aas1089

Tesis
ED 2011
M6.

UNIVERSIDAD CATÓLICA ANDRÉS BELLO
FACULTAD DE HUMANIDADES Y EDUCACIÓN
ESCUELA DE EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA Y QUÍMICA

Obtención de proteínas de secreción/excreción de aislados venezolanos de *Trypanosoma evansi,* con propiedades antigénicas e inmunogénicas.

(Trabajo de Grado como requisito para optar al Título de Licenciado en Educación Mención: Biología y Química)

Tutor:
Lic. Nereida PARRA

Proyecto de investigación presentado por:
Eva Maria MONIZ ALVAREZ
Karlíst Fernanda RIVERO YANES

Caracas, marzo 2011.

UCAB Universidad Católica ANDRÉS BELLO
CENTRO CULTURAL PADRE CARLOS G. PLAZA S.J.
BIBLIOTECA CENTRAL - SALA P. PLAZA S.J.
PLANTA BAJA - SALA - TESIS

APROBACIÓN DEL TUTOR

En mi carácter de tutora de la tesis titulada **"Obtención de proteínas de secreción/excreción de aislados venezolanos de *Trypanosoma evansi*, con propiedades antigénicas e inmunogénicas"** presentada por las ciudadanas Moniz Alvarez Eva y Rivero Yanes Karlist, para optar al grado de Licenciado en Educación mención Biología y Química, considero que dicha tesis reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometida a la presentación pública y evaluación por parte del jurado examinador que se designe.

En Caracas a los 18 días del mes de Marzo de 2011.

Lic. Nereida Parra

C.I.:13.532.292

AGRADECIMIENTOS

- A la Doctora Trina M. Perrone por habernos dado la oportunidad de realizar esta investigación y permitirnos trabajar junto a ella y su equipo en el laboratorio del IVIC. No sólo fue una excelente profesora para nosotras sino una gran persona, que siempre nos apoyó y nos brindó su ayuda incondicional. Aunque no esté con nosotras físicamente siempre estará en nuestros recuerdos y nuestros corazones.

- A Nereida Parra, nuestra tutora, por haber asumido la responsabilidad de trabajar con nosotras durante este proyecto, siempre brindándonos su ayuda y permitiéndonos contar con ella cada vez que la necesitamos, haciendo siempre un espacio en su tiempo para nosotras en su nueva etapa como madre.

- Al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) por habernos permitido trabajar allí durante el tiempo de experimentación del proyecto.

- A nuestros familiares y amigos, por el apoyo y cariño que siempre nos han brindado.

- A Dios, por darnos la motivación y la fuerza para haber logrado la culminación de este proyecto, a pesar de las dificultades que enfrentamos.

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS ii

INDICE GENERAL iii

INDICE DE TABLAS vi

INDICE DE FIGURAS Vii

RESUMEN Ix

INTRODUCCIÓN 1

CAPITULO I: EL PROBLEMA 3

Planteamiento del problema 3

Justificación 5

Objetivo general 8

Objetivos específicos 8

CAPITULO II: MARCO TEÓRICO 10

Morfología del Parásito 10

Vías de Secreción del Parásito 11

Ciclo de Vida de los Tripanosomas 14

Trypanosoma evansi 15

Mecanismo de Transmisión de *T. evansi* 17

Clínica de la Enfermedad 18

Patogenicidad 19

Diagnóstico de la Tripanosomosis 24

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA **27**

Fase I: Obtención de Parásitos y Fracciones Proteicas 28

A) Expansión de *T. evansi* en animales experimentales. 28

B) Extracción de la sangre a partir de ratas infectadas experimentalmente con *T. evansi* 28

C) Determinación de la parasitemia 28

D) Purificación de los tripanosomas por cromatografía de intercambio iónico en columna de DEAE-celulosa 29

E) Cuantificación y viabilidad de los tripanosomas purificados. 32

F) Obtención de proteínas de excreción/secreción 32

G) Obtención de fracción de proteínas de excreción/secreción en tampón PBSG. 33

H) Lisis de parásitos 33

I) Determinación de la concentración de las proteínas secretadas por los parásitos en el medio. 33

Fase II. Evaluación de los perfiles polipeptídicos de las fracciones proteicas. 34

A) Evaluación del perfil polipeptídico en 1D. 34

B) Tinción de geles de acrilamida 34

C) Electrotransferencia 34

Fase III. Evaluación de los perfiles antigénicos de las fracciones proteicas. 35

A) Obtención de anticuerpos policlonales de proteínas de excreción/secreción 35

B) Inmunotinción con sueros policlonales de conejo 37

C) Inmunotinción con sueros de infecciones naturales y experimentales de *T. evansi.* 39

CAPITULO IV: RESULTADOS **42**

Fase I: Obtención de Parásitos y Fracciones Proteicas 42

A) Purificación de parásitos por intercambio iónico 42

B) Preparación de fracciones proteicas 43

Fase II. Evaluación de los perfiles polipeptidicos de las fracciones proteicas. 45

A) Patrones polipeptídicos de las diferentes fracciones de los tres aislados 45

Fase III. Evaluación de los perfiles antigénicos de las fracciones proteicas del aislado El Frío 47

A) Patrones antigénicos de las fracciones proteicas con sueros policlonales 47

B) Patrones antigénicos de las fracciones proteicas con sueros de infecciones naturales y experimentales 50

CAPITULO V: DISCUSIÓN DE RESULTADOS **52**

CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES **59**

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS **62**

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Esquema resumen del procedimiento de inmunización de conejos 35

Tabla 2. Concentración de parásitos para Teva, El Frío y TeGub-323 42

Tabla 3. Concentración de los factores de secreción obtenidos en tampón de secreción (E/S), proteínas solubles (PS) y factores de secreción obtenidos en tampón PBSG de tres aislados de campo de Trypanosoma evansi. 44

Tabla 4. Viabilidad de parásitos durante la incubación de tampón de secreción y PBSG para la obtención de los factores de secreción. 44

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama esquemático de los diferentes mecanismos de secreción de los eucariotas. 13

Figura 2. Diagrama general de la morfología de un tripomastigote sanguíneo *T. evansi.* 15

Figura 3. Esquema de purificación de tripanosomas a partir de sangre fresca infectada. 31

Figura 4. Sistema homólogo y heterólogo de las tres fracciones que contienen los anticuerpos contra las membranas que contienen los antígenos. 38

Figura 5. Esquema de inmunotinción de los sueros positivos provenientes de infecciones de campo y experimentales contra las membranas de excreción/secreción. 40

Figura 6. Gráfica de la parasitemia de los clones de los parásitos de los tres aislados. 43

Figura 7. Patrones polipeptídicos de las fracciones proteicas de los tres aislados de *T. evansi* obtenidos por SDS-page. 46

Figura 8. Sistema homólogo. Electrotransferencias de tres fracciones (PBSG, E/S, PS) del aislado El Frío. 48

Figura 9. Sistema heterólogo. Electrotransferencia de tres fracciones (PBSG, E/S, PS) del aislado El Frío. 49

Figura 10. Comparación de patrones antigénicos de excreción/secreción obtenidos experimentalmente con sueros de campo del aislado El frío. 50

UNIVERSIDAD CATÓLICA ANDRÉS BELLO
ESCUELA DE EDUCACIÓN
MENCIÓN BIOLOGÍA Y QUÍMICA

OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS DE SECRECIÓN/EXCRECIÓN DE AISLADOS VENEZOLANOS DE *Trypanosoma evansi,* CON PROPIEDADES ANTIGÉNICAS E INMUNOGÉNICAS.

Autores: Eva Moniz
Karlist Rivero
Tutora: Nereida Parra
Marzo, 2011.

Resumen

Trypanosoma evansi es el parásito protozoario causante de la enfermedad conocida como "derrengadera" que afecta gran cantidad de mamíferos silvestres y domésticos en América, África y Asia, entre ellos y de especial interés, a los equinos. Este parásito se caracteriza por su habilidad para producir y secretar en el hospedador distintos tipos de antígenos de superficie durante el curso de la infección, generando diferentes respuestas inmunológicas en el hospedador y variantes en la clínica y en la patología de la enfermedad. El objetivo de este estudio fue evaluar la presencia de proteínas con propiedades antigénicas e inmunogénicas en fracciones de secreción/excreción de poblaciones homogéneas de aislados venezolanos de *T. evansi*, mediante la comparación de sus patrones antigénicos con la finalidad de determinar posibles moléculas que puedan ser potencialmente utilizadas para ensayos de diagnóstico de la enfermedad en animales infectados, además contribuirá con el desarrollo de técnicas de vacunación basadas en el análisis de las proteínas secretadas por los parásitos. Se inocularon 3 ratas con clones de parásitos de tres aislados de *T. evansi* (Teva, El Frío y TeGub-323 y) para luego obtener las proteínas de E/S, PBGS y Proteínas solubles. Posteriormente se obtuvieron anticuerpos policlonales anti-proteínas de las tres fracciones mediante la inmunización de tres conejos, seguidamente se determinó antigenicidad y especificidad de estos sueros para luego compararlos con sueros de campo de infecciones naturales y experimentales. Los resultados obtenidos en esta investigación representan una importante contribución a los estudios de la biología de *T. evansi*, particularmente de aislados venezolanos, a la búsqueda de métodos de diagnóstico certeros y métodos de control efectivos.

Palabras clave: *Trypanosoma evansi,* antígeno, anticuerpo.

INTRODUCCIÓN

La Tripanosomosis animal, conocida como "derrengadera", "surra", o "mal de caderas" causada por el parásito *Trypanosoma evansi*, es una de las enfermedades que genera más pérdidas económicas y afecta la productividad del ganado en forma negativa en África, América y Asia. (Holzmuller *et al.* 2008).

Esta especie de tripanosomas son transmitidos en el contienente africano por la mosca *Glossina* también llamada mosca "tsetse", y en América por insectos comúnmente conocidos como "tabanos" y durante su infección en mamíferos desarrollan estrategias para escapar de la respuesta inmune del hospedador, tales como, la variación de sus proteínas de superficie y la localización extracelular, lo cual permite el éxito de la supervivencia del parásito en el hospedador (Pays, 2006). La virulencia del parásito depende de varios factores, entre ellos la especie del huésped, la presencia de otras infecciones simultáneas, la edad del animal, las condiciones fisiológicas del huésped, la susceptibilidad hacia la infección y las condiciones epizootiológicas (Perrone *et al.* 2006).

El *Trypanosoma evansi* fue observado por primera vez por Griffith Evans en 1880 en sangre de caballos y camellos que sufrían una enfermedad endémica conocida en la India como "surra". En Venezuela, el parásito fue observado por Rafael Rangel en 1905, en sangre de caballos infectados por una enfermedad conocida como "derrengadera". Estudios realizados demuestran que existen diferencias en cuanto a las características de virulencia e infectividad en aislados venezolanos y es probable que proteínas de excreción/secreción estén involucradas en este

fenómeno (Perrone *et al.* 2006). Por tal motivo, se escogió estudiar tres aislados diferentes de *T. evansi* (Teva, El Frío y TeGub-323 y) con el objetivo de evaluar la presencia de proteínas con propiedades antigénicas e inmunogénicas mediante la comparación de los patrones antigénicos de los aislados. Esta investigación puede ser útil para el desarrollo de vacunas y pruebas diagnósticas para estudios epidemiológicos de *Trypanosoma evansi.*

La presentación de esta investigación se ha organizado de la siguiente manera:

El **Capítulo I** se refiere al planteamiento del problema, los objetivos y su justificación.

El **Capítulo II** presenta el marco teórico donde se resaltan los aspectos más importantes de este estudio: *Trypanosoma evansi,* tripanosomosis, virulencia, patogenicidad y proteínas de excreción/secreción.

El **Capítulo III** desarrolla la metodología donde se incluye el cronograma de actividades y los procedimientos llevados a cabo en la investigación.

El **Capítulo IV** muestra los resultados obtenidos en las diferentes fases experimentales llevadas a cabo en este estudio.

El **Capítulo V** presenta los análisis de los resultados obtenidos.

Por último el **Capítulo VI** hace referencia a las conclusiones de la investigación realizada. Asimismo, luego de este capítulo se encuentra reflejado todo el material bibliográfico que se utilizó para la elaboración de este trabajo.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

Trypanosoma evansi es un parásito que afecta gran cantidad de mamíferos salvajes y domésticos en África, América, Asia y Europa. *T. evansi* es el agente etiológico causante de la enfermedad que se conoce como "mal de caderas" o "derrengadera" en América que afecta a equinos, bovinos y ovinos principalmente. Los factores que intervienen en la interacción entre hospedador y parásito no han sido completamente dilucidados, pero una de las características más peculiares es su habilidad para producir en uno u otro hospedador distintos tipos de antígenos de superficie durante el curso de la infección, lo que le confiere la cualidad de permanecer durante más tiempo dentro del hospedador y producir diferentes respuestas inmunológicas. (Trajano *et al*, 2004)

Sin embargo, los efectos que produce el parásito en el hospedador van acorde a la virulencia o al tipo de tripanosoma (Brun *et al,* 1998). Cuando la infección causada por el tripanosoma no es tratada, produce invariablemente resultados fatales en el hospedador; esto se debe en parte a una respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos. Durante la infección, los órganos experimentan cambios que llevan a la muerte de animales tales como equinos y roedores (Uche *et al,* 1992).

Por otro lado, la tripanosomosis es una de las enfermedades más importantes que afectan la productividad del ganado de una forma negativa en África y en otras partes del mundo. Éste, es el componente integral de la industria ganadera que contribuye significativamente con la

economía y seguridad alimentaria en países en vías desarrollo. Las deficiencias en el conocimiento acerca de la epidemiología de *Trypanosoma evansi* contribuyen con la expansión de la enfermedad dentro de esta industria. (Taylor *et al*, 1999)

En América, se han hecho caracterizaciones bioquímicas de aislados de *T. evansi*, específicamente en Brasil, donde se ha demostrado que existen diferencias significativas en la virulencia de estos aislados derivados de diferentes tipos de hospedadores que fueron observados durante el transcurso de la infección siguiendo una inoculación con una baja dosis de parásitos. Las tasas de mortalidad obtenidas fueron del 100% para todos los aislados estudiados. (Queiroz *et al*, 2000).

Por otro lado, la existencia de *Trypanosoma venezuelense* es conocida desde el año 1905, en la época de Rafael Rangel, quien consideró que la epizootia conocida como "Derrengadera" de los equinos era lo mismo que la "Peste boba". En Venezuela se han realizado estudios con tripanosoma en los cuales se demostró que los cambios de conducta con respecto a la adaptación del parásito en los hospedadores no dependen únicamente de las características del huésped (factores nutricionales, fisiología, factores inmunológicos, agentes específicos y quimioterápicos), sino que gran parte se deben a la virulencia del parásito y la severidad de la infección, las cuales varían dependiendo de las diferentes localidades. (Arcay *et al*, 1980).

