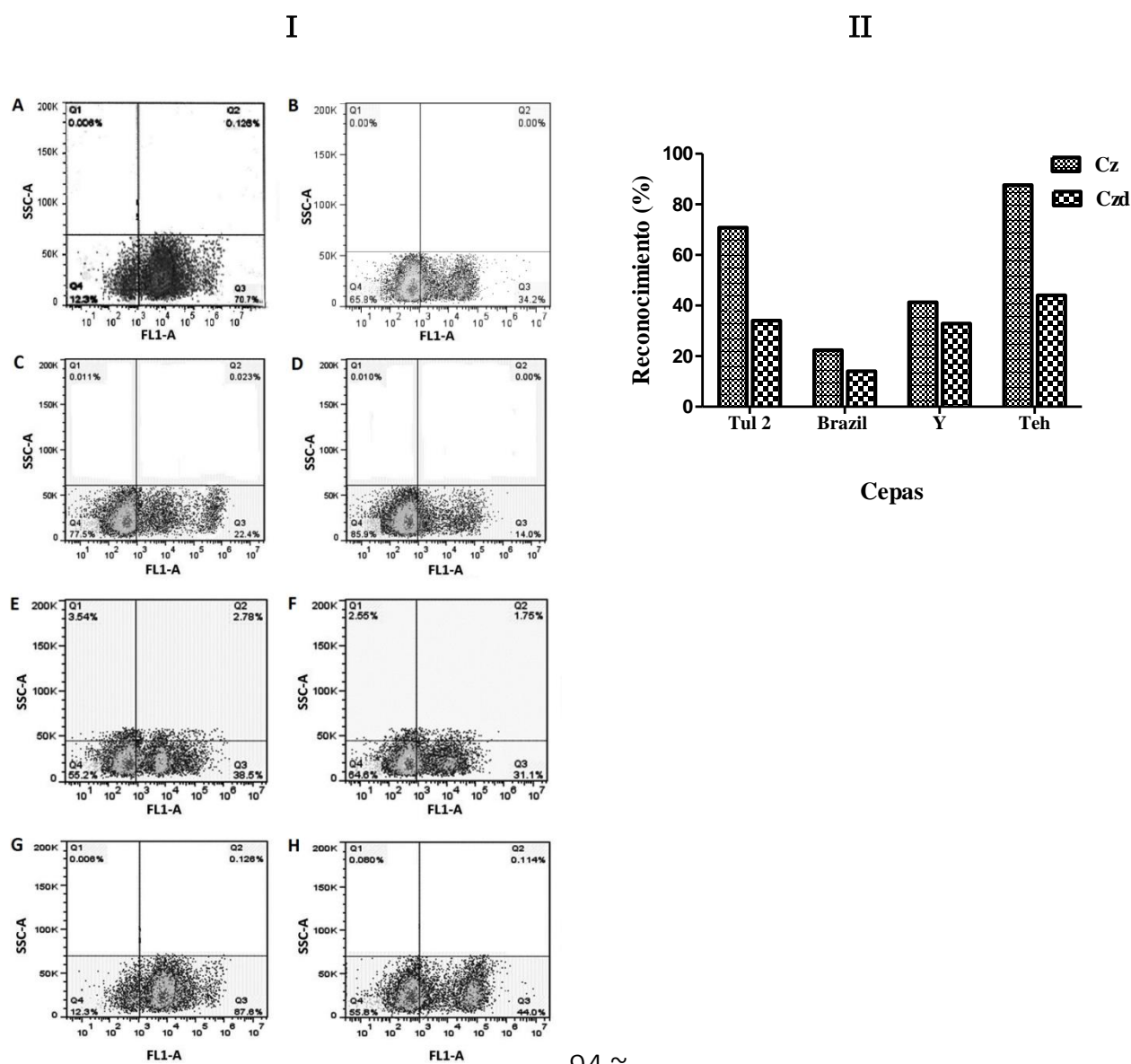


Figura 24. Reconocimiento de epítopes sulfatados expuestos en membrana plasmática de trypomastigotes

I: Dot Plots obtenidos por citometría de flujo con trypomastigotes de las cepas Tul 2, Brazil, Y y Teh confrontados con IgGs anti-Cz(A, C, E y G) y anti-Czd (B, D, F y H) respectivamente. II: Gráfico de barras reflejando el reconocimiento en% para cada “pool” de IgGs obtenido a partir de los resultados de citometría de flujo.

2.1.7. Efecto de la sulfatación en la invasión de cardiomiocitos

Varios mecanismos fueron descritos explicando la invasión de cardiomiocitos por *T. cruzi* (Calvet *y col.*, 2012). Estos involucran, entre otras cosas, la participación de oligosacáridos del huésped y/o del parásito en el proceso. Entre los oligosacáridos del parásito implicados en la invasión se encuentran la manosa y la N-acetyl glucosamina (de Araújo-Jorge y de Souza 1986, 1988). La Cz posee ambos azúcares en la N-glicosilación ubicada en el C-T. Se considera a esta glicosilación como potencial responsable de interactuar con el receptor de manosa de macrófagos modulando la respuesta inmune innata (Garrido W *y col.*, 2011).

Hasta el momento, solo se había involucrado a la Cz participando de la invasión en cardiomiocitos como proteasa (Sharfsteiny *col.*, 2000; Todorov *y col.*, 2003). En este contexto resultó relevante estudiar si los sulfatos presentes en la N-glicosilación ubicada en el C-T de la Cz participaban en la invasión de las células cardíacas.

Para estudiar la posible participación de los sulfatos en el proceso de invasión, infectamos células HL-1, línea de cardiomiocitos murinos, (Claycomb *y col.*, 1998*) con trypomastigotes tratados con clorato de sodio. Estos trypomastigotes fueron crecidos en células VERO en presencia del inhibidor durante 96 horas. Se utilizaron las concentraciones de clorato de sodio, 10 y 25 mM, ya que a estas concentraciones no se observaron cambios morfológicos significativos en el parásito durante los ensayos previamente realizados. A partir de los trypomastigotes cosechados en estas condiciones se procedió a infectar a las células HL-1. Mientras el tratamiento con 10 mM de clorato no arrojó diferencias significativas con respecto al control (trypomastigotes crecidos en ausencia de

clorato), el número de células HL-1 infectadas a partir de los trypomastigotes tratados con 25 mM de clorato mostró un descenso significativo (Fig. 25). Es importante mencionar que la infección se realizó en ausencia de tratamiento con clorato de manera que los cardiomiocitos no se vieran afectados por el mismo.

Con el fin de descartar posibles efectos pleiotrópicos desconocidos debidos al uso de clorato y hacer un análisis referido específicamente a los epitopes sulfatados de la Cz, se realizó un segundo ensayo libre de clorato de sodio. En el mismo se incubaron Cz, Czd, C-T y C-Td por separado con las células HL-1 antes y durante la infección. Cabe destacar que la actividad de la Cz fue inhibida irreversiblemente mediante la adición de E-64, inhibidor irreversible y específico para cisteína-proteasas. De esta manera se descartó la influencia de la actividad de la proteasa en los resultados. Además, exclusivamente para este ensayo la desulfatación se hizo enzimáticamente ya que la desulfatación química requiere condiciones desnaturizantes que podrían alterar la conformación de las proteínas a utilizar y así interferir en los resultados.

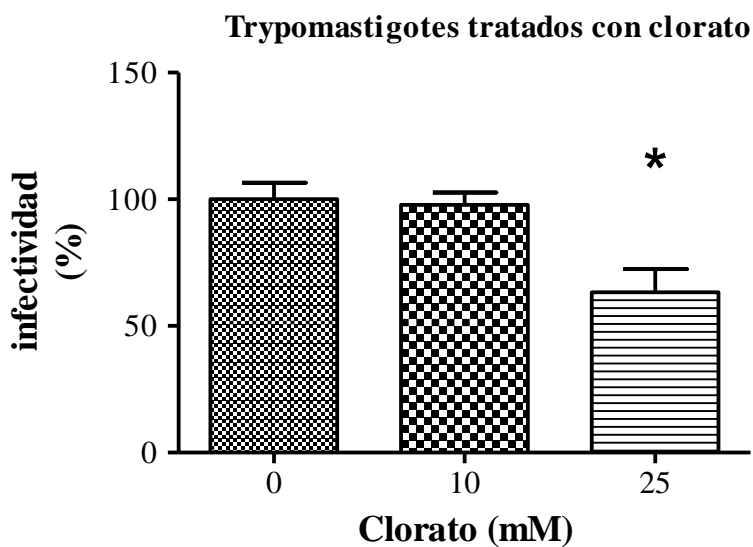


Figura 25. Efecto del clorato en la infección de la línea celular cardiaca HL-1 Se infectaron cultivos celulares de células HL-1 con trypomastigotes de la cepa Tul 2 tratados con concentraciones crecientes de clorato de sodio (0, 10, y 25 mM). Al tercer día post -infección las células se fijaron y tiñeron con May-Grungwald Giemsa. Se realizaron recuentos de las células infectadas y se calculó la infectividad como $100 \times \frac{\text{número de células infectadas tras el tratamiento}}{\text{número de células infectadas en el control sin}}$

tratar (0 mM clorato). El 30 % de las células resultaron infectadas en el control del tratamiento. El Test estadístico utilizado fue el ANOVA de un factor* $p < 0,05$ 25 mM Vs 0 mM de clorato. Gráfico obtenido con software Graphpad prism.

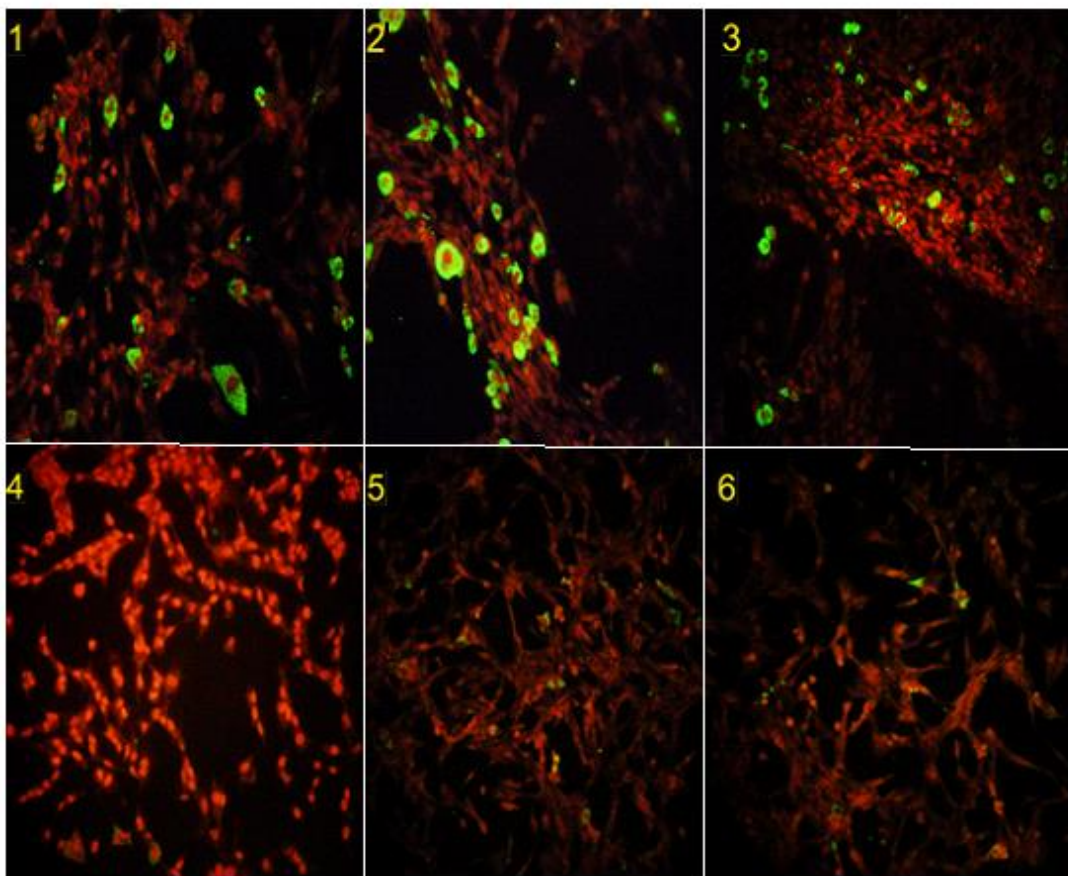
Tras el análisis del porcentaje de células infectadas se observó que ni la Cz ni el C-T afectaban la infectividad del parásito en comparación con el control de células sin tratar. Sin embargo, luego de las incubaciones tanto con Czd como con C-Td se logró una disminución significativa del porcentaje de células infectadas (Fig. 26A, B, C). El hecho de que se hayan obtenido resultados similares entre los tratamiento con Cz y C-T y los tratamientos con Czd y C-Td es consistente con la presencia del epítipo sulfatado en el C-T como se describió previamente (Barboza *y col.*, 2005).

Del conjunto de los resultados obtenidos relacionados con la invasión de los trypomastigotes de *T. cruzi* a cardiomiocitos podemos destacar que: i) El nivel de sulfatación de los parásitos influye en su habilidad de infectar este tipo de células, ya que la inhibición de esta vía mediante clorato de sodio va en detrimento de la capacidad de infección; ii) los sulfatos de la Cz presentes en el C-T participan en el proceso de invasión. Si bien los proteoglicanos sulfatados se encuentran implicados en el reconocimiento celular para varios patógenos humanos (Pancake *y col.*, 1992; Ortega-Barria y Boothroyd, 1999; Carruthers *y col.*, 2002; Fleckenstein *y col.*, 2002) inclusive *T. cruzi* (Herrera *y col.*, 1994; Oliveira *y col.*, 2008; Bambino-Medeiros *y col.*, 2011) este es a nuestro entender el primer informe sobre la participación de los motivos sulfatados del parásito y de la Cz como glicoproteína sulfatada en el proceso de infección.

Por otro lado, hay antecedentes que relacionan la participación de receptores de manosa en la invasión del parásito y que afirman que este receptor tiene la capacidad de unir tanto oligosacáridos sulfatados como no sulfatados (Liu *y col.*, 2001). Con el fin de verificar esta hipótesis, se realizó una pre-incubación de células HL-1 con anticuerpos monoclonales específicos para los dominios del receptor de manosa relacionados con la interacción de azúcares no sulfatados. Luego se procedió a infectar las células con trypomastigotes en iguales condiciones que el ensayo anterior. Como resultado del tratamiento con

anticuerpos, se observó un marcado descenso del porcentaje de células infectadas (Figura 26 A y D). Este resultado coincide con lo descrito sobre la participación de este receptor en la internalización del parásito (Garrido *y col.*, 2011; Soeiro *y col.*, 1999). La Czd estaría actuando análogamente a los anticuerpos específicos para el receptor de manosa, los cuales presentan interacción con el receptor pero tienen una limitada capacidad para desencadenar las señales intracelulares implicadas en la internalización del parásito. Nuestros resultados permiten hipotetizar que las formas desulfatadas de la Cz, bloquean el sitio de unión de la Cz interfiriendo con el reciclado del receptor o la endocitosis mediada por el mismo dejando células menos susceptibles para ser infectadas (Garrido *y col.*, 2011; Soeiro *y col.*, 1999). En este contexto, la participación de los glicoconjugados sulfatados de la Cz en la invasión de cardiomiocitos a través del receptor de manosa es muy factible.

A



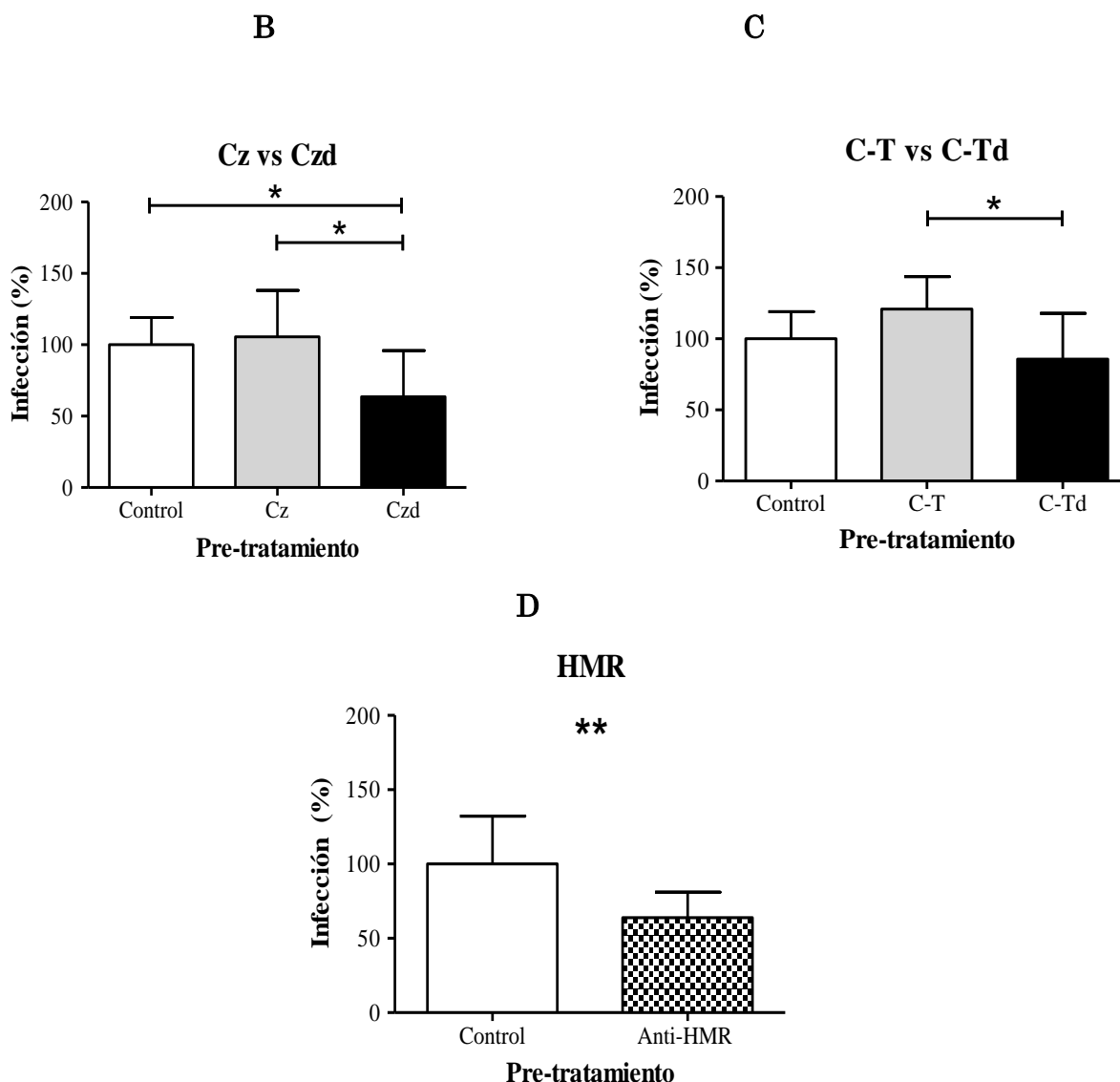


Figura 26. Efectos de la Cz, derivados y anticuerpos anti-HMR sobre la infección de la línea cardíaca celular HL-1.

A) Inmuno-Fluorescencias correspondientes a células HL-1 tratadas 2h previas a la infección y durante la infección con las siguientes glicoproteínas: C-T (2), Cz (3), C-Td (4), Czd (5) y anti-HMR (6). Las células HL-1 sin tratamiento se usaron de control (1). Revelado con anticuerpos de cabra anti-ratón Alexa Fluor 594. Aumento 200x. Escala: 1cm-50 μ m. (B, C y D) Gráficos de infecciones obtenidos a partir de las inmuno-fluorescencias para cada pre-tratamiento. El porcentaje de infección fue calculado como 100x número de células infectadas con tratamiento/número de células infectadas sin tratamiento. Para los gráficos B y C el Test estadístico utilizado fue el ANOVA de un factor y para el D, el Test de Student * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Gráficos en Graphpad Prism.

Cabe destacar que la presencia del receptor de manosa en la línea HL-1 fue corroborada por inmunofluorescencia directa (Fig. 27).

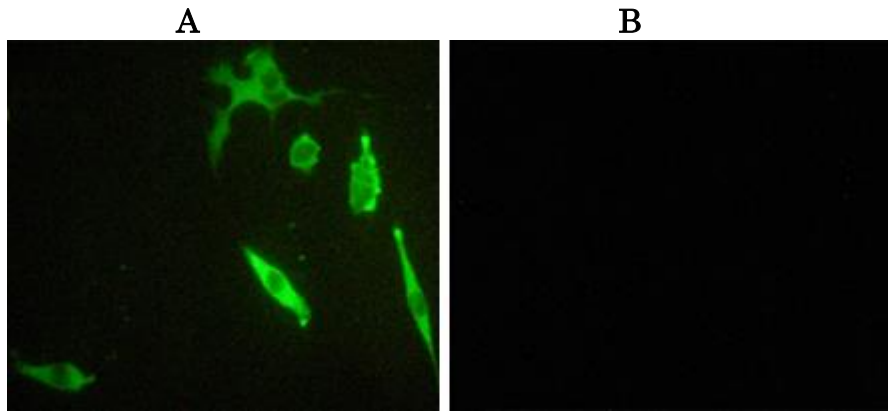


Figura 27. Control de la presencia de HMR en la línea cardíaca celular HL-1
Resultado de inmuno-fluorescencia directa sobre células HL1 revelados mediante el uso de anticuerpos anti-ratón acoplados a FITC. A) Control positivo incubado con anticuerpos monoclonales específicos para el receptor de manosa seguido de una segunda incubación con una mezcla de anticuerpos de ratón anti-conejo y anti-ratón FITC pre-incubada con anterioridad. B) Control negativo incubado únicamente con la mezcla de anticuerpos ratón anti- conejo y anti-ratón FITC.

2.1.8. Modelo de Infección de miocardiocitos del hospedador por trypomastigotes de *T. cruzi* vía receptor de manosa.

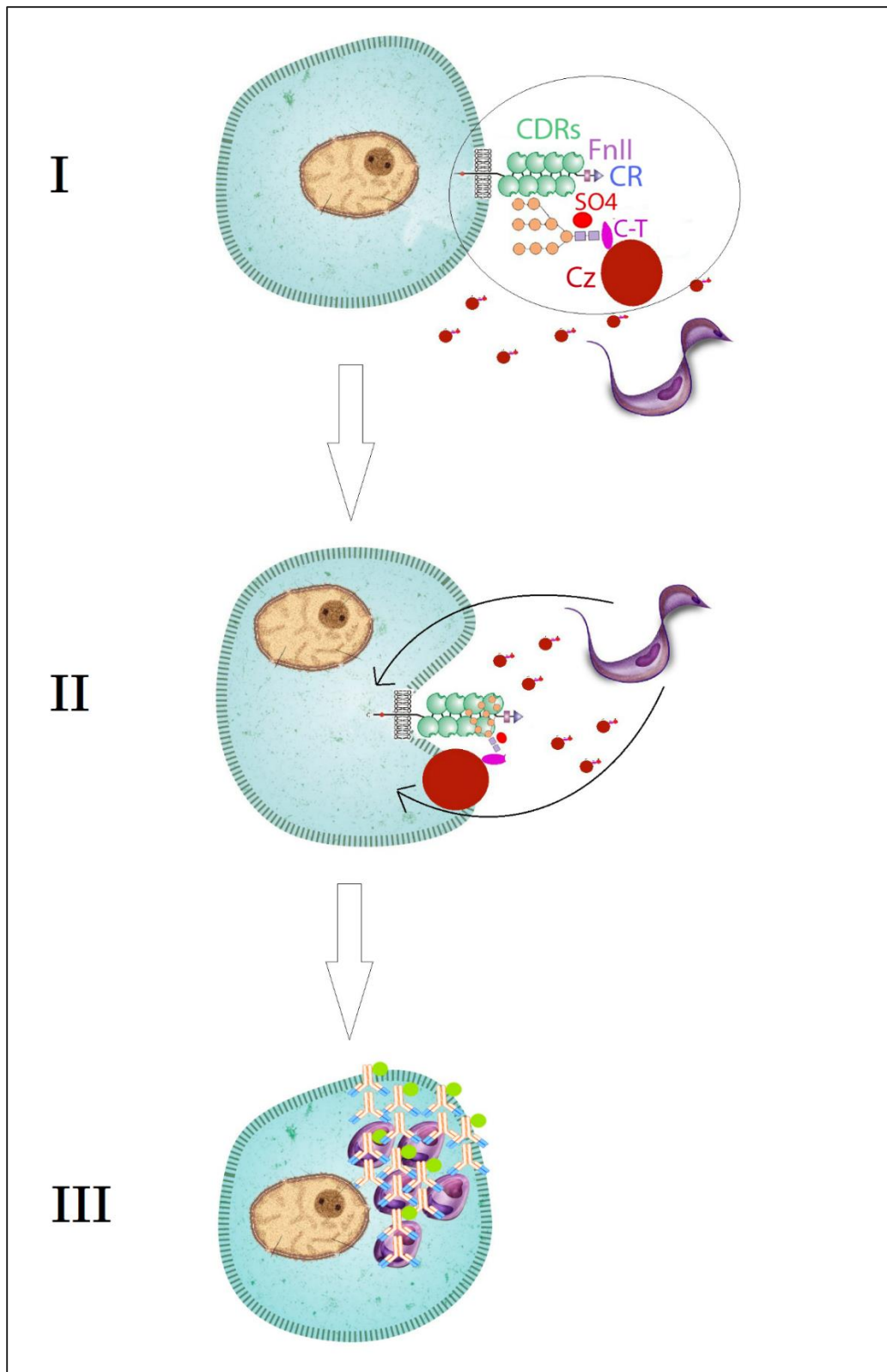


Figura 28. Esquema del modelo de infección de cardiomiocitos del hospedador por trypomastigotes de *T. cruzi* vía receptor de manosa.