La caracterización de proteínas y/o antígenos de secreción/excreción en la tripanosomosis causada por *Trypanosoma evansi* ha sido poco estudiada. Asimismo, en investigaciones realizadas por Chavez *et al.* (2007) se ha observado que aislados venezolanos de estos parásitos exhiben diferencias, en cuanto a características de virulencia e infectividad, en animales que han sido contagiados y cabe la posibilidad de que proteínas de excreción secreción estén involucradas.

Por tal motivo es importante estudiar cuál sería la acción de estas moléculas para compararlas en futuras investigaciones con otras proteínas de aislados de *T. evansi* de diferentes virulencias. Por ello, Se trabajará con el aislado El Frío debido a que es medianamente virulento y patógeno comparado con otros aislados como Teva y TeGub-323 estudiados en investigaciones previas de Perrone (2003).

De lo anteriormente expuesto se derivan las siguientes interrogantes:

¿Existe alguna relación entre las proteínas secretadas por los parásitos con los patrones de virulencia expresados por los mismos?

¿Es posible determinar la presencia de moléculas antigénicas que puedan ser potencialmente utilizadas para ensayos de diagnóstico, a partir de la obtención de proteínas de excreción/secreción en parásitos vivos y en extracto soluble de parásitos lisados de *Trypanosoma evansi*?

Justificación

Trypanosoma evansi es un parásito que afecta principalmente a equinos, y ganado doméstico en Asia, África, Centro y Suramérica y vive en la sangre y linfa de sus hospedadores. Conjuntamente, este parásito se encuentra ampliamente distribuido en la tripanosomosis animal patogénica (Luckins, 1998).

A finales de siglo XIX y principios del siglo XX, ocurrieron serias epidemias de tripanosomiasis en Indonesia y Filipinas y con menor incidencia, se observó la presencia de la enfermedad en Vietnam, Tailandia y China. Actualmente, en estos países no se dan

frecuentemente las epidemias, pero si se manifiestan casos de padecimiento de la enfermedad (Luckins, 1998).

No sólo en Asia y África se ha observado la presencia de enfermedades causadas por *Trypanosoma evansi*; en el continente americano también se han dado graves casos de tripanosomosis. (Arcay *et al.* 1980).

Por otro lado, referente al factor económico, la tripanosomosis es una de las enfermedades limitantes más importantes en la productividad del ganado en África y otras partes del mundo, lo cual genera un gran impacto negativo, puesto que, estos animales son un importante componente de los sistemas ganaderos, ya que, contribuyen significativamente al aumento de la seguridad alimentaria y económica de países en vía de desarrollo. (Taylor *et al.* 1999).

Según García *et al.* (2001), la tripanosomiasis causada por *T. evansi* es una enfermedad de carácter endémico causante de brotes con alta mortalidad de caballos y con una amplia distribución geográfica en importantes regiones de Suramérica dedicadas a la explotación de ganadería bovina extensiva, entre las que se señalan: los llanos de Colombia, Venezuela, Brasil y la región costeña de Argentina. Tratando de disminuir la propagación de la enfermedad ocasionada por la picadura de las moscas o vampiros, los dueños del ganado han venido utilizando medidas preventivas que incluyen: mantener a los animales resguardados en establos, el uso de humo de incendios para espantar a las moscas y el uso de redes para proteger diariamente al ganado. Asimismo, se ha empleado el tratamiento con drogas tripanocidas, el cual se ha convertido en el método más usado para tratar camellos, ganados, búfalos, caballos y cerdos (Luckins, 1998).

Actualmente, en el control de la tripanosomosis, se han utilizado métodos inadecuados para prevenir las enormes pérdidas socioeconómicas que resultan de esta enfermedad y tratar de aminorar el grave problema que ésta representa para la medicina veterinaria. Podría pensarse en el desarrollo de una vacuna como medida de control; sin embargo, esto resulta difícil debido a la complejidad del repertorio antigénico que el parásito presenta en las glicoproteínas variables de su superficie, para evadir la respuesta inmune. Esto se debe a que el parásito está en permanente contacto con el sistema inmunológico del hospedador (Taylor *et al.* 1999).

Estudios previos realizados en el laboratorio de Fisiología de Parásitos del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) han mostrado que aislados venezolanos de *Trypanosoma evansi* muestran comportamientos diferenciales en cuanto a las características de virulencia. Igualmente, estos parásitos secretan moléculas cuyas funciones no están claramente definidas. Entre las funciones se puede considerar la de participar en mecanismos de evasión inmunológica, degradación proteica del hospedador como fuente de alimento, y factores de virulencia, entre otros. (Perrone *et al.* 2006)

Se conoce poco sobre las características de los productos liberados por *T. evansi*. Los mismos pudieran participar como potentes inmunógenos y su estudio contribuye al conocimiento de los mecanismos relacionados con las características de infectividad y virulencia de los tripanosomas. Asimismo, los comportamientos diferentes de cada aislado pueden estar asociados a las diferentes proteínas antigénicas e inmunogénicas secretadas por los parásitos. Las proteínas inmunogénicas tienen gran importancia en el desarrollo de vacunas y en la detección de patrones de virulencia entre distintos aislados. Por otro lado las proteínas antigénicas tienen utilidad en la estandarización de

pruebas diagnósticas para estudios epidemiológicos de *Trypanosoma evansi.*

Este proyecto de investigación contribuirá con el estudio de la tripanosomosis en Venezuela y fundamentalmente servirá para determinar posibles moléculas antigénicas que puedan ser potencialmente utilizadas para ensayos de diagnóstico de la enfermedad en animales infectados. Asimismo, contribuirá con el desarrollo de técnicas de vacunación basadas en el análisis de las proteínas secretadas por los parásitos que actúan como antígenos para generar una respuesta inmunitaria en el hospedador.

Objetivo general

Evaluar la presencia de proteínas con propiedades antigénicas e inmunogénicas en fracciones de secreción/excreción de poblaciones homogéneas de aislados venezolanos de *Trypanosoma evansi.*, mediante la comparación de sus patrones antigénicos.

Objetivos específicos

1. Comparar los patrones de virulencia de clones de tres aislados de *T. evansi* en función de los niveles de parasitemia en infecciones experimentales de ratas susceptibles al parásito.
2. A partir de infecciones experimentales en rata, obtener fracciones de excreción/secreción de los parásitos en dos diferentes medios de secreción.

3. Comparar patrones polipeptídicos de las fracciones de excreción/secreción por electroforesis 1-D.
4. Evaluar los patrones antigénicos de las fracciones de excreción/secreción con sueros de infecciones naturales, infecciones experimentales con *T. evansi* e inmunizaciones con estos sobrenadantes, por medio de la técnica Western blot.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Según la clasificación sistemática de Hoare, 1972. El tripanosoma es un parásito perteneciente al Reino: protista, Phylum: Protozoo, Sub-Phylum: Sarcomastigophora, Super clase: Mastigophora, Clase: Zoomastigophora, Orden: Quinetoplastida, Sub-orgen: Tripanosomatina, Familia: Tripanosomatidae.

Los tripanosomas presentes en los mamíferos se encuentran clasificados en dos secciones basados en el sitio de multiplicación del parásito en el huésped intermediario. Los tripanosomas que tienen su ciclo en la parte anterior del tracto digestivo de insectos, pertenecen a la sección Salivaria, mientras que los que se multiplican en la sección posterior del tracto digestivo pertenecen a la sección Stercoraria. Los tripanosomas salivarios incluyen los subgéneros Tejeraria, donde se encuentra el *Trypanosoma rangeli,* el Duttonella, *Trypanosoma vivax*, Nannomonas, *Trypanosoma congolense,* Pycnomonas, *Trypanosoma suis* y por último el subgénero Trypanozoon donde se encuentran como géneros mas representativos el *Trypanosoma brucei y Trypanosoma evansi.* (Desquesnes *et al.* 2007)

Morfología del parásito

Los tripanosomas de los mamíferos tienen una forma lanceolada, la cual puede ser elíptica u oval en su sección transversal y en su extremo distal, alargado y delgado. El cuerpo del tripanosoma se encuentra

embebido en una envoltura bastante fuerte conocida como periplasto, la cual les permite preservar su forma. Esta membrana se compone de tres capas, la interna y externa son mas densas que la capa intermedia, juntas constituyen la membrana única que tiene 8 nanómetros de grosor. El núcleo del tripanosoma generalmente se sitúa en diferentes partes del cuerpo, no obstante, cuando estos se encuentran en el torrente sanguíneo, el núcleo se sitúa cerca del centro del cuerpo o hacia la porción anterior del parásito. La envoltura nuclear está compuesta por dos membranas, que se encuentran perforadas por poros, de la membrana externa emergen tubos que se continúan hacia el retículo endoplasmático rugoso y hacia el resto del citoplasma. (Hoare, 1972).

El aparato locomotor del tripanosoma está formado por un único flagelo que atraviesa todo el margen de la membrana ondulante del cuerpo del parásito, la longitud de este flagelo y la relación con la porción del cuerpo a la cual se adhiere, determina el grado de desarrollo de la membrana ondulante (Hoare, 1972).

El sistema alimentario de los tripanosomas comienza con la absorción de macromoléculas por la superficie del cuerpo entrando a la célula por pinocitosis. Este proceso se lleva a cabo en un punto predeterminado del periplasto del cuerpo. Este tipo de pinocitosis es observado en diversos tipos de formas de tripanosoma en el torrente sanguíneo, como el *Trypanosoma raiae, T. conorhini, T. vivax, T. congolence, T. brucei, y T.evansi.* El área pinocitótica se diferencia porque circunscribe una depresión en el periplasto (bolsillo flagelar), análogo a lo que sería el citostoma. Después de que las moléculas pasan al citoplasma son tomadas por vesículas que son vaciadas en vacuolas donde estas partículas son digeridas. Los procesos de pinocitosis, que se llevan a cabo varían según el estadio de desarrollo del tripanosoma. Otra estructura que juega un papel importante en la pinocitosis es la vacuola

contráctil, bombea hacia fuera el exceso de agua que es embebida durante la pinocitosis (Hoare, 1972).

Vías de secreción del parásito

Existen dos vías de secreción de proteínas en los eucariotas, la clásica y la no clásica. En la vía secretoria clásica las proteínas contienen un péptido que lleva a una cadena de aminoácidos al translocón SEC-61, a través del cual ocurre el transporte hacia el interior del retículo endoplasmático. Luego de la translocación al lumen del retículo, el péptido señal es eliminado. La vía secretoria clásica es la responsable principalmente de distribuir los productos sintetizados a través de los compartimientos de endomembranas, así como llevarlos al exterior de la célula a través del aparato de golgi y exportarlos mediante vesículas secretoras. A esta vía clásica de secreción de proteínas también se le conoce con el nombre de ER/Golgi dependiente (Corrales *et. al* 2009).

En varios estudios realizados en los tripanosomas, se ha demostrado que la endocitocis y la exocitocis, generalmente se llevan a cabo en el bolsillo flagelar, que es una superficie encontrada en la parte posterior de la célula, formada por proteínas de membrana diferentes a las existentes en el resto de la membrana del parásito. Esta restricción se debe a la presencia de una densa red de microtúbulos subpeliculares los cuales previenen los eventos de fusión/fisión en cualquier otro lugar de la superficie del parásito (Grebáut, 2009).

El bolsillo flagelar tiene un rol importante controlando la orientación de las moléculas dentro y fuera de la superficie de la célula para evadir el sistema inmune del huésped; así se tiene a las VSG que tienen como

función la supervivencia del parásito en el huésped, y son secretadas a través del bolsillo flagelar (Bonhivers *et. al.* 2008).

Por otro lado, en la vía no clásica, las proteínas son sintetizadas por ribosomas libres en el citoplasma. Estas proteínas, en algunos casos, son transferidas a la membrana más externa del aparato de golgi para ser transportadas por las vesículas de secreción hasta la membrana plasmática, donde ocurre la translocación al exterior de la célula. En otros casos las proteínas son liberadas al espacio extracelular a través de exosomas o lisosomas (Corrales *et. al.* 2009).

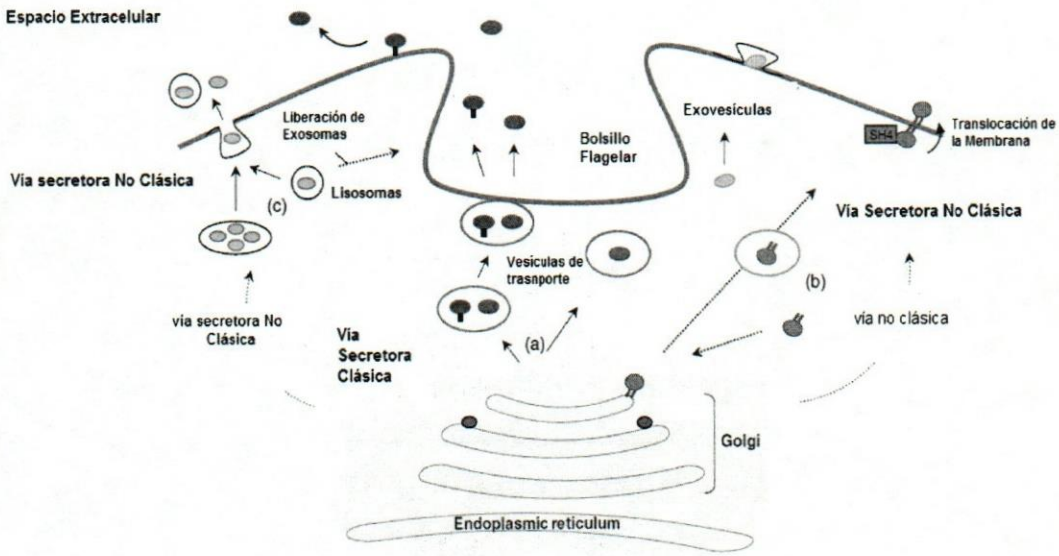


Figura 1. Diagrama esquemático de los diferentes mecanismos de secreción de los eucariotas. (a) vía secretora clásica. (b) vía secretora no clásica. (Tomado de Corrales *et. al.* (2009). Modificado por Eva Moniz y Karlíst Rivero)

Ciclo de vida de los tripanosomas

Existen dos métodos de reproducción de los tripanosomas de mamíferos: la múltiple desigual y la fisión binaria. En todos los casos el proceso de división de tripanosomas se define en una secuencia que comienza con la envoltura del cuerpo, flagelo, quinetoplasto y culmina con el citoplasma. El primer signo de división se manifiesta con la replicación del cuerpo basal la cual viene acompañada de la división del flagelo y el kinetoplasto. (Hoare, 1972).

Los tripanosomas son parásitos digenéticos, cuyo ciclo de vida necesita de la participación de dos organismos, diversos invertebrados hematófagos que actúan como vector, es decir, transmiten la infección al huésped final, que generalmente es un animal vertebrado; en el caso de los tripanosomas de mamíferos, los vectores son insectos chupadores de sangre, que toman los parásitos de torrente sanguíneo cuando se alimentan. Seguidamente, en el huésped intermediario o vector, los parásitos se desarrollan culminando en la producción de formas finales infectivas conocidas como tripanosomas metacíclicos o metatripanosomas, que son transmitidos a un nuevo huésped mamífero por varios métodos. La infección dependerá de la supervivencia del parásito y de su localización en las partes bucales del insecto (Hoare, 1972).

En los mamíferos, el ciclo de vida del parásito es relativamente simple, se inicia con la infección de los metatripanosomas por el huésped primario (insecto). Esta infección puede ser pasiva mediante la contaminación de las membranas mucosas o la piel; o activa, mediante la inoculación a través de la picada del insecto. Los metatripanosomas viajan por el torrente sanguíneo y los tejidos, donde son transformados en tripanomastigotes que poseen las características estructurales de la especie a la cual pertenecen (Hoare, 1972).

Trypanosoma evansi.

El *Trypanosoma evansi* fue el primer tripanosoma patógeno descubierto, causante de la enfermedad que afectaba equinos y camellos llamada "surra", que también se le conoce con otros nombres dependiendo de la localidad. Este parásito se ha conocido en India desde hace mucho tiempo, pero a nivel mundial en el año 1880 por Griffith Evans, quien lo visualizó en la sangre de equinos y camellos afectados por esta enfermedad. Esta especie esta típicamente representada por los tripomastigotes (figura 1), que se reconocen por tener un flagelo libre en su extremidad posterior y se encuentra rodeado por el quinetoplasto situado a cierta distancia de la punta. Las formas intermediarias, tienen un flagelo mas corto que frecuentemente esta en la extremidad posterior y el quinetoplasto se encuentra cerca de esa punta (Hoare, 1972).

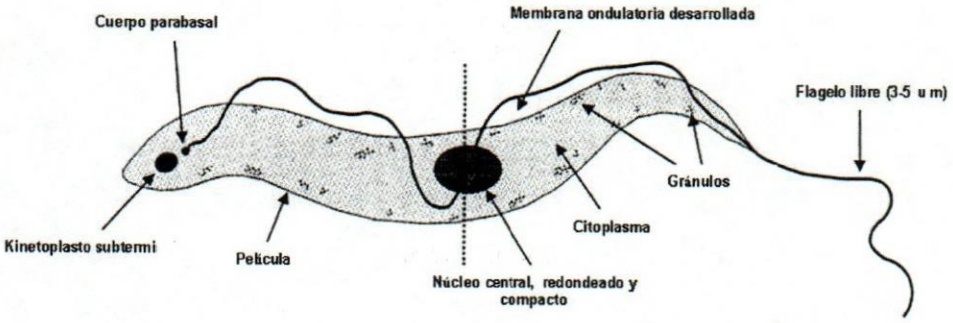


Figura 2. Diagrama general de la morfología de un tripomastigote sanguíneo *T. evansi.* (Imagen tomada de: www.fao.org/docrep/006/x0413e/X0413E02.htm. (Modificado por Nereida Parra)).

Según investigaciones hechas por Mitzmain en 1913 y Gómez Rodríguez en 1956, en la mosca del tábano y en caballos infectados con la enfermedad, se encontró que el *Trypanosoma evansi* no desarrolla un ciclo de vida en la mosca del tábano y otras moscas (Hoare, 1972).

Los tripanosomas que afectan a los animales son de gran importancia para los laboratorios veterinarios de diagnóstico, especialmente en las áreas intertropicales de Asia, África y Latinoamérica; donde la mayoría de las especies patogénicas de tripanosomas se ubican dependiendo de la distribución geográfica de los parásitos y de varias especies potencialmente presentes en huéspedes o vectores. En Argentina por ejemplo, la detección de anticuerpos positivos se evidenció en el 20% de animales de la región de Formosa, donde aproximadamente hay 57.000 caballos expuestos a la enfermedad. Por otro lado en Brasil, específicamente en la región de Pantanal, 13% de los caballos son perdidos anualmente (Perrone *et. al.* 2009).

En la Sabana Venezolana se ha reportado un 50 y 80% de animales infectados con *T. evansi* en caballos (*Equus caballus)* y capibaras (*Hydrochoerus hydrochaeris)* respectivamente produciendo en caballos específicamente la tripanosomiasis equina conocida como "derrengadera". Esta enfermedad se manifiesta con un incremento en la temperatura corporal, edema, anemia, debilidad, caquexia, parálisis y en algunos casos la muerte del animal. Esta enfermedad consta de varias fases; la primera se denomina período de prepatencia, y ocurre inmediatamente después de la inoculación, en ella, los parásitos se detectan por observación directa de la sangre. Seguidamente, continúa el período agudo de la enfermedad caracterizado por un incremento en los niveles de parasitemia y notables síntomas clínicos ya mencionados. Posteriormente, ocurre la fase crónica, caracterizada por un descenso en la parasitemia, la cual puede conducir a la demacración del animal o la

desaparición de los síntomas. En la última fase, aumenta excesivamente la parasitemia hasta la muerte del animal (Perrone *et. al.* 2009).

Mecanismo de Transmisión de *T. evansi*

El mecanismo de transmisión de este parásito, es llevado a cabo principalmente por moscas hematófagas del género *Stomoxys spp, Tabanus spp* y murciélagos de la especie *Desmodus rotundus*. Los daños causados por los tripanosomas a sus hospedadores están en función de la especie y aislado del tripanosoma, la raza y especie del hospedador (Boada *et. al.* 2004).

Los insectos que actúan como vectores son dípteros chupadores de sangre, que transmiten la enfermedad mediante inoculaciones mecánicas, especialmente la mosca Tábano. Por regla general, mientras mas corto sea el intervalo entre dos picaduras de la mosca existe mayor posibilidad de que la transmisión mecánica sea exitosa, ya que depende del tiempo que puedan sobrevivir los tripanosomas de la sangre en las partes bucales del vector (Boada *et al.* 2004).

Por otro lado, además de los dípteros como vectores, los murciélagos chupadores de sangre (*Desmodus rotundus*), actúan como intermediarios transmisores de la enfermedad, sobretodo en Latinoamérica, ya que se encuentran desde México hasta Argentina; cuando el vampiro muerde a su víctima, en lugar de chupar la sangre, que no se coagula por la presencia de un anticoagulante en la saliva del animal, la lame. Durante ese proceso de alimentación del vampiro, se transmite la enfermedad a través de la saliva donde se encuentran los parásitos. Los murciélagos infectados duran aproximadamente un mes, pudiendo recuperarse, o por el contrario, morir (Boada *et. al.* 2004).

Después de ocurrida la transmisión del parásito al huésped, bien sea a través de la mosca o del murciélago, comienza el proceso infeccioso. Después de un período de 4-9 días, los tripanosomas invaden la sangre, la temperatura aumenta junto con la parasitemia del huésped y disminuye cuando la parasitemia decae. Los tripanosomas pueden aparecer en la sangre de manera periódica o persistir, sin embargo, en etapas posteriores de la enfermedad, los parásitos pueden ser indetectables en la sangre, hasta que reaparecen en la fase terminal, la cual puede durar de 2 a 3 meses o más y es usualmente fatal. A pesar de esto, algunos hospedadores como los caballos ocasionalmente pueden albergar *T. evansi* sin demostrar síntomas clínicos. Al inicio de la enfermedad la parasitemia fluctúa en altos niveles por 3 ó 4 meses, a esto se le conoce como fase aguda y puede terminar en la muerte, pero en aquellos animales que sobreviven y pasan a la fase crónica, las recaídas se hacen cada vez menos frecuentes y el animal parece mostrar signos de buena salud durante varios años (Hoare, 1972).

Clínica de la enfermedad

Los signos clínicos de la tripanosomosis se caracterizan por fiebre y anemia, seguida de emaciación, edema, caquexia y aumento del tamaño de los nódulos linfáticos y del bazo. Posteriormente aparecen síntomas neurológicos característicos de la enfermedad. En caballos y camellos se desarrolla la forma aguda de la enfermedad la cual es fatal y los animales mueren en pocas semanas o meses (Luckins 1.999).

En perros infectados experimentalmente la enfermedad se caracterizó por fiebre intermitente estrechamente relacionada con los picos de la parasitemia, la cual fue del tipo ondulante y los principales

síntomas clínicos observados consistieron en palidez de las mucosas, edema, emaciación progresiva y agrandamiento palpable de los nódulos linfáticos (Aquino *et. al.* 1.999).

En otros hospedadores como ovinos y caprinos la infección se desarrolla de manera crónica y puede persistir por muchos años (Onah *et. al.* 1.998).

El curso de la infección experimental con *T. evansi* en coatíes (*Nasua nasua) que* fue seguida por 262 días por Herrera *et. al.* (2002) reveló en el análisis hematológico una marcada disminución en los valores de hemoglobina, hematocrito y contaje total de glóbulos rojos. También se observó una anemia intensa durante el primer pico de parasitemia, la cual persistió hasta el final del experimento. Análisis bioquímicos mostraron un incremento en los niveles de alanina y aspartato aminotransferasa y una disminución de los niveles de albúmina. El principal rasgo histopatológico consistió en miocarditis con presencia de fibras cardíacas degeneradas y meningoencefalitis. Este estudio mostró que los coatíes infectados con *T. evansi* desarrollaron una infección del tipo crónica.

Por otro lado, hasta ahora, los chigüires pueden ser considerados como reservorios de la tripanosomiasis ya que no se han evidenciado signos clínicos de la enfermedad (Arias *et. al.* 1.997).

Patogenicidad

Trypanosoma evansi es patogénico en la mayoría de los animales domésticos, pero sus efectos en diferentes huéspedes varía según:

a) La virulencia del aislado del parásito.

b) La susceptibilidad del huésped relacionada con el stress del animal e infecciones simultaneas.

c) Condiciones epizootiológicas locales.

Cuando un elemento extraño, virus, bacteria o incluso alguna proteína, invade los tejidos de un vertebrado superior como el ser humano, equinos, ovinos y bovinos, el organismo se defiende mediante un mecanismo llamado respuesta inmunitaria. El factor que desencadena esta respuesta, se denomina antígeno, y una inmunoglobulina específica que se une a éste factor, se denomina anticuerpo. La respuesta inmunitaria ocurre de dos maneras, la humoral, donde las células linfáticas, denominadas linfocitos B sintetizan moléculas de inmunoglobulina específicas que son secretadas de la célula y se unen a la sustancia invasora. Gracias a esta unión del linfocito con el agente extraño, la célula queda marcada para posteriormente ser destruida por los macrófagos. Los linfocitos B permanecerán durante cierto tiempo en el organismo, aun después de que el antígeno haya desaparecido, esta persistencia constituye la memoria inmunitaria que permite que se produzca una respuesta inmunitaria rápida ante una segunda estimulación por parte del mismo antígeno. Por otro lado, en la respuesta inmunitaria celular, las células linfáticas llamadas linfocitos T, que llevan moléculas similares a la inmunoglobulina en su superficie, identifican y destruyen a las células extrañas (Mathews *et. al.* 2004).

La respuesta inmunitaria tiene algunas características destacables, en primer lugar, puede responder ante un número de sustancias extrañas diferentes; en segundo lugar, tiene lo que se denomina memoria. Después de una primera exposición a un antígeno, la segunda exposición en una fecha posterior dará lugar a una producción rápida y masiva de los anticuerpos específicos. (Mathews *et. al.* 2004).

T. evansi contiene varios antígenos, uno de los cuales es una variación específica de cada cepa y es responsable de la obtención de anticuerpos contra ataques homólogos, es decir, ataques similares. Aparentemente existen dos factores relacionados con el mecanismo de defensa: a) celular: representado por la fagocitosis de los parásitos que se han encontrado con los leucocitos en el hígado y el bazo de animales infectados y b) humoral: representado por la tripanolisis (Hoare, 1972).

Son muchos los factores, tanto en el hospedador como en el parásito, que controlan el curso de la infección, la cual se caracteriza por poblaciones oscilantes de parásitos en el torrente sanguíneo (Barry and Turner, 1991). La respuesta inmune hacia los principales antígenos de superficie (VSG), generalmente elimina la mayor parte de la población de parásitos durante los picos de parasitemia, dando curso a una nueva población con una nueva variante de superficie. Sin embargo existen evidencias experimentales que demuestran que no solo la respuesta inmune controla la densidad de la población, sino que están involucrados factores secretados por los parásitos.

Las proteínas de excreción/secreción (secretoma) se relacionan con el curso de los procesos fisiopatológicos de la infección en el hospedador, puesto que se cree que intervienen en la virulencia y patogenicidad del parásito. El secretoma está compuesto por una mezcla de proteínas, carbohidratos y lípidos excretados por la superficie del parásito, mediante vesículas de exocitocis por medio del bolsillo flagelar. La composición de estas proteínas es desconocida, pero pueden contener péptidos importantes para la vida parasitaria, por ende se pueden utilizar para diagnósticos, drogas o vacunas. Por otro lado, las proteínas solubles y proteínas secretadas en medio glucosado, corresponden al proteoma y proteoma en medio glucosado respectivamente (Grébaut *et.al.* 2009)

Otro de los factores que controla el curso de la infección en el hospedador, tiene que ver con regulación de la población de tripanosomas en sus dos formas: Slender (forma alargada), que representa la fase de proliferación y Stumpy (forma corta y redondeada) que reemplaza la forma anterior a medida que crece la población de parásitos (Holzmuller *et. al.* 2008).

La regulación de las poblaciones de stumpy (forma corta y redondeada) y slender (forma alargada) depende de un factor soluble de bajo peso molecular liberado por el parásito, conocido como Stumpy Induction Factor (SIF) que detiene la señal del ciclo durante la fase G1/G0 por la acción del AMPc (Adenosin 3'-5'-monofosfato cíclico) bajo la regulación de homólogos (AMP) (Holzmuller *et al.* 2008)

Se ha determinado también en ensayos con *T. brucei brucei*, que la interacción entre el parásito y las células del sistema inmune del hospedador se produce a través de factores excretados-secretados que muestran propiedades inmunomodulatorias. Uno de estos factores, comparable con *SIF*, es TLTF (Trypanosome-derived lymphocyte trigering factor), el cual induce a las células T CD8(+) a la producción de Interferon-gamma (IFN-γ), factor paracrino que a su vez favorece el crecimiento de la población de parásitos (Bakhiet *et.al.* 1993).

El IFN-γ también actúa sobre la activación clásica de los macrófagos y dirige la producción de factores citotóxicos, como el óxido nítrico. Pero a pesar de la activación de los macrófagos, y su consecuente actividad en la remodelación y reparación celular; se ha observado en *T. brucei brucei,* que conlleva a un incremento de la actividad arginasa, favoreciendo el crecimiento de la población de tripanosomas y reduciendo la producción de óxido nítrico.