El esquema muestra: I- la interacción descrita entre Cz y el receptor de manosa (Garrido *y col.*, 2011), II- la vía de internalización propuesta para este receptor (Soeiro *y col.*, 1999) y III- La detección de amastigotes por inmunofluorescencia directa sobre las células infectadas. Nuestros resultados proponen que existe una participación de los sulfatos de la Cz en la infección a través de la interacción de estos epitopes con el dominio CR del receptor (Liu *y col.*, 2000).

A partir de los resultados expuestos en los ensayos de infección de la sección 2.2.7 de resultados, proponemos un modelo de infección involucrando la interacción entre la Cz liberada al medio por los trypomastigotes de *T. cruzi* y el receptor de manosa expresado en los miocardiocitos del hospedador.

El receptor de Manosa contiene un dominio rico en cisteína de unión a azúcares sulfatados (CR), un dominio de fibronectina tipo II (FNII), y dominios de reconocimiento de carbohidratos (CDRs) (Martinez-Pomares *y col.*, 2001). (Cz) Cruzipaina, (C-T) dominio C-terminal de la Cz, (SO₄) sulfatación de la N-acetil hexosamina presente en la N-glicosilación del C-T de la Cz.

Parte 2:**2.2. Siglecs, Sulfatos e Inmunomodulación en *T. cruzi***

Las Siglecs reconocen fundamentalmente estructuras que contengan ácido siálico, y aunque la interacción entre las Siglecs y *T. cruzi* fue demostrada, poco se conoce acerca de los factores que regulan dicho reconocimiento. Si bien el nivel de sialidación del parásito es determinante en esta interacción, recientes descubrimientos hacen hincapié en que otras modificaciones deberían contribuir para que ocurra el cambio de interacción de *Cis* a *Trans* de las siglecs con sus ligandos (Redelinghuys *et al.*, 2011).

Esta parte del trabajo de Tesis tiene como objetivo dilucidar si la sulfatación es uno de los factores que contribuyen en el reconocimiento del parásito por medio de esta lectina. Como modelo de siglec se usó la Siglec-E murina, ortóloga de la Siglec-9 humana. Para poder reconocer fácilmente la marca generada por Siglec-E mediante anticuerpos conjugados comerciales, se utilizó en todos los ensayos una proteína de fusión Siglec-E-Fc. La secuencia genética codificante para esta proteína se obtuvo a partir de un plásmido pcDNA3.1+ cedido por el laboratorio de Thomas Jacobs (Departamento de Inmunología, Bernhard Noth Institute for Tropical Medicine, Hamburg, Germany). Mediante técnicas de clonado y PCR se aisló la secuencia codificante y se ligó a un plásmido LeGO Ic2 el cual posee las características necesarias para expresar genes en células eucariotas además de una proteína de marcación de las células transfectadas denominada “mCherry”. Con este plásmido primero se transformaron bacterias *E.coli* top 10 con el fin de expandir el mismo y luego de la correspondiente purificación de ADN plasmídico se transfectaron células CHO por electroporación. Del sobrenadante de dichas células se purificó la proteína de fusión Siglec-E-Fc. El Fc (Fragmento cristalizante) fusionado corresponde al Fc de la IgG₁ humana. La Cz, fue utilizada como modelo de proteína sulfatada.

2.2.1. Localización de los ligandos de las Siglecs en el parásito y reconocimiento de las proteínas de membrana y de las fracciones subcelulares de Tul 2 por Siglec-E

Antes de evaluar la participación de los sulfatos en la interacción con esta lectina, llevamos a cabo la localización de los ligandos de Siglec-E en el parásito. Para ello, se obtuvieron fracciones subcelulares a partir de un cultivo axénico de epimastigotes de la cepa Tul 2 de *T. cruzi*. Luego de la ruptura de los parásitos con carburo de silicio, se separaron las siguientes fracciones por centrifugación diferencial: Gránulos Grandes (GG) y Gránulos Pequeños (GP) formados por vesículas mitocondriales, lisosomas y glicosomas en diferente proporción (Duschak y Cazzulo, 1991); Nuclear (N); Citosólica o Soluble (S); y Microsomal (M) que contiene principalmente retículo endoplasmático y membrana plasmática. Posteriormente, se evaluó el reconocimiento de Siglec-E por las diferentes fracciones subcelulares mediante ensayos de ELISA, en los cuales dichas fracciones constituyeron la fase inmóvil. Se determinó el enriquecimiento de las fracciones subcelulares en organelas o partes de la célula específicas mediante la comparación de los niveles enzimáticos de marcadores específicos.

De todas las fracciones examinadas, la única que poseía ligandos para Siglec-E fue la fracción microsomal (Fig. 29 A). Este resultado fue revalidado en un ensayo similar en el cual la fracción microsomal fue reconocida por la lectina Mal II (Maackia Amurensis Lectin II), a diferencia del resto de las fracciones que no mostraron reconocimiento (Fig. 29 B). Mal II tiene una reconocida afinidad por ácido siálico y es frecuentemente utilizada para la detección del mismo, especialmente en su unión $\alpha 2,3$ (Kim *y col.*, 2014). Ensayos de ELISA posteriores realizados a partir de glicoesfingolípidos sulfatados y neutros de epimastigotes de Tul 2 con Mal II y Siglec-E, descartaron que estas macromoléculas contribuyeran al reconocimiento de la fracción microsomal por ambas lectinas. Este resultado que realizamos a modo de control está de acuerdo con el hecho de que el ácido siálico no está presente en los en glicoesfingolípidos o sulfatados de *T. cruzi*.

Finalmente, dado que no fue factible hacer extensiva la separación subcelular a los trypomastigotes, se realizaron ensayos de ELISA a partir de extracciones de proteínas de membrana tanto en epimastigotes como en trypomastigotes de la cepa Tul 2 para determinar si efectivamente éstas eran las responsables de la interacción con ambas lectinas que se observó con la fracción microsomal (Fig. 29 C).

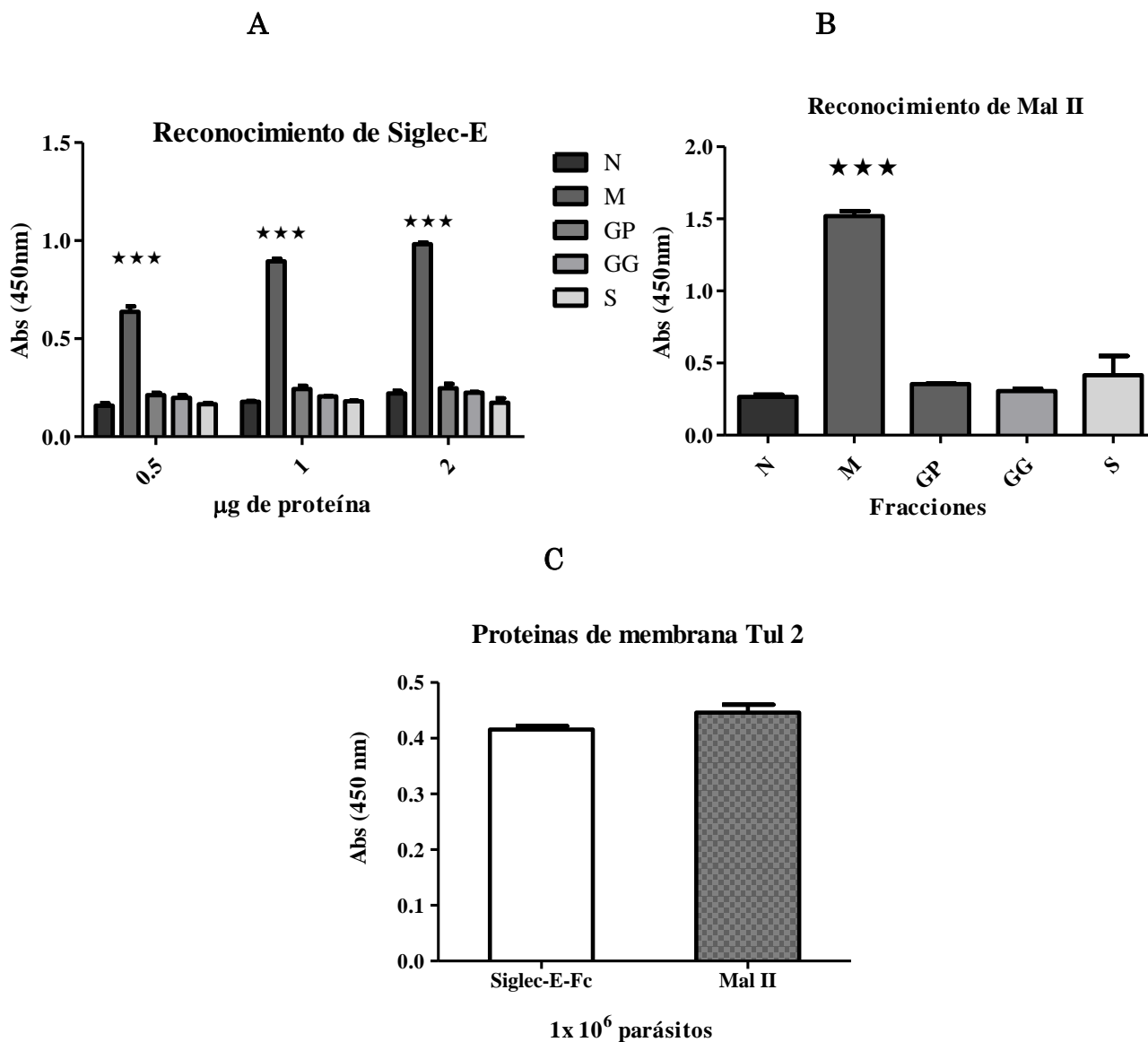


Figura 29. Reconocimiento de las proteínas de membrana y de las fracciones subcelulares de Tul 2 por Siglec-E

A-El gráfico representa los resultados obtenidos en ensayos de ELISA del reconocimiento de Siglec-E-Fc de las proteínas de las diferentes fracciones sub-celulares de epimastigotes de la cepa Tul 2 usando cantidades crecientes (0,5; 1 y 2 µg) de proteína. Como agente bloqueante y control negativo se usó BSA. Los resultados de Abs405nm de

este control fueron debidamente restados de las Abs medidas en todas las muestras. Fracciones: Nuclear (N), Microsomal (M), Gránulos pequeños (GP), Gránulos grandes (GG) y soluble (S). Análisis estadístico ANOVA de un factor. *** $p < 0,001$. B-1 μg de cada una de las fracciones utilizadas en la figura 15 A, fue sometido a ensayos de ELISA para evaluar el contenido de ácido siálico mediante el uso de la lectina Mal II, la cual es ávida por el reconocimiento de estas moléculas en unión α -2,3. C-Evaluación del reconocimiento de ambas lectinas: Siglec-E-Fc y Mal II. El gráfico muestra los resultados obtenidos en ensayos de ELISA realizados a partir de muestras de proteínas de membrana de trypomastigotes de la cepa Tul 2 extraídas a partir de 1×10^6 parásitos usando Triton X-100. En todos los casos los ensayos de ELISA fueron realizados por triplicado. Gráficos realizados en software Graphpad Prism

El hecho de que solo se encuentren cantidades significativas de ácido siálico mediante el reconocimiento con Mal II y ligandos de Siglecs en la fracción microsomal y no en el resto de las fracciones subcelulares, confirma, que estos azúcares cumplen un rol específico en la interacción con moléculas del hospedador definitivo del parásito. Los resultados expuestos en la sección 2.2.1 acorde a lo demostrado por Erdmann en 2009 (Erdmann *y col.*, 2009) sugieren que el parásito dirige específicamente los ligandos de Siglecs, exponiéndolos para interaccionar con estas lectinas en su hospedador, con el fin de regular la respuesta inmunológica. Concretamente estos ligandos estarían situados únicamente en las glicoproteínas del parásito.

2.2.2 Unión de la Cz de membrana a Siglec-E-Fc

Una vez ubicados los ligandos de Siglecs en el parásito propiamente dicho, se decidió buscar ligandos en el material que este libera al medio. Para llevar a cabo dicho estudio se utilizó sobrenadante de trypomastigotes metacíclicos de la cepa CL Brener obtenidos por generación espontánea (Duschak *y col.*, 2006), por ser esta cepa la que presentaba mejor diferenciación y ser representativa de la expresión de todos los genes del proyecto genoma de *T. cruzi* (El Sayed, *y col.*, 1995). Se realizó una cromatografía de afinidad a Siglec-E-Fc. Para ello, se le acopló Siglec-E-Fc como ligando a una columna de Sefarosa 4B activada con bromuro de cianógeno. El sobrenadante obtenido a partir de los trypomastigotes metacíclicos se pasó por la columna, se lavó y eluyó acorde a lo descrito en materiales y métodos. El material de elución de la columna se analizó mediante

una electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante evidenciando las bandas correspondientes a las proteínas liberadas al medio por los trypomastigotes, que contienen estructuras de unión a Siglec-E. Estas bandas proteicas se ubicaron en el rango de PM aparente de 50-70 kDa., valores correspondientes a las isoformas crossreactivas con Cz en ese estadio parasitario (Duschak *y col.*, 2006). Cabe recordar que estas estructuras deben contener ácido siálico. La presencia de Cz en el eluido de la columna de Siglec-E-Fc se pudo confirmar mediante la técnica de western blot utilizando anticuerpos policlonales de conejo específicos contra esta proteína. Destacamos que el hecho de que la muestra fuera sobrenadante de trypomastigotes permite confirmar que las isoformas de Cz de membrana son capaces de unirse a Siglec-E. (Fig. 30). Este resultado indica que las potenciales isoformas de Cz de membrana al igual que la lisosomal en epimastigotes se encuentran sialidadas. Teniendo en cuenta que el peso molecular aparente de las bandas a través del análisis de la electroforesis supera los 50 kDa, no se puede descartar el hecho de que algunas de ellas pudieran ser parte de la familia de mucinas *TcMUC* las cuales contienen también ácido siálico y conforman gran parte de las proteínas de membrana de los trypomastigotes (Buscaglia *y col.*, 2004).

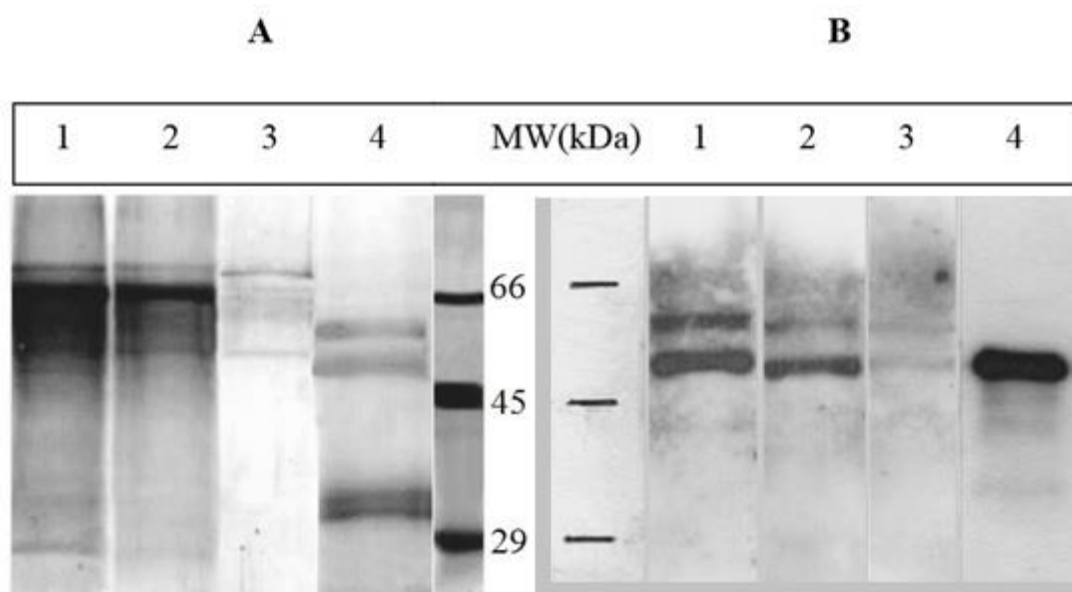


Figura 30. Purificación de isoformas de Cz de membrana por cromatografía de afinidad a Siglec-E-Fc-Sefarosa.

A- SDS-PAGE 10 % en condiciones desnaturalizantes 1-Sobrenadante de trypomastigotes metacíclicos de la cepa CL Brener obtenidos por diferenciación espontanea. 2- Percolado de la cromatografía de afinidad entre el sobrenadante y la columna de Siglec-E Sefarosa. 3- Eluido de la columna de Siglec-E. 4- Cz control purificada a partir de epimastigotes de la cepa Tul 2 acorde a lo descrito en materiales y métodos B- Western blot revelado con suero policlonal de conejo anti-Cz realizado con muestras obtenidas a partir de la cromatografía de afinidad con sobrenadante de trypomastigotes metacíclicos de CL brener obtenidos por diferenciación espontanea (1); Percolado de la columna (2); Eluido de la columna (3); Cz (4).

Es necesario mencionar que el control de Cz utilizado en este ensayo proviene de una purificación parcial en Mono-Q a partir de epimastigotes. Esto se evidencia como dos bandas en la tinción de plata (Fig. 30 A) donde la superior corresponde a la Serina Carboxipeptidasa (SCP) y la inferior a Cz como señala el Western blot (Fig. 30 B). En trypomastigotes metacíclicos, a diferencia de epimastigotes, utilizando estas condiciones de corrida electroforética se pueden distinguir tres bandas crossreactivas con Cz mediante la técnica de western blot (Duschack *y col.*, 2006). En nuestro resultado solo pudimos evidenciar dos de ellas.

2.2.3 Participación de los sulfatos de la Cz en la interacción de Siglec-E

Para poder analizar la participación de los sulfatos en la interacción entre Cz y Siglec-E fue primordial verificar que efectivamente Siglec-E y Mal II reconocen los mismos epitopes de manera de poder establecer a Mal II como control de las técnicas siguientes. Para tal fin, se realizaron ensayos de competencia en citometría de flujo con trypomastigotes de *T. cruzi*, cepa Tul 2, los cuales fueron incubados con Siglec-E-Fc o con Mal II, por separado, o con Siglec-E seguido de Mal II (Fig. 31).

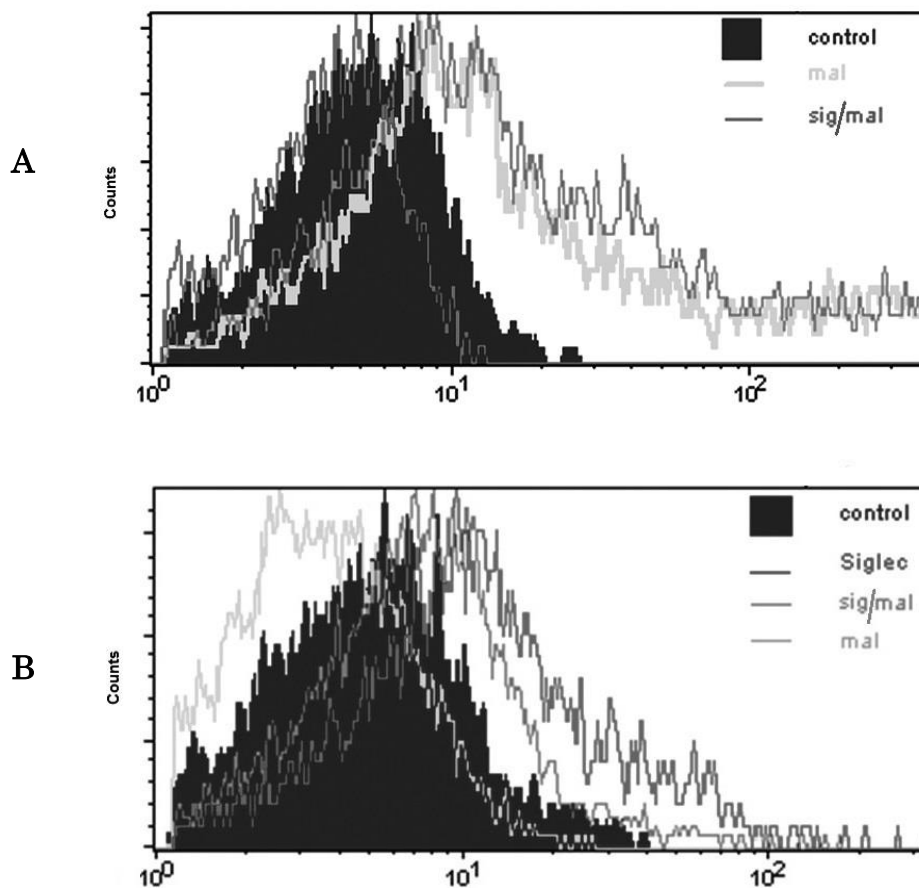


Figura. 31 Ensayo de competencia por ligandos de superficie de trypomastigotes de la cepa Tul 2 entre Siglec-E y Mal-II.

A y B. Histogramas de citometrías de flujo mostrando parásitos fijados y teñidos con las lectinas Siglec-E (Siglec), Mal II (mal) o con Siglec-E seguido de Mal II (sig/mal). Las lectinas fueron reveladas usando anticuerpos específicos acoplados a alofococianina (APC) para el caso de Mal II y ficoeritrina para Siglec-E. Al reconocimiento obtenido a partir de los parásitos incubados con los anticuerpos de detección específicos para el Fc humano se lo denominó Control. La unión de Mal II a los parásitos fue detectada en el canal Fl-4 útil para medir la presencia de alofococianina (APC) (A) y la unión de Siglec-E fue detectada midiendo la presencia de Ficoeritrina (PE) en el canal Fl-2 (B).

Los datos del ensayo de competencia realizados mediante citometría de flujo mostraron que el reconocimiento de Siglec-E-Fc por su ligando, decrece luego de agregar Mal II (sig/mal), respecto del reconocimiento de Siglec-E-Fc en los parásitos incubados solamente con esta lectina (Siglec) (Fig. 31 B). Por otro lado, el reconocimiento de Mal II se mantuvo constante cuando los parásitos fueron preincubados con Siglec-E-Fc (sig/mal), es decir que la intensidad del reconocimiento por los parásitos resultó semejante a la observada en ausencia de pre-incubación con Siglec-E-Fc (Mal II) (Fig. 31 A). En conjunto, estos resultados

señalaron que ambas lectinas compiten por el mismo ligando y que Mal II presenta una mayor afinidad por el ligando en cuestión. Por otro lado, es importante notar que existe un reconocimiento residual de Siglec-E-Fc tras el agregado de Mal II reflejado en la figura 17 B. Teniendo en cuenta la teoría, esto podría deberse a que las Siglecs además de reconocer ácido siálico unido en α -2,3 pueden reconocerlo en α -2,6 o α -2,8, lo cual no es característico de la lectina Mal II, que solo presenta reconocimiento por su ligando en α -2,3 (Kim *et al.*, 2014; Crocker *et al.*, 2007). Una vez establecido Mal II como control de nivel de sialidación, se procedió a evaluar la participación de los sulfatos de la Cz en la unión de esta glicoproteína a Siglec-E-Fc. De esta manera, los cambios en los niveles de ácido siálico se verían reflejados en el reconocimiento de ambas lectinas, y los cambios en el nivel de sulfatación se deberían ver reflejados solo en el reconocimiento de Siglec-E ya que Mal II no presenta interacción por este tipo de modificaciones.