Estas variadas funciones de los macrófagos reflejan su plasticidad y versatilidad en la respuesta a los cambios del microambiente donde se encuentran, y la capacidad que tienen estos parásitos de modificar ciertas respuestas del hospedador para su exitosa proliferación (Gobert *et.al.* 2000; Duleu *et.al.* 2004).

Como se ha visto, la modulación en la expresión de estos factores secretados/excretados de tripanosomas pertenecientes a un mismo grupo genético podría reflejar al menos en parte, la complejidad de procesos post-genómicos en la maduración de los parásitos, lo cual podría estar asociado con la heterogeneidad de los patrones de virulencia y/o patogenicidad del parásito en diferentes hospedadores.

En recientes estudios realizados por Holzmuller *et. al.* (2008), varios aislados de *T. brucei gambiense* de una misma región geográfica y genéticamente homogéneos, fueron comparados en infecciones experimentales, encontrando diferencias en su capacidad inmunomodulatoria y en la expresión de proteínas antigénicas. Se observó además la inducción de altos niveles de arginasa y de algunos factores de crecimiento, a través de la activación alternativa de los macrófagos. Resultados que concuerdan con lo observado en *T. brucei brucei* (Gubert *et.al.* 2000; Duleu *et.al.* 2004).

Al inducirse la producción de arginasa en el hospedador, disminuye la síntesis de componentes tripanocidas nitrosilados e incrementa a su vez la producción de L-ornitina. Este último es el primer factor en la ruta de síntesis de poliamina, la cual es esencial para el crecimiento poblacional del parásito y para la síntesis de tripanotión, componente equivalente al glutatión en mamíferos, esencial para el mantenimiento del equilibrio intracelular del transporte de electrones, y defensa contra el estrés oxidativo causado por peróxido y radicales libres (Vincedeau *et. al.* 2003).

Ahora bien, el estudio de los factores de secreción asociados a los efectos sobre el hospedador no está limitado a parásitos del género *Tripanosoma*; en *Leishmania spp*, protozoario digenético y agente causal de la infección tropical y subtropical conocida como leishmaniasis, también se han encontrado factores de secreción asociados a virulencia, de gran importancia para la comprensión de rutas secretorias en kinetoplastideos y su regulación (Silverman *et al.* 2008).

Diagnóstico de la tripanosomosis

Las pruebas diagnósticas son importantes a nivel individual para detectar un animal enfermo y asegurar un tratamiento efectivo. A nivel grupal, se determina la prevalencia de la enfermedad dentro de una población (Luckins, 1998).

Algunos métodos de diagnóstico indirectos son la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI), que consiste en la utilización de anti-inmunoglobulinas G con Isotiocianato de fluoresceína, los frotis con los sueros problema se observan en un cuarto oscuro con un microscopio de fluorescencia con lámpara de mercurio, los sueros positivos fluorescen de color verde brillante, mientras que los negativos no exhiben fluorescencia (Basalo, 1995). El ensayo inmunoenzimático para la detección de anticuerpos (Ab-ELISA), ensayo inmunoenzimatico para la detección de antígenos en suero (Ag-ELISA). En general, el método ELISA consiste en emplear un antígeno de entrecruzamiento para acoplarlo covalentemente a un anticuerpo que se utiliza para analizar una sustancia; como producto de la interacción de un sustrato cromogénico y una enzima que ha sido acoplada al anticuerpo detector, se observa la presencia de color en la muestra. (Mathews, 2004).

El método ELISA no se considera un test específico para una especie, debido a que existen similitudes entre los antígenos de los tripanosomas salivarios, esto se conoce como Reacción cruzada y se ha observado entre *T. congolense, T. vivax, T. evansi y T. brucei.* Las reacciones cruzadas entre parásitos cercanos son generalmente exploradas para prevenir falsos positivos en la interpretación de los test o para tomar ventaja de ellos a través de una detección interespecífica (Desquesnes *et al.* 2007)

En los estudios de Desquesnes *et al.* (2007), la detección de IgG (inmunoglobulina específica para un antígeno, relacionada con la memoria inmunitaria) en *T. evansi* no fue significativamente diferente a la de otros test donde se utilizaron antígenos de *T. cruzi.* La sensibilidad de ELISA en *T. evansi* alcanzó un 92,6%, la cual es similar a la sensibilidad de ELISA en *T. cruzi.* Debido a las reacciones cruzadas entre los tripanosomas salivarios ELISA para *T. evansi* ha sido usado para detectar infecciones en *T. vivax, T. brucei brucei y T. congolense.* Los antígenos comunes podrían ser utilizados como herramientas para el desarrollo de pruebas de diagnóstico de la enfermedad.

Desquesnes *et al.* (2007) también encontró falsos resultados negativos que fueron generalmente obtenidos con muestras positivas presentando un bajo nivel de anticuerpos detectados por *T. cruzi.* Estos casos generalmente no se presentan en otros test, tales como BCM, PCR y detección de IgM (inmunoglobulina temporal y polivalente), revelando una probable infección temprana. El método de detección de parásitos en circulación (BCM) y la detección específica de los anticuerpos IgM, siempre arrojan un resultado muy diferente a los detectados con una prueba de IgG. Los primeros son más sensitivos a infecciones tempranas, mientras que los IgG se detectan en infecciones avanzadas.

La prueba de aglutinación en tarjeta (CATT), utiliza tripanosomas fijados y teñidos de un VAT de *T. evansi* definido, en la reacción de aglutinación intervienen antígenos de superficie tanto variables como constantes. El resultado positivo de la prueba se evidencia por la aparición de depósitos granulados y azulados visibles en la placa (Vargas, 2004). Por último, la prueba de aglutinación con partículas de látex (LAT), consiste en la detección de antígenos liberados por el parásito mediante partículas de látex sensibilizadas por anticuerpos específicos que provocan al contactar con los antígenos correspondientes una reacción de aglutinación (Del Valle, 1985).

Otra técnica más novedosa es la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Secuencias de ADN han sido investigadas como posibles puntos claves de la detección del tripanosoma, como miniexones, minicirculos, y secuencias cortas de ADN satélite que son altamente repetitivas. Esta técnica trae ventajas en cuanto a la disminución de costos y la posibilidad de utilizar mayor numero de muestras en estudios epidemiológicos (Mathews *et. al.* 2004).

Por otro lado, algunos métodos de diagnóstico directo son el análisis de la muestra de sangre mediante punción de las venas de la oreja o de la cola, extensión de sangre fresca, tinción de frotis densos y finos, biopsias de los nódulos linfáticos, entre otras, todas para detectar la presencia del parásito (Vargas, 2004).

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

El tipo de investigación realizada en este trabajo es de campo de tipo experimental según lo señalado en el Manual de Trabajos de Grado, Especialización, Maestría y Tesis Doctorales, ya que plantea el análisis sistemático de problemas en la realidad, con el propósito bien sea de describirlos, interpretarlos, entender su naturaleza, factores constituyentes o explicar sus causas y efectos, predecir su ocurrencia haciendo uso de métodos característicos de cualquiera de los paradigmas o enfoques de investigación conocidos. Los datos utilizados pueden ser recogidos de forma directa o datos censales o muestrales no recogidos (UPEL, 2006).

Este estudio fue desarrollado en el Laboratorio de Fisiología de Parásitos, Centro de Biofísica y Bioquímica, en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). El laboratorio contaba con los recursos necesarios para el desarrollo de la investigación propuesta y con el apoyo de otros grupos de investigación relacionados con el área. El financiamiento fue otorgado por el proyecto: TRYPADVAC 2 "Development of an "anti-disease" vaccine and diagnostic tests for African tripanosomosis." Specific Targeted Research Project. Contract No. 003716, Universidad Simón Bolívar- IVIC.

La metodología de la investigación se llevó a cabo en tres fases:

Fase I. obtención de Parásitos y Fracciones proteicas.

A) Expansión de *Trypanosoma evansi* en animales experimentales.

Para ello se inocularon tres ratas *Sprague dawley* vía intraperitoneal con 0,5 ml una población homogénea de clones de parásitos, obtenidos a partir de criopreservados de aislados directos de poblaciones heterogéneas de El Frío (chigüire), TeGUB-323 (asno) y Teva(caballo), todos positivos a la infección con *Trypanosoma evansi*, Estos criopreservados provienen de investigaciones previas realizadas por la Dra. Trina Perrone en el IVIC. Las ratas fueron sometidas a control y seguimiento interdiario de la parasitemia, tomando 5 ul de sangre de la cola y observando al microscopio los parásitos circulantes en sangre.

B) Extracción de la sangre a partir de ratas infectadas experimentalmente con *T. evansi.*

Cuando las parasitemias alcanzaron valores de 10^6-10^8 tripanosomas/ml se procedió a la extracción de sangre. (Lanham, *et al. 1970)*. Para ello, las ratas fueron anestesiadas con 1,5ml de Quetamina, (1gr/10ml) y con una jeringa de 10ml, con 0,5 ml de Heparina como anticoagulante, se realizó la punción cardíaca.

C) Determinación de la parasitemia.

Se determino según el método de Brener (1969) modificado. Colocando 5 ul de sangre en una lámina portaobjetos y cubriendo la gota de sangre con una lámina cubreobjetos de 22 x 22 mm, de tal forma que la muestra se extienda uniformemente por toda el área de la lámina cubreobjetos. Posteriormente se cuentan los parásitos presentes en 100 campos en un microscopio de luz con un aumento de 40X. La parasitemia obtenida se expresó como el número de tripanosomas/ml de sangre según la siguiente fórmula:

Parásitos/ml=Tc x F x 200 x D

Donde:
Tc= Tripanosomas contados
F= Factor de conversión cuyo valor se relaciona con el área de visión y el número de campos observados al microscopio a un aumento determinado de los oculares y del objetivo (10X x 40X respectivamente) calibrado con un micrómetro de platino.
D= Factor de dilución.

D) Purificación de los tripanosomas por cromatografía de intercambio iónico en columna de DEAE-celulosa.

Preparación de columna de intercambio iónico: Todos los procedimientos para la purificación de los parásitos fueron realizados en campana de flujo laminar; los tampones de elución fueron esterilizados en autoclave previo a su uso al igual que todo el material a utilizar durante la purificación. Se usó la técnica de cromatografía de intercambio iónico en columna de DEAE-Celulosa de acuerdo al método de Lanham y Godfrey (1970) con modificaciones descritas por Hollzmuller *et.al.* (2008) (Figura 3)

1. Se hizo un montaje de columna para el intercambio iónico con una jeringa plástica de 10ml. Se tomaron 6 gr de DEAE-celulosa (sigma) y se resuspendieron en 80 ml de PBS y se ajustó a pH 8. Seguidamente se realizó el empaquetamiento de la resina en la columna tomando en cuenta que 10ml de resina empaquetada permitirán fluir 2 ml de muestra.

2. Se lavó la columna con cinco volúmenes de PBSG y se verificó que el pH del eluato permaneciera en 8.

Elución de los parásitos.

1. La sangre obtenida de las ratas fue colectada en tubos plásticos cónicos y se centrifugó a 2000 rpm por diez (10) minutos. Se descartó el plasma (capa superior) evitando remover la capa blanca que sedimenta sobre los eritrocitos; esta capa está constituida por leucocitos y tripanosomas.

2. Se agregó 0,02M de Tampón Fosfato Salino (PBS) (Na_2HPO_4 anhidro 95Mm, $Na_2HPO_4H_2O$ 5Mm, NaCl 73Mm), pH 8 con Glucosa al 1% a la muestra y se centrifugó de nuevo bajo las mismas condiciones, posteriormente se eliminó el sobrenadante y se colectó toda la capa correspondiente a glóbulos blancos y tripanosomas arrastrando la menor cantidad de eritrocitos como sea posible; esta se resuspendió en PBSG en relación 1:3.

3. Esta resuspensión de sangre y parásitos (Volumen final máximo de 2 ml) se colocó sobre la columna. Se dejó eluir los parásitos a través de la columna con tampón PBSG y los componentes sanguíneos quedaron asociados a la resina. Los parásitos eluídos fueron colectados en tubos de 15 ml y posteriormente se cuantifica el número de parásitos.

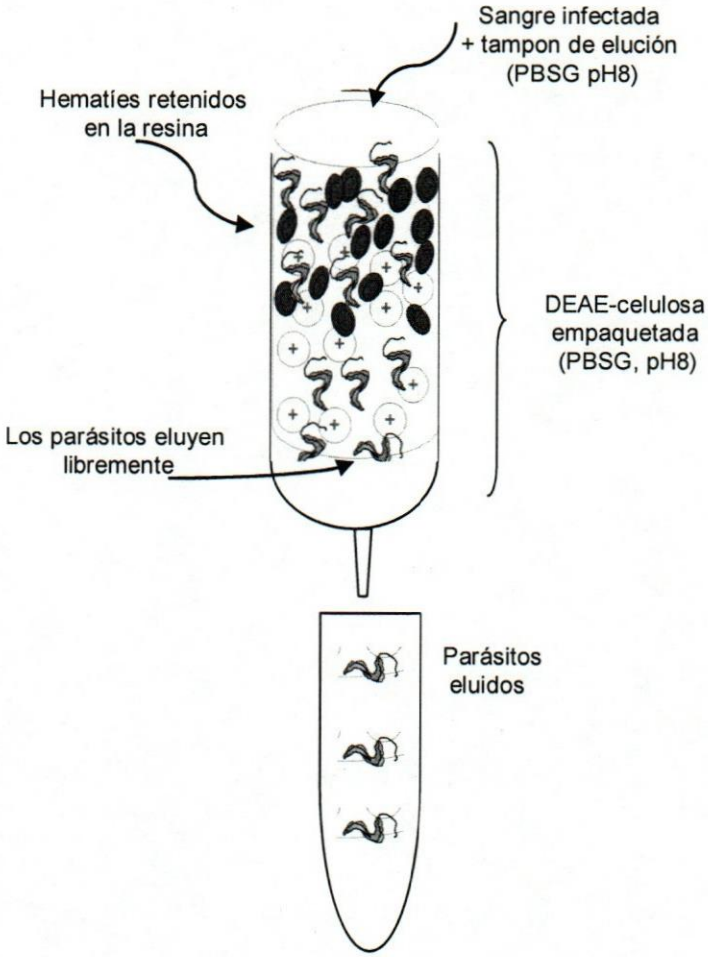


Figura 3. Esquema de purificación de tripanosomas a partir de sangre fresca infectada. Al hacer pasar de sangre contentiva de tripanosomas a través de una columna de intercambio aniónico, los hematíes del hospedador, con mayor carga negativa que los tripanosomas, quedan retenidos en la matriz de intercambio de la columna (resina), mientras que los tripanosomas son arrastrados con el tampón de elución, conservando su viabilidad e infectividad originales.

E) Cuantificación y viabilidad de tripanosomas purificados.

A fin de determinar la viabilidad de los parásitos durante la incubación en el tampón de secreción/excreción, se tomaron alícuotas de 50 ul de la suspensión celular y se mezcló 1:1 con Trypan Blue. Se observo al microscopio a 40X, contando un total de 100 células. El número de células viables se calculó utilizando la siguiente fórmula:

Viabilidad = No. Células viables (no teñidas) / No total de células

F) Obtención de proteínas de excreción/secreción.

1. De los parásitos obtenidos en la purificación, se tomarom 2 x 10^8 parásitos/ml fueron centrifugados a 1500g por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y el precipitado de parásitos se resuspendió en 5 ml de Tampón de excreción/secreción (Ringer lactato, glucosa 0,6%, KCL 0,4%, $NaHCO_3$ 0,125%, polymixina B 5µg/ml, L-glutamina 2Mm, MEM aminoácidos no esenciales, pH8, de acuerdo al método de Lanham y Godfrey (1970) con modificaciones descritas por Hollzmuller *et.al.* (2008)) en un tubo cónico de 15 ml.

2. Los parásitos fueron incubados por 2 horas a 37ºC en presencia de CO_2 al 5%.

3. Una vez cumplida la incubación se verificó la viabilidad de los parásitos.

4. Los parásitos fueron centrifugados a 1500g por 10 min, el sobrenadante correspondiente a la fracción de excreción/secreción, se filtró (0,22 µm, Low binding protein), y se añadió 40µl de solución antiproteasa (25x) y se almacenó a -80ºC para su posterior uso.

5. El precipitado de parásitos correspondiente a la **fracción de proteínas totales** de los parásitos también se colectó y almacenó a -80°C con 20µl de solución antiproteasa.

G) Obtención de fracción de proteínas de excreción/secreción en tampón PBSG.

Para la obtención de proteínas de excreción/secreción en medio glucosado (PBSG), se siguió la misma metodología que se utilizó para obtener las proteínas en medio de excreción/secreción, pero en lugar de resuspender el precipitado en tampón de excreción/secreción, se hizo en buffer PBSG (NaH_2PO_4 anhidro 95Mm, NaCl a 73Mm y Glucosa 1%, pH 8, de acuerdo al método de Lanham y Godfrey (1970).

H) Lisis de parásitos.

Para la obtención de proteínas totales de los parásitos, se lisaron los parásitos mediante congelamiento/descongelamiento. Los parásitos fueron resuspendidos en 100 µl 0,05M de Tris/HCl pH 7,4, se sometieron a 5 ciclos de congelamiento en nitrógeno líquido por 5 minutos, descongelamiento en un baño térmico a 37°C por 5 minutos y se centrifugaron a 12.000g por 5 minutos.

I) Determinación de la concentración de las proteínas secretadas por los parásitos en el medio.

Se utilizó el estuche comercial **BCA protein assay kit** (Thermo Scientific Pierce), el cual utiliza ácido bicinconínico (BCA) como reactivo de detección de Cu^{+}, el cual se forma cuando Cu^{++} es reducido por una proteína en un ambiente alcalino. Una reacción púrpura es el producto formado por la quelación de dos moléculas de BCA por un ión cobre (Cu^{+}). Los resultados colorimétricos fueron cuantificados en un espectrofotómetro a 562nm, para la determinación de la concentración de proteínas.

Se elaboró una curva de calibración de los stocks de BSA de concentración conocida, para correlacionar los valores obtenidos de la absorbancia de cada muestra de proteína con los resultados.

Fase II. Evaluación de los Perfiles Polipeptídicos de las Fracciones Proteicas.

A) Evaluación del perfil polipeptídico en 1D.

Las fracciones proteicas fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) y gel de apilamiento 4%, usando el sistema discontinuo de geles de poliacrilamida reportado por Laemmli *et.al.* (1970), bajo condiciones reductoras: Tampón muestra 1X (0,125M Tris/HCl, 5% B-mercaptoetanol, 2,3% SDS y 0,01% azul de bromofenol, pH 6,8) calentándolas a 100 °C. Se prepararon las muestras proteicas: 20 µg de muestra en 20 µl de tampón muestra 1X, luego se colocaron en los bolsillos del gel. Se utilizó un bolsillo para el marcador de peso molecular de 220 – 15 kDa (5 µl). Se aplicó corriente de 80 voltios hasta que las muestras migraron del gel de apilamiento al gel de corrida y luego 100 voltios constante hasta que el frente de corrida llegó hasta el final del gel.

B) Tinción de geles de acrilamida

Para la visualización de los patrones polipeptídicos, los geles fueron teñidos con azul de Comassie.

C) Electrotransferencia.

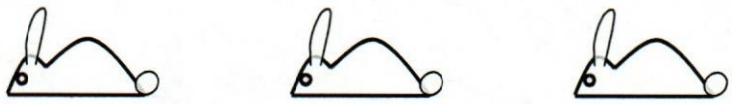
Para la obtención de las membranas destinadas a inmunotinción, se hizo la transferencia de los patrones polipeptídicos a membranas de nitrocelulosa utilizando el sistema de transferencia húmeda de BioRad Trans-Blot, con una corriente de 100 voltios durante 30 minutos. La membrana de nitrocelulosa sobre la cual se transfirieron los patrones polipeptídicos, se colocó en una bandeja con rojo Ponceau hasta que se

visualizaron las bandas. Posteriormente se lavaron con agua destilada para eliminar el exceso de coloración.

Fase III. Evaluación de los Perfiles Antigénicos de las Fracciones Proteicas.

A) Obtención de anticuerpos policlonales anti-proteínas de excreción/secreción.

1. **Inmunización de conejos con proteínas de excreción/secreción para la obtención de anticuerpos específicos:** Se utilizaron 3 conejos albinos mantenidos en condiciones de bioterio para evitar infecciones secundarias y fueron inmunizados de acuerdo al siguiente esquema:



Fracción excreción/secreción (300 ug) | Fracción de excreción/secreción en PBSG (300 ug) | Fracción de proteínas totales (300 ug)

Tabla 1. *Esquema resumen del procedimiento de inmunización de conejos.*

Día	0	15	21	36	42	57
1° inmunización Adyuvante completo de Freund		Sangrado	2° Inmunización Adyuvante incompleto de Freund	Sangrado	3° Inmunización Adyuvante incompleto de Freund	Sangrado

2. **Preparación del inmunógeno**: Se mezcló el inmunógeno (Fracciones proteicas) a utilizar con adyuvante completo o incompleto de Freund (según sea el caso) de acuerdo a las concentraciones de proteínas de cada conejo.

3. **Sangramiento del conejo y obtención del suero pre-inmune.**

Previo a la primera inoculación, se obtuvo el suero preinmune del conejo. Para ello se rasuró la oreja del conejo a unos tres centímetros de la vena marginal, se limpió con alcohol, se cubrió la zona afeitada con una capa muy fina de vaselina y se frotó una zona alejada de la oreja con xilol para estimular la irrigación sanguínea.

3.1. Se realizó un corte transversal con una hojilla estéril en la vena marginal, teniendo cuidado de no cercenar la vena.

3.2. Se recolectaron aproximadamente 5ml de sangre en un tubo estéril para la obtención de suero.

4. **Primera Inmunización**, (Día 0): se limpió muy bien con alcohol el lomo del conejo y se inocularon 200µl del inmunógeno, en total se hicieron 5 inoculaciones en diferentes zonas del lomo, a razón de 20µl cada una para un total de 1ml de inmunógeno. Posteriormente se limpió suavemente con alcohol la zona de inoculación.

4.1. Obtención del suero: Se sangró el conejo como se ha descrito en el punto 3. La sangre obtenida se incubó a 37°C por una hora y se dejó toda la noche a 4°C. Una vez transcurrido este tiempo se centrifugó a 2000 rpm por 15 minutos y se separó el suero que posteriormente se almacenó a -20°C.

4.2. Sangramiento primario: A los 15 días de la primera inmunización se sangró nuevamente el conejo y se procesó la sangre para la obtención del suero inmune.

5. **Segunda Inmunización (Día 21):** se realizó a los 21 días de la primera inmunización. Se preparó el inmunógeno de la misma forma pero utilizando Adyuvante Incompleto de Freund. Se inoculó el conejo de la misma forma descrita en el punto 4.

5.1. Sangramiento Secundario: se realizó a los 15 días de la segunda inmunización (día 21). Se sangró nuevamente el conejo de acuerdo al punto 3, utilizando la otra oreja. Se procedió a utilizar la sangre para la obtención del suero inmune.

6. **Tercera Inmunización (día 42):** se realizó a los 21 días de la segunda inmunización y se preparó el inmunógeno de la misma forma utilizando Adyuvante Incompleto de Freund. Se inoculó el conejo como se describe en el punto 4 y el sangramiento se realizó como se indica en el punto 3.

6.1. Sangramiento Terciario: se realizó a los 15 días de la tercera inmunización. Se sangró nuevamente el conejo de acuerdo a la metodología ya explicada, utilizando la otra oreja. Se procedió a utilizar la sangre para la obtención del suero inmune.

B) Inmunotinción con sueros policlonales de conejo.

Para determinar la antigenicidad y especificidad de los sueros policlonales obtenidos en los conejos, se realizó inmunotinción utilizando las membranas transferidas con las tres fracciones proteicas.

Se evaluó un sistema homólogo para identificar el reconocimiento de las proteínas correspondientes con los sueros de los conejos inmunizados y otro sistema heterólogo para identificar las proteínas comunes detectadas por los diferentes sueros de cada fracción, de acuerdo al siguiente esquema:

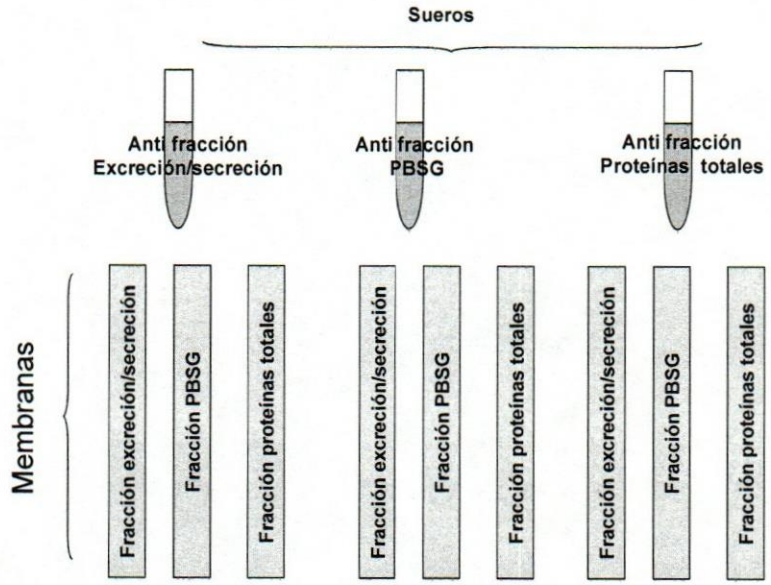


Figura 4. Sistema homólogo y heterólogo de las tres fracciones que contienen los anticuerpos contra las membranas que contienen los antígenos.

Procedimiento para la inmunotinción

1. Se cortó con ayuda de una tijera limpia la membrana de nitrocelulosa en los sitios donde se desplazaron las bandas de proteínas, aproximadamente de 5mm de ancho. Se colocaron por separado las tiras en tubos de ensayo con tapa y se cubrieron las membranas con una solución bloqueadora al 5% de leche descremada en tampón TBS, por cinco minutos en agitación constante, con la finalidad de bloquear todos los lugares de unión de proteínas de la membrana que no fueron ocupados.

2. Pasado el tiempo se descartó la solución bloqueadora y se incubó durante una hora en agitación constante con el anticuerpo

primario (suero de la tercera inmunización) en una dilución 1/50 en el buffer TBS-T.

3. Luego se descartaron los sueros y se lavaron las tiras 3 veces por un minuto en agitación, cada vez con TBS-T. Seguidamente, se descartó el TBS-T y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente a IgG antiovino peroxidasa (Pierce) durante una hora en agitación constante. Posteriormente, se lavó con agua destilada por un minuto en agitación constante para eliminar restos de TBST.

4. Se descartó el agua destilada y se agregó la solución reveladora o sustrato del anticuerpo secundario (Fosfatasa alcalina o peroxidada) hasta observar las bandas de interés e inmediatamente se lavó con agua destilada para detener la reacción.

5. Finalmente, se dejaron secar las transferencias sobre un papel de filtro y luego fueron almacenadas a -20°C.

C) Inmunotinción con sueros de infecciones naturales y experimentales de *T. evansi*.

Se evaluó el reconocimiento de los sobrenadantes por anticuerpos presentes en sueros de animales infectados con tripanosomas naturalmente y experimentalmente.

Se realizó inmunotinción de acuerdo al siguiente esquema:

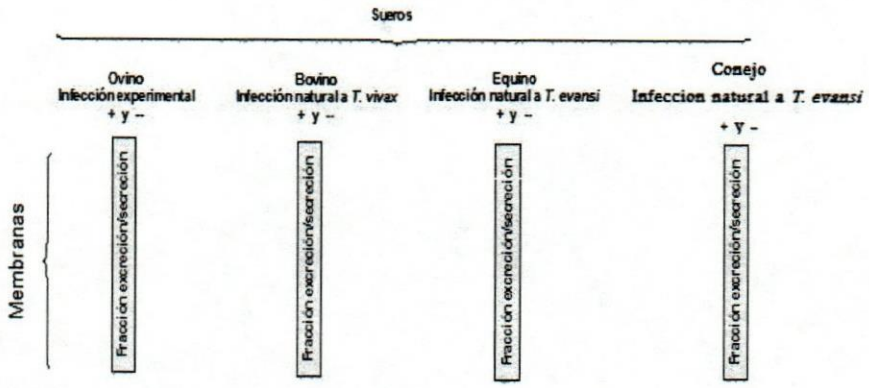


Figura 5. Esquema de la inmunotinción de sueros positivos provenientes de infecciones de campo y experimentales contra las membranas de excreción/secreción.

Procedimiento para la inmunotinción

1. Se colocaron por separado las tiras de las membranas previamente transferidas en tubos de ensayo con tapa y se cubrieron las membranas con una solución bloqueadora al 5% de leche descremada en tampón TBS, por cinco minutos en agitación constante, con la finalidad de bloquear todos los lugares de unión de proteínas de la membrana que no fueron ocupados.

2. Pasado el tiempo se descartó la solución bloqueadora y se incubó durante una hora en agitación constante con el anticuerpo primario (suero de campo correspondiente) en una dilución 1/100 en el buffer TBS-T.

3. Luego se descartaron los sueros y se lavaron las tiras 3 veces por un minuto en agitación, cada vez con TBS-T. Seguidamente, se descartó el TBS-T y se incubó con el

anticuerpo secundario correspondiente a cada suero durante una hora en agitación constante. Posteriormente, se lavó con agua destilada por un minuto en agitación constante para eliminar restos de TBST.