Tanto Cz como su dominio C-terminal (C-T) fueron utilizados para realizar ELISAs con el fin de evaluar el reconocimiento de Siglec-E por estas moléculas. Para establecer una comparación, se utilizaron también Czd y C-Td obtenidas luego de un proceso de desulfatación química. Este tipo de desulfatación involucra una incubación a 100 °C, resultando inevitable la desnaturalización de las muestras. Como consecuencia de esta desnaturalización, las glicosilaciones presentes en las proteínas sometidas a dicho proceso pueden presentar mayor exposición. Por lo tanto, para evaluar las consecuencias de este efecto, se sometió a la Cz a tratamientos de desnaturalización parcial (CzP*) y se comparó su capacidad de unir Mal II con la de la proteína en estado nativo y con la sometida al proceso de desulfatación química mediante ELISA (Fig. 32 A). Los resultados obtenidos indicaron que el efecto de la desnaturalización aumentó la unión a la lectina, probablemente por el aumento en la exposición del ácido siálico. A pesar de intensificar los procesos de desnaturalización, el valor de la media de unión de la Czd por la lectina se mantuvo levemente mayor a la de la Cz desnaturalizada (Cz*) sin resultar significativas. Lo mismo sucedió para el caso de C-T y C-Td

(Fig. 32 B). Por este motivo, las medias obtenidas para Czd y C-Td fueron consideradas como 100 % de exposición y utilizadas para corregir el valor de unión a Siglec-E de Cz* y C-T*, respectivamente, en relación a esta exposición (Fig. 32 C). Es importante aclarar que el C-T no modificó significativamente su afinidad por Mal II luego del tratamiento de desnaturalización (C-T*). Los resultados reflejan claramente una contribución de los sulfatos en la unión de la lectina Siglec-E a la Cz y al C-T. Además, el hecho de que la Cz* una más Siglec que el C-T indica que los ligandos para esta lectina no solo se encuentran en el dominio C-T de la molécula de Cz.

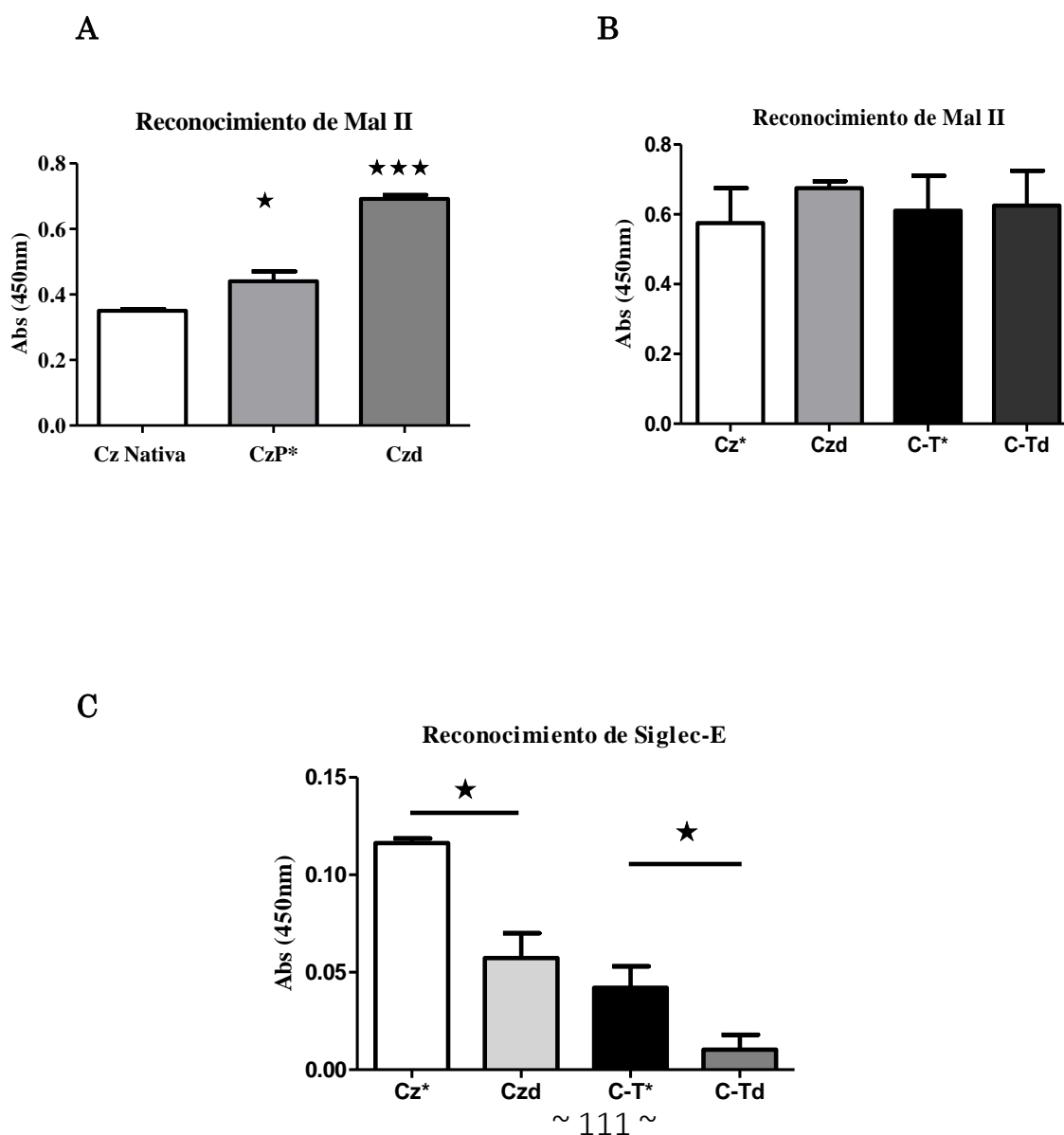


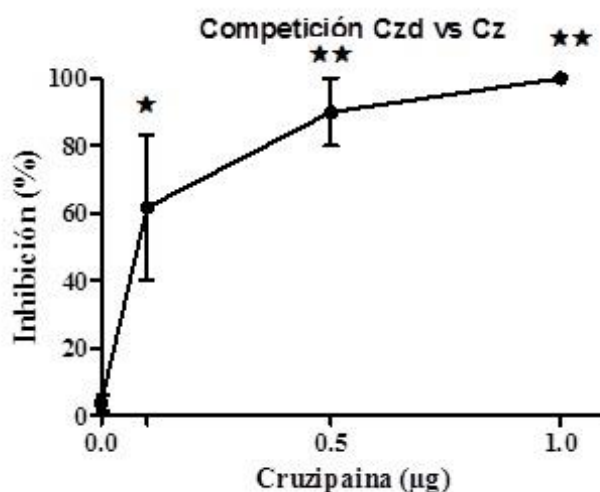
Figura 32. Contribución de los grupos sulfato presentes en la N-Glicosilación del dominio C-T de la Cz en la interacción con Siglec-E-Fc.

Los gráficos representan ELISAs realizados para medir el reconocimiento de Mal II por A) Cz nativa, Cz desnaturalizada parcialmente (CzP*) y cruzipaina desulfatada químicamente (Czd). B) Cruzipaina desnaturalizada (Cz*), Cz desulfatada (Czd), C-T desnaturalizado (C-T*) y C-T desulfatado (C-Td). Los valores obtenidos en estos ensayos fueron utilizados para corregir los resultados obtenidos en los ELISAs contra Siglec-E acorde a la exposición de ácido siálico para cada molécula. C) Relación entre el reconocimiento de Mal II (exposición de ácido siálico) y reconocimiento de Siglec-E-Fc por: Cz*, Czd, C-T* y C-Td. A partir de los valores de reconocimiento de Mal II hacia Czd y C-Td obtenidos en el gráfico 18 B, considerados como 100 % de exposición de ligandos, se relativizaron los reconocimientos de Siglec-E a Cz* y C-T* respectivamente. El análisis estadístico fue realizado mediante test de ANOVA donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$. Gráficos realizados en software Graphpad Prism

Con el objetivo de confirmar la participación de los sulfatos en la interacción de la Siglec-E por sus ligandos en la Cz se realizó un ensayo de competencia en placa de ELISA para el cual la fase estacionaria estaba compuesta de 1 μg de Czd únicamente. Las placas sensibilizadas con 1 μg de Czd fueron sometidas a la incubación con diferentes concentraciones de Cz y una concentración constante de Siglec-E. Una completa inhibición de la señal producto de la interacción entre Siglec-E-Fc y Czd se logró al agregar 1 μg de Cz en competencia. Si tenemos en cuenta que al agregar 0,5 μg de Cz hay en competencia 1,5 μg de proteína en total, podríamos predecir que en caso de no haber diferencia entre las especies en competencia los 0,5 μg de Cz representarían el 33 % de la interacción con Siglec-E. Sin embargo, dado que la inhibición sobre el reconocimiento de la Czd fue del 80 %, podemos estimar que la presencia del sulfato en la Cz estaría incrementando la afinidad en un 250 %. Sin embargo, esta aproximación debería ser corroborada por ensayos de Resonancia Plasmónica de Superficie (BIACORE) (Fig. 33 A). El mismo ensayo de competencia se realizó utilizando Cz en la fase estacionaria en lugar de Czd e incubando a las placas sensibilizadas con concentraciones constantes de Siglec-E-Fc y diferentes concentraciones de Czd (0,1; 0,5 y 1 μg) para corroborar lo observado en el primer ensayo. De los datos de este segundo ensayo obtuvimos un máximo de inhibición de alrededor del 25% de la señal para la competencia con 1 μg de Czd (no se muestra). Este resultado confirmó la contribución de los epitopes sulfatados en la interacción de Cz con Siglec-E. Paralelamente se realizó

un segundo ELISA de competencia en el cual la fase estacionaria estaba compuesta por la fracción microsomal utilizada en los ensayos correspondientes a la sección 2.2.1. A esta fase se la sometió a una competencia con Siglec-E y Cz o Czd en diversas cantidades (0, 1 y 2 μg) manteniendo fija la concentración de Siglec-E (Figura 33 B). El control de interacción entre la fracción microsomal y la Siglec-E corresponde a la señal obtenida en ausencia de Cz o Czd (0 μg). Si bien ningún efecto pudo ser observado en presencia de 1 μg de Cz o Czd como competidores en comparación con el control, un llamativo aumento en la interacción de siglec-E por la fracción microsomal se observó en presencia de 2 μg de Czd como competidor. Cabe mencionar que este efecto no fue observado cuando se utilizaron 2 μg de Cz.

A



B

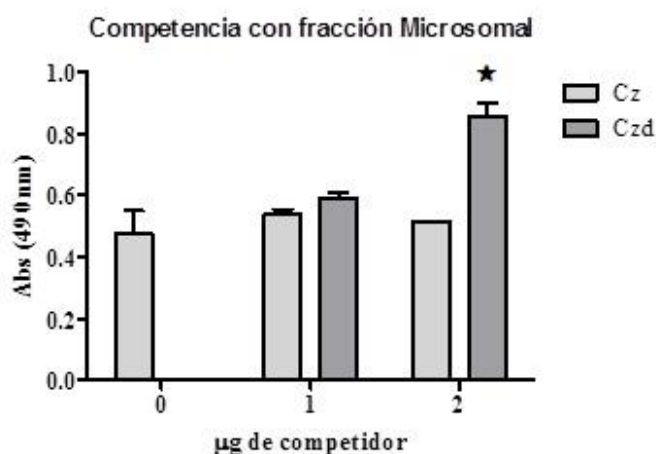


Figura 33. ELISA de competencia por Siglec-E entre Czd y Cz.

Los gráficos representan los resultados obtenidos en los ELISA de competencia para los cuales se usó A-1 μg de Czd o B-1 μg de fracción microsomal, como antígeno para sensibilizar las placas. Posteriormente, las placas sensibilizadas y bloqueadas fueron incubadas con cantidades crecientes de A-Cz (0,1; 0,5 y 1 μg) o B-Cz o Czd (0, 1 y 2 μg) y con cantidades constantes de Siglec-E-Fc. El revelado fue realizado con anticuerpos anti-Fc humano acoplado a HRP. El análisis estadístico fue realizado mediante test de ANOVA donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ y el post test fue Dunnett. Gráficos realizados en software Graphpad Prism

En conjunto los resultados expuestos en las secciones 2.2.2 y 2.2.3 muestran que la Cz secretada por los trypomastigotes metacíclicos al igual que la Cz lisosomal de epimastigotes (Barboza *y col.*, 2003), contienen ácido siálico, ya que es reconocida por Siglec-E. Además de la contribución del ácido siálico, los resultados obtenidos por ELISA directo y de competencia coinciden en que la sulfatación de esta enzima, modificación que estaría presente en los tres estadios del parásito (Ferrero *y col.*, 2014) podría tener un rol aumentando la afinidad de la Siglec-E por los oligosacáridos de la Cz de manera determinante. La figura 19b, aporta un enfoque sobre la participación que podrían tener los sulfatos en el contexto proteico en el cual interactúan siglec-E con sus ligandos. Teniendo en cuenta que la fracción microsomal contiene Cz en su estado nativo, es esperable que la competencia con Cz no modifique sustancialmente la interacción entre esta fracción y la lectina. Sin embargo, el exceso de Cz desulfatada frente a los ligandos expuestos en la fracción microsomal aumentó significativamente la interacción entre estos ligandos y Siglec-E la cual parecería estar afectada por el nivel de sulfatación del entorno. En conjunto, los resultados de las secciones 2.2.2 y 2.2.3, indican que la Cz estaría contribuyendo a la interacción entre el parásito y Siglec-E, a través del ácido siálico y el grupo sulfato el cual incrementa significativamente la interacción. Ambas estructuras, presentes en la Cz podrían tener como finalidad, lograr una inmuno-modulación de la respuesta hacia el patógeno.

2.2.4. Participación de los sulfatos presentes en las moléculas de los trypomastigotes en la interacción con Siglec-E.

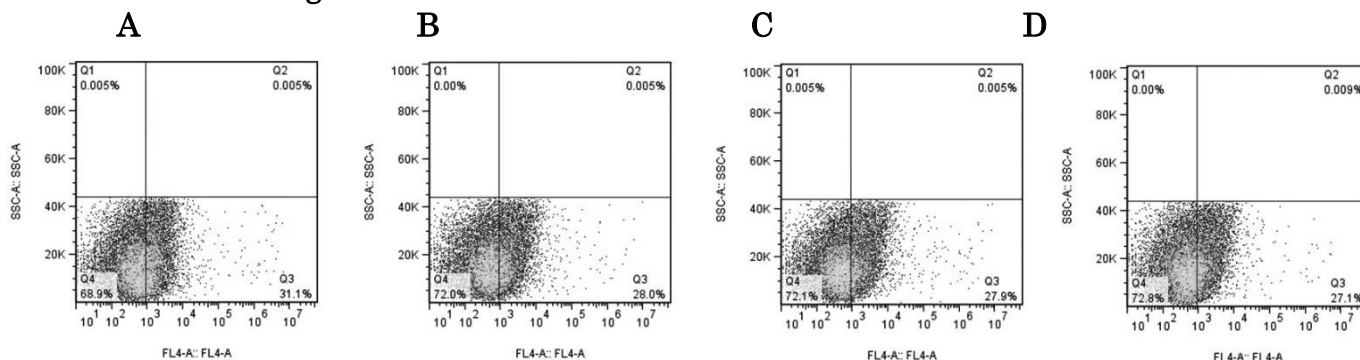
Después de corroborar que los sulfatos de la Cz contribuyen significativamente a la unión de Siglec-E con su ligando, resultó importante evaluar si esta contribución sustancial de los sulfatos se mantenía frente al reconocimiento de esta lectina por la superficie del parásito. Para tal fin, se volvió a utilizar clorato de sodio a diferentes concentraciones (0, 10, 20 y 40 mM) y en presencia de este inhibidor, se crecieron trypomastigotes de la cepa Tul 2 de *T. cruzi* mediante la infección de células Hg39.

La unión de los parásitos derivados del tratamiento con las diferentes concentraciones de clorato a Siglec-E-Fc, se evaluó mediante citometría de flujo. Para descartar que las posibles diferencias se pudieran deber a variaciones en el nivel de ácido siálico expuesto por el parásito producidas por el uso del clorato de sodio, se realizaron los controles pertinentes utilizando la lectina Mal II. Cabe mencionar que en este ensayo no solo se evalúa la participación de los sulfatos de la Cz si no que se también se tiene en cuenta la participación de cualquier otro potencial epítoto sulfatado presente en los trypomastigotes que estén expuestos a nivel de membrana plasmática. Mientras que el nivel de ácido siálico en los parásitos, reflejado por la unión de Mal II, se mantuvo constante (Fig. 34 E, F, G, H; Fig. 34 II), la interacción de Siglec-E-Fc por los mismos descendió concomitante con el aumento de la concentración de clorato de sodio (Fig. 34 A, B, C, D- Fig. 34 I).

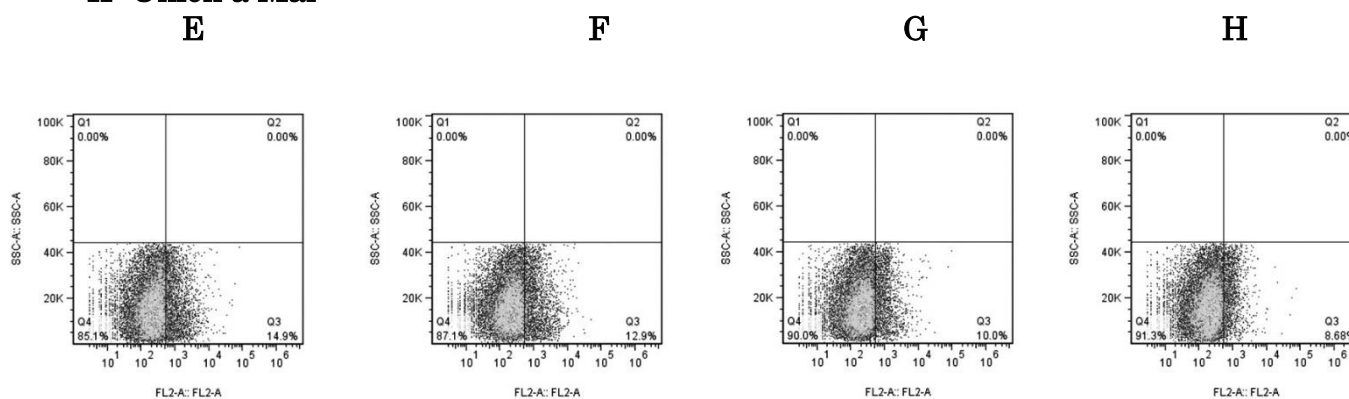
Los datos obtenidos al igual que lo observado a partir de la inhibición de la vía de sulfatación utilizando clorato de sodio, sostienen firmemente que los sulfatos contribuyen incrementando la interacción entre Siglec-E y los trypomastigotes de Tul 2. Antígenos como la Cz, estarían participando de este reconocimiento cuyo fin es modular la respuesta inmunológica, principalmente inflamatoria, acorde a los resultados expuestos por Erdmann en 2009 donde se reporta que la interacción de Siglec-E con un anticuerpo específico contra esta

lectina, disminuye la expresión de interleucina 12 (IL-12) en células dendríticas activadas y el nivel de INF γ en células T (Erdmann *et al.*, 2009).

I. Unión a Siglec



II: Unión a Mal



III

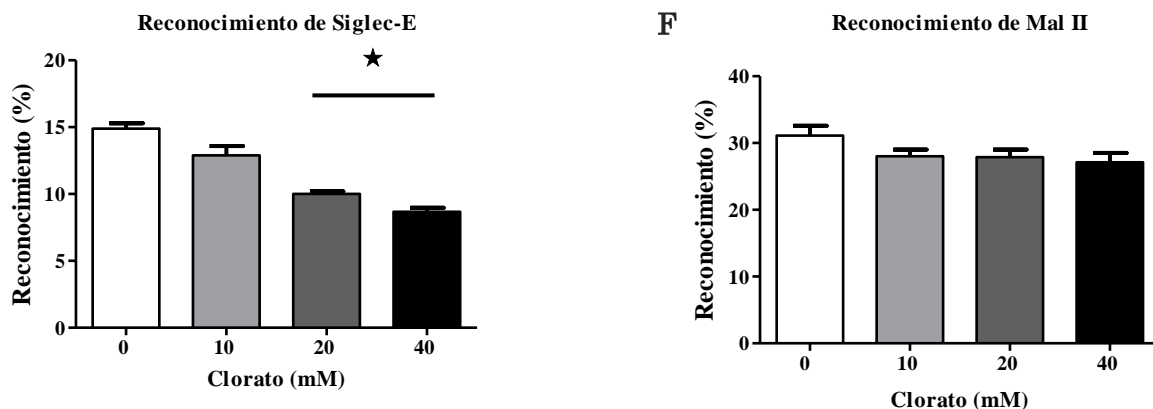


Figura 34. Participación de los sulfatos presentes en moléculas de trypanomastigotes en su interacción con Siglec-E. Resultados de citometría de flujo que reflejan la unión de Siglec-E (A, B, C, D, I) y Mal II (E, F, G, H, II) a trypanomastigotes de *T. cruzi*, cepa Tul 2, tratados con clorato de sodio. A

y E corresponden a los controles sin tratar para Siglec-E y Mal II respectivamente. B y F corresponden al tratamiento con 10 mM. C y G al tratamiento con 20 mM, y D y H al tratamiento con 40 mM. Los eventos positivos obtenidos en los dotplots fueron reflejados en los gráficos de barra I y II, donde I corresponde a los resultados de Siglec-E y II a los de Mal II. El revelado fue realizado con anticuerpos anti-Fc humano acoplado a HRP. El análisis estadístico fue realizado mediante test de ANOVA donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ y el post test fue Dunnett. Gráficos realizados en software Graphpad Prism.

Teniendo en cuenta que el nivel de afinidad entre las Siglecs y sus ligandos determina el cambio de interacción de *cis* a *trans* y que a su vez, es este cambio es el que promueve una señalización efectiva mediante los dominios ITIM de estas lectinas (Crocker *y col.*, 2007). Sumado a las evidencias que muestran que la sobre expresión de ácido siálico no sería suficiente para determinar este cambio de interacción, el cual conduce a la anergia de células del sistema inmune innato (Redelinghuys *y col.*, 2011), nuestros resultados sugieren que los sulfatos podrían ser los desencadenantes del cambio en el tipo de interacción. Este efecto ocasionaría un detrimento en la activación y/o proliferación de las células del sistema inmune encargadas de atacar al parásito.

Nuestro grupo ha reportado previamente que los sulfatos presentes en la N-Glicosilación del dominio C-T de la Cz, son blanco de una respuesta humoral específica en ratones (Acosta *y col.*, 2008). Por otro lado, pacientes con enfermedad de Chagas también desarrollan una respuesta IgG2 específica contra estos epitopes, presentes en diferentes glicoconjugados del parásito, la cual se correlaciona inversamente con la severidad de la patología crónica ocasionada por la infección (Acosta *y col.*, 2008, 2012). Los resultados obtenidos con Siglec-E respecto del nivel de sulfatación del parásito y particularmente de la Cz en este trabajo, son para nuestro grupo una evidencia más de la contribución de los sulfatos en la inmuno-modulación de la respuesta del hospedador contra la infección por *T. cruzi*.