4. Se descartó el agua destilada y se agregó la solución reveladora o sustrato del anticuerpo secundario (Fosfatasa alcalina o peroxidada) hasta observar las bandas de interés e inmediatamente se lavó con agua destilada para detener la reacción.

5. Finalmente, se dejaron secar las transferencias sobre un papel de filtro y luego fueron almacenadas a -20ºC.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

Fase I. Obtención de parásitos y Fracciones Proteicas.

A) Purificación de parásitos por intercambio iónico: Para el desarrollo y cumplimiento de los objetivos planteados en este trabajo de investigación se trabajó con clones de tres aislados de *Trypanosoma evansi* (El frío, TeGub-323 y Teva), los cuales presentan diferentes características biológicas, de virulencia y patogenicidad. Los clones fueron reactivados en ratas *Sprague dawley* a razón de 10^6 parásitos/rata; al observarse altas parasitemias en sangre, se extrajo la misma y se purificaron los parásitos de acuerdo a los protocolos mencionados con anterioridad. En la Tabla 2 se muestra la concentración de parásitos obtenidos posterior a la purificación por cromatografía de intercambio iónico, con cada uno de los aislados.

Tabla 2. *Concentración de parásitos para Teva, el Frío y Tgub-323.*

Aislado	Hospedador original	Parásitos/ml
Teva	Caballo	1×10^{10}
El frío	Chigüire	$8,4 \times 10^{7}$
Tgub-323	Asno	$1,04 \times 10^{7}$

La figura 6 muestra la comparación de los patrones de parasitemia de los clones de los tres aislados, se observa que el aislado Teva genera una infección del tipo hiperaguda, con altas parasitemias y muerte rápida del animal; mientras que la infección con el aislado El Frío es de tipo aguda, con parasitemias altas y ondulantes y con una sobrevida más larga; y por último la infección con Te-Gub323 es del tipo crónica, con una duración más larga en el tiempo y parasitemias bastante bajas.

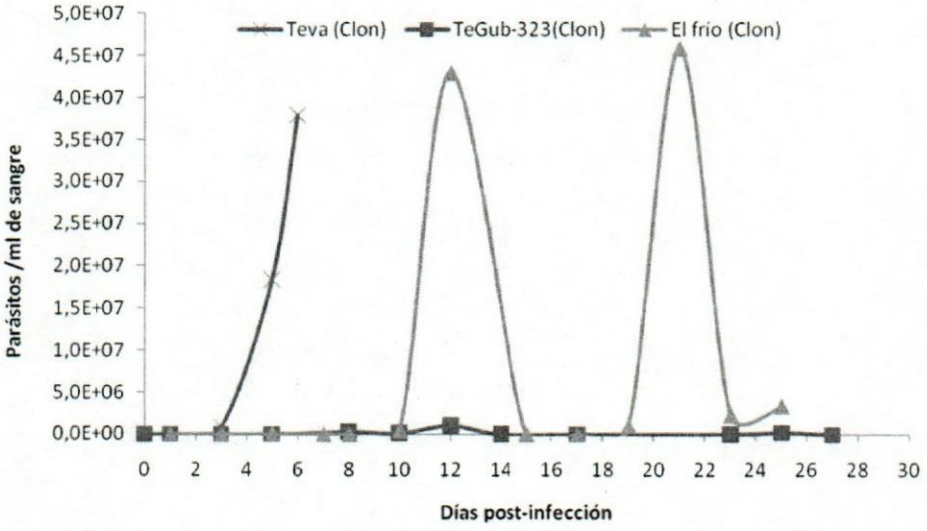


Figura 6: Gráfica de la parasitemia de los clones de los parásitos de los tres aislados.

B) Preparación de fracciones proteicas: La tabla 3 muestra la concentración de los factores de secreción obtenidos en tampón de secreción, proteínas solubles y factores de secreción obtenidos en tampón PBSG, obtenidos a partir de 2 x 10^8 parásitos/ml. Cada una de estas fracciones proteicas corresponden al material de trabajo para los ensayos bioquímicos e inmunológicos posteriores.

Tabla 3. *Concentración de los factores de secreción obtenidos en tampón de secreción (E/S), proteínas solubles (PS) y factores de secreción obtenidos en tampón PBSG de tres aislados de campo de Trypanosoma evansi.*

Aislado	Fracción de Proteínas solubles (PS) (Proteoma)	Fracción de factores de secreción en PBSG	Fracción E/S (Secretoma)
Teva	3289 ug/ml	188,9 ug/ml	183 µg/ml
El frío	914 µg/ml	199 µg/ml	408 µg/ml
Tgub-323	2765 ug/ml	318,06	669,67 µg/ml

En la tabla 4 se muestran los porcentajes de viabilidad de los parásitos posteriormente a la incubación en tampón de secreción y tampón PBSG respectivamente, determinado de acuerdo a lo explicado en la metodología.

Tabla 4. *Viabilidad de parásitos durante la incubación en tampón de secreción y PBSG para la obtención de los factores de secreción*

	% de Viabilidad post-purificación (1 hora y 55 min de incubación)	
Aislado	PBSG	E/S
Teva	90	92
El frío	91	97
Tgub-323	89	92

Fase II. Evaluación de los Perfiles Polipeptidicos de las Fracciones Proteicas.

A) Patrones polipeptídicos de las diferentes fracciones de los tres aislados: De cada una de las fracciones proteicas obtenidas anteriormente se determinaron los patrones polipeptidicos por electroforesis en SDS-page (12%). En la Figura 6 se muestran los respectivos patrones polipeptídicos.

Los perfiles polipeptídicos muestran diferencias entre los 3 aislados de *T. evansi* (El Frío, Teva, Tegub-323), observándose en la fracción de E/S para El Frio un total de 11 bandas, entre 15 y 37KDa hay 2 bandas, entre 37 y 50KDa, se observan 4 bandas, destacándose la de peso molecular aproximado 48KDa, de 50 a 75KDa hay 2 bandas y las siguientes 3 bandas de pesos moleculares 100, 150 y 250KDa respectivamente. Para la fracción de proteína soluble de El Frío, se observan 12 bandas; 3 entre 37 y 50 KDa, 4 bandas entre 50 y 75KDa, 5 bandas entre 75 y 150KDa. En la fracción de PBSG 14bandas; 2 entre 15 y 37KDa, 5 bandas entre 37 y 50KDa, 3 bandas entre 50 y 75KDa, 4 bandas entre 75 y 150KDa.

Para el aislado Teva en la fracción de excreción/secreción se observan un total de 13 bandas, 3 entre 15 y 37KDa; 5 bandas entre 37 y 50KDa; 3 entre 50 y 75KDa; una en 150KDa y otra en 250KDa. En la fracción de proteína soluble 18 bandas, 3 entre 15 y 7KDa; 4 bandas entre 37 y 50KDa; 6 bandas entre 50 y 100KDa y 4 bandas entre 100 y 250KDa. Para la fracción de PBSG se pueden observar 3 bandas entre 15 y 37KDa, 4 bandas entre 37 y 50KDa, 4 bandas entre 50 y 100KDa, y las dos últimas en 150KDa y 250KDa respectivamente.

Por último para el aislado TeGub-323, en la fracción de excreción/secreción se observa una sola banda con un peso aproximado de 60KDa. Para el aislado de proteína soluble, no es posible identificar bandas. Finalmente en la fracción de PBSG, se observa una sola banda de peso molecular aproximado de 58KDa.

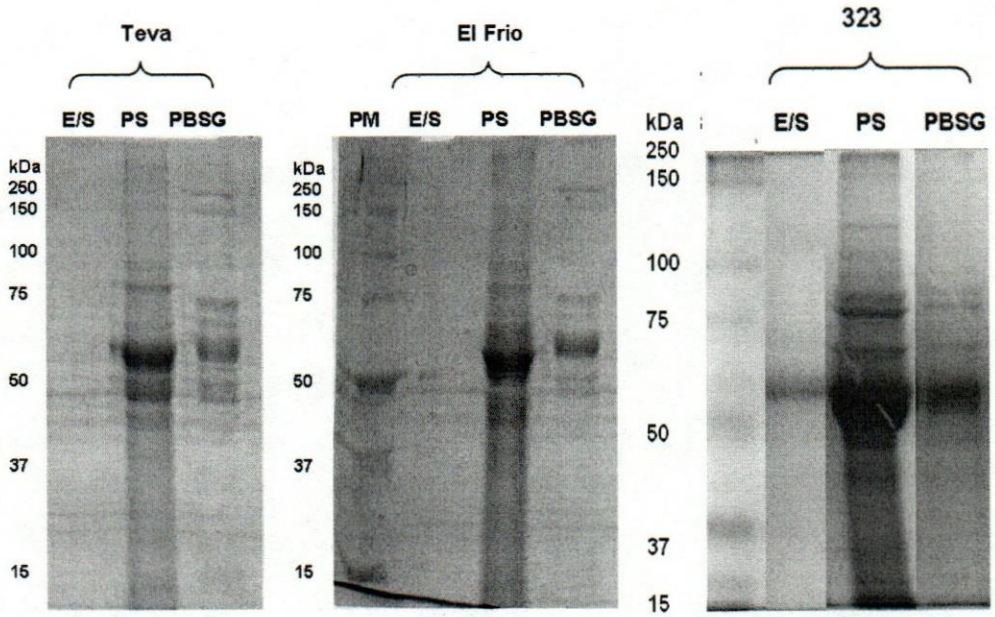


Figura 7. Patrones polipeptídicos de las fracciones proteicas de los tres aislados de *T.evansi*, obtenidos por SDS-page (12%), con tinción con Azul de Coomassie.

Una vez determinados los patrones polipeptídicos de las fracciones proteicas de los tres aislados, se escogió El frío para posteriores experimentos, ya que según estudios realizados por Perrone (2003), al comparar este aislado con otros de *T. evansi*, entre los cuales se encontraban Teva y TeGub-323, el aislado El Frío muestra ser medianamente virulento, y su comportamiento parasicológico es típico de las infecciones con *T. evansi*, tal como parasitemias ondulantes.

Fase III. Evaluación de los Perfiles Antigénicos de las fracciones Proteicas del Aislado El Frío.

A) **Patrones antigénicos de las fracciones proteicas con sueros policlonales:** Después de determinar los patrones polipeptídicos se realizó la inmunotinción utilizando las fracciones proteicas del aislado El Frío como antígeno inmovilizado en las membranas y sueros de conejos inmunizados con estas fracciones proteicas.

La evaluación antigénica se hizo en dos grupos o sistemas:

- Un sistema homólogo para identificar la presencia de las proteínas correspondientes con los sueros de los conejos inmunizados.
- Y un sistema heterólogo para identificar las proteínas comunes detectadas por reacción cruzada entre las diferentes fracciones proteicas.

Sistema homólogo:

Este sistema homólogo corresponde al reconocimiento de sueros de conejos inoculados con las proteínas en estudio, hacia las mismas proteínas inmovilizadas en una membrana.

Conejo1: Proteínas de excreción/secreción contra suero de excreción/secreción.

Conejo 2: PBSG contra suero PBSG.

Conejo 3: Proteínas solubles contra sueros de proteína soluble.

En este sistema, para el conejo 1, se observa la presencia de dos bandas de peso molecular aproximado entre 60 y 70KDa, para el conejo 2, una banda de aproximadamente 65KDa y para el conejo 3, una banda entre 75 y 100 KDa.

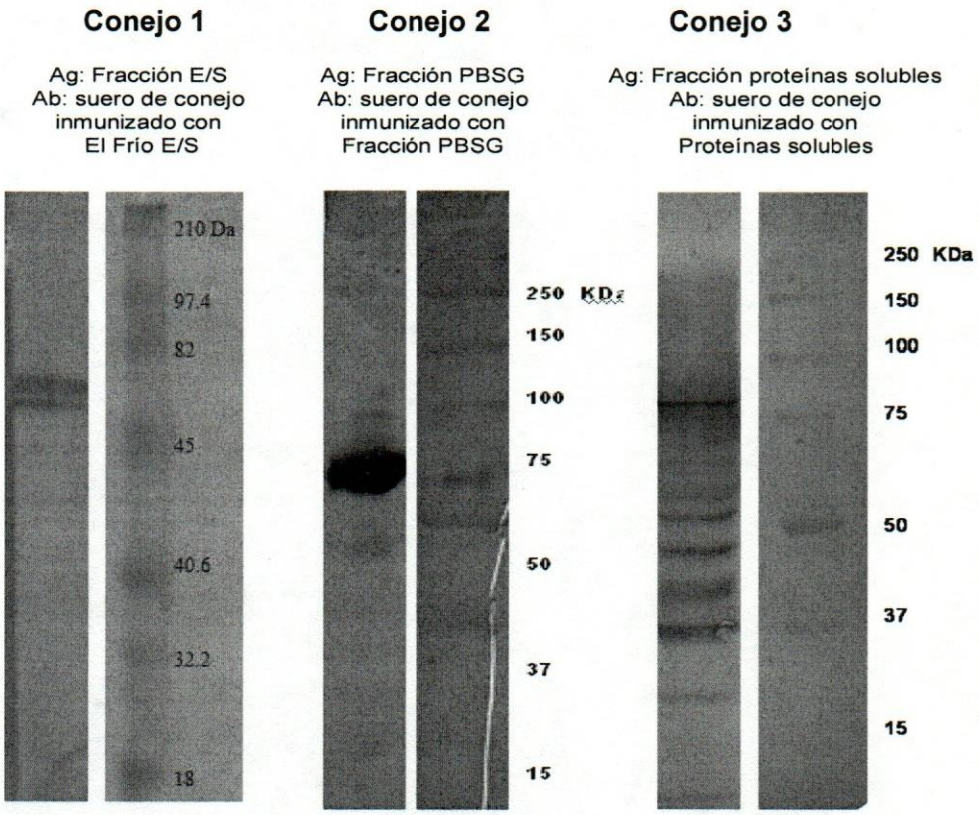


Figura 8. Sistema homólogo. Electrotransferencias de tres fracciones (PBSG, E/S, proteínas solubles) del aislado El Frío.

Sistemas heterólogos:

El sistema heterólogo corresponde al reconocimiento cruzado de los sueros de los conejos inmunizados con las proteínas en estudio, hacia otras fracciones de proteínas inmovilizadas en una membrana. De esta forma, se tiene:

Conejo 1: Inmunizado con proteínas de excreción/secreción contra suero de PBSG y proteínas solubles.

Conejo 2: Inmunizado con PBSG contra sueros de excreción/secreción y proteínas solubles.

Conejo 3: Inmunizado con Proteínas solubles contra sueros de PBSG y excreción/secreción.

En este sistema se observan para el conejo 1, cuatro bandas entre 37 y 75KDa, dos bandas entre 150 y 250 KDa. La banda más representativa tiene un peso molecular aproximado de 60KDa. Para la fracción de proteína soluble, no se pueden determinar bandas, puesto que se observa una sola mancha.