Sabemos que la Cz, cisteína proteínasa de *T. cruzi* implicada en diversos procesos metabólicos del parásito, desde los cambios de estadios hasta la invasión de las células del hospedador, contiene un dominio C-T para el cual no hay descrita hasta hoy en día una función específica. Sin embargo, diferentes

investigaciones apuntan a la importancia de este dominio, inmuno-dominante en esta glicoproteína, el cual logra desviar la respuesta humoral del hospedador protegiendo al dominio catalítico de la enzima y en consecuencia su actividad enzimática. A partir de la importancia que adquiere este dominio y de la incapacidad de obtener un cristal de la molécula entera que lo incluya, nuestro grupo se dedicó a caracterizar las glicosilaciones presentes en el mismo. Como resultado, describimos por primera vez de manera completa una *O*-Glicosilación y una *N*-glicosilación situadas en el C-T de Cz. La primera glicosilación, constituida por un residuo de N-Acetil Glucosamina, constituyó un epítopo común con la miosina, el cual estaría implicado en la reactividad cruzada que existe entre ambas proteínas. La segunda glicosilación, mucho más compleja que la primera, está compuesta por dos N-acetil hexosaminas, a partir de las cuales se extiende una ramificación de alta manosa que presenta diversas sustituciones con residuos como ácido siálico y fucosa. El grupo de trabajo describió por primera vez la presencia de grupos sulfato en una glicoproteína de Trypanosomátidos. Particularmente, localizados en una de las N-Acetil hexosaminas de los oligosacáridos de tipo de alta manosa unidos a la Asn 255 del dominio C-T de la Cz. Teniendo en cuenta la importancia que representa el dominio C-T en la respuesta inmune, nuestro grupo se enfocó en determinar si la sulfatación participaba en la antigenicidad del dominio y en qué medida. Los primeros resultados obtenidos indicaron que el sulfato presente en la *N*-Glicosilación del C-T era comprendido como un epítopo singular en la respuesta inmunológica, reconocido exclusivamente por un subconjunto de anticuerpos de tipo IgG2b en ratones. Paralelamente determinamos que este epítopo podría tener implicancias en el daño del tejido cardíaco característico en la enfermedad de Chagas, ya que su presencia generaba alteraciones estructurales en este tejido en ratones inmunizados con Cz y con C-T. Además, se determinó también que existe una respuesta humoral específica de IgG2 para este epítopo en seres humanos infectados por *T. cruzi* y que esta respuesta disminuye a medida que aumenta la severidad y el grado de compromiso cardíaco en la enfermedad en su estadio crónico. Por otro lado, se pudo demostrar también, entre diferentes estructuras

sintéticas aniónicas estudiadas, que el epítopo sulfatado N-acetil d-glucosamina-6-sulfato fue el que mostró el mejor reconocimiento por los sueros de pacientes con enfermedad de Chagas, siendo esta la estructura sulfatada expuesta en la Cz natural. Finalmente, se demostró también que este epítopo era el motivo responsable de reactividad cruzada entre los sulfátidos del parásito y la Cz.

En este contexto, el presente trabajo intentó no solo profundizar el análisis sobre el impacto de la sulfatación presente en la molécula de Cz durante la infección por *T. cruzi*, proponiendo la participación de los sulfatos de la Cz en la infección posiblemente a través de la interacción de estos epítopos con el dominio rico en cisteína de unión a azúcares sulfatados (CR) del receptor de manosa, sino también describir la vía de sulfatación y lograr un enfoque más general acerca de la importancia de esta vía en el metabolismo del parásito y en la enfermedad de Chagas. En conjunto nuestros resultados sostienen que la sulfatación tendría un rol tanto en la estructura y el metabolismo del parásito, como en el proceso de invasión celular, y sugieren que las glicoproteínas silalidas del parásito, que contienen grupos sulfatos como la Cz, interaccionan con Siglec-E, lectina ortóloga de la Siglec-9 humana, modulando la respuesta inmune del hospedador, favoreciendo la parasitemia y la persistencia del parásito.

Los datos presentados reivindican la importancia del proceso de sulfatación en el parásito y lo exponen como un posible blanco terapéutico. El hecho de que exista en la secuencia genómica de *T. cruzi* un gen codificante para la proteína PAPS reductasa, enzima clave en la síntesis de esta molécula, en conjunto con los resultados obtenidos en este trabajo, logran consolidar la noción de que la sulfatación en *T. cruzi* ocurre mediante un mecanismo que utiliza a PAPS como molécula dadora y requiere de una sulfotransferasa (ST). Si bien en el genoma de *T. cruzi* no pudimos evidenciar una secuencia homóloga a las STs descritas en mamífero o incluso en protistas como *Dictyostelium discoideum*, es importante destacar que estas transferasas no presentan gran homología de secuencia, excepto por sus dos sitios de unión a PAPS, los cuales están conservados en gran parte de las mismas. Considerando indispensable la

existencia de una ST en el parásito ya que este utilizaría PAPS para llevar a cabo la sulfatación y teniendo en cuenta la ausencia de secuencias genómicas que podamos identificar como tales, incluso de sitios de unión a PAPS ordenados en una misma secuencia génica, creemos firmemente que esta vía es un potencial blanco terapéutico a tener en cuenta.

3. Conclusiones

Conclusiones obtenidas en la parte “I” de este trabajo de tesis:

- Tanto la Cz como los de sulfátidos en *T. cruzi* requieren para ser sulfatados, de una vía de sulfatación dependiente de 3'- fosfoadenosina-5' fosfosulfato (PAPS). Esta molécula es ampliamente reconocida como dadora de grupos sulfatos en las reacciones de sulfatación catalizadas por sulfotransferasas específicas.
- La inhibición de la sulfatación en las formas epimastigotes del parásito tiene un impacto estructural y metabólico marcado a partir de concentraciones superiores a 50 mM de clorato de sodio.
- Los epitopes sulfatados se encuentran expuestos en la superficie de los trypomastigotes.
- Estos epitopes sulfatados participan en el proceso de invasión del parásito.
- Los sulfatos presentes en la Cz están implicados en el proceso de invasión del parásito.

Conclusiones obtenidas en la parte “**II**” de este trabajo de tesis:

- Los ligandos de Siglecs están preferentemente localizados en glicoproteínas expuestas en la membrana plasmática del parásito o liberadas al medio.
- Tanto la Cz lisosomal de epimastigotes como la Cz liberada al medio por trypomastigotes metacíclicos contienen estructuras que sirven como ligandos para Siglec-E.
- Los sulfatos de la Cz promueven la interacción entre esta glicoproteína y Siglec-E .
- El reconocimiento de Siglec-E por los trypomastigotes de *T. cruzi*, se ve aumentado de acuerdo al nivel de sulfatación expuesto por el microorganismo.

4. Materiales y Métodos

Parte I

Cultivo y cosecha de parásitos

Los epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Tulahuén, stock 2 fueron cultivados en caldo líquido monofásico BHT (BrainHeartTryptose) suplementado con 10 % SFB (suero fetal bovino de la marca Notocor inactivado a 56°C durante 35 minutos) y penicilina y estreptomycin (100 U/ml). Se cultivaron a 27 °C en oscuridad, con ambiente húmedo y en agitación continua a 100 rpm. La cosecha se realizó por centrifugación a 8000 rpm durante 12 minutos en una centrifuga Sorvall (usando los rotores GSA y SS34) y a una temperatura de 10 °C. Finalmente, se lavó 2 veces con PBS 1X y se guardó el pellet a -20 °C.

BHT: se preparó con Infusión cerebro-corazón 33 g/l, Tryptosa 3 g/l, Na₂HPO₄ 4 g/l, KCl 0,4 g/l, Glucosa 0,3 g/l y Hemina 20 mg/l.

Para la obtención del homogenato total de *T. cruzi* (Segura y col., 1974) utilizado en la titulación de los sueros por ELISA, se cultivaron los parásitos en medio líquido compuesto por infusión cerebro-corazón 5 g/l, extracto de levadura Difco 3 g/l, Na₂HPO₄ 10 g/l, KCl 0,4 g/l, NaCl 4 g/l, glucosa 4 g/l y hemina 20 mg/l.

Los diferentes medios de cultivo se llevaron a pH óptimo: 7.5 con NaOH 0,1 M y se esterilizaron con autoclave durante 20 min a 121 °C.

Purificación de Cruzipaína

La purificación de la Cz se llevó a cabo a partir de epimastigotes de *T. cruzi*. La primera parte de la purificación incluye la obtención del extracto libre de células. Para ello, se llevó a cabo la ruptura de los parásitos mediante dos ciclos consecutivos de congelado (a -20 °C) y descongelado seguidas de un período de congelado adicional de 48 h, luego del cual se descongelaron y resuspendieron en una solución de sacarosa 0,25 M y KCl 5 mM (3 ml/ gramo de parásitos). El homogenato resultante se centrifugó a 7000 rpm con el rotor SS34 durante 10

min a 5 °C, el sobrenadante (que se conserva en hielo) se recuperó y el precipitado se volvió a resuspender en la misma solución y se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min a 5 °C con el mismo rotor. Se recuperó el sobrenadante, se juntó con el anterior y ambos se clarificaron por centrifugación a 19000 rpm durante 30 min a 4 °C, descartando el sedimento. El sobrenadante clarificado es denominado comúnmente “extracto crudo”. A continuación se realizó una precipitación con solución saturada de sulfato de amonio pH 7,5, mediante goteo lento sobre el extracto hasta llegar a una concentración final de sulfato de amonio al 50 %. Esto se hizo manteniendo la temperatura del sobrenadante a 0 °C (baño en agua-hielo) y en agitación baja. Finalmente, la suspensión se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos a 5 °C (rotor SS34). En este caso, se recuperó el pellet, se resuspendió en TBS (buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,5- NaCl 150 mM), se dializó contra TBS 2 veces y se dejó durante toda la noche a 4 °C.

La segunda parte de la purificación de la Cz se realizó por medio de una cromatografía de afinidad a Concanavalina A (ConA). Para ello, al extracto libre de células dializándose le agregaron CaCl₂, MgCl₂ y MnCl₂ hasta alcanzar una concentración final 3 mM de cada uno, y el mismo se centrifugó a 10000 rpm durante 12 minutos a 5 °C (rotor SS34). El sobrenadante resultante se aplicó a la columna de ConA-Sefarosa, previamente lavada y equilibrada con el buffer TBS-cationes (Tris-HCl 50mM, NaCl 150mM, CaCl₂ 1mM, MgCl₂ 1mM y MnCl₂ 1mM), en forma de “batch” (con agitación suave a 4 °C durante 2 h) o en forma continua (3 pasajes por la columna a 4 °C). La columna se lavó con el mismo amortiguador TBS-cationes hasta absorbancia nula a 280 nm. La competencia y elución se realizó utilizando α -metil-manopiranosido 10 % en TBS-cationes. Para ello, se agregó el buffer de elución a la columna de ConA-Sefarosa, se cerró el flujo y se incubó a 37 °C durante 1 h. Luego, se recogieron fracciones de 1 ml que fueron monitoreadas por absorbancia a 280/230 nm. Se recuperaron las fracciones con actividad enzimática sobre sustrato sintético cromogénico benzoil-prolil-fenil-arginil-paranitroanilida (Bz-Pro-Phe-Arg-pNA), se juntaron y se dializaron contra Tris-HCl 50 mM pH 7.6 a 4 °C durante toda la noche.

El siguiente paso de purificación incluyó una columna de cromatografía de intercambio iónico Mono Q HRTM 10/10 equilibrada con el mismo buffer (Duschak *y col.*, 2001). Se realizaron algunas modificaciones para separar las isoformas de la Cz de la proteína contaminante SCP. La elución fue realizada usando un gradiente de NaCl 0-1M, con agregado de un paso isocrático a NaCl 180 mM. Se monitoreó por absorbancia a 280 nm. Las fracciones fueron recolectadas a una velocidad de flujo de 1 ml/min y se seleccionaron las fracciones adecuadas mediante ensayos de actividad enzimática frente a los sustratos sintéticos furil-acrilil-fenilalanil-fenilalanil (FA-Phe-Phe-OH) (para medir la actividad SCP) y Bz-Pro-Phe-Arg-pNA (para Cz). Las fracciones recolectadas fueron dializadas contra Tris-HCl 50 mM a 4 °C durante toda la noche.

Para calcular el rendimiento y el grado de pureza de todos los pasos de la purificación se llevó a cabo la determinación de proteínas y actividad enzimática frente a sustratos sintéticos cromogénicos, SDS-PAGE y Western Blot con suero policlonal específico para Cz en cada purificación. La determinación de proteínas se realizó mediante el método de Bradford (1976). El rendimiento de la purificación es el valor resultante de la división de (actividad total de la muestra pura)/(actividad total de la muestra inicial) (extracto crudo) multiplicado por 100. El grado de pureza está dado a partir de considerar la actividad específica (Actividad total/cantidad de proteína total) del extracto crudo como 1. Luego de la división de la actividad específica de la muestra purificada/actividad específica del extracto crudo surge el factor de purificación.

Obtención y purificación del dominio carboxilo-terminal de la cruzipaina

La obtención de este dominio se llevó a cabo mediante autoproteólisis de la Cz según Hellman *y col.*, 1991 con algunas modificaciones. Para la autoproteólisis, la enzima se resuspendió en buffer acetato de sodio 50 mM pH 6 y β -mercaptoetanol 10 mM y se incubó durante 48 h a 40 °C.

La purificación del dominio C-T se realizó por medio de una cromatografía de exclusión molecular utilizando BioGel P-30 como matriz. El producto de la

autoproteólisis se concentró hasta un volumen menor a 1 ml y se sembró en la base de una columna de 1,5 x 100 cm conteniendo el BioGel P-30 previamente lavado y equilibrado con el buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,6. La elución se realizó con el mismo buffer, a un flujo lento (3 gotas/min); se recogieron 130 fracciones de 20 gotas cada una y se siguió la elución por absorbancia a 280/230 nm. Se recuperaron dos tandas de fracciones, ambas con valores de absorbancia mayores al blanco utilizado. Antes de juntar las dos tandas de fracciones (una fracción correspondiente a los péptidos mayores a 30 kDa y la otra a los péptidos de menor tamaño molecular) se controló la separación correcta por medio de SDS-PAGE, tinción de plata y Western Blot utilizando suero policlonal específico anti-Cz (Barboza *y col.*, 2003). La determinación de proteínas se realizó por el método de (Lowry *y col.*, 1951).

Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las muestras se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida discontinuos de 10 condiciones desnaturalizantes (Laemmli *y col.*, 1970). Las muestras se disolvieron en buffer de siembra, se hirvieron a 100 °C durante 3 min y se sembraron. Los geles se corrieron a un voltaje constante de 110 volts. La estimación de los pesos moleculares se realizó haciendo referencia a los patrones de peso molecular comerciales (Bio-Rad) corridos en paralelo.

Revelado con Nitrato de Plata

Luego de la separación, los geles se fijaron con una solución de metanol: ácido acético: agua (25:5:20, v/v/v) durante 10 min, se pasó a una solución de metanol: ácido acético: agua (3,5:2,5:44) durante 10 min y se lavó luego con abundante agua deionizada durante 10 min. A continuación se incubó con una solución de Glutaraldehído 10 % durante 15 min. Se descartó la solución y se lavó con abundante agua deionizada durante 40 min, haciendo varios cambios. Se agregó el reactivo de plata, recién preparado, se incubó 10 min, se descartó y nuevamente se lavó con agua deionizada durante 5 min. Se incubó con la solución

reveladora hasta la aparición de manchas de la intensidad deseada y el revelado se detuvo por agregado de una solución de ácido acético 10 %.

-**Reactivo de Plata:** 1 ml de NH_3 se mezcló con 1 ml de NaOH 1M, se llevó a 10 ml con agua deionizada y se tituló, gota a gota y con agitación magnética, con 2 ml de solución acuosa de nitrato de plata 20 % recién preparada. Se llevó a 50 ml finales con agua deionizada.

- **Revelador:** 25 μl de formaldehído 37 % se mezclaron con 50 μl de ácido cítrico (50 mg/ml) y se llevaron a 50 ml con agua deionizada.

Ensayos de transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa y reacción con antisueros específicos (Western Blot)

Las proteínas separadas por SDS-PAGE fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa (Amersham Biosciences) durante 45 min a 300 mA en buffer Tris-Glicina, metanol 20 %. Para el revelado, las membranas se bloquearon durante 30 min con TBS-leche descremada 3 % y se incubaron durante 60 minutos a TA con los sueros policlonales de conejo específicos para Cz y C-T en una dilución 1:1000 o 1:500, respectivamente. Luego se lavaron con TBS, 2 veces por 10 minutos y una vez con TBS con 0,05% NP-40. Posteriormente las membranas fueron incubadas con anticuerpos anti-conejo acoplados a peroxidasa en una dilución de 1:50000 por 60 min a temperatura ambiente (TA). El revelado se realizó utilizando el reactivo ECL (Amersham Biosciences) en un analizador de imágenes FujiFilm Las1000.

Tratamientos de desulfatación

La desulfatación enzimática se realizó mediante digestión con 25 mU de sulfatasa de *Abalone entrails* (Type VII; Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA) en 50 mM de acetato de sodio pH 5 durante 18 h a 37 °C.

Para la desulfatación química, las muestras se pasaron por 0.5 ml de la resina AG50W-8X (H+) y la columna se lavó con 2 ml de agua destilada. Después

de la adición de piridina (0,015 ml), la muestra se liofilizó, se disolvió en 0,2 ml dimetilsulfoxido/metanol (9:1, v/v) y se ajustó el pH a 4 con ClH diluido. Una vez realizada la incubación a 100 °C durante 2 h, la muestra se llevó a seco y se guardó en freezer (Freeze *et al.*, 1983; Barboza *et al.*, 2005).

Para confirmar que el proceso de desulfatación, química y enzimática, no alteraba la estructura de la molécula, comparamos las muestras antes y después del tratamiento mediante SDS-PAGE al 10 %, verificando que la proteína no había modificado su peso molecular aparente. Además, mediante análisis de EM-UV-MALDI-TOF se confirmó que la modificación post-traduccional *N*-glicosilación de estas moléculas permanece intacta luego de ser sometida al proceso de desulfatación (Barboza *et al.*, 2005).

Inmunización de los animales y obtención de IgGs específicas

La Cz y el C-T se purificaron como se describió en materiales y métodos y se sometieron a la hidrólisis química y enzimática de los grupos sulfato. Estos antígenos, antes y después del tratamiento, fueron utilizados para inmunizar ratones y conejos y obtener sueros específicos a partir de los mismos.

La inmunización de conejos Nueva Zelanda linaje Blanco se llevó a cabo usando 50 µg de Cz y de dCz por dosis, recuperadas a partir de geles de SDS-PAGE al 12 %. La inmunización de cada animal consistió en 3 dosis aplicadas cada 3 semanas. El inmunógeno se disolvió en solución fisiológica (0,1M de NaCl) y se utilizó adyuvante completo de Freund (1:1, v/v).

La extracción de sangre fue a blanco. La misma se dejó en estufa durante 2 h a 37 °C y luego se centrifugó a 1000 g durante 15 minutos. Se recuperó el suero, se fraccionó y llevó a cabo la titulación de cada suero para los ensayos posteriores.

Los anticuerpos del suero de conejo primero se precipitaron con sulfato de amonio, y luego las IgGs se purificaron utilizando una columna de Proteina A-Sefarosa. La elusión de las IgGs fue realizada con 0,1 M de buffer citrato pH 3,5 de acuerdo a lo descrito en Eyy *et al.*, (1978).

Obtención de IgGs-enriquecidos-AS

La obtención de IgGs-enriquecidos-AS se realizó mediante la adsorción de un pool de IgGs policlonales específicos para Cz purificadas, con Czd previamente adsorbida a una membrana de nitrocelulosa. La adsorción de la Czd a nitrocelulosa se realizó durante 1 h a temperatura ambiente utilizando 3.34 μg de la proteína en 10 μl de PBS. Luego esta membrana fue sometida al bloqueo de sus sitios de unión remanentes mediante la incubación durante 1 h a temperatura ambiente con una mezcla de leche descremada al 3% en PBS. Luego del bloqueo, las IgG anti-Cz (3,34 μg en 100 μl de 1% de leche descremada en PBS) se incubaron con la membrana durante 1 h a 37°C. Este proceso se realizó por duplicado utilizando la misma solución de IgGs anti-Cz y dos membranas adsorbidas con Czd utilizadas secuencialmente. El resultado de realizar el mismo proceso más cantidad de veces, no resultó en un grado de especificidad significativamente mayor de los sueros adsorbidos por los epitopes sulfatados.

ELISAs de competencia con NAcGlc6S

Se realizó un ELISA con el fin de evaluar el éxito de la adsorción de las IgGs anti Cz-T con Czd produciendo un enriquecimiento en IgG anti-sulfatos. Los ELISAs se realizaron de la siguiente manera: Las placas de fondo plano se recubrieron con 0,3 μg por pocillo de Cz y Czd, por separado, durante la noche a 4°C. Ambas proteínas estaban desnaturalizadas previamente en 0,15 μM 2-mercaptoetanol. Después de bloquear con PBS-3% de leche descremada, las placas se incubaron con una dilución final de 1/4000 de IgG anti-Cz-T o IgG-enriquecidos-AS durante 1 ha TA para los controles (0 μg de NAcGlc6S) en ausencia de competencia. Para los pocillos donde se realizó competencia, 50 μl de IgG, anti-Cz-T o enriquecidos-AS a iguales concentraciones, se diluyeron 1/1000 en PBS-1% de leche descremada y se pre-incubaron con diferentes cantidades de GlnNAc6S en un volumen final de 200 μl durante 2 h a 37 °C en presencia de 0,1 M de 2-mercaptoetanol para luego incubar las mezclas de IgGs y el competidor 1 ha TA en los pocillos correspondientes. Después de lavar con PBS-Tween 0,01%,

las placas se incubaron con HRP-IgG de ratón anti-conejo (Jackson) diluida 1/2000 durante 40 min a TA. El color se desarrolló con dihidrocloruro de o-fenilendiamina (OPD) y la Absorbancia (Abs) se leyó a 490 nm usando un lector de microplacas ELISA (Dynatech).

Tratamiento de parásitos con clorato de sodio.

Se cultivaron epimastigotes de la cepa Tul 2 de *T. cruzi* en tubos de 15 ml y una concentración inicial de 2×10^6 parásitos/ml (volumen final: 4 ml) con diferentes cantidades de clorato de sodio (Sigma-Aldrich) (0, 10, 25, 50 mM) y se recogieron después de 24, 48 y 72 hs. El recuento de epimastigotes se realizó en cámara de Neubauer.

Se crecieron trypomastigotes de la cepa Tul 2 de *T. cruzi* en células Vero con diferentes concentraciones de clorato de sodio (0, 10 y 25 mM) durante 96 h. Después del lavado, los trypomastigotes se recogieron, se contaron en una cámara de Neubauer y se utilizaron para infectar las células HL1 como se describe a continuación. En todos los casos, el medio de cultivo se renovó diariamente para mantener la concentración de clorato constante en cada muestra.

Efecto del clorato sobre la síntesis proteica.

A partir de tres alícuotas de 50000 epimastigotes de la cepa Tul 2 de *T. cruzi* crecidos en diferentes concentraciones de clorato de sodio (0, 25 y 50mM), se realizó una cuantificación de proteínas por método de Bradford (Bradford, 1976) y una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes seguido por una tinción de plata y posterior western blot (wb) con anticuerpos específicos contra Cz. Las bandas resultantes fueron analizadas mediante el Image J software.

Análisis de sulfatación de Cz por western blot

Los epimastigotes de la cepa Tul 2 de *T. cruzi* (2×10^5 /calle), con o sin tratamiento con clorato fueron lisados y sometidos a electroforésis en gel de

poliacrilamida 10% en condiciones desnaturalizantes. Paralelamente se utilizó Cz purificada (1 µg) como control. Posteriormente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa durante 2 h a 200 mA. Después de la transferencia, las membranas se recubrieron con una solución salina tris-tamponada que contiene 3 % de leche descremada (TBS-M). Las proteínas transferidas se incubaron con IgG enriquecidas-AS o IgG anti- *TcAKR* producidos en conejo, gentilmente cedidos por la Dra. Gabriela Garcia (diluidos 1/500 en TBS-M) durante 1 h a TA. Luego, se incubaron las membranas con anticuerpos policlonales anti-IgG de conejo HRP (Jackson) (diluido 1/2000 en TBS-M) durante 1 h a TA. La detección se realizó con el reactivo de quimioluminiscencia (ECL) (AmershamBiosciences, Cambridge, UK). La cuantificación de la intensidad lumínica se realizó con un densitómetro FujiLAS1000 equipado con un software medidor de imagen 3.122 (Fuji Film, Tokio, Japón).