Para el conejo 2, PBSG en la fracción de excreción/secreción se observa una banda de peso aproximado de 65KDa y para la fracción de proteína soluble, se observa entre 15 y 37KDa una banda, entre 37 y 50KDa tres bandas y entre 50 y 75KDa tres bandas. La banda más representativa de esta fracción esta aproximadamente en 75KDa.

Para el conejo 3 en la fracción de excreción/secreción se observa una sola banda con un peso aproximado de 70KDa. Para la fracción de PBSG no se observa ninguna banda.

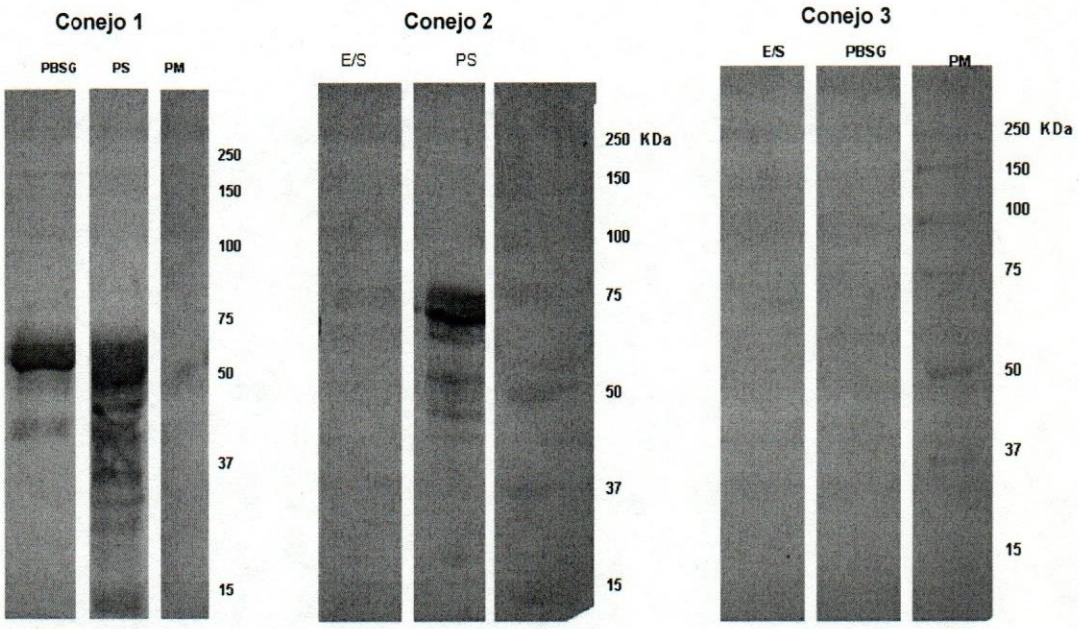


Figura 9. Sistema heterólogo. Electrotransferencias de tres fracciones (PBSG, E/S, proteínas solubles) del aislado El Frío.

B) Patrones antigénicos de las fracciones proteicas con sueros de infecciones naturales y experimentales.

Por último, en la figura 10, se compararon los patrones antigénicos de excreción/secreción del aislado El Frío, con sueros de campo de animales infectados con *T. evansi.*

Las muestras de ovino provienen de infecciones experimentales con *T. evansi*, las de bovino de sueros de campo positivos de *T. vivax* por ELISA, las de equino pertenecen a sueros de campo positivos de *T. evansi* determinados por ELISA y por último, las de conejo provienen de una infección experimental con proteínas de excreción/secreción de *T. evansi.* Para el suero de ovino positivo, se encontraron 3 bandas cuyos pesos son aproximadamente 44, 65 y 70 KDa respectivamente. Para el suero de bovino positivo, no se evidenciaron bandas. Para el suero de equino positivo, se observan 3 bandas cuyos pesos son aproximadamente 44, 65 y 70 KDa respectivamente.

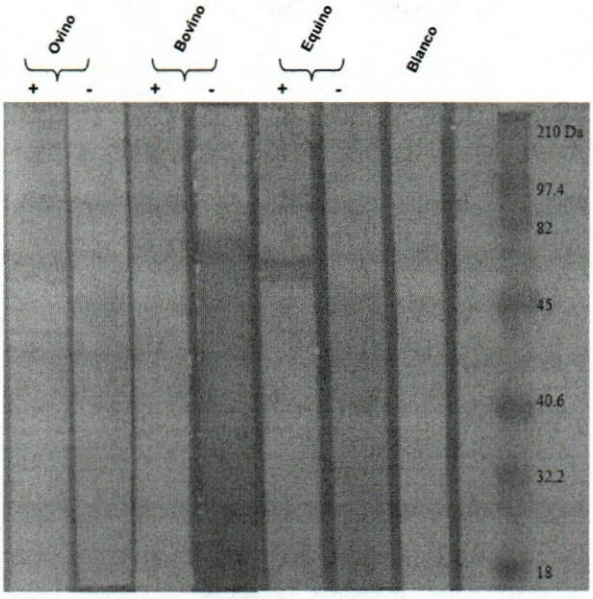


Figura 10: Comparación de patrones antigénicos de excreción/secreción obtenidos experimentalmente con sueros de campo del aislado El Frío.

Para las bandas 1,5 y 7, correspondientes a ovino, conejo y equino, respectivamente (fig 10) se observó la presencia de una banda de peso molecular entre 60 y 70KDa aproximadamente, lo cual indica la presencia de proteínas de excreción/secreción. Por otro lado, para los sueros negativos (bandas 2, 4, 6 y 8) no se evidencian bandas de proteínas, asimismo para el suero positivo de bovino (banda 3).

CAPITULO V

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Debido a la importancia económica que tiene la tripanosomosis en la productividad del ganado, el estudio del diagnóstico de esta patología presenta gran importancia, pues permite conocer la epidemiología de la misma; por lo que el objetivo de este estudio fue evaluar la presencia de posibles moléculas secretadas o excretadas por *T. evansi* que posean características antigénicas y que potencialmente puedan ser utilizadas para ensayos de diagnóstico mediante la comparación de estos patrones antigénicos.

En las infecciones experimentales se encontró que el valor máximo de parasitemia lo obtuvo el aislado Teva (proveniente de caballo), seguido por El Frío (proveniente de chigüire) con una parasitemia media y TeGub-323 (proveniente de asno) obtuvo el menor valor de parasitemia. Es importante destacar que aunque en esta investigación se trabajó con clones de poblaciones homogéneas del parásito, los patrones de virulencia y patogenicidad no varían con respecto a los observados en poblaciones heterogéneas de parásitos provenientes de aislados directos. En los estudios de Holzmuller *et al.* (2008) se observaron los mismos patrones de virulencia y patogenicidad en infecciones experimentales en ratas naturalmente inmunosuprimidas e inoculadas con poblaciones heterogéneas de parásito; en estos ensayos los autores obtuvieron valores de parasitemia similares para los tres aislados, encontrando también una relación entre estos valores y la virulencia y patogenicidad de cada uno de ellos, siendo así Teva el más virulento, el Frío, medianamente virulento y TeGub-323 el menos virulento. Los resultados

obtenidos en este estudio concuerdan también con los reportados por Perrone (2003), usando ratones susceptibles al parásito como modelo experimental, y encontrando que Teva es el aislado más virulento por presentar una parasitemia rápida y fulminante, y TeGub-323 el menos virulento debido a que su parasitemia es de tipo ondulante y críptica en algunos casos.

Según Turner *et al.* (1995), las altas parasitemias son características de aislados virulentos de tripanosomas africanos en roedores; en sus estudios, obtuvo valores de parasitemia, en ratones infectados experimentalmente con *T. brucei*, muy similares a los encontrados en este trabajo de investigación.

Al evaluar los porcentajes de viabilidad post-purificación para PBSG y proteínas de excreción/secreción. En los tres aislados, el mayor porcentaje de viabilidad se obtuvo para la fracción de E/S. Del mismo modo, Hollzmuller *et. al.* (2008) encontró que la viabilidad para *T. congolense* y *T. evansi* es mayor al 97% después de dos horas en el medio de secreción y Grébaut *et. al.* (2009), obtuvo para *T. congolense* una viabilidad de 98% en el mismo medio. Dado que en este trabajo se ha seguido rigurosamente el protocolo descrito por estos autores, se esperaba obtener un alto porcentaje de viabilidad de los parásitos, lo cual asegura que el contenido proteico presente en la fracción excreción/secreción sea en realidad producto de una secreción activa y no proveniente de productos de lisis celular:

Por otro lado, dado que la viabilidad de los parásitos incubados en PBSG fue menor, estos resultados comprueban que el medio de excreción/secreción es el más apto para mantener los parásitos activamente durante más tiempo, y para poder obtener proteínas secretadas que pudieran estar involucradas en la interacción con las células del hospedador durante la infección.

Para los objetivos de este trabajo, es de vital importancia que el porcentaje de sobrevivencia de los parásitos sea alto, ya que como se mencionó anteriormente, se buscan proteínas secretadas de forma activa por parásitos vivos, las cuales podrían mostrar propiedades inmunogénicas. Si esto ocurriese in vivo podría hipotéticamente generar una respuesta humoral en el hospedador durante la infección y permitir controlar la infección y los niveles de parasitemia.

Al hacer la comparación de la concentración de las proteínas de las fracciones de excreción/secreción, proteína soluble y PBSG de los tres aislados se encontró que en la fracción de proteínas solubles, el aislado Teva obtuvo una mayor concentración. Por otro lado el aislado Tgub-323 obtuvo los mayores valores de concentración en las fracciones de E/S y de PBSG. Finalmente para El Frío se encontraron concentraciones intermedias en las tres fracciones proteicas estudiadas.

En el gel de acrilamida (fig. 1) se muestra el patrón proteico teñido con azul de Coomassie de las tres fracciones antigénicas electrotransferidas en SDS page, donde se observa una banda de peso molecular aproximado de 50KDa. Grébaut *et al.* (2009) en sus estudios obtuvieron varias proteínas de peso molecular similar a 50KDa. Entre ellas, las llamadas tubulina de cadena β y tubulina de cadena α; la proteína precursora de calreticulina; La sub unidad B de la ATP sintetasa vacuolar. Todas estas proteínas son secretadas por *T. congolense* y su función de ha relacionado con una elevada virulencia y patogenicidad del parásito. Asimismo, algunos de estos péptidos están dedicados a interactuar con el sistema inmune del hospedador, como es el caso de la tubulina de cadena α. Además, según Uzcanga *et al.* (2000), las VSG tienen un peso molecular que oscila entre 55 y 65KDa. Estas proteínas cubren la superficie del parásito y su especificidad antigénica cambia continuamente, este proceso permite el desarrollo de infecciones

sostenidas previniendo la rápida muerte del huésped (Pays, 2006). No se puede asegurar que las proteínas encontradas en este estudio correspondan a las obtenidas en las investigaciones de Grébaut *et al.* (2009), Uzcanga *et al.* (2000) y Pays (2006), sin embargo al tener similitud en su peso molecular se sugiere que podrían existir similitudes en cuanto a sus funciones y su participación en el proceso de infección y virulencia.

Silverman *et al.* (2008), realizó estudios con *Leishmania* donde encontró que este parásito puede secretar factores de virulencia al medio extracelular, incluyendo el compartimiento citosólico de células del huésped. También al examinar la composición del secretoma de *Leishmania* se espera identificar proteínas que podrían estar involucradas en la virulencia. En este estudio se consideraron 151 proteínas pertenecientes al secretoma de *Leishmania*.

El propósito de caracterizar el secretoma de tripanosomas africanos como *T. congolense* es identificar factores patogénicos que puedan ser usados como candidatos en alguna estrategia para prevenir la infección, posiblemente mediante el uso de drogas para diagnóstico y elaboración de vacunas. Entre las proteínas secretadas que fueron identificadas en esta especie de tripanosomas se encuentran algunas que ya han sido descritas como candidatas importantes para diagnóstico de enfermedades causadas por microorganismos similares a tripanosomas. Entre ellas se pueden mencionar la glicoproteína variante de superficie, la cistein proteasa, la calreticulina, la subunidad A de la ATP sintetasa catalítica vacuolar y la fosfoglicerato quinasa citosólica, entre otras (Grebaut *et. al.* 2009).

Dado que los objetivos de este trabajo son limitados, no se logró hacer una identificación exhaustiva de las proteínas presentes en la fracción de excreción/secreción, sin embargo se considera este paso de gran importancia ya que permitiría determinar con exactitud si están

presentes proteínas que hayan sido descritas previamente en tripanosomas como potenciales blancos para diagnóstico, tratamientos, etc.

Por otro lado, una vez realizadas la inmunización de conejos con las fracciones proteicas y obtenidos los respectivos sueros pudo hacerse la evaluación de las propiedades inmunogénicas y antigénicas de las fracciones proteicas.

Dado que todos los sueros de los conejos posteriores a la inmunización mostraron reconocimiento de proteínas inmovilizadas en las membranas, se considera que las proteínas de excreción/secreción son capaces de generar una respuesta inmune del tipo humoral y por ende, anticuerpos específicos contra este grupo de proteínas, por lo tanto puede decirse que son inmunogénicas.

Extrapolando a lo sucede durante una infección natural, estos resultados sugieren que los factores secretados por estos tripanosomas pudieran ser en parte responsables de una respuesta inmune por el hospedador que controle los niveles de parasitemia, sin eliminar totalmente la población de parásitos. Esto podría representar una estrategia del parásito para mantenerse en el hospedador por más tiempo, replicarse y probablemente transmitirse a nuevos hospedadores. Por otro lado, podría existir diferencias entre los factores excretados, tanto en niveles de expresión o tipos de factores presentes, que estén relacionados con la virulencia de cada aislado.

Ahora bien, para comparar si existe un reconocimiento cruzado de los sueros hacia proteínas inmovilizadas entre las fracciones proteicas, se realizó la inmunotinción como sistema heterólogo.

Para la membrana de excreción/secreción (conejo 1) se observa una reacción cruzada entre las proteínas de E/S con las que fue inmunizado el conejo y los anticuerpos de los sueros de Proteínas solubles y PBSG. Es decir que las proteínas de E/S son reconocidas por los anticuerpos de los sueros de PBSG y proteínas solubles, ya que entre esas proteínas presentes en la membrana y las proteínas del suero, existen similitudes. Una reacción cruzada, puede generar resultados positivos para un antígeno específico sin que este necesariamente se encuentre en la muestra, esto se debe a que existen semejanzas en los antígenos que producen una respuesta inmunitaria por parte de los anticuerpos. Este resultado se conoce como falso positivo.

Una vez determinado que la fracción de excreción/secreción es antigénica al menos al ser reconocida por sueros de conejos inmunizados, se procedió a evaluar este reconocimiento con sueros de animales hospedadores del parásitos, infectados de forma natural (Caballos), infectados experimentalmente (ovinos) e infectados naturalmente con *T. vivax* (Bovinos).

De este ensayo se encontró que para ovino y equino (natural), hubo reconocimiento de las proteínas de excreción/secreción, lo cual evidencia que los sueros contienen los anticuerpos para detectar dichas proteínas.