Electroforésis Bidimensional (2D)

Epimastigotes de la cepa Tul 2 de *T. cruzi* (2×10^5), con o sin tratamiento de clorato resuspendidos, Cz (1µg) o Cz + Czd (1µg de cada una) en tampón de muestra de enfoque isoeléctrico (IEF) se separaron por IEF usando una relación 4 a 1 de Bio-Lyte 5-7 y Bio-Lyte 3-10 (Bio-Rad). Los tubos que contienen el Bio-Lytes fueron pre-corridos electroforéticamente a 200 V durante 10 min seguido de 300 V durante 15 min y 400v durante 15 min finales. Después de cargar la muestra, la electroforesis se realizó a 500 V durante 10 min y luego 1000 V durante 3 h y 30 min. A continuación, la segunda dimensión de la separación se realizó en geles con 10% SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se realizó un western blot como se describe en la sección anterior utilizando suero policlonal de conejo específico anti-Cz.

Aislamiento y purificación de GSLs

La purificación de GSLs se llevó a cabo a partir de epimastigotes de *T. cruzi* cultivados en presencia de diferentes concentraciones de clorato de sodio (0,

10, 25 y 50 mM) y cosechados como se describió anteriormente. La masa húmeda obtenida fue liofilizada, la extracción se realizó utilizando 1 ml de la mezcla cloroformo/metanol (1:1, v/v), la misma se centrifugó y se recuperó el sobrenadante. Luego de repetir estos pasos dos veces más, se juntaron todos los sobrenadantes y se evaporaron con una corriente de N₂ gaseoso. La muestra se sometió a una cromatografía de intercambio iónico utilizando como matriz DEAE-Sephadex A-25, obteniendo las fracciones correspondientes a los lípidos ácidos y a los neutros. Para ello, el extracto se resuspendió en 100 µl de cloroformo/metanol/agua (30:60:8, v/v/v) y se sembró sobre la matriz previamente equilibrada con el mismo buffer. Después de la siembra se lavó la columna con 30 ml del mismo buffer recuperándose la fracción de NGSLs y zwitterionicos (Couto *y col.*, 2004). Se realizó la elución de los GSLs aniónicos con 30 ml de cloroformo/metanol/acetato de sodio 0,8 M (30:60:8, v/v/v). Ambas fracciones se secaron totalmente, se trataron con NaOH 0,1 M en metanol y se incubaron a 37 °C durante 3 h (saponificación). Esta mezcla fue neutralizada con ClH 1 M en presencia de 50 µl de buffer fosfato 1 M pH 7. Estos productos se evaporaron nuevamente y se desalaron pasando por una columna de Sep-Pack C-18 “cartridge” (Worldwiremonitoring PA, USA), previamente lavada con 20 ml de metanol seguido por 20 ml de agua. La muestra resuspendida en 100 µl de agua se sembró y se lavó con 50 ml de agua (para eliminar las sales). La elución se realizó primero con 50 ml de metanol y a continuación con 50 ml de cloroformo/metanol 1:1. Se recuperaron estas últimas fracciones y se secaron totalmente.

La purificación de AGSLs se completó utilizando una columna de Unisil (7 x 50 mm). La muestra seca se resuspendió en cloroformo y se eluyó con 30 ml de cloroformo, 30 ml de cloroformo/metanol (98:2, v/v) y, 30 ml de cloroformo/metanol (1:3, v/v). Estas últimas fracciones fueron sembradas en una placa de silicadesilica gel- 60 sin indicador (Merk). (TLC) y se llevó a cabo la cromatografía en capa delgada usando los solventes propanol/NH₃/H₂O (75:5:5, v/v/v). Se reveló con yodo gaseoso. Los “spots” o manchas correspondientes a los

sulfoglicolípidos se extrajeron de la sílica con metanol/cloroformo (1:1, v/v) y se analizaron por EM-UV-MALDI-TOF y DotBlot.

Espectrometría de masa UV-MALDI-TOF

Equipo utilizado: Los análisis fueron realizados utilizando un espectrómetro de masa Ultraflex II TOF/TOF equipado con un láser de estado sólido de alto rendimiento ($\lambda = 355$ nm) y un reflector. El sistema fue operado a través del software Flexcontrol 3.0 (BrukerDaltonicsGmbsH, Bremen, Germany).

Análisis de los glicosfingolípidos de *T. cruzi*: Las muestras fueron irradiadas con una potencia de láser de 40-60 %. Se trabajó tanto en modo lineal como en modo reflectrón, y en los modos positivo y negativo del equipo. Los espectros fueron obtenidos por la suma de 100 a 500 disparos simples del láser, dependiendo de las condiciones de las muestras. Las muestras fueron sembradas en un porta muestras de acero inoxidable sin pulir (MTP 384 groundsteel; BrukerDaltonicsGmbsH) utilizando el método mezcla. Se mezclaron volúmenes iguales de solución de matriz y analito y luego se colocó una alícuota de 1 μ l en la superficie del electrodo porta muestras. La mezcla se dejó secar a TA en desecador.

Matriz utilizada en UV-MALDI-TOF MS: El uso de 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB, gentisic acid, GA) (AldrichChemical Co.) indica que todos los iones formados detectados se encuentran cargados positivamente ya sea por los iones Na^+ , H^+ o K^+ . La determinación de la estructura química se logró a partir de la búsqueda de picos coincidentes con el ión molecular propuesto y con los fragmentos generados por las posibles rupturas predichas sobre la estructura.

Calibración. Se utilizaron calibrantes externos para el análisis por UV-MALDI-TOF: α -Cyclodextrina (cyclohexaamylosa, MW 972,9), β -cyclodextrina (cycloheptaamylosa, MW 1135,0), γ -cyclodextrina (cyclooctaamylosa, MW 1297,1), angiotensina I (MW 1296,49), neurotensina (MW 1672,96) e insulina bovina (MW

5733,5) todos de Sigma-Aldrich. Las muestras fueron irradiadas con una potencia de 40 a 60 % y el espectrocorresponde a la suma de entre 80 a 100 disparos.

Análisis mediante microscopía electrónica.

Los parásitos se cosecharon por centrifugación y se lavaron con buffer fosfato salino. Luego, fueron fijados por inmersión en paraformaldehído 4%, glutaraldehído 0,25% en buffer fosfato 0.1M, pH 7,5, durante 24 h y se procesaron para análisis por microscopía electrónica. Los bloques fueron lavados con sacarosa al 10% en el mismo buffer y deshidratados por inmersión en soluciones de alcohol etílico 50 % y 70 % sucesivamente. Se realizaron 3 cambios de 20 min cada uno a 4 °C y luego se sumergieron en resina pura LR White resinmonomer (48 h a 50°C).

Posteriormente, se realizaron cortes para obtener secciones ultrafinas en un Porter-Blum MT2 Sorvall ultramicrotomo y luego fueron recogidas en grillas de níquel de 300-mesh. La tinción se realizó primero con acetato de uranilo al 0.5 % y luego en solución Reynolds con citrato. Las muestras fueron examinadas bajo un microscopio electrónico Siemens Zeiss C10 (Siemens, Alemania). Las fotografías fueron tomadas con una película Kodak electronimaging film (Eastman Kodak, Rochester, NY, EE.UU.). El número de reservosomas electrodensos o electrolúcidos fueron contados por célula (se analizaron 200 células, software Image J, NIH, USA).

Determinación de actividad enzimática sobre sustrato sintético

La determinación de la actividad enzimática de las diferentes etapas y fracciones de la purificación de la Cz se ensayaron sobre el sustrato sintético cromogénico Bz-Pro-Phe-Arg-pNA (Cazzuloy *col.*, 1990). La reacción se llevó a cabo en presencia de Tris-Acetato 0,2 mM pH 8, β-mercaptoetanol 10 mM, sustrato 0,3 mM y un volumen dado de la muestra (volumen final de reacción 500 µl). Se midió la aparición de color generado por la liberación de la para-nitroanilina del sustrato a 410 nm.

Ensayo de actividad enzimática de Cz y Czd

La desulfatación de la Cz fue enzimática, mediante el uso de tres unidades internacionales de una Sulfatasa comercial (*A. Entrailis* VII Sigma Aldrich), a 37°C en una solución tampón de Acetato de Sodio 0.05M pH 5, durante la noche con 500 µg de Cz. Paralelamente se incubaron otros 500 µg de Cz en iguales condiciones pero en ausencia de sulfatasa. En el segundo ensayo, tanto a la Cz tratada sin sulfatasa como a la Czd enzimáticamente se las incubó con IgGs purificadas de conejo específicos para Cz total y Czd e IgGs obtenidas de un suero pre-inmune durante 1 h y 30 min a 4°C. Para esto se utilizó una relación de 90 µg de enzima con 10 µg de IgGs. Es útil mencionar que los anticuerpos anti-Czd fueron obtenidos a partir de Cz desulfatada químicamente, lo que asegura un 99 % de desulfatación. Posteriormente se procedió a medir la actividad de cada muestra y se obtuvieron los valores por µg de enzima. La actividad de la Cz no tratada (control) expresada en unidades específicas representó el 100% y los valores obtenidos para el resto de las muestras fueron relativizados acorde al 100% del control.

Detección de epitopes sulfatados en la superficie del parásito por Citometría de flujo

Para los ensayos de citometría de flujo, los trypomastigotes de la cepa Tul 2 de *T. cruzi* se lavaron con tampón FACS (FCS al 0,1% en PBS) y después se incubaron en un volumen final de 100 µl con 10 µg de IgG purificadas a partir de suero de conejo pre-inmune o de sueros policlonales específicos anti-Cz y anti-Cz desulfatada durante 60 min a TA. Luego, los parásitos se lavaron con tampón de FACS para realizar posteriormente la incubación con una dilución 1/100 de anticuerpo hecho en cabra anti-IgG de conejo marcado con FITC (Dako A/S, Dinamarca). Después de 40 min de incubación, las muestras se lavaron dos veces con tampón FACS y se fijaron con 2% de Paraformaldehído (PFA). Se incluyó una muestra que se incubó solamente con el anticuerpo secundario como control

negativo. Las muestras se corrieron en un FACSCalibur (Becton Dickinson), y los datos se analizaron con el software FlowJo. La obtención de los trypomastigotes se detalla en la sección 2 “Cepas y células utilizadas”.

Ensayos de infección de la línea celular cardíaca de ratón HL-1.

Las células HL-1 (Claycomb *col.*, 1998) se cultivaron en frascos de cultivo T-25 recubiertos con 0,02% de gelatina (DIFCO) y 0,005 mg/ml de fibronectina (Sigma), en medio Claycomb (SAFC Biosciences) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS; Sigma), 2 mM de L-glutamina (Sigma), y antibióticos penicilina y estreptomina (100 U/ml) en estufa humidificada a 37 °C, con una atmósfera de CO₂ al 5%. Para los ensayos de infección, se sembraron 2x10⁴ células HL-1 en placas de cultivo de 24 pocillos que contienen cubreobjetos de vidrio (12 mm de diámetro) recubiertas con gelatina y fibronectina 24 horas antes de la siembra. Trypomastigotes de la cepa Tul 2 de *T. cruzi* controles sin tratar o tratados con clorato (10, 25 mM) (2x10⁵ por pocillo) se añadieron a las células y después de 4 horas, se removieron los parásitos lavándose dos veces con medio fresco. En otros experimentos, las células HL-1 se pre-incubaron durante 2 h a 37 °C, ya sea con 20 µg/ml de Czy E-64 (Trans-epoxi-succinil-L-leucil amido-4-guanidino butano, inhibidor irreversible de Cisteína proteasas), Czd y E-64, C-T, C-Td o un anticuerpo monoclonal de conejo anti-HMR (5 mg/ml) (CD-206-H 300 Santa Cruz Biotecnología Inc, CA, EE.UU.). Exclusivamente para este ensayo, a fin de conservar la estructura tridimensional de la Cz, la desulfatación de Cz purificada y activa se realizó enzimáticamente con sulfatasa VII de *A. entralis* (Sigma Aldrich) como se describió previamente. Lugo se realizó la infección de las células acorde a lo mencionado previamente en ausencia de lavado con medio fresco.

La infección procedió durante 3 días. Los cubreobjetos de vidrio se retiraron y las células fueron fijadas y teñidas por la técnica de May-GrünwaldGiemsa o por inmuno-fluorescencia directa. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

El porcentaje de células infectadas (infectividad) para ambos ensayos de infección, se evaluó en 80 campos por muestra a 200x. La infectividad se calculó como el número de células infectadas en las muestras con el tratamiento (trypomastigotes tratados con clorato o células pre-tratadas con Cz, Czd, C-T, C-Td o anticuerpos monoclonales contra el receptor de manosa) / número de células infectadas en las muestras control (trypomastigotes control o células no tratadas), multiplicado por 100.

Inmuno-Fluorescencia Directa

Las células infectadas sobre el portaobjetos se fijaron durante la noche a 4°C con 200 µl de solución fijadora (2% PFA en PBS). Luego se lavaron con PBS una vez. La permeabilización de las células se hizo agregando 500 µl de la solución de permeabilización (0.1% Tritón X-100 en PBS) por no más de 5 min. Luego de remover la solución anterior, se bloquearon los sitios reactivos remanentes con 1% BSA en PBS por 1 h a TA. Posteriormente se incubaron los portaobjetos con una dilución 1/1000 de un suero de ratón crónico infectado con la cepa Tul 2 en PBS 1% de BSA (PBSA) a 4°C durante la noche. Luego de 3 lavados con PBS durante 15 min cada uno, se realizó la incubación con el segundo anticuerpo anti-ratón acoplado a FITC (Alexa fluor 488, Invitrogen) en una dilución 1/1000 en PBSA 1% 1 h a TA. Se realizaron 3 lavados con PBS durante 15 min cada uno. Finalmente se realizó la tinción de contraste con una incubación con solución 0,66 µg/ml de bromuro de etidio en PBS durante 10 min. Luego de 1 lavado con PBS 5-10 min, se realizó el montaje con 5 µl de Fluoromount-G (Diagnostic Biosystems Inc, CA, USA) sobre el portaobjetos con las células mirando hacia el porta.

Parte II

Cepas y células utilizadas

En esta parte del trabajo se utilizaron trypomastigotes de cultivo de las cepas de *T. cruzi* Tehuantepec (Teh), Tulahuen 2 (Tul 2), Brazil e Y. Los

parásitos fueron obtenidos de cultivos de células Hg39 mantenidas con medio DMEM (GIBCO) suplementado con 10% suero fetal bovino y antibióticos penicilina y estreptomina (100U/ml) (RPMI completo) en estufa humidificada a 37 °C, con una atmósfera de CO₂ al 5%. Los sobrenadantes de los cultivos de células Hg39, conteniendo los trypomastigotes recientemente liberados, fueron centrifugados durante 20 min a 2300 rpm a 37° una centrífuga eppendorf modelo 5804R. Se resuspendió el pellet en medio RPMI-1640, se determinó el número de parásitos en cámara de Neubauer y se preparó una suspensión final de 1x10⁷ trypomastigotes/ml. A partir de estos cultivos se obtuvieron también los parásitos correspondientes al ensayo “**Detección de epitopes sulfatados en la superficie del parásito**” correspondiente a la primera parte.

Localización de los ligandos de las Siglecs en el parásito

Obtención de proteínas de membrana

Los trypomastigotes (10⁸-10¹⁰) se suspendieron en Tris 10 mM, EDTA 2 mM (TE) y se lavaron dos veces en TE (se centrifugaron a 40.000 xg durante 8 min. cada vez). Después de la adición gota a gota de las células en 1 ml de TE a 2% de Triton X-100 en PBS mientras se agitaba (concentración final 1% de Triton-X-100), se realizó la solubilización durante 30 min. a 4 °C y se incubó durante 16 h a la misma temperatura en una concentración final de Tritón-X-100 1%. Luego, se centrifugó el material a 100.000 xg durante 10 min. Las proteínas de membrana solubilizadas se recuperaron en los sobrenadantes.

Obtención de Fracciones sub-celulares de *Trypanosoma cruzi*

Los epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Tul 2, se cosecharon y se lavaron con TBS, se resuspendieron en solución de sacarosa 0,25 M, KCl 1mM y EDTA 1mM. La suspensión se homogeneizó en un mortero con carburo de silicio y luego se centrifugó a 500 rpm a 4 °C durante 10 min., para eliminar las células enteras y el carburo de silicio. Las fracciones subcelulares se obtuvieron por centrifugación diferencial a diferentes velocidades y se obtuvieron fracciones

nucleares (N, sedimentado 10 min a 1000xg), gránulos grandes (GG, sedimentado 10 min a 5000xg), gránulos pequeños (GP, sedimentado 10 min a 14500xg), microsomal (M, sedimentado 60 min a 105000xg) y soluble (S, sobrenadante final), usando marcadores enzimáticos específicos para evidenciar el enriquecimiento de cada fracción (Bontempi *y col.*, 1989; Duschak and Cazzulo, 1991).

Clonado de Siglec-E-Fc

A partir de primers específicos se levantó la secuencia de Siglec-E-Fc por PCR de un plásmido pcDNA3.1(+) y ADN polimerasa de *Pyrococcus furiosus* DSM3638 para luego ligarla a un plásmido LeGO-Ic2 y expandirlo en bacterias *E.coli* top 10 en medio LB durante 12 horas a 37 °C.

Cebadores:

Fw-conteniendo sitio de restricción para EcoR1

CCCGAATTCACCCTGAATGTGGAAAGGA

Rv-conteniendo sitio de restricción para NotI

GGGCGGCCGCTCGCACTCATTACCCGGA

Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR).

1 Ciclo

Desnaturalización inicial: 95°C 2 min

30 ciclos

Desnaturalización: 95°C 1 min

Hibridación: 68°C 30 seg

Extensión: 72°C 3 min

1 ciclo

Extensión final: 72°C 5 min.

El producto de PCR se corrió en gel de agarosa 1% y su peso molecular esperado de 1968 pb fue corroborado. Posteriormente se extrajo el producto del gel utilizando el kit de Fermentas (Thermo Fisher Massachusetts, USA).

La digestión del producto de PCR se realizó durante 20 min a 37°C utilizando la solución tampón “Fermentas O Buffer” (ThermoScientific Massachusetts, USA) 1 µg de ADN y 1 µl de las enzimas EcoR1 y NotI (FastDigest, ThermoScientific, Massachusetts, USA). La ligación al plásmido LeGO Ic2 (LeGOvectors, Kristoffer Weber) se realizó utilizando la T4 ligasa y las soluciones y protocolos correspondientes a esta enzima (ThermoScientific Massachusetts, USA). Con el producto de ligación se procedió a transformar bacterias competentes *E.coli* top 10 (OneShot® TOP10 ChemicallyCompetent *E. coli*, LifetechnologiesCalifornia, UnitedStates) con el fin de expandir el plásmido LeGO conteniendo la secuencia de Siglec-E-Fc. La transformación química de las bacterias se realizó de acuerdo a lo indicado en el Kit correspondiente a la marca de las bacterias empleadas. Posteriormente las bacterias fueron plaqueadas en LB agar e incubadas a 37°C durante la noche. Se levantaron seis colonias las cuales se evaluaron por PCR y a partir de las cuales se realizó una “miniprep” de manera de purificar el ADN plasmídico utilizando el kit Nucleospin (NucleoSpin® Plasmid (NoLid) Macherey-Nagel). Posterior a la secuenciación del MCS del plásmido LeGO conteniendo la secuencia de Siglec-E-Fc, los plásmidos fueron transfectados en células CHO por electroporación (230V, 950µF, Biorad Pulser). Las células fueron analizadas por citometría de flujo, para corroborar la presencia del plásmido y la expresión de Siglec-E-Fc en sobrenadante fue determinada por western blot utilizando un anticuerpo anti-Siglec-E hecho en ratón (Gentilmente cedido por Dr. Thomas Jacobs, Hamburg, Germany).

Purificación de Siglec-E-Fc

Las células CHO transfectadas se crecieron en medio DMEM (Gibco) en presencia de 10% de Suero Fetal Bovino depletado de IgGs. La Siglec-E-Fc se purificó de sobrenadante utilizando columnas de proteína G “HiTrapprotein G columns” (GE Healthcare) y los protocolos otorgados por la marca.

ELISAs

Se utilizaron para determinar la capacidad de unión de Siglec-E-Fc o de Mal II a diferentes biomoléculas de *T. cruzi*. Las moléculas se fijaron a las placas de alto pegado, y el ELISA se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito con anterioridad en esta misma sección. Se incubaron las placas con las lectinas Siglec-E-Fc o Mal II-Biotinilado según corresponda. Se revelaron con un anticuerpo conjugado con peroxidasa anti-humana-Fc. (Dako A/S, Dinamarca) o con la molécula estreptavidina acoplada a peroxidasa (Life technologies California, UnitedStates) en el caso de Siglec-E o de Mal II, respectivamente. En todos los casos, se utilizó una solución de BSA al 1% en PBS como agente bloqueante, a diferencia del protocolo convencional. Además, se utilizaron como controles negativos los anticuerpos secundarios Siglec-E-Fc y Mal II.

Ensayos competitivos de ELISA.

Los ensayos competitivos entre Siglecs y Cz se realizaron con una cantidad constante de Czd (1 µg) como antígeno y cantidades crecientes de Cz (0, 0,1, 0,5 y 1 µg) usada como competidor. La actividad de Cz fue inhibida con 100 µM de E-64 mediante incubación durante 30 min a 0 °C para estos ensayos realizados en condiciones reductoras (0,1 M de DTT). Este ensayo también se realizó utilizando Cz en la fase inmóvil y Czd en cantidades crecientes (0, 0,1 0,5 y 1 µg) como competidor. La concentración de Silgec-E-Fc constante en ambos casos (Dilución 1/100 de una solución de 0,6 µg/µl).

Otro ensayo de competición se realizó con 1 µg de la fracción microsomal como antígeno, la cual se enfrentó con cantidades crecientes (0, 1 y 2 mg) de Cz o de Cz desulfatada. En ambos casos, el reconocimiento por Siglec-E-Fc se realizó como fue descrito anteriormente.

Acoplamiento de Siglec-E-Fc purificadas a Sefarosa 4B activada con bromocianógeno

Las Siglec-E-Fc previamente purificadas (100-200 µg) se disolvieron en NaHCO₃ 0,1M, pH 8,3, 0,5M de NaCl (Buffer de acople) y se mezclaron con la Sefarosa 4B previamente (300 mg /ml de columna) lavada con ClH 0,1 M y estabilizada en el mismo buffer de acople. Se utilizaron aproximadamente 5-10 mg de ligando por ml de matriz y se agitó cabeza-cola durante 60 min a TA.

Una vez realizado el acople se recuperó el sobrenadante y se lavó la matriz acoplada con buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8 y tres ciclos consecutivos de pH alternado (Buffer acetato 0,1 M pH 4, 0,5 M ClNa y Buffer Tris-HCl 0,1M, 0,5M ClNa) (Richard *y col.*, 2004)

Purificación de Cz por afinidad a Siglec-E-Fc como ligando.

Los sobrenadantes de los trypomastigotes metacíclicos obtenidos a partir de generación espontánea, gentilmente cedidos por la Dra B.Franke de Cazzulo (De Carvahlo y De Souza, 1983) se dialisaron frente a 50 mM de Tris ClH pH 7,6 y se aplicaron sobre la columna de la Siglec-E-Sefarosa (1 ml) tres veces, se lavó con 20 ml de Tris ClH pH 7,6 50mM y consecutivamente se eluyó con 0,5 M y 3 M NaCl en Tris ClH 50 mM pH 7,6. Las etapas de purificación se analizaron por SDS-PAGE 10% seguido por tinción de plata y Western blot con sueros policlonales de conejo específico para Cz.

La tinciones en citometría de flujo

Para analizar las interacciones de Siglec-E-Fc y MaII con los trypomastigotes de *T. cruzi* hubo una etapa inicial de pre-incubación de cada

lectina con su anticuerpo/proteína de afinidad secundario correspondiente. En la pre-incubación, cada muestra contenía 1 µg de Mal II biotinilado + estreptavidina APC (Dako A/S, Dinamarca) en PBS (1:40) y 2 µg de Fc Siglec-E-Human + anti-humana ficoeritrina (Dako A/S, Dinamarca) de burro en PBS (1:40). Después de la pre-incubación de 30 a 60 min, se añadieron 10 µl de la solución mencionada en cada muestra de trypomastigotes(en ~ 90 ul de tampón FACS) y se mantuvieron 1 h 30 min. Como mínimo. Después de la incubación, las muestras se lavaron dos veces con tampón FACS y se fijaron con 2% de PFA.Finalmente, las muestras se corrieron en un FACSCalibur (BectonDickinson), y los datos se analizaron con el software FlowJo.

Tratamiento con clorato y evaluación con Siglec-E-Fc

Los trypomastigotes de *T. cruzi*, cepa Brasil, fueron tratados con diferentes concentraciones de clorato de sodio (0, 10, 20, y 40 mM) para infectar luego células Hg39 (línea celular de glioblastoma humano 39). El medio de cultivo celular contenía 75 % de medio Dulbecco's, Modification of Eagle's depletado de sulfatos (MP Biomedicals, LLC), 25% de medio IMDM (Gibco) y 2,5% de FCS durante las primeras 72 horas. Las últimas 24 h (día cuatro) cuando los parásitos del sobrenadante se cosecharon, el medio de cultivo celular fue de 100% medio Dulbecco's Modification of Eagle's suplementado con 1% de FCS. Cada 24 h el medio se renovó y se añadió clorato de sodio fresco (Ferrero *y col.*, 2014). Los parásitos recuperados se tiñeron con Mal II o Siglec-E-Fc de acuerdo con los procedimientos descriptos anteriormente.

Cuantificación de proteínas

-Método de Bradford

Se utilizó la técnica en microescala, para la cuantificación de proteínas en solución. Las muestras se llevaron a 500 µl con agua, se agregaron 500 µl del reactivo comercial Bradford (BioRad), se agitó y determinó la absorbancia a 595

nm. Para la curva de calibración se utilizaron diluciones de una solución madre de BSA 1 mg/ml (Bradford, 1976).

-Método de Lowry

Cada muestra se llevó a 200 μ l con agua, se le agregó 1ml de la solución de trabajo, se agitó y dejó reposar durante 10 min a temperatura ambiente. Luego se agregaron 100 μ l del reactivo de Folin 1N (Sigma), se agitó e incubó en oscuridad durante 40 min. La absorbancia se determinó a 750 nm. La curva de calibración fue realizada utilizando diluciones de una solución patrón de BSA 1mg/ml (Lowry *y col.*, 1951).

-Solución de trabajo: esta solución se realiza en el momento de usar mezclando 20 ml de solución A (Carbonato de sodio 2 % en NaOH 0,1 N) con 0,4 ml de solución B (sulfato de cobre 0,5 % en tartrato de sodio y potasio 1 %)

-Equipamiento utilizado

A continuación se detallan los equipos utilizados durante la realización de esta tesis:

Micropipetas de marca Eppendorf y Gibson con rango variable de volumen que van desde 0.5-1000 μ l.

La balanza Mettler Toledo Clasic AB204-S (precisión 0,1 mg) y analítica.

Las determinaciones de pH se realizaron por medio del pHS-3D pH Meter Sanxin.

Para los cultivos se utilizó el agitador orbital termostatzado frio-calor con control por microprocesador Sontec modelo OS22.

Para la esterilización del material de vidrio se usó una estufa y autoclave.

Para la observación microscópica se utilizó el microscopio Axiostar Plus Zeiss y el recuento de parásitos se hizo con cámara de Neubauer.

Para el recuento de infección por fluorescencia se utilizó el microscopio Nikon Eclipse E200 fluorescencemicroscope.

Para las incubaciones a temperatura regulada se utilizó el baño termostático modelo Masson y el termostato electrónico Faeta S.A

Para trabajar en esterilidad se utilizó la cabina de seguridad biológica clase II Biosafe Plus IIA Veco.

Para la centrifugación en tubos Eppendorf y Falcon (15 ml y 50 ml) se utilizó la centrifuga de mesada Eppendorf (con regulación de temperatura, modelo 5804R) y para volúmenes mayores una centrifuga Sorvall RC-5B y los rotores GSA (para mamaderas de 250 ml) y SS-34 (para mamaderas de 50 ml).

Para las electroforesis en geles de poliacrilamida y las transferencias de geles se usó el sistema Miniprotean III de BioRad y la fuente de poder PowerPac 3000 de BioRad.

Para la determinación de proteína por espectrometría UV-Visible se utilizó el espectrómetro UVIDEC-340 Jasco y para la medición de actividad enzimática el espectrómetro BeckmanCoulter DU 640B.

Para los ensayos de ELISA se usó el lector de placas Espectro Bio-Tek EL 808.

Para las evaporaciones de solventes orgánicos se utilizó N₂ gaseoso y un rotavaporBüchi R-114 equipado con un baño termostatizado (Büchi B-480), mientras que para la concentración y liofilización de muestras acuosas se utilizó un liofilizador-concentrador SC-110A SpeedVac Plus (ThermoSavant).

Para las cromatografías de exclusión molecular se utilizó un colector automático de fracciones modelo Frac-200 de Pharmacia LKB.

Las muestras analizadas por espectrometría de masa se llevaron a cabo en espectrómetro de masa Ultraflex II TOF/TOF equipado con laser UV (λ em 355 nm) y modo reflectrón, BrukerDaltonicsGmbSH, Bremen, Germany. El sistema es operado por el Flexcontrol 2.4.

En todos los casos se utilizaron solventes y reactivos de grado analítico o similar. Se utilizó agua deionizada grado MilliQ (resistividad 18.2 M). Todos los reactivos fueron de grado de pureza analítica.

Para los ensayos de determinación y cuantificación mediante quimioluminiscencia (reactivo de ECL) se usó el densitómetro FujiLAS1000, equipado con el programa IMAGE GAUGE3.122 software (Fuji Film, Tokyo, Japón).

Los citómetros utilizados para medir la interacción de los trypomastigotes a las diferentes lectinas e IgGs fue el Accuri C6 (BectonDickinson), y para el ensayo de competencia entre Mal II y Siglec-E el citómetroFACSCalibur (BectonDickinson)

Para la electroforesis en dos dimensiones se utilizó el equipo Mini-PROTEAN 2-D ElectrophoresisCell (Bio-Rad)

Para las reacciones en cadena de Polimerasa se utilizó el ciclador de Bio-Rad T100™ ThermalCycler

5. Referencias

- *Abramo-Orrego L, Lansetti JC, Bozzini JP, Wynne de Martini GJ. 1980. Hemoculture as a diagnostic method in Chagas disease. *Med (Bs As)*, 40:56-62.
- *Acosta DM, Arnaiz MR, Esteva MI, Barboza M, Stivale D, Orlando UD, Torres S, Laucella SA, Couto AS, Duschak VG. 2008. Sulfates are main targets of immune responses to Cz and are involved in heart damage in BALB/c immunized mice. *Int. Immunol*, 20:461-70.
- *Acosta DM, Soprano LL, Ferrero MR, Landoni M, Esteva MI, Couto AS, Duschak VG. 2011. A striking common O-linked N-acetylglucosaminyl moiety between cruzipain and myosin. *Parasite Immunol.*, 33:363-70.
- *Acosta DM., Soprano LL, Ferrero MR, Esteva MI, Riarte A, Couto AS, Duschak VG. 2012. Structural and immunological characterization of sulfatides. Relevance of sulfated moieties in *Trypanosoma cruzi* glycoconjugates. *Parasite Immunol.* 34:499-510.
- *Aliberti JC, Cardoso MA, Martins GA, Gazzinelli RT, Vieira LQ, Silva, JS. 1996. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect. Immun.*, 64:1961-1967.
- *Almeida IC, Ferguson MA, Schenkman S, Travassos LR. 1994. Lytic anti-alpha-galactosyl antibodies from patients with chronic Chagas' disease recognize novel O-linked oligosaccharides on mucin-like glycosyl-phosphatidylinositol-anchored glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.*, 304:793-802.
- *Alvarez V, Parussini F, Aslund L, Cazzulo JJ. 2002. Expression in insect cells of active mature cruzipain from *Trypanosoma cruzi*, containing its C-terminal domain. *Protein. Expr. Purif.* 26(3):467-75.
- *Andrade D, Serra R, Svensjö E, Lima AP, Ramos ES Jr, Fortes FS, Morandini AC, Morandi V, Soeiro Mde N, Tanowitz HB, Scharfstein J. 2012. *Trypanosoma cruzi* invades host cells through the activation of endothelin and bradykinin receptors: a converging pathway leading to chagasic vasculopathy. *Br. J. Pharmacol.*, 165:1333-47.
- *Aparicio IM, Scharfstein J, Lima AP. 2004. A new cruzipain-mediated pathway of human cell invasion by *Trypanosoma cruzi* requires trypomastigote membranes. *Infect Immun.*, 72:5892-902.

- *Araújo-Jorge TC, De Souza W. 1988. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with macrophages. Involvement of surface galactose and N-acetyl-D-galactosamine residues on the recognition process. *Acta Trop.*, 45:127-36.
- *Avila JL, Rojas M, Carrasco H. 1993. Elevated levels of antibodies against sulphatide are present in all chronic chagasic and dilated cardiomyopathy sera. *Clin. Exp. Immunol.*, 92:460-5.
- *Baeuerle PA, Huttner WB. Chlorate. 1986. A potent inhibitor of protein sulfation in intact cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 141:870-7.
- *Bambino-Medeiros R, Oliveira FO, Calvet CM, Vicente D, Toma L, Krieger MA, Meirelles MN, Pereira MC. 2011. Involvement of host cell heparan sulfate proteoglycan in *Trypanosoma cruzi* amastigote attachment and invasion. *Parasitology*, 138:593-601.
- *Barbosa HS, de Meirelles M de N. 1992. Ultrastructural detection in vitro of WGA-, RCA I-, and Con A-binding sites involved in the invasion of heart muscle cells by *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Res.*, 78:404-9.
- *Barbosa HS, Meirelles MN. 1995. Evidence of participation of cytoskeleton of heart muscle cells during the invasion of *Trypanosoma cruzi*. *Cell Struct.* 20:275-284.
- *Barboza M, Duschak VG, Cazzulo JJ, Lederkremer RM, Couto AS. 2003. Presence of sialic acid in N-linked oligosaccharide chains and O-linked N-acetylglucosamine in cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 127:69-72.
- *Barboza M, Duschak VG, Fukuyama, Y, Nonami H, Erra-Balsells R, Cazzulo JJ, Couto AS. 2005. Structural analysis of the N-glycans present in cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*. Identification of sulfated high-mannose type oligosaccharides. *FEBS J.*, 272:3803-15.
- *Barreto-Bergter E, Vermelho AB, Hartmann R, Pohlentz G, Klein RA, Egge H. 1992. Structural characterization of neutral glycosphingolipids from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 51:263-70.
- *Barreto-Bergter E, Vermelho AB, Hogge L, Gorin PA. 1985. Glycolipid components of epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, 80:543-5.

- *Barrett MP, Burchmore RJ, Stich A, Lazzari JO, Frasch AC, Cazzulo JJ, Krishna S. The trypanosomiasis. *Lancet* 2003; 362:1469-80.
- *Bastos KR, Barboza R, Sardinha L, Russo M, Alvarez JM, Lima MR. 2007. Role of endogenous IFN-gamma in macrophage programming induced by IL-12 and IL-18. *J Interferon Cytokine Res.*, 27:399-410.
- *Benghezal M, Fauvarque MO, Tournebise R, Froquet R, Marchetti A, Bergeret E, Lardy B, Klein G, Sansonetti P, Charette SJ, Cosson P. 2006. Specific host genes required for the killing of Klebsiella bacteria by phagocytes. *Cell Microbiol.* 8:139-48.
- *Benítez-Hernández I, Méndez-Enríquez E, Ostoa P, Fortoul T, Ramírez JA, Stempin C, Cerbán F, Soldevila G, García-Zepeda EA. 2010. Proteolytic cleavage of chemokines by *Trypanosoma cruzi*'s cruzipain inhibits chemokine functions by promoting the generation of antagonists. *Immunobiology*, 215:413-426.
- *Bernfield M, Götte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, Zako M. 1999. Functions of cell surface heparin sulfate proteoglycans. *Annual Review of Biochemistry*, 68:729-777.
- *Bernstein HB, Compans RW. 1992. Sulfation of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein. *J. Virol.*, 66:6953-6959.
- *Blanco SB, Segura EL, Cura EN, Chuit R, Tulian L, Flores I, Garbarino G, Villalonga JF, Gurtler RE. 2000. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: an operational outline for detecting and treating infected infants in north-western Argentina. *Trop Med Int Health*, 5:293-301.
- *Blasius AL, Colonna M. 2006. Sampling and signaling in plasmacytoid dendritic cells: the potential roles of Siglec-H. *Trends Immunol.* 27:255-260.
- *Bochner, B.S., Alvarez, R.A., Mehta, P., Bovin, N.V., Blixt, O., White, J.R., and Schnaar, R.L. 2005. Glycan array screening reveals a candidate ligand for Siglec-8. *J. Biol. Chem.*, 280:4307-4312.
- Bonay P, Fresno M. 1995. Characterization of carbohydrate binding proteins in *Trypanosoma cruzi*. 270:11062-70.

*Bonet AH, Cichero JA, Kushnir E, Grand JC, Segura EL. 1968. Estudio epidemiológico sobre la enfermedad de Chagas Mazza en comunidades rurales de la provincia de Córdoba. *Sem Medic*, 133:58.

*Bontempi E, Martinez J, Cazzulo JJ. 1989. Subcellular localization of a cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 33:43-7.

*Brack C. 1968. Electron microscopic studies on the life cycle of *Trypanosoma cruzi* with special reference to developmental forms in the vector *rhodnius prolixus*. *Acta Trop.*, 25:289-356.

*Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54.

*Brenner Z, Gazzinelli RT. 1997 Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol.*, 114:103-10.

*Brion F, Schwartz JC, Vargas F. 1987. Properties and localization of the sulfate-activating system in rat brain. *Neurochem.* 48:1171-1177.

*Búa J, Volta BJ, Velazquez EB, Ruiz AM, Rissio AM, Cardoni RL. 2012. Vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* infection: quantification of parasite burden in mothers and their children by parasite DNA amplification. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 106: 623-628.

Budzikiewicz H, Djerassi C, Williams DH. 1967. Mass spectrometry of organic compounds. (San Francisco, Holden-Day).

*Burleigh BA, Andrews NW. 1995. A 120 kDa alkaline peptidase from *Trypanosoma cruzi* is involved in the generation of a novel Ca²⁺ signaling factor for mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, 270:5172-5180.

*Burleigh BA, Andrews NW. 1998. Signaling and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Curr. Opin. Microbiol.*, 1:461-465.

*Buscaglia CA, Campo VA, Di Noia JM, Torrecilhas AC, De Marchi CR, Ferguson MA, Frasch AC, Almeida IC. 2004. The surface coat of the mammal-dwelling infective

trypomastigote stage of *Trypanosoma cruzi* is formed by highly diverse immunogenic mucins. *J Biol Chem.*, 16:15860-9.

*Buscaglia CA, Campo VA, Frasch AC, Di Noia JM. 2006. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: hostdependent coat diversity. *Nat Rev Microbiol.*, 4:229-236.

*Butler CE, Tyler KM. 2012. Membrane traffic and synaptic cross-talk during host cell entry by *Trypanosoma cruzi*. *Cell. Microbiol.* 14:1345-1353.

*Caler EV, Vaena de Avalos S, Haynes PA, Andrews NW, Burleigh B. 1998. Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* invasion. *EMBO J.*, 17:4975-4986.

*Calvet CM, Melo TG, Garzoni LR, Oliveira FO Jr, Neto DT, Meirelles L, Pereira MC. 2012. Current understanding of the *Trypanosoma cruzi*-cardiomyocyte interaction. *Front. Immunol.* 3:1-8.

*Calvet CM, Toma L, De Souza, FR, Meirelles MN, Pereira MC. 2003. Heparan sulfate proteoglycans mediate the invasion of cardiomyocytes by *Trypanosoma cruzi*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 50:97-103.

*Campanero-Rhodes MA, Childs RA, Kiso M, Komba S, Le Narvor C, Warren J, Otto D, Crocker PR, Feizi T (2006) Carbohydrate microarrays reveal sulphation as a modulator of siglec binding. *Biochem Biophys Res Commun* 344(4):1141-6.

*Campetella O, Henriksson J, Aslund L, Frasch ACC, Pettersson U, Cazzulo JJ. 1992. The major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* is encoded by multiple polymorphic tandemly organized genes located on different chromosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 50:225-34.

*Campetella O, Martínez J, Cazzulo JJ. 1990. A major cysteine proteinase is developmentally regulated in *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol. Lett.* 67:145-50.

*Carlier Y, Torrico F. 2003. Congenital infection with *Trypanosoma cruzi*: from mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control. *Rev Soc Bras Med Trop*, 36:767-771.

- *Carruthers VB, Hakansson S, Giddings OK, Sibley LD. 2002. *Toxoplasma gondii* uses sulfated proteoglycans for substrate and host cell attachment. *Infect.Immun.* 68 (7):4005–4011
- *Castro JA, de Mecca MM, Bartel LC. 2006. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Hum Exp Toxicol.*, 25:471-9.
- *Cavalcanti DP, Shimada MK, Probst CM, Souto-Padrón TC, de Souza W, Goldenberg S, Fragoso SP, Motta MC. 2009. Expression and subcellular localization of kinetoplast-associated proteins in the different developmental stages of *Trypanosoma cruzi*. *BMC Microbiol.*9:120.
- *Cazorla SI, Frank FM, Malchiodi EL. 2009. Vaccination approaches against *Trypanosoma cruzi* infection. *Expert. Rev. Vaccines.*, 8: 921-35.
- *Cazorla SI, Frank FM, Becker PD, Arnaiz M, Mirkin GA, Corral RS, Guzmán CA, Malchiodi EL. 2010. Redirection of the immune response to the functional catalytic domain of the cysteine proteinase cruzipain improves protective immunity against *Trypanosoma cruzi* infection. *J Infect Dis.* 11; 202 (1):136-44.
- *Cazzulo JJ. 2002. Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: potential targets for the chemotherapy of Chagas disease. *Curr. Top. Med. Chem.* 2(11): 1261-71.
- *Cazzulo JJ, Cazzulo Franke MC, Martinez J, Franke de Cazzulo BM. 1990a. Some kinetic properties of cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1037:186-91.
- *Cazzulo JJ, Couso R, Raimondi A, Wernstedt C, Hellman U. 1989. Further characterization and partial amino acid sequence of a cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 33:33-41.
- *Cazzulo JJ, Frasch ACC. 1992. SAPA/trans-sialidase and cruzipain: two antigens from *Trypanosoma cruzi* contain immunodominant but enzymatically inactive domains. *FASEB J.*, 6:3259-64.
- *Cazzulo JJ, Hellman U, Couso R, Parodi AJ. 1990. Amino acid and carbohydrate composition of a lysosomal cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. Absence of phosphorylated mannose residues. *Mol. Biochem. Parasitol.* 38:41-8.

- *Cazzulo JJ, Labriola C, Parussini F, Duschak VG, Martínez J, Franke de Cazzulo B. 1995. Cysteine proteinases in *Trypanosoma cruzi* and other trypanosomatid parasites. *Acta. Chim. Slov.* 42:409-18.
- *Cazzulo JJ, Martinez J, Parodi AJA, Hellman U, Wernstedt C, Hellman U. 1992. On the post-translational modifications at the C-terminal domain of the major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. *FEMS. Microbiol. Lett.*, 79:411-6.
- *Cazzulo JJ, Segura EL. 1985. *Trypanosoma cruzi*. En: Carcavallo RH, Rabinovich JE, Tonn RJ. Parásitos-reservorios-control-situación regional. Buenos Aires: Servicio Nacional de Chagas. Factores biológicos y ecológicos en la Enfermedad de Chagas. 2: 251-62.
- *Cazzulo JJ, Stoka V, Turk V. 1997. Cruzipain, the major cysteine proteinase from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Biol. Chem.*, 378:1-10.
- *Cazzulo JJ, Stoka, V., Turk, V. 2001. The major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*: A valid target for chemotherapy of Chagas disease. *Curr. Pharm. Des.*, 7:1143-1156.
- *Cerisola JA, Rohweder R, Segura EL, del Prado CCe, Alvarez M, de Martini G JW. 1974. El xenodiagnóstico. Normalización, utilidad. Publ. Ministerio de Bienestar Social Secret De Estado de Salud Pública de BsAs Argentina.
- *Chiba H, Komatsu K, Lee YC, Tomizuka T, Strott CA. 1995. The 3'-terminal exon of the family of steroid and phenol sulfotransferase genes is spliced at the N-terminal glycine of the universally conserved GXXGXXK motif that forms the sulfonate donor binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92:8176-9.
- *Chuenkova MV, Furnari FB, Cavenee WK, Pereira MA. 2001. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase: a potent and specific survival factor for human Schwann cells by means of phosphatidyl inositol 3-kinase/Akt signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 9936-9941.
- *Cieniewski-Bernard C, Bastide B, Lefebvre T, Lemoine J, Mounier Y, Michalski JC. Identification of O-linked N-acetylglucosamine proteins in rat skeletal muscle using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteom.* 2004; 3: 577-85.

- *Claycomb WC, Lanson NA Jr., Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A, Izzo NJ Jr. 1998. HL-1 cells: A cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95(6), 2979-84.
- *Cohen JE, Gürtler RE. 2001. Modeling household transmission of American trypanosomiasis. *Science.* 293:694-698.
- *Colli W. 1993. Trans-sialidase: a unique enzyme activity discovered in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. *FASEB J.*, 7:1257-1264.
- *Collins BE, Blixt O, Bovin NV, Danzer CP, Chui D, Marth JD, Nitschke L, Paulson JC. 2002. Constitutively unmasked CD22 on B cells of ST6Gal I knockout mice: novel sialoside probe for murine CD22. *Glycobiology*, 12:563-571.
- *Coombs GH, Mottram JC. 1997. Trypanosomiasis and Leishmaniasis (Hide G & Mottram JC, Coombs GH & Holmes PH, eds.), pp. 177–197. CAB International, Oxford, UK.
- *Coombs GH, Mottram JC. 1997. Parasite proteinases and amino acid metabolism: possibilities for chemotherapeutic exploitation. *Parasitology*, 114: S61-80.
- *Couto AS, Soprano LL, Landoni M, Pourcelot M, Acosta DM, Bultel L, Parente J, Ferrero MR, Barbier M, Dussouy C, Esteva MI, Kovensky J, Duschak VG. 2012. An anionic synthetic sugar containing 6-SO₃⁻-NAcGlc mimics the sulfated cruzipain epitope that plays a central role in immune recognition. *FEBS J.* 279(19):3665-79.
- *Couto AS, Caffaro C, Uhrig ML, Kimura E, Peres VJ, Merino EF, Katzin AM, Nishioka M, Nonami H, Erra-Balsells R. 2004. Glycosphingolipids in *Plasmodium falciparum* Presence of an active glucosylceramide synthase. *Eur. J. Biochem.* 271: 2204-14.
- *Crocker PR, Paulson JC, Varki A. 2007. Siglecs and their roles in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.*, 7:255-266. Review.
- *Crocker PR, Gordon S. 1989. Mouse macrophage hemagglutinin (sheep erythrocyte receptor) with specificity for sialylated glycoconjugates characterized by a monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* 169:1333-1346.

*Crocker PR, Varki A. 2001. Siglecs in the immune system. *Immunology*, 103:137-145.

*Crocker PR, Mucklow S, Bouckson V, McWilliam A, Willis AC, Gordon S, Milon G, Kelm S, Bradfield P. 1994. Sialoadhesin, a macrophage sialic acid binding receptor for haemopoietic cells with 17 immunoglobulin-like domains. *EMBO J.*, 13:4490-4503.

*Cunha-e-Silva N, Sant'Anna C, Pereira MG, Porto-Carreiro I, Jeovanio AL, de Souza W. 2006. Reservosomes: multipurpose organelles? *Parasitol Res.*, 99:325-327.