En estudios de Uzcanga *et al.* (2002) se encontró un polipéptido de 64KDa, reconocido por equinos de infección experimental. Este polipéptido fue identificado como proteína variante de superficie (VSG) y está asociado a la evasión del parásito del sistema inmune del hospedador. Esta proteína exhibe una reacción cruzada con *T. vivax*, lo cual limita la posibilidad de utilizar este polipéptido como herramienta para el diagnóstico específico por infección de *T. evansi.*

patogenicidad del parásito; Así como las VSG, que se encargan del mecanismo de evasión del parásito hacia el sistema inmune del hospedador. No se puede asegurar que las proteínas obtenidas en esta investigación sean las anteriormente mencionadas, sin embargo se sugiere que podrían existir similitudes en cuanto a sus funciones y su participación en el proceso de infección y virulencia. Para asegurar esto, sería necesario realizar estudios de electroforesis en 2D e identificación por espectrometría de masas, a fin de determinar la identidad de estas proteínas.

- Dado que los objetivos de este trabajo son limitados, no se logró hacer una identificación exhaustiva de las proteínas presentes en la fracción de excreción/secreción, sin embargo este estudio se continuó como objetivo de la tesis doctoral de la Lic. Nereida Parra en la Universidad Simón Bolívar, titulado, "Comparación e Identificación de Factores Secretados/excretados de Aislados Venezolanos de *T. evansi* que Presentan Diferentes Grados de Virulencia", lo que permitiría determinar con exactitud si están presentes proteínas que hayan sido descritas previamente en tripanosomas como potenciales blancos para diagnóstico, tratamientos y vacunas.

- Se considera que las proteínas de excreción/secreción son capaces de generar una respuesta inmune del tipo humoral por lo tanto puede decirse que son inmunogénicas.

- Finalmente se encontró para ovino y equino, un reconocimiento de las proteínas de excreción/secreción, lo cual evidencia que los sueros contienen los anticuerpos para detectar dichas proteínas. Por otro lado para *T. vivax* se presenta una reacción cruzada, lo que limita la posibilidad de utilizar estas proteínas como una herramienta de diagnóstico específico para *T. evansi.*

En el suero de ovino, se observa una banda poco nítida en comparación a las de equino y conejo, esto puede deberse a que es una infección experimental crónica donde los niveles de anticuerpos en el suero son bajos, quizás debido a que las parasitemias en estos animales es del tipo críptica.

En el caso de los sueros de bovino proveniente de infecciones de campo, no se observó reconocimiento de los antígenos de E/S. Esto podría interpretarse por un lado debido a que los bovinos en nuestra región geográfica son naturalmente infectados con *T.vivax*, agente causal de la tripanosomosis bovina, razón por la cual los bovinos podrían no presentar anticuerpos específicos hacia las proteínas secretadas por *T. evansi* aún cuando se ha descrito reacción cruzada de antígenos en el diagnóstico de estos dos parásitos en bovinos, esta reacción cruzada esta descrita para proteínas totales de los parásito, pero no para el secretoma o fracción secreción/excreción (Desquesnes, 2007). Por otro lado también podría hipotetizarse que en esta región geográfica a diferencia de lo que sucede en África, los bovinos no son susceptibles a la infección por *T. evansi*.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

- Al realizar este estudio se determinó la presencia de moléculas secretas o excretadas por *T. evansi* que poseen características antigénicas y que pueden ser potencialmente utilizadas para ensayos de diagnóstico mediante la comparación de patrones antigénicos.

- Al comparar la parasitemia de los clones de los tres aislados (El Frío, TeGub-323, Teva) de *Trypanosoma evansi*, se encontró que el aislado El Frío presentó una parasitemia intermedia lo cual está relacionado con la infectividad y virulencia del parásito, así como con las propiedades biológicas de cada aislado. Es importante destacar que estos patrones de virulencia e infectividad no varían al compararlos con poblaciones heterogéneas del parásito.

- Se encontró que en el medio de Excreción/Secreción los parásitos muestran un mayor porcentaje de viabilidad, ya que este medio busca simular las condiciones naturales que ocurren durante la infección, lo cual es de vital importancia para la obtención de proteínas secretadas de forma activa por parásitos vivos, las cuales podrían tener propiedades inmunogénicas.

- Al realizar la electroforesis de las tres fracciones antigénicas se obtuvieron polipéptidos con aparentes pesos moleculares similares a la tubulina de cadena β y tubulina de cadena α; la proteína precursora de calreticulina y la sub unidad B de la ATP sintetasa vacuolar, todas ellas relacionadas con una elevada virulencia y

- En el caso de los sueros de bovino, no se observó reconocimiento de los antígenos de E/S. Esto podría interpretarse por un lado debido a que los bovinos en nuestra región geográfica son naturalmente infectados con *T.vivax*, por la cual los bovinos podrían no presentar anticuerpos específicos hacia las proteínas secretadas por *T. evansi*. Aún cuando se ha descrito reacción cruzada de antígenos en el diagnóstico de estos dos parásitos en bovinos, esta reacción cruzada esta descrita para proteínas totales de los parásito, pero no para el secretoma o fracción secreción/excreción.

- Finalmente, se considera que los resultados de este trabajo representan una importante contribución a los estudios de la biología de *T. evansi*, particularmente de aislados venezolanos, a los cuales se les ha venido realizando haciendo un seguimiento desde hace algunos años, en la búsqueda de métodos de diagnóstico certeros y métodos de control efectivos para los rebaños.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aquino, L., Machado, R., Alessi, A., Marques, L., Castro, M., Malheiros, E. (1.999). "Clinical, Parasitological and Inmunological Aspects of Experimental infections with Trypanosoma evansi in Dogs" *Mem. Inst.* Oswaldo Cruz, 94: 255-260.

Arcay, L., Díaz Milá de la Roca, C., Ojasti, J. (1980) Comportamiento de una cepa de Trypanosoma venezuelense (T. evansi) Aislada de Hydrochoerus hydrochaeris ("Chigüire" o "Capybara") en Animales de Laboratorio. *Acta Biológica Venezuelica.* 10 (4) 391-418

Arias, J., García, F., Rivera, M., López, R., (1.997). "Trypanosoma evansi in capybara from Venezuela". J. Wildl. Dis. 33: 359-361.

Bakhiet, M., Olsson, T., Edlund, C., Höjeberg, B., Holmberg, K., Lorentzen, J. and Kristensson, K. (1993). A Trypanosoma brucei brucei-derived factor that triggers CD8+ lymphocytes to interferon-gamma secretion: purification, characterization and protective effects in vivo by treatment with a monoclonal antibody against the factor. *Scand J Immunol.* 2:165-78.

Barry, J., and Turner, C., (1991). The dynamics of antigenic variation and growth of African trypanosomes. *Parasitol Today.*7(8):207-11.

Basalo, A., Parra, O., Arraga, C., León, E., Guillén, A., (1995). Establecimiento de la técnica serológica de inmunofluorescencia indirecta (I.F.I.) como método de diagnóstico de la babesiosis bovina en el laboratorio de diagnóstico de la policlínica veterinaria de L.U.Z. *Revista científica.* 5(2).

Brener, Z. (1969) The behavior of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the blood-stream of normal and immune mice. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 63:215-20.

Boada-Sucre, A., Rossi. M., De Stefano, H. *et al.* (2004). Alteraciones en el patrón de enlazamiento de lectinas en el riñón de ratones infectados experimentalmente con una cepa venezolana de *Trypanosoma evansi.* [Publicación en línea]. Consultado el 5 de abril de 2008 de la World Wide Web: http://www.serbi.luz.edu.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592004010000008&lng=pt&nrm=iso

Bonhivers, M., Nowacki, S., Landrein, N., Robinson, D. (2008). Biogenesis of the Trypanosome Endo-Exocitotic Organelle is Cistoskeleton Mediated. *Plos biology.* 6(5): 1033-1046.

Brun, R., Hecker, H., Lun Z. (1998). *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum:* distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship. *Veterinary Parasitology.* 79: 95-107.

Chavez E., Gonzalez R., Perrone T. *et al.* (2007). Trypanosoma vivax: Biometría y eritrometría en infecciones experimentales. *Rev. Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel.* 38(2). 131-145.

Corrales, R., Sereno, D., Mathieu-Daudé, F. (2009). Deciphering the Leishmania Exoproteome: what we know and what we can learn. *Fems Inmunology & Medical Microbiology.* 58: 27-38.

Desquesnes, M., Davila. (2002) Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: a review and perspectivas. *Veterinary Parasitology.* 109(3-4): 213-231

Desquesnes, M., Bosseno, M. y Frederic, S. (2007). Detection of Chagas Infection using *Trypanoma evansi* crude antigen demonstrates high cross-reaction with *Trypanosoma cruzi. Science Direct.* 7: 457-462.

Del Valle M. et al. (1985) Identificación Rápida del Agente Etiológico Mediante Prueba de Aglutinación de Latex en Meningitis Bacteriana Aguda. *Rev. chil. pediatr.* 56: 159-161

Duleu, S., Vincendeau, P., Courtois, P., Semballa, S., Lagroye, I., Daulouède, S., Boucher, J.L., Wilson, K.T., Veyret, B. and Gobert, A.P. (2004). Mouse strain susceptibility to trypanosome infection: an arginase-dependent effect. *J Immunol.* 15;172(10):6298-303.

Garcia, F., Rivera, M., Ortega, M., Suárez, C. (2001). Tripanosomiasis Equina Causada por *Trypanosoma evansi* en Tres Hatos Ganaderos del Estado Apure, Venezuela. *Rev. Facultad de Ciencias Veterinarias. UCV.* 41(4). 91- 100

Gobert, A.P., Daulouede, S., Lepoivre, M., Boucher, J.L., Bouteille, B., Buguet, A., Cespuglio, R., Veyret, B. and Vincendeau P. (2000). L-Arginine availability modulates local nitric oxide production and parasite killing in experimental trypanosomiasis. *Infect Immun.* 68(8):4653-4657.

Grébaut, P., Chuchana, P., Brizard, J.P., Demettre, E., Seveno, M., Bossard, G., Jouin, P., Vincendeau, P., Bengaly, Z., Boulangé, A., Cuny, G. and Holzmuller, P. (2009). Identification of total and differentially expressed excreted–secreted proteins from *Trypanosoma congolense* strains exhibiting different virulence and pathogenicity. *International Journal for Parasitology.* Article in Press.

Herrera, H., Alessi, A., Marques L., Santana A., Aquino L., Menezes R., Moraes M., Machado R., (2002). Experimental *Trypanosoma evansi* infection in South American Coati *(Nasua nasua)*: Haematological, biochemical and histopathological changes. *Acta Trop.* 81: 203-210.

Hoare, C. (1972). *The trypanosomes of mammals.* A Zoological Monograph. Blackwell Scientific Publication. Oxford and Edinburgh

Holzmuller, P. (2008). Secretome of animal Trypanosomes. *Animal Biodiversity and emerging diseases.* 1149: 337-342.

Laemmli, U.K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature.* 259: 680-685.

Lanham, S. y Godfrey D. (1970) Isolation of salivarian tripanosomes from man and other animals using DEAE-cellulose. *Experimental parasitology.* 28. 521-534.

Luckins, A. (1998) Epidemiology of Surra: Unanswered Questions. *J. Protozool Res.* 8. 106-119.

Mathews, C., Van Holde, K., Aherrn, K. (2004). *Bioquímica.* 3º Edición. Editorial Pearson: Madrid.

Onah, D.N., Hopkins, J. and Luckins, A.G. (1998). "Proliferative responses of peripheral blood leucocytes of sheep infected with *Trypanosoma evansi*". *Scand. J. Immunol.* 48: 170-176.

Pays, E. (2006). The variant surface glycoprotein as a tool for adaptation in African trypanosomes. Review. *Microbes and Infection.* 8: 930-937.

Perrone, T., Garrizzo, J., Roschman, A., Tejero, F., Escalante A. y Aso, P. (2006). Susceptibility of different mouse strains to experimental infection with a Venezuelan isolates of *Trypanosoma evansi. Journal of Protozoology Res.* 16, 1-8.

Perrone, T., Fernández, D., Gonzáles, B., Eleizalde, M., González, E. y Mendoza, M. (2009). *Tripanosoma evansi* a comparison of PCR and parasitologycal diagnostic test in experimentally infected mice. *Experimental parasitology.* 121. 1-7.

Queiroz, A., Cabello, P., Jansen, A. (2000) Biological and Biochemical Characterization of Isolates of *Trypanosoma evansi* from Pantanal of Matogrosso- Brazil. *Veterinary Parasitology.* 92. 107-118.

Silverman, J.M., Chan, S.K., Robinson, D.P., Dwyer, D.M., Nandan, D., Foster, L,J. and Reiner NE. (2008). Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani. Genome Biol.* 2: 35.

Taylor, K., Mertens, B. (1999) Inmune Response of Cattle with African Trypanosomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 94(2). 239-244.

Trajano, V., Oliveira, A., Muniz, M., Pereira, M., Jansen, A. (2004). *Trypanosoma evansi* in inbred and Swiss-Webster mice: distinct aspects of pathogenesis. *Parasitol Res.* 94. 193-200.

Turner, C.M.R., Aslam, N. and Dye, C. (1995). Replication, diferentiation, growth and virulence of *Trypanosoma brucei* infections. *Parasitology.* 111: 289-300.

Turner, M. (1999). Antigenic variation in *Trypanosoma brucei* infections: An holistic view. *Journal of the cell Science.* 112. 3187-3192.

Uche, U., Jones, T., Boid, R. (1992). Antibody Patterns in Rabbits Showing Different Levels of Susceptibility to an Experimental *Trypanosoma evansi* Infection. *Acta Tropica.* 52, 139-147.

UPEL, (2006). *Manual de Trabajos de Grado, Especialización y Maestría y Tesis Doctorales.* Fondo Editorial UPEL.

Uzcanga, G., Mendoza, M., Aso, P.M. and Bubis, J. (2002). Purification of a 64kDa antigen from *Trypanosoma evansi* that exhibits cross-reactivity with *Trypanosoma vivax*. *Parasitology*. 124:287-299.

Uzcanga G.L., Perrone, T., Noda, J.A., Pérez-Pazos, J., Medina, R., Hoebeke, J. and Bubis, J. (2004). Variant Surface Glycoprotein from *Trypanosoma evansi* is Partially Responsible form the Cross-Reaction between *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma vivax*. *Biochemistry.* 43:595-606.

Vargas, D., Bonet, R., Oliva, P. y Campano, S. (2004). Implementación de la técnica de PCR en la identificación de Babesia ssp en equinos. *Parasitol. latinoam.*.59(3-4) 179-182.

Vincendeau, P., Gobert, A.P., Daulouède, S., Moynet, D. y Mossalayi, M.D. (2003). Arginases in parasitic diseases.*Trends Parasitol.* **1**:9-12.