*Cunha-e-Silva NL, Atella GC, Porto-Carreiro IA, Morgado-Diaz JA, Pereira MG, De Souza W. 2002. Isolation and characterization of a reservosome fraction from *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol Lett.*, 214:7-12.

*Cunha-Neto E, Bilate AM, Hyland KV, Fonseca SG, Kalil J, Engman DM. 2006. Induction of cardiac autoimmunity in Chagas disease: A case for molecular mimicry. *Autoimmunity.*, 39:41-54.

*De Andrade AL, Zicker F, de Oliveira RM, Almeida Silva S, Luquetti A, Travassos LR, Almeida IC, de Andrade SS, de Andrade JG, Martelli CM. 1996. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet.* 348:1407-13.

*De Araújo-Jorge TC, de Souza W. 1986. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with macrophages: effect of previous incubation of the parasites or the host cells with lectins. *Z Parasitenkd.* 72:153-71.

*De Carvalho TU, de Souza W. 1983. Separation of amastigotes and trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* from cultured cells. *Z Parasitenkd.* 69:571-5.

*De Lederkremer RM, Zingales B, Confalonieri AN, Couto AS, Martin NF, Colli W. 1985. *In vivo* incorporation of palmitic acid and galactose in glycolipids of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Biochem Int.*, 10:79-88.

*De Melo-Jorge, M., and Pereira Perrin, M. 2007. The Chagas'disease parasite *Trypanosoma cruzi* exploits nerve growth factor receptor TrkA to infect mammalian hosts. *Cell Host Microbe*, 1:251-261.

- *De Souza W. 2008. Electron microscopy of trypanosomes: a historical view. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 103(4):313-25.
- *De Souza W, Souto-Pradón T. 1978. The kinetoplast of *Trypanosoma cruzi* during cell differentiation (proceedings). *An. Acad. Bras. Cienc.* 50:597-7.
- *De Souza W. 1999. A Short Review on the Morphology of *Trypanosoma cruzi* from 1909 to 1999. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.*, 94(SI):17-36.
- *De Souza W, de Carvalho TU, Benchimol M, Chiari E. 1978b. *Trypanosoma cruzi* ultrastructural, cytochemical and freeze-fracture studies of protein uptake. *Exp Parasitol.*, 45:101-15.
- *De Souza W, Martínez-Palomo A, González-Robles A. 1978a. The cell surface of *Trypanosoma cruzi*: cytochemistry and freeze-fracture. *J Cell Sci.*, 33:285-99.
- *Del Nery E, Juliano MA, Lima APCA, Scharfstein J, Juliano L. 1997. Kininogenase activity by the major cysteinyl proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.*, 272: 25713-8.
- *Dell A, Morris HR. 2001. Glycoprotein structure determination by mass spectrometry. *Science*. 291:2351-6.
- *Dias JC, Silveira AC, Schofield, CJ. 2002. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97:603-612.
- *Dietrich CP, Tersariol IL, Toma L, Moraes CT, Porcionatto MA, Oliveira FW, Nader HB. 1998. Structure of heparan sulfate: identification of variable and constant oligosaccharide domains in eight heparan sulfates of different origins. *Cell and Molecular Biology*, 44:417-429.
- *Dos Reis FCG, Judice WAS, Juliano MA, Juliano L, Scharfstein J, Lima APC de A. 2006. The substrate specificity of cruzipain-2, a cysteine protease isoform from *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 259: 215-20.
- *Doyle P, de la Canal L, Engel JC, Parodi AJ. 1986. Characterization of the mechanism of protein glycosylation and the structure of glycoconjugates in tissue culture

trypomastigotes and intracellular amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 21(1): 93-101.

*Doyle PS, Zhou YM, Hsieh I, Greenbaum DC, McKerrow JH, Engel JC. 2011. The *Trypanosoma cruzi* protease cruzain mediates immune evasion. *PLoS Pathog.*,7:e1002139.

*Duffy T, Bisio M, Altcheh J, Burgos JM, Diez M, Levin MJ, Favaloro RR, Freilij H, Schijman AG. 2009. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis*, 3:e419.

*Duschak, VG. 2011. A Decade of Targets and Patented Drugs for Chemotherapy of Chagas Disease. *Recent Pat. Anti-Infect. Drug Disc.* 6:216-59.

*Duschak VG, Barboza M, Garcia GA, Lammel EM, Couto AS, Isola ELD. 2006. Novel cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Parasitology.* 132: 345-55.

*Duschak VG, Barboza M Couto AS. 2003. *Trypanosoma cruzi*: partial characterization of minor cruzipain Isoforms non-adsorbed to Concanavalin A-Sepharose. *Exp. Parasitol.*, 104:122-130.

*Duschak VG, Cazzulo JJ. 1991. Subcellular localization of glutamate dehydrogenases and alanine aminotransferase in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol. Lett.* 83 : 131-6.

*Duschak VG, Ciaccio M, Nasser JR. Basombrío MA. 2001. Enzymatic activity, protein expression, and gene sequence of cruzipain in virulent and attenuated *Trypanosoma cruzi* strains. *J. Parasitol.* 87(5): 1016-22.

*Duschak VG, Couto AS. 2009. Cruzipain, the Major Cysteine Protease of *Trypanosoma cruzi*: A Sulfated Glycoprotein Antigen as Relevant Candidate for Vaccine Development and Drug Target. A Review. *Current Med. Chem.* 16:3174-202.

*Dutra WO, Gollob KJ. 2008 Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Curr Opin Infect Dis.* 21(3):287-92.

- *Eakin AE, Miles AA, Harth G, McKerrow JH, Craik CS. 1992. The sequence, organization and expression of the major cysteine protease (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.*, 267:7411-20.
- *Engel JC, Doyle PS, Hsieh Y, McKerrow JH. 1998. Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Exp. Med.*, 88:725-34.
- *Engel JC, Parodi AJ. 1985. *Trypanosoma cruzi* Cells Undergo an Alteration in Protein N-Glycosylation upon Differentiation. *J. Biol. Chem.*, 260:10105-10.
- *Engel P, Nojima Y, Rothstein D, Zhou LJ, Wilson GL, Kehrl, JH, Tedder TF. 1993. The same epitope on CD22 of B lymphocytes mediates the adhesion of erythrocytes, T and B lymphocytes, neutrophils, and monocytes. *J. Immunol.*, 150, 4719–4732.
- *Erdmann H, Steeg C, Koch-Nolte F, Fleischer B, Jacobs T. 2009. Sialylated ligands on pathogenic *Trypanosoma cruzi* interact with Siglec-E (sialic acid-binding Ig-like lectin-E). *Cell Microbiol.*, 11:1600-1611.
- *Erra-Balsells R, Nonami H. 2002. Nor-Harmane (9H-pyrido [3,4-b]indole) as outstanding matrix for UVMATRIX-assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of synthetic and biopolymers. *Environ Control Biol.*, 40: 55-73.
- *Erra-Balsells R. 2004. “Del Vuelo de las Proteínas y de como lograrlo” (Espectrometría de masa UV-MALDI). *Revista Química Viva*, 2: 56-69.
- *Ey PL, Prowse SJ, Jenkin CR. 1978. Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-sepharose. *Immunochemistry.* 15:429-36.
- *Feldman S, García G, Svetaz MJ, Avila JL, Revelli S, Bottasso AO, Marcipar, A. 1999. Evidence that antisulfatide autoantibodies from rats experimentally infected with *Trypanosoma cruzi* bind to homologous neural tissue. *Parasitol. Res.*, 85:446-51.
- *Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 1989; 246(4926):64-71.

- *Fernandes MC, Andrews, NW. 2012. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. *FEMS Microbiol. Rev.*36, 734–747.
- *Fernandes MC, de Andrade LR, Andrews, NW, Mortara, RA. 2011. *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes induce cytoskeleton modifications during HeLa cell invasion. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 106:1014-1016.
- *Ferreira D, Cortez M, Atayde VD, Yoshida N. 2006. Actin cytoskeleton dependent and independent host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is mediated by distinct parasite surface molecules. *Infect. Immun.*, 74:5522-5528.
- *Figueiredo RCBQ, Steindel M, Soares MJ. 1994. The reservosomes of epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*: occurrence during *in vitro* cultivation. *Parasitol Res.*, 80: 517-522.
- *Fleckenstein JM, Holland JT, Hasty DL. 2002. Interaction of an outer membrane protein of enterotoxigenic *Escherichia coli* with cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Infect. Immun.* 70 (3): 1530–1537.
- *Fiorentino BF, Bond MW, Mosmann TR. 1989. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exp. Med.*170:2081.
- *Frank FM, Cazorla SI, Sartori MJ, Corral RS. 2008. Elicitation of specific, Th1-biased immune response precludes skeletal muscle damage in cruzipain-vaccinated mice. *Exp. Mol. Pathol.* 84(1): 64-70.
- *Franke de Cazzulo BM, Martínez J, North MJ, Coombs GH, Cazzulo JJ. 1994. Effects of proteinase inhibitors on the growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *FEMS. Microbiol. Lett.*124:81-86.
- *Freeze HH, Wolgast D. 1986. Structural analysis of N-linked oligosaccharides from glycoproteins secreted by *Dictyostelium discoideum*. Identification of mannose 6-sulfate. *J. Biol. Chem.*, 261:127-134.
- *Freeze HH, Yeh R, Miller AL, Kornfeld S. 1983. Structural analysis of the asparagine-linked oligosaccharides from free lysosomal enzymes of *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* 258(4): 14874-9.

- *Fukuda M, Hiraoka N, Akama TO, Fukuda MN. 2001. Carbohydrate-modifying sulfotransferases: structure, function, and pathophysiology. *J. Biol. Chem.*, 276: 47747-50.
- *Garavaglia PA, Cannata JJ, Ruiz AM, Maugeri D, Duran R, Galleano M, García GA. 2010. Identification, cloning and characterization of an aldo-keto reductase from *Trypanosoma cruzi* with quinone oxido-reductase activity. *Mol. Biochem. Parasitol.* 173 (2),132-141
- *Garrido VV, Dulgerian LR, Stempin CC, Cerbàn FM. 2011. The increase in mannose receptor recycling favors arginase induction and *Trypanosoma cruzi* survival in macrophages. *Int. J. Biol. Scien.* 7:1257-72.
- *Gascon J, Bern C, Pinazo MJ. 2010. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop.* 115: 22-27.
- *Giacometti A, Camara MM, Bouvier LA, Miranda MR, Pereira CA. 2010. TcAdk3, una adenilato quinasa de localización glicosomal de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Fac. Cs Méd. Univ. Nac. Córdoba*, 67(S2):39-40.
- *Giordanengo L, Maldonado C, Rivarola HW. 2000. Induction of antibodies reactive to cardiac myosin and development of heart alterations in cruzipain-immunized mice and their offspring. *Eur. J. Immunol.* 30: 3181-9.
- *Gironés N, Fresno M. 2003. Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence or both? *Trends Parasitol.* 19:19-22.
- *Goldenberg SI, Contreras VT, Salles JM, Bonaldo MC, De Lima Franco MPA, Linss J, Lafaille J, Valle D, Morel CM. 1984. Facts and hypothesis on *Trypanosoma cruzi* differentiation. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 79:39-44.
- *Gomis Yagües V. 2008. Espectrometría de masas. Universidad de Alicante. Departamento de Ingeniería Química Técnicas Instrumentales en el Análisis Industrial, Tema 5.
- *Gonzalez Cappa SM, Sanz Op, Muller LA, Molina HA, Fernandez J, Rimoldi MT, Sica RE. 1987. Peripheral nervous system damage in experimental chronic Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg.* 36:41-5

- *Green ED, van Halbeek H, Boime I, Baenziger JU. 1985. Structural elucidation of the disulfated oligosaccharide from bovine lutropin. *J.Biol. Chem.*, 260:15623-15630.
- *Guía de Prevención y Tratamiento de las Infecciones Congénitas y Perinatales 2010. <http://www.msal.gov.ar/promin/archivos/pdf/Guia-de-Infecciones.pdf>
- *Guías para la atención al paciente infectado con *Trypanosoma cruzi* (Enfermedad de Chagas) 2012. Buenos Aires: Ministerio de Salud de la Nación.
- *Hadjuk SL, Sabatini RS. 1996. RNA editing: post-transcriptional restructuring of genetic information. P.134-158. In DF Smith & M Parsons (eds), *Molecular Biology of Parasitic Protozoa*, IRL Press, New York.
- *Haedo AH, Chiale PA, Bandieri JD, Lázzari JO, Elizari MV, Rosenbaum MB. 1986. Comparative antiarrhythmic efficacy of verapamil, 17-monochloroacetylajmaline, mexiletine and amiodarone in patients with severe chagasic myocarditis: relation with the underlying arrhythmogenic mechanisms. *J Am Coll Cardiol.*, 7:1114-20.
- *Hamerman JA, Lanier LL. 2006. Inhibition of immune responses by ITAM-bearing receptors. *Sci. STKE*, (320):re1.
- *Harris JL, Backes BJ, Leonetti F, Mahrus S, Ellman JA, Craik CS. . 2000. Rapid and general profiling of protease specificity by using combinatorial fluorogenic substrate libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 97:7754-9.
- *Harth G, Andrews N, Mills AA, Engel JC, Smith R, McKerrow JH. 1993. Peptide-fluoromethyl ketones arrest intracellular replication and intercellular transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem. Parasitol.* 58:17-24.
- *Harvey DJ. 2011 Analysis of carbohydrates and glycoconjugates by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: an update for the period 2005–2006. *Mass Spect. Reviews.* 30: 1-100.
- *Harvey DJ. 1999. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates. *Mass. Spectrom. Rev.*, 18:349-50.

- *He D, Falany CN. 2007. Inhibition of SULT2B1b expression alters effects of 3beta-hydroxysteroids on cell proliferation and steroid hormone receptor expression in human LNCaP prostate cancer cells. *Prostate*. 67:1318-29.
- *Hellman U, Wernstedt C, Cazzulo JJ. 1991. Self-proteolysis of the cysteine proteinase, cruzipain, from *Trypanosoma cruzi* gives a major fragment corresponding to its carboxy-terminal domain. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 44: 15-22.
- *Herrera EM, Ming M, Ortega-Barria E, Pereira ME. 1994. Mediation of *Trypanosoma cruzi* invasion by heparan sulfate receptors on host cells and penetrin counter receptors on the trypanosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 65 (1):73-83
- *Hissa B, Duarte JG, Kelles LF, Santos FP, del Puerto HL, Gazzinelli-Guimarães PH, de Paula AM, Agero U, Mesquita ON, Guatimosim C, Chiari E, Andrade LO. 2012. Membrane cholesterol regulates lysosome-plasma membrane fusion events and modulates *Trypanosoma cruzi* invasion of host cells. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 6:e1583.
- *Hoft DF, Lynch RG, Kirchhoff LV. 1993. Kinetic analysis of antigen-specific immune responses in resistant and susceptible mice during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.*, 151:7038.
- *Honke K, Taniguchi N. 2002. Sulfotransferases and sulfated oligosaccharides. *Med. Res. Rev.*, 22:637-54.
- *Hu Y, Suarez J, Fricovsky E, Wang H, Scott BT, Trauger SA, Han W, Hu Y, Oyeleye MO, Dillmann WH. 2009. Increased enzymatic O-GlcNAcylation of mitochondrial proteins impairs mitochondrial function in cardiac myocytes exposed to high glucose. *J. Biol. Chem.* 284:547-55.
- *Huete-Pérez JA, Engel JC, Brinen LS, Mottram JC, McKerrow JH. 1999. Protease trafficking in two primitive eukaryotes is mediated by a prodomain protein motif. *J. Biol. Chem.*, 274:16249-56.
- *Jacobs T, Erdmann H, Fleischer B .2010. Molecular interaction of Siglecs (sialic acid-binding Ig-like lectins) with sialylated ligands on *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Cell Biol* 89:113-116.
- *Jankovic D, Zhugong L, Gause, WC. 2001. Th1 and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. *Trends Immunol.* 22:450.

- *Juhasz P, Costello CE. 1992. Matrix-assisted laser desorption Ionization time-of-flight mass spectrometry of underivatized and permethylated gangliosides. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, 3:785-96.
- *Kakuta Y¹, Pedersen LG, Pedersen LC, Negishi M. 1998. Conserved structural motifs in the sulfotransferase family. *Trends Biochem Sci.*, 23:129-30.
- *Karas M, Hillenkamp F. 1988. Laser desorption Ionization of proteins with molecular masses exceeding 10 000 Daltons. *Anal. Chem.*, 60:2299-301.
- *Kierszenbaum F. 2003. Views on the autoimmunity hypothesis for Chagas disease pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 37:1-11.
- *Kim DS, Hosmillo M, Alfajaro MM, Kim JY, Park JG, Son KY, Ryu EH, Sorgeloos F, Kwon HJ, Park SJ, Lee WS, Cho D, Kwon J, Choi JS, Kang MI, Goodfellow I, Cho KO. 2014. Both α 2,3- and α 2,6-Linked Sialic Acids on O-Linked Glycoproteins Act as Functional Receptors for Porcine Sapovirus. *PLoS Pathog.*, 10:e1004172.
- *Klaassen CD, Boles JW. 1997. Sulfation and sulfotransferases 5: the importance of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) in the regulation of sulfation. *FASEB J.*, 11: 404-18.
- *Klemba M, Goldberg DE. 2002 Biological roles of Proteases in parasitic protozoa. *Annu. Rev. Biochem.* 71: 275-305.
- *Komatsu K, Driscoll WJ, Koh YC, Strott CA. 1994. A P-loop related motif (GxxGxxK) highly conserved in sulfotransferases is required for binding the activated sulfate donor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 204, 1178-1185
- *Kumar S, Tarleton RL. 2001. Antigen-specific Th1 but not Th2 cells provide protection from lethal *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Immunol.* 166: 4596-4603.
- *Kuschnir E, Sgammini H, Castro R., Evequoz C, Ledesma R, Brunetto, J. 1985. Evaluation of cardiac function by radioisotopic angiography, in patients with chronic Chagas cardiopathy. *Arq. Bras. Cardiol.* 45: 249-56.

- *Lacombe OK, Zuma AA, da Silva CC, de Souza W, Motta MC. 2014. Effects of camptothecin derivatives and topoisomerase dual inhibitors on *Trypanosoma cruzi* growth and ultrastructure. *J Negat Results Biomed.*, 13:11.
- *Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*. 227:680-5.
- *Lanoue A, Batista FD, Stewart M, Neuberger MS. 2002. Interaction of CD22 with alpha 2,6-linked sialoglycoconjugates: innate recognition of self to dampen B cell autoreactivity? *Eur. J. Immunol.*, 32:348-355.
- *Laranja FS, Dias, E, Nobrega, G, Miranda, A. 1956. Chagas' Disease. A clinical, epidemiologic, and pathologic study. *Circulation*. (XIV).
- *Leon JS, Godsel LM, Wang K, Engman DM. 2001. Cardiac Myosin Autoimmunity in Acute Chagas' Heart Disease. *Inf. Immun.*, 69:5643-9.
- *Levine ND, Corliss JO, Cox PEG. 1980. A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool.* 27:37-58.
- *Lima APCA, Dos Reis FCG, Serveau C, Lalmanach G, Juliano L, Ménard R, Vernet T, Thomas DY, Storer AC, Scharfstein J. 2001. Cysteine protease isoforms from *Trypanosoma cruzi*, cruzipain 2 and cruzain, present different substrate preference and susceptibility to inhibitors. *Mol. Biochem. Parasitol.* 114:41-52.
- *Liu Y, Chirino AJ, Misulovin Z, Leteux C, Feizi T, Nussenzweig MC, Bjorkman PJ. 2000. Crystal structure of the cysteine-rich domain of mannose receptor complexed with a sulfated carbohydrate ligand. *J. Exp. Med.*, 191:1105-1116.
- *Losavio A, Jones MC, Sanz OP, Mirkin G, Gonzalez Cappa SM, Muchnik S, SicaREP. 1989. A sequential study of the peripheral nervous system involvement in experimental Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg.* 41:539-547.
- *Lowry OH, Rosebrough NH, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.*, 193:265-75.

- *Malchiodi EL, Chiaramonte MG, Martínez JA, Zwirner NW, Margni RA, Cazzulo JJ. 1993. Identity of the major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* and an antigen (Ag163B6) isolated with a monoclonal antibody. *Immunol. Lett.* 35: 59-62.
- *Martinez J, Campetella O, Frasch AC, Cazzulo JJ. 1991. The major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* is antigenic in human infections. *Infect Immun.* 59(11):4275-7.
- *Martínez J, Campetella O, Frasch AC, Cazzulo JJ. 1993. The reactivity of sera from chagasic patients against different fragments of cruzipain, the major cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*, suggests the presence of defined antigenic and catalytic domains. *Immunol Lett.* 35(2):191-6.
- *Martínez J, Cazzulo JJ. 1992. Anomalous electrophoretic behaviour of the major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* in relation to its apparent molecular mass. *FEMS. Microbiol. Lett.* 74(2-3): 225-9.
- *Martinez J, Henriksson J, Ridaker M, Pettersson U, Cazzulo JJ. 1998. Polymorphisms of the genes encoding cruzipain, the major cysteine of *Trypanosoma cruzi*, in the region encoding the C-terminal domain. *FEMS. Microbiol. Lett.* 159:35-39.
- *Martínez J, Henriksson J, Rydåker M, Cazzulo JJ, Pettersson U. 1995. Genes for cysteine proteinases from *Trypanosoma rangeli*. *FEMS. Microbiol. Lett.* 129: 135-41.
- *Martinez-Pomares L, Sheena A, Linehan, Philip R, Taylor y Siamon Gordon. 2001. Binding Properties of the Mannose Receptor. *Immunobiol.* 204:527–535.
- *Martinez-Pomares L, Wienke D, Stillion R, McKenzie EJ, Arnold JN, Harris J, McGreal E, Sim RB, Isacke CM, Gordon S. 2006. Carbohydrate-independent recognition of collagens by the macrophage mannose receptor. *Eur. J. Immunol.* 36: 1074-82.
- *Maya JD, Cassels BK, Iturriaga-Vásquez P, Ferreira J, Faúndez M, Galanti N, Ferreira A, Morello A. 2007. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.*, 146:601-20.
- *Mc Lafferty FW, Turecek F. 1993. Interpretation of mass spectra, 4th ed., California, University Science Books.

- *McMillan SJ, Sharma RS, McKenzie EJ, Richards HE, Zhang J, Prescott A, Crocker PR. 2013. Siglec-E is a negative regulator of acute pulmonary neutrophil inflammation and suppresses CD11b β 2-integrin-dependent signaling. *Blood*, 121:2084-94.
- *Medzihradzky KF, Campbell JM, Baldwin MA, Falick AM, Juhasz P, Vestal ML, Burlingame AL. 2000. The characteristics of peptide collision-induced dissociation using a high performance MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer. *Anal. Chem.*, 72:552-8.
- *Meirelles MN, Juliano L, Carmona E, Silva SG, Costa EM, Murta AC, Scharfstein J. 1992. Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* in vitro. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 52:175-84.
- *Meirelles MN, Pereira MC, Singer RH, Soeiro MN, Garzoni LR, Silva DT, Barbosa HS, Araujo-Jorge TC, Masuda MO, Capella MA, Lopes AG, Vermelho AB. 1999. *Trypanosoma cruzi*-cardiomyocytes: new contributions regarding a better understanding of this interaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 94(S1):149-52.
- *Menna-Barreto RF, Salomão K., Dantas AP, Santa-Rita RM, Soares MJ, Barbosa HS, de Castro SL. 2009. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study. *Micron* 40, 157-168
- *Metzner SI, Sousa MC, Hellman U, Cazzulo JJ, Parodi AJ. 1996. The use of UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase for radiolabeling protein-linked high mannose-type oligosaccharides. *Cell. Mol. Biol.* 42:631-5.
- *Ming M, Ewen ME, Pereira ME. 1995. Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF beta signaling pathway. *Cell*, 82:287-296.
- *Monteiro AC, Schmitz V, Svensjo E, Gazzinelli RT, Almeida IC, Todorov A, de Arruda LB, Torrecilhas AC, Pesquero JB, Morrot A, Bouskela E, Bonomo A, Lima AP, Müller-Esterl W, Scharfstein J. 2006. Cooperative activation of TLR2 and bradykininB2 receptor is required for induction of type I immunity in a mouse model of subcutaneous infection by *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 177:6325-6335.
- *Monteiro VG, Lobato CS, Silva AR, Medina DV, de Oliveira MA, Seabra SH, de Souza W, DaMatta RA. 2005. Increased association of *Trypanosoma cruzi* with sialoadhesin positive mice macrophages. *Parasitol. Res.*, 97:380-385.

- *Morales-Serna JA, Boutureira O, Díaz Y, Matheu MI, Castellón S. 2007. Recent advances in the glycosylation of sphingosines and ceramides. *Carbohydr. Res.*, 342: 1595-612.
- *Moreno SN, Docampo R, Mason RP, Leon W, Stoppani AO. 1982. Different behaviors of benzimidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. *Arch Biochem Biophys.* 218: 585-91.
- *Morris HR, Paxton T, Dell A, Langhorne J, Berg M, Bordoli RS, Hoyes J, Bateman RH. 1996. High sensitivity collisionally-activated decomposition tandem mass spectrometry on a novel quadrupole/orthogonal-acceleration time-of-flight mass spectrometer. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* 10:889-96.
- *Moustakas A, Pardali K, Gaal A, Heldin CH. 2002. Mechanisms of TGF-beta signaling in regulation of cell growth and differentiation. *Immunol. Lett.* 82:85-91.
- *Murta AC, Persechini PM, Padron T de S, De Souza W, Guimarães JA, Scharfstein J. 1990. Structural and functional identification of GP57/51 antigen of *Trypanosoma cruzi* as a cysteine proteinase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 43(1): 27-38.
- *El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, Ghedin E, Worthey EA, Delcher AL, Blandin G, Westenberger SJ, Caler E, Cerqueira GC, Branche C, Haas B, Anupama A, Arner E, Aslund L, Attipoe P, Bontempi E, Bringaud F, Burton P, Cadag E, Campbell DA, Carrington M, Crabtree J, Darban H, da Silveira JF, de Jong P, Edwards K, Englund PT, Fazelina G, Feldblyum T, Ferella M, Frasch AC, Gull K, Horn D, Hou L, Huang Y, Kindlund E, Klingbeil M, Kluge S, Koo H, Lacerda D, Levin MJ, Lorenzi H, Louie T, Machado CR, McCulloch R, McKenna A, Mizuno Y, Mottram JC, Nelson S, Ochaya S, Osoegawa K, Pai G, Parsons M, Pentony M, Pettersson U, Pop M, Ramirez JL, Rinta J, Robertson L, Salzberg SL, Sanchez DO, Seyler A, Sharma R, Shetty J, Simpson AJ, Sisk E, Tammi MT, Tarleton R, Teixeira S, Van Aken S, Vogt C, Ward PN, Wickstead B, Wortman J, White O, Fraser CM, Stuart KD, Andersson B. 2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease, *Science*, 309:409-415.
- *Noguchi N, Nakano M. 1992. Structure of the acidic N-linked carbohydrate chains of the 55-kDa glycoprotein family (PZP3) from porcine zona pellucida. *Eur. J. Biochem.*, 209:883-894.
- *Nonami H, Fukui S, Erra-Balsells R. 1997. b-carboline alkaloids as matrices for matrix-assisted ultraviolet laser desorption time-of-flight mass spectrometry of proteins and sulfated oligosaccharides: a comparative study using phenylcarbonyl compounds, carbazoles and classical matrices. *J. Mass Spectrom.* 32:287-296.

- *Oliveira FO Jr, Alves CR, Calvet CM, Toma L, Bouças RI, Nader HB, Castro Côrtes LM, Krieger MA, Meirelles Mde N, Souza Pereira MC. 2008. *Trypanosoma cruzi* heparin-binding proteins and the nature of the host cell heparan sulfate-binding domain. *Microb. Pathog.*, 44:329-38.
- *Organización Mundial de la Salud (OMS). 2007. Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas. *Organización Mundial de la Salud*.
- *Organización Panamericana de la Salud (OPS/HDM/CD/425-06). 2006. Estimación cuantitativa de la Enfermedad de Chagas en Las Américas, 6 -7.
- *Organización Panamericana de la Salud (PAHO/CHA/CD). 2014. Control de Enfermedad de Chagas. Interrupción de la Transmisión Vectorial.
- *Ori A, Wilkinson MC, Fernig, DG. 2008. The heparanome and regulation of cell function: structures, functions and challenges. *Frontiers in Bioscience* 13:4309-4338.
- *Ortega-Barria E, Boothroyd JC. 1999. A Toxoplasma lectin-like activity specific for sulfated polysaccharides is involved in host cell infection. *J. Biol. Chem.* 274:1267-1276.
- *Overath P, Stierhof Y-D, Wiese M 1997. Endocytosis and secretion in trypanosomatid parasites - tumultuous traffic in a pocket. *Trends Cell Biol* 7: 27-33.
- *Pancake SJ, Holt GD, Mellouk S, Hoffman SL, 1992. Malaria sporozoites and circumsporozoite proteins bind specifically to sulfated glycoconjugates. *J. Cell Biol*, 117: 1351-1357
- *Parodi AJ, Labriola C, Cazzulo JJ. 1995. The presence of complex-type oligosaccharides at the C-terminal domain glycosylation site of some molecules of cruzipain. *Mol. Biochem. Parasitol.* 69:247-55.
- *Parussini F, Duschak VG, Cazzulo JJ. 1998. Membrane-bound Cysteine proteinase isoforms in different developmental stages of *Trypanosoma cruzi*. *Cell. Mol. Biol.* 44: 513-19.
- *Peterson SM, Iskenderian A, Cook L, Romashko A, Tobin K, Jones M, Norton A, Gómez-Yafal A, Heartlein MW, Concino MF, Liaw L, Martini PG. 2010.

Human Sulfatase 2 inhibits in vivo tumor growth of MDA-MB-231 human breast cancer xenografts. *BMC Cancer*. 13:10:427.

*Petry K, Nudelman E, Eisen H, Hakomori S. 1988. Sulfated lipids represent common antigens on the surface of *Trypanosoma cruzi* and mammalian tissues. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 30:113-121.

*Pietschmann S, Fehn M, Kaulmann G, Wiederanders B, Wenz I, Schilling K. 2002. Foldase Function of the Cathepsin S Proregion Is Strictly Based upon Its Domain Structure. *Biol. Chem.* 383(9): 1453-8.

*Porto-Carreiro I, Attias M, Miranda K, De Souza W, Cunha-e-Silva N. 2000. *Trypanosoma cruzi* epimastigote endocytic pathway: cargo enters the cytostome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes. *Eur. J. Cell Biol.*, 79:858–869.

*Powell, L.D. and Varki, A. (1995) I-type lectins. *J. Biol. Chem.*, 270:14243–14246.

*Previato JO, Sola-Penna M, Agrellos OA, Jones C, Oeltmann T, Travassos LR, Mendonça-Previato L. 1998. Biosynthesis of O-N-acetylglucosamine-linked glycans in *Trypanosoma cruzi*. Characterization of the novel uridine diphospho-N-acetylglucosamine:polypeptide N-acetylglucosaminyltransferase-catalyzing formation of N-acetylglucosamine alpha1->O-threonine. *J. Biol. Chem.*, 273:14982-8.

*Procópio DO, Barros HC, Mortara RA. 1999. Actin-rich structures formed during the invasion of cultured cells by infective forms of *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Cell Biol.* 78: 911-924.

*Qvarnstrom Y, Schijman AG, Veron V, Aznar C, Steurer F, da Silva AJ. 2012. Sensitive and specific detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in clinical specimens using a multi-target real-time PCR approach. *PLoS Negl Trop Dis*, 6:e1689.

*Radek R, Hausmann K 1994. Endocytosis, digestion, and defecation in flagellates. *Acta Protozool.* 33:127-147.

*Rapoport EM, Pazynina GV, Sablina MA, Crocker PR & Bovin NV. 2006. Probing sialic acid binding Ig-like lectins (siglecs) with sulfated oligosaccharides. *Biochemistry*, 71:496-504.

*Rassi A Jr, Rassi A, Little W. 2000. Chagas heart disease. *Clin Cardiol.*, 23:883-889.

*Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. 2010. Chagas disease. *Lancet*, 375:1388-1402

*Rassi A, Rassi Junior, Rassi GG. 2000. Patología. En: *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Editado por Brener Z, Andrade ZA, Barral-Netto. *Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2da edición.* 231-245.

*Ravetch, J.V. and Lanier, L.L. 2000. Immune inhibitory receptors. *Science*, 290:84-89.

*Rawlings ND, Barrett AJ. 1993. Evolutionary families of peptidases. *Biochem. J.* 290: 205-18.

*Rawlings ND, Barrett AJ. 1994. Families of cysteine peptidases. *Methods Enzymol.* 244:461-86.

*Redelinghuys P, Antonopoulos A, Liu Y, Campanero-Rhodes MA, McKenzie E, Haslam SM, Dell A, Feizi T, Crocker PR. 2011. Early murine T-lymphocyte activation is accompanied by a switch from N-Glycolyl- to N-acetyl-neuraminic acid and generation of ligands for siglec-E. *J Biol Chem.*, 286:34522-32.

*Reisenman CE, Lawrence G, Guerenstein PG, Gregory T, Dotson E, Hildebrand JG. 2010. Infection of kissing bugs with *Trypanosoma cruzi*, Tucson, Arizona, USA. *Emerg Infect Dis.*, 16:400-5.

*Rens Domiano SS, Roth JA. 1987. Inhibition of M and P phenol sulfotransferase by analogues of 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate. *J. Neurochem.* 48:1411-1415.

*Richard C, Drider D, Fliss I, Denery S, Prevost H. 2004. Generation and utilization of polyclonal antibodies to a synthetic C-terminal amino acid fragment of divercin V41, a class IIa bacteriocin. *Appl Environ Microbiol.* 70(1):248-54.

*Rodríguez A, Martínez I, Chung A, Berlot CH, Andrews NW. 1999. cAMP regulates Ca²⁺ dependent exocytosis of lysosomes and lysosome-mediated cell invasion by trypanosomes. *J. Biol. Chem.* 274:16754-16759.

- *Rosenbaum MB, Cerisola JA. 1961. Epidemiología de la enfermedad de Chagas en la República Argentina. *Hospital*, 60:55-100.
- *Rosenbaum MB, Chiale PA, Haedo A, Lázzari JO, Elizari MV. 1983. Ten years of experience with amiodarone. *Am Heart J*, 106:957-64
- *Rosenbaum MB. 1964 Chagasic myocardopathy. *Prog Cardiovasc Dis.*, 7:199-225.
- *Rosestolato CT, Dutra JM, De Souza, W, Carvalho TM. 2002. Participation of host cell actin filaments during interaction of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* with host cells. *Cell Struct. Funct.* 27:91-98.
- *Sant'Anna C, Pereira MG, Lemgruber L, de Souza W, Cunha, Silva NL. 2008. New insights into the morphology of *Trypanosoma cruzi* reservosome. *Microsc. Res. Tech.*, 71:599-605.
- *Sant'Anna C, Nakayasu ES, Pereira MG, Lourenço D, de Souza W, Almeida IC, Cunha-E-Silva NL. 2009. Subcellular proteomics of *Trypanosoma cruzi* reservosomes. *Proteomics*,9:1782-94.
- *Santos-Buch CA, Acosta A. 1985. Pathology of Chagas' disease. En: Immunology and pathogenesis of Trypanosomiasis. Ed. Ian Tizard, *CRC Press Inc.* Boca Raton, Florida.
- *Sasaki N, Hirano T, Kobayashi K, Toyoda M, Miyakawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Akutsu H, Umezawa A, Nishihara S. 2010. Chemical inhibition of sulfation accelerates neural differentiation of mouse embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 401:480-6.
- *Scharfstein J, Andrade D, Svensjö E, Oliveira AC, Nascimento CR. 2013. The kallikrein-kinin system in experimental Chagas disease: a paradigm to investigate the impact of inflammatory edema on GPCR-mediated pathways of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Front Immunol.*3:396.
- *Scharfstein J, Schechter M, Senna M, Peralta JM, Mendonça-Previato L, Miles MA. 1986. *Trypanosoma cruzi*: characterization and isolation of a 57/51,000 m.w. surface glycoprotein (GP57/51) expressed by epimastigotes and bloodstream trypomastigotes. *J Immunol.* 15:137(4):1336-41.

- *Scharfstein J, Schmitz V, Morandi V, Capella MM, Lima AP, Morrot A, Juliano L, Müller-Esterl W. 2000. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B2 receptors. *J. Exp. Med.*, 192:1289-1300.
- *Schijman AG, Vigliano C, Burgos J, Favaloro R, Perrone S, Laguens R. 2000. Early diagnosis of recurrence of *Trypanosoma cruzi* infection by polymerase chain reaction after heart transplantation of a chronic Chagas' heart disease patient. *J. Heart Lung Transplant*, 19:1114-1117.
- *Schmunis GA, Cruz JR. 2005. Safety of the blood supply in Latin America. *Clin. Microbiol. Rev.*, 18:12-29.
- *Schmunis GA. 1994. American Trypanosomiasis as a public health problem. In: "Chagas' disease and the Nervous System. *PAHO. Sci. Pub.*, 547: 3-29.
- *Schnapp AR, Eickhoff, CS, Sizemore D, Curtiss R, Hoft DF. 2002. Cruzipain induces both mucosal and systemic protection against *Trypanosoma cruzi* in mice. *Infect. Immun.* 70:5065
- *Segura EL, Cura EN, Paulone I, Vasquez C, Cerisola JA. 1974. Antigenic makeup of subcellular fractions of *Trypanosoma cruzi*. *J. Protozool.* 21: 571-4.
- *Serveau C, Lalmanach G, Juliano MA, Scharfstein J, Juliano L, Gauthier F. 1996. Investigation of the substrate specificity of cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, through the use of cystatin-derived substrates and inhibitors. *Biochem. J.*, 313:951-6.
- *Sica RE, Filipini D, Panizza M, Fumo T, Baso S, Lazzari J, Molina HA. 1986. Involvement of the peripheral sensory nervous system in human chronic Chagas disease. *Med (Bs As)*, 46:662-668.
- *Siuzdak, G. 1996. Mass spectrometry for Biotechnology. Academic Press.
- *Soares MJ, De Souza W. 1988. Cytoplasmic organelles of trypanosomatids: a cytochemical and stereological study. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 20:349-361.
- *Soares MJ, De Souza W. 1991. Endocytosis of gold-labeled proteins and LDL by *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Res.* 77:461-468.

- *Soares MJ, Souto-Padrón T, Bonaldo MC, Goldenberg S, De Souza W. 1989. A stereological study of the differentiation process in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Res.* 75:522-527.
- *Soares MJ, Souto-Padrón T, De Souza W. 1992. Identification of a large pre-lysosomal compartment in the pathogenic protozoan *Trypanosoma cruzi*. *J. Cell Sci.*, 102:157-167.
- *Soares MJ, De Souza MF, De Souza W. 1987. Ultrastructural visualization of lipids in trypanosomatids. *J. Protozool.*, 34:199-203.
- *Soeiro MN, Mota RA, Batista DG, Pereira MC, Meirelles MN. 2002-2003. *Trypanosoma cruzi* Infection Impairs the Endocytosis of Zymosan A by Cardiomyocytes. *Pathobiology*, 70:69-75.
- *Soeiro MN, Paiva MM, Barbosa HS, Meirelles MN, Araújo-Jorge TC. 1999. A cardiomyocytes mannose receptor system is involved in *Trypanosoma cruzi* invasion and is down-modulated after infection. *Cell. Struct. Funct.* 24:139-49.
- *Solari AJ. 1980. Function of the dense plaques during mitosis in *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Cell Res.*, 127:457-60.
- *Souto-Padron T, Campetella OE, Cazzulo JJ, de Souza W. 1990. Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction. *J. Cell Sci.*, 96:485-490.
- *Stamenkovic I, Sgroi D, Aruffo A, Sy MS, Anderson T. 1991. The B lymphocyte adhesion molecule CD22 interacts with leukocyte common antigen CD45RO on T cells and $\alpha 2-6$ sialyltransferase, CD75, on B cells. *Cell.* 66:1133-1144.
- *Stempin C, Giordanengo L, Gea S, y Cerbán F. 2002. Alternative activation and increase of *Trypanosoma cruzi* survival in murine macrophages stimulated by cruzipain, a parasite antigen. *Journal of Leukocyte Biology* 72, 727-734
- *Stoka V, McKerrow JH, Cazzulo JJ, Turk V. 1998. Substrate inhibition of cruzipain is not affected by the C-terminal domain. *FEBS. Lett.* 429:129-33.
- *Stoka V, Nycander M, Lenarcic B, Labriola C, Cazzulo JJ, Bjork I, Turk V. 1995. Inhibition of cruzipain, the major cysteine proteinase of the protozoan parasite,

Trypanosoma cruzi, by proteinase inhibitors of the cystatin superfamily. *FEBS. Lett.*, 370:101-104.

*Suzuki Y, Suzuki M, Ito E, Goto-Inoue N, Miseki K, Iida J, Yamazaki Y, Yamada M, Suzuki A. 2006. Convenient structural analysis of glycosphingolipids using MALDI-QIT-TOF mass spectrometry with increased laser power and cooling gas? flow. *J Biochem* (Tokyo), 139: 771-7.

*Tan JH, Ludeman JP, Wedderburn J, Canals M, Hall P, Butler SJ, Taleski D, Christopoulos A, Hickey MJ, Payne RJ, Stone MJ. 2013. Tyrosine sulfation of chemokine receptor CCR2 enhances interactions with both monomeric and dimeric forms of the chemokine monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *J Biol Chem.*, 288:10024-34.

*Tarleton RL. 1990. Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*, 144: 717-724.

*Tarleton RL. 2001 Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int J Parasitol.*, 31:550-4.

*Taylor ME, Bezouska K, Drickamer K. 1992. Contribution to ligand binding by multiple carbohydrate-recognition domains in the macrophage mannose receptor. *J. Biol. Chem.* 267: 1719–1726.

*Taylor, ME, Drickamer K. 1993. Structural requirements for high affinity binding of complex ligands by the mannose receptor. *J. Biol. Chem.*, 268:399-404.

*Thomas AM, Kelly JM. 1996. Stage-regulated expression of cruzipain, the major cysteine protease of *Trypanosoma cruzi* is independent of the level of RNA'. *Mol. Biochem. Parasitol.* 76: 91-103.

*Tomas, A.M., Miles, M.M., Kelly, J.M. 1997. Overexpression of cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, is associated with enhanced metacyclogenesis. *Eur. J. Biochem.* 244, 596–603.

- *Todorov AG, Andrade D, Pesquero JB, Araujo Rde C, Bader M, Stewart J, Gera L, Müller-Esterl W, Morandi V, Goldenberg RC, Neto HC, Scharfstein J. 2003. *Trypanosoma cruzi* induces edematogenic responses in mice and invades cardiomyocytes and endothelial cells *in vitro* by activating distinct kinin receptor (B1/B2) subtypes. *FASEBJ*, 17:73-75.
- *Todorov AG, Einicker-Lamas M, de Castro S.L, Oliveira MM, Guilherme A. 2000. Activation of host cell phosphatidylinositol 3-kinases by *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Biol. Chem.*, 275:32182-32186.
- *Tomlinson S, Pontes de Carvalho LC, Vandekerckhove F, Nussenzweig V. 1994. Role of sialic acid in the resistance of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to complement. *J Immunol.*153:3141-3147.
- *Uchimura K, Rosen SD. 2006. Sulfated L-selectin ligands as a therapeutic target in chronic inflammation. *Trends Immunol.* 27:559-65.
- *Uhrig ML, Couto AS, Zingales B, Colli W, Lederkremer RM. 1992. Metabolic labelling and partial characterization of a sulfoglycolipid in *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *Carbohydr. Res.*, 231:329-34.
- *Urbina JÁ.1994. Intermediary metabolism of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today*, 10:107-110.
- *Van den Boom J, Heider D, Martin SR, Pastore A, Mueller JW. 2012. 3'-Phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) synthases, naturally fragile enzymes specifically stabilized by nucleotide binding. *J Biol Chem.*, 287:17645-55.
- *Van Rooijen, JJM, Kamerling JP, Vliegenthart JF. 1998. Sulfated di-, tri- and tetraantennary N-glycans in human Tamm-Horsfall glycoprotein. *Eur. J. Biochem.*, 256, 471-487.
- *Varki A, Angata T. 2006, Siglecs — the major subfamily of I-type lectins. *Glycobiology*, 16:1R-27R.
- *Vieira M, Dutra JM, Carvalho TM, Cunha-e-Silva NL, Souto-Padrón T, Souza W. 2002. Cellular signaling during the macrophage invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Histochem. Cell Biol.*, 118:491-500.

- *Waghabi MC, Keramidas M, Bailly S, Degrave W, Mendonça-Lima L, Soeiro Mde N, Meirelles Mde N, Paciornik S, Araújo-Jorge TC, Feige JJ. 2005. Uptake of host cell transforming growth factor beta by *Trypanosoma cruzi* amastigotes in cardiomyocytes: potential role in parasite cycle completion. *Am. J. Pathol.*, 167:993-1003.
- *Waghabi MC, Keramidas M, Bailly S, Degrave W, Mendonça-Lima L, Soeiro Mde N, Meirelles Mde N, Paciornik S, Araújo-Jorge TC, Feige JJ. 2007. SB-431542, a transforming growth factor beta inhibitor, impairs *Trypanosoma cruzi* infection in cardiomyocytes and parasite cycle completion. *Antimicrob Agents Chemother.* 51: 2905-2910.
- *Webster P, Russel DG. 1993. The flagellar pocket of trypanosomatids. *Parasitol Today* 9:201-205.
- *Weinkauff C, Salvador R, Pereira Perrin M. 2011. Neurotrophin receptor TrkC is an entry receptor for *Trypanosoma cruzi* in neural, glial, and epithelial cells. *Infect. Immun.*, 79:4081-4087.
- *WHO. 2002. Control of Chagas's disease. Second Report of the WHO Expert Committee. Technical Report Series No. 905. Geneva.
- *WHO. 2014. La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana) Facts Sheet. N°340.
- *Wiederanders B. 2000. The function of propeptide domains of cysteine proteinases. *Adv. Exp. Med Biol.*, 477:261-70.
- *Wilkowsky SE, Barbieri MA, Stahl P, Isola EL. 2001. *Trypanosoma cruzi*: phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B activation is associated with parasite invasion. *Exp. Cell Res.*, 264:211-218.
- *Wincker P, Bosseno MF, Britto C, Yaksic N, Cardoso MA, Morel CM, Brenière SF. 1994. High correlation between Chagas' disease serology and PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA in Bolivian children living in an endemic area. *FEMS Microbiol Lett.*, 124:419-423.
- *Woolsey AM, Sunwoo L, Petersen CA, Brachmann SM, Cantley LC, Burleigh BA. 2003. Novel PI3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. *J. Cell Sci.*, 116:3611-3622.

*Yokoyama-Yasunaka, JK, Pral EM, Oliveira Júnior OC, Alfieri SC, Stolf AM. 1994. *T. cruzi*: identification of proteinases in shed components of trypomastigote forms. *Acta Trop.*, 57:307-15.

*Yoshida N. 2006. Molecular basis of mammalian cell invasion by *T. cruzi*. *Acad. Bras. Scienc.* 78:87-111.

*Yung S, Chan TM. 2007. Glycosaminoglycans and proteoglycans: overlooked entities? *Peritoneal Dialysis International*, 27:104-109.

6.Publicaciones

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis fueron objeto de las siguientes publicaciones:

-“Interaction between immune modulatory mouse siglec-E and sulfates from cruzipain, a major antigen of *Trypanosoma cruzi*”. Ferrero M.R., Heins A.M., Soprano L.L.; Acosta D.M.; Esteva M.I., Couto A.S, Jacobs T, and Duschak V.G. (manuscrito en preparación para enviar a *Molecular Microbiology and Immunology* 2014)

-“Effects of chlorate on the sulfation process of *Trypanosoma cruzi* glycoconjugates. Implication of parasite sulfates in cellular invasion”. Ferrero MR, Soprano LL, Acosta DM, García GA, Esteva MI, Couto AS, Duschak VG. *Acta Trop.* 2014 137:161-